

# 马齿苋组织培养的优化

刘红梅,蒋继志,官卫波,李 丽,廖祥儒

(河北大学 生命科学学院,河北 保定 071002)

**摘要:**用野生马齿苋的种子得到无菌苗。以无菌苗的下胚轴和子叶为外植体,在 18 个不同浓度 6-BA,2,4-D,NAA 和 KT 组合的 MS 培养基上进行愈伤组织诱导、不定芽分化和增殖及生根的培养。得到诱导马齿苋愈伤组织的最佳条件是:初代培养基:MS + 3% 蔗糖 + 6-BA 1 mg/L + 2,4-D 1 mg/L;丛生芽增殖培养基:MS + 3% 蔗糖 + KT 3 mg/L + NAA 0.5 mg/L;生根培养基:MS + 3% 蔗糖。

**关键词:**马齿苋;组织培养;植株再生

**中图分类号:**S68 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2006)增刊-0063-04

## Improvement of Tissue Culture of *Portulaca oleracea* L.

LIU Hong-mei, JIANG Ji-zhi, GONG Wei-bo, LI Li, LIAO Xiang-ru

(College of Life Sciences, Hebei University, Baoding 071002, China)

**Abstract:** Asepsis plantlets were obtained from seeds of wildness *Portulaca oleracea* L.. Cotyledon and hypocotyledonary axis were used as explants to induce calli and differentiate shoots and roots in the MS medium containing 18 different concentrations of 6-BA, 2,4-D, NAA, and KT. From data obtained the best inducement condition of *Portulaca oleracea* L. calli tissue: prime medium: MS + 3% sucrose + 6-BA 1 mg/L + 2,4-D 1 mg/L; shoots proliferation medium: MS + 3% sucrose + KT 3 mg/L + NAA 0.5 mg/L; crude root substrate: MS + 3% sucrose.

**Key words:** *Portulaca oleracea* L.; Tissue Culture; Plant Regeneration

马齿苋(*Portulaca oleracea* L),又名长命草、五行草<sup>[1]</sup>,属马齿苋科马齿苋属,原产温带及热带地区,为一年生肉质草本植物。马齿苋全草含有大量去甲肾上腺素(Noradrenaline, 0.15%)<sup>[2]</sup>;丰富的 $\alpha$ 2亚麻酸( $\alpha$ -linolenic acid)等多不饱和脂肪酸,素有“天然抗生素”之称<sup>[2-5]</sup>。马齿苋含有丰富的营养物质与大量的药用成分,食药兼用,生熟食用均可,在治疗手足癣、湿疹、高血压、动脉硬化、糖尿病、心血管病等多种疾病中疗效显著<sup>[6-8]</sup>。另外美国科学家研究发现,它富含的 $\omega$ -3脂肪酸是对人体极为重要的营养成分,它是构成细胞膜,尤其是脑细胞和眼细胞的重要组成成分,有助于人体抗衰老,这一发现使其食用价值和药用价值倍增。我国陕西师范大学的多名研究人员于2002年在我国最早对马齿苋组织培养与植株再生进行了大胆的试验,取得了较好的成

果<sup>[9]</sup>。本研究通过对马齿苋组织培养的部分条件进行了优化,为进一步利用马齿苋进行转基因研究与植株再生以及规模化生产医药蛋白奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

马齿苋种子采集于保定市郊外。以MS<sup>[10]</sup>为基本培养基加适当浓度的不同激素,蔗糖3%,琼脂1%,pH 5.8。(灭菌条件:蒸汽高温灭菌,压力1.05 kg/cm<sup>2</sup>,温度121.3℃,时间25 min。)

### 1.2 试验方法

1.2.1 无菌苗的培养 马齿苋种子用75%乙醇灭菌60 s,经无菌水洗净,再用0.1% HgCl<sub>2</sub>消毒8 min,无菌水冲洗4次后,接种于加MS液体培养基的滤纸上。培养温度25℃,每天光照14 h,光照强度

收稿日期:2006-08-12

基金项目:河北省自然科学基金项目(300081);河北省重点学科生物工程

作者简介:刘红梅(1978-),女,河北保定人,在读博士,主要从事生物化学与分子生物学方面的研究;蒋继志为通讯作者。

40  $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 。

1.2.2 愈伤组织的诱导 以萌发 10 d 种子的下胚轴、子叶为外植体,在附加不同配比的激素(6-BA, KT, 2,4-D, NAA, 琼脂 1%, pH 5.8, 表 1)的培养基上诱导愈伤组织,培养条件为 25  $^{\circ}\text{C}$ ,每日光照 14 h,光照强度 40  $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 。

表 1 诱导愈伤组织的激素配比

Tab.1 Different combinations of hormones for callus induction

激素组合 Combinations of hormones	浓度范围(以左侧顺序为准)(mg/L) Range of density(the left as standard)
6-BA + 2,4-D	(0~2) + (0~2)
6-BA + NAA	(0~4) + (0~0.5)
KT + NAA	(0~3) + (0~0.5)

1.2.3 再生植株的获得 取长势优良的马齿苋愈伤组织接种于分化培养基上(6-BA + NAA 与 KT + NAA, 表 2)以诱导不定芽的产生。暗培养 4 d 后转至恒温光培养间,温度 25  $^{\circ}\text{C}$ ,每日光照 14 h,光照强度 40  $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 。15 d 后观察结果。在不定芽长至 1~2 cm 时,转入到生根培养基(MS + 3% 蔗糖),诱导其生根,条件如前。

表 2 不定芽诱导时的不同激素配比

Tab.2 Different combinations of hormones for

multi-plication bud induction mg/L

梯度 Gradients	组合 1 Combination 1		组合 2 Combination 2	
	6-BA	NAA	KT	NAA
A	1	0.2	0.5	0.2
B	2	0.3	1	0.3
C	3	0.4	2	0.4
D	4	0.5	3	0.5

## 2 结果与分析

### 2.1 不同外植体对愈伤组织形成的影响

试验表明,在相同培养条件下(MS + 3% 蔗糖 + 6-BA 0.5 mg/L + 2,4-D 0.5 mg/L),下胚轴与子叶相比,产生愈伤组织时间短,生长速度快,但二者的愈伤组织诱导率相近(表 3;图 1,2)。

培养 8 d 后,下胚轴两端逐渐膨大并产生浅黄色愈伤组织;继续培养 7~14 d 后,生长速度明显加快,形成结构疏松,颗粒状的浅黄色愈伤组织。子叶在培养中先略有膨大,约 10 d 后,在边缘切口处产生许多小突起,继而在子叶表面形成结构疏松,颗粒状的浅黄色愈伤组织。胚根中未有愈伤组织形成。因此,马齿苋愈伤组织的诱导,以子叶,胚轴作为外植体能取得较好的效果。

表 3 不同外植体在 MS + 6-BA 0.5 mg/L + 2,4-D 0.5 mg/L 培养基上的培养效果

Tab.3 Culture effect of different explants on MS + 6-BA 0.5 mg/L + 2,4-D 0.5 mg/L

外植体种类 Species of explants	子叶 Cotyledon	胚轴 Hypocotyl	胚根 Radicle
接种数 No. of inoculation	217	101	100
形成愈伤组织数 No. of callus	209	98	0
诱导率(%) Rate of induction	96.31	97.03	0
愈伤组织形成时间(d) Time of callus formation	10	8	-
愈伤组织生长速度 Speed of callus growing	较快	快	-



图 1 下胚轴的诱导结果

Fig.1 Culture effect of hypocotyls



图 2 子叶的诱导结果

Fig.2 Culture effect of cotyledon

### 2.2 不同激素搭配对愈伤组织的诱导作用

在 MS + 3% 蔗糖培养基中分别附加适当浓度的 6-BA + NAA, 6-BA + 2,4-D, KT + NAA, 对愈伤组织进行诱导,结果如表 4。

由表可见,6-BA 在诱导马齿苋愈伤组织形成的过程中起着关键作用,KT 效果不好。而与 6-BA 搭配的生长素中,2,4-D 加 6-BA 效果最好,而 NAA 次之。总之,激素搭配从优到劣依次为 6-BA + 2,4-D > 6-BA + NAA > KT + NAA(图 3)。

### 2.3 不同激素浓度对愈伤组织形成的影响

将不同浓度的 6-BA 与 2,4-D 附加在含 3% 蔗糖的 MS 培养基中,观察其对外植体诱导成愈伤组织的作用,结果如表 5。

表 4 不同激素搭配对愈伤组织的诱导作用

Tab.4 Effect of different combinations of hormones on callus induction

激素搭配 Arrangement of hormones	浓度配比按左边 激素顺序(mg/L) Concentrations of hormone by the order of left row(mg/L)		接种外植体数 No. of inoculation explants		形成愈伤 组织块数 No. of callus blocks		诱导率(%) Rate of induction	
			子叶 Cotyledon	胚轴 Hypocotyl	子叶 Cotyledon	胚轴 Hypocotyl	子叶 Cotyledon	胚轴 Hypocotyl
			6-BA + 2,4-D	0.5	0.5	60	30	57
6-BA + NAA	1.0	0.5	60	30	56	27	93.3	90.0
	2	0.3	60	30	23	8	38.8	27.7
KT + NAA	4	0.5	60	30	32	14	53.3	47.7
	0.5	0.2	60	30	26	9	43.3	30.0
	1	0.4	60	30	31	13	50.2	43.3

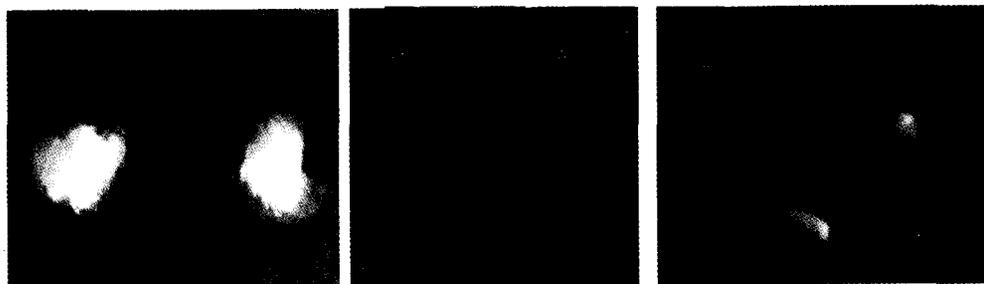


图 3 子叶的愈伤组织 (6-BA + 2,4-D;6-BA + NAA;KT + NAA)

Fig.3 Callus of hypocotyls(6-BA + 2,4-D;6-BA + NAA;KT + NAA)

表 5 不同激素浓度对愈伤组织形成的影响

Tab.5 Effect of different combinations of  
6-BA + 2,4-D on callus formation

2,4-D (mg/L)	6-BA (mg/L)	接种外 植体数		形成愈伤 组织块数		诱导率(%) Rate of induction	
		子叶 Cotyledon	胚轴 Hypocotyl	子叶 Cotyledon	胚轴 Hypocotyl	子叶 Cotyledon	胚轴 Hypocotyl
		No. of inoculation explants	No. of callus blocks	Rate of induction			
0	0	60	30	0	0	0	0
0	0.5	60	30	57	29	85.0	90.0
0.5	0	60	30	30	15	50.0	50.0
0.5	0.5	60	30	57	29	95.0	96.7
0.5	1	60	30	56	27	93.3	90.0
0.5	2	60	30	35	16	50.8	53.3
1	0.5	60	30	39	21	65.0	70.0
1	1	60	30	60	30	100	100
2	2	60	30	36	19	60.0	63.3

单独加 6-BA 或 2,4-D 时,均可诱导出愈伤组织,但诱导率较低;而不使用任何激素时则无法诱导。当 6-BA 与 2,4-D 搭配使用时,能诱导出大量愈伤组织,当配比为 6-BA 1 mg/L + 2,4-D 1 mg/L 时(图 4),诱导率可达 100%;同时,愈伤组织生长状态良好,经继代培养一次,可由疏松浅黄的愈伤组织转变为翠绿致密的愈伤组织。

由试验可知,高浓度的 6-BA 与 2,4-D 对愈伤组织的形成有抑制作用,而马齿苋的下胚轴与子叶外植体对激素的敏感程度无明显差别。

2.4 不定芽的研究

将不同外植体诱导出的浅黄色疏松的愈伤组织继代于分化培养基上(不同浓度组合的 6-BA + NAA 或 KT + NAA + 3%蔗糖 + MS)诱导不定芽,结果如表 6 所示。

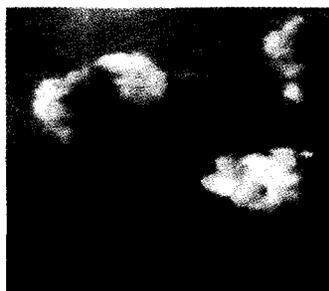


图 4 6-BA 1 mg/L 配合 2,4-D 1 mg/L 对子叶的诱导结果

Fig.4 Result of hypocotyls induced by MS medium with 6-BA 1 mg/L and 2,4-D 1 mg/L

马齿苋黄色、疏松、易碎的愈伤组织,经过 2~3 次继代培养之后,颜色开始转绿并且结构变的致密坚硬,在表面形成较大的凸起,再经过一段时间的培养会萌生出少量的不定芽。幼芽整株呈现暗红色,几天后幼芽长大,伸长,幼叶呈现绿色,进而整株转为绿色,仅边缘仍略呈暗红色,这时与野生植株的形态,色泽相近。结果表明在 MS + 3%蔗糖的培养基上,高浓度的 6-BA 或 KT 对不定芽的诱导有一定的促进作用,尤其 KT 与 NAA 混合使用时,愈伤组织再分化的速度更快(图 5,6)。

表6 不同激素组合对不定芽诱导的影响

Tab.6 Effect of different combinations of hormones on multiplication bud induction

6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)	接种愈伤 组织块数 No. of inoculation callus blocks	产生 芽数 No. of buds	平均增值 率(%) Average rate of accretion	6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)	接种愈伤 组织块数 No. of inoculation callus blocks	产生 芽数 No. of buds	平均增值 率(%) Average rate of accretion
1	0.2	30	117	3.9	0.5	0.2	30	131	4.4
2	0.3	30	123	4.1	1	0.3	30	203	6.8
3	0.4	30	172	5.4	2	0.4	30	294	9.8
4	0.5	30	336	11.2	3	0.5	30	401	13.4



图5 子叶愈伤组织形成的不定芽

Fig.5 Multiplication bud regenerated from conformation of hypocotyl



图6 下胚轴愈伤组织形成的不定芽

Fig.6 Multiplication bud regenerated from conformation of cotyledon

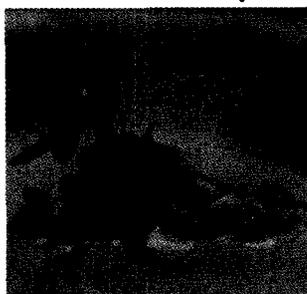


图7 不定根的生成

Fig.7 Multiplication root regenerated

### 2.5 不定根的研究

将高于 0.5 cm 的不定芽分割成单芽后接种于生根培养基上,经 14 d 培养,芽可长高到 1~2 cm,基部生出 6~8 条 1 cm 左右的不定根,随着时间的延长不定根的数量增加(图 7)。试验表明,当基本培养基中不附加任何激素时,有利于马齿苋不定根的诱导,其诱导率高达 95% 以上,采用常规炼苗法将其移植大田,成活率可达 100%。

### 3 结论

马齿苋的不同外植体在愈伤组织的诱导过程中,子叶与下胚轴的诱导率相近,但生长速度比下胚轴慢,胚根无法诱导出愈伤组织。

诱导马齿苋愈伤组织的最佳条件是:MS + 3% 蔗糖 + 6-BA 0.5 ~ 1.5 mg/L + 2,4-D 0.5 ~ 1 mg/L。激素搭配从优到劣依次为 6-BA + 2,4-D > 6-BA + IAA > 6-BA + NAA > KT + NAA。

在外植体脱分化过程中,生长素与细胞分裂素的适当配合有利于愈伤组织的生成,其中细胞分裂素尤其 6-BA 起决定作用。但是高浓度的激素水平对愈伤组织的形成有抑制作用。

高浓度的 6-BA 或 KT 对不定芽的诱导有一定的促进作用,尤其 KT 与 NAA 混合使用时愈伤组织再分化的速度更快。

### 参考文献:

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典(上册)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1975: 289.
- [2] 屠连珍. 马齿苋的药理研究[J]. 中成药, 2001, 23(7): 519.
- [3] 马慕英. 马齿苋抑菌作用的探讨[J]. 食品科学, 1992, 1: 36.
- [4] 李利峰. 马齿苋——野菜中的保健珍品[J]. 辽宁农业科学, 1997, 4: 56.
- [5] 刘玫琦, 王莹, 李世敬, 等. 马齿苋的开发与利用[J]. 中国林副特产, 1996, 5: 52.
- [6] 郑虎占, 董泽宏, 余靖. 中药现代研究与应用[M]. 北京: 学苑出版社, 1997: 753.
- [7] Mohamed A I, Hussein AS. Chemical Composition of Portulaca Oler2 acea[J]. Plant Foods Hum Nutr, 1994, 45(1): 1.
- [8] Simopoulos A P. Omega23 fatty acids wild plants, nuts and seeds[J]. Asia Pacific J Clin Nutriol, 2002, 11(Suppl 6): S1632S173.
- [9] 李焘, 王吉之. 马齿苋组织培养及植株再生系统的建立[J]. 陕西师范大学学报, 2003, 2(31): 95-98.
- [10] 中国科学院上海植物生理研究所. 上海市植物生理学会, 现代植物生理学实验指南[M]. 北京: 科学出版社.