

崖白菜的愈伤组织诱导及植株再生

杨精华¹, 刘曦¹, 张乐¹, 王玉兵¹, 杨敬元², 梁宏伟^{1*}

¹三峡大学生物技术研究中心, 湖北宜昌443002; ²神农架金丝猴保育生物学湖北省重点实验室, 湖北神农架442421

摘要: 通过愈伤组织诱导不定芽发生途径, 建立了崖白菜的组培再生体系, 研究了崖白菜幼嫩子房和不同植物生长调节剂对其愈伤组织诱导和不定芽发生的影响。结果表明, 以崖白菜的幼嫩子房作为外植体, 诱导子房分化形成愈伤组织的最适培养基为MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+2,4-D 0.2 mg·L⁻¹, 诱导率可达82.83%; 最适的不定芽分化培养基为MS+6-BA 0.5 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹; 诱导不定芽生根的最适培养基为1/2MS+NAA 0.1 mg·L⁻¹。

关键词: 崖白菜; 愈伤组织; 不定芽; 植株再生

Callus Induction and Plant Regeneration of *Rehmannia rupestris* Hemsl

YANG Jing-Hua¹, LIU Xi¹, ZHANG Le¹, WANG Yu-Bing¹, YANG Jing-Yuan², LIANG Hong-Wei^{1*}

¹Biotechnology Research Center, China Three Gorges University, Yichang, Hubei 443002, China; ²Hubei Provincial Key Laboratory of Conservation Biology of Golden Monkey in Shennongjia, Shennongjia, Hubei 442421, China

Abstract: Tissue culture regeneration system of *Rehmannia rupestris* was established by the way to induce adventitious shoots. Young ovary and different plant growth regulators were discussed for callus induction and adventitious buds differentiation. The results showed that young ovary of *Rehmannia rupestris* served as explants, the best medium for callus formation was MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+2,4-D 0.2 mg·L⁻¹, induction rate reached 82.83%; the optimum adventitious buds differentiation medium was MS+6-BA 0.5 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹; in addition, the medium of 1/2MS+NAA 0.1 mg·L⁻¹ had the best effect on root formation.

Key words: *Rehmannia rupestris*; callus; adventitious buds; plant regeneration

崖白菜为玄参科(Scrophulariaceae)崖白菜属多年生宿根草本植物, 根茎药用, 仅分布在湖北及四川东南部的局部地区, 生长于海拔290~1 200 m悬崖上(钟补求和杨汉碧1979)。由于该植物生境特殊, 分布存在地理局限性, 并受人活动的影响, 其野生资源已日趋减少, 已被列为国家II级重点保护植物(中华人民共和国国务院1999), 同时被《中国物种红色名录》(IUCN标准)定为易危种(汪松和解焱2004)。崖白菜叶片雪青色、肥大、肉质, 属于美丽的观叶植物, 同时也具有重要的药用价值。目前, 仅有崖白菜的器官形态、群落分布和遗传学等方面相关研究报道(李晓东和李建强2006; Jensen等2009; Xia等2009), 但对崖白菜的组织培养尚无报道。开展崖白菜无性繁殖技术研究, 提高其繁殖系数, 对崖白菜种质资源保存和栽培利用具有极其重要的意义。

材料与方法

1 植物材料

崖白菜(*Rehmannia rupestris* Hemsl)采自湖北

省兴山县。

2 灭菌处理

先用洗洁精水将幼花、茎叶清洗干净, 再用自来水流水冲洗2 h。灭菌方法有3种: (1)先用70%乙醇处理20 s, 0.1%升汞处理5 min, 无菌水清洗5次; (2)先用70%乙醇处理20 s, 0.1%升汞处理6 min, 无菌水清洗5次; (3)先用70%乙醇处理20 s, 4% NaClO处理10 min, 无菌水清洗5次。用镊子和剪刀将子房剥离出来, 用刀将子房切成2~4块, 将茎切成1 cm长茎段, 叶片切成1 cm×1 cm的块状叶片进行接种。

3 培养基

基本培养基为MS, 添加3% (W/V)蔗糖和0.8% (W/V)琼脂, pH 6.0。愈伤组织诱导培养基: MS+6-BA (0.5、1.0 mg·L⁻¹)+2,4-D (0.1、0.2 mg·L⁻¹), 不定

收稿 2012-03-05 修定 2012-04-29

资助 神农架金丝猴保育生物学湖北省重点实验室开发基金(2012AB002C)。

* 通讯作者(E-mail: lianghwcen@yahoo.com.cn; Tel: 0717-6397188)。

芽分化培养基: MS+6-BA (0.5、1.0、1.5、2.0 mg·L⁻¹)+NAA (0.05、0.1、0.2 mg·L⁻¹), 生根培养基: 1/2MS+NAA (0、0.1、0.2、0.4、0.6、1.0 mg·L⁻¹)。

4 培养条件

培养温度为(25±2) °C, 每天光照12 h, 光照强度为15 μmol·m⁻²·s⁻¹, 培养4~5周后观察并统计各培养基中不同外植体的诱导情况。

试验中每个组合重复3次, 采用SPSS软件对实验数据进行方差分析, 以邓肯法评价差异的显著性。

实验结果

1 不同外植体的灭菌效果

对不同的崖白菜外植体进行同种方法灭菌, 发现灭菌效果存在显著差异。结果(表1)表明, 崖白菜茎段对灭菌剂十分敏感, 在低浓度和较短时间灭菌情况下, 褐化率仍达到100%。叶片由于表面绒毛过密, 灭菌不彻底, 灭菌效果极差, 染菌率达95%以上。故本文仅以崖白菜幼嫩子房为外植体进行研究。

表1 三种不同外植体的灭菌效果

Table 1 The sterilizing effect of three different explants

外植体	接种数量	染菌数量	染菌率/%	褐化率/%
子房	90	55	61.1	42.0
叶片	90	86	95.5	73.3
茎段	90	21	23.3	100.0

2 不同灭菌方法的效果

采用3种不同的灭菌方法对崖白菜子房进行灭菌处理, 结果(表2)表明, 采用70%乙醇处理20 s+0.1%升汞处理6 min对崖白菜子房外植体进行灭菌的效果较好, 染菌率仅为6.7%, 存活率达73.3%。而另外两种方法灭菌效果差, 污染率高导致存活下来的外植体很少。

表2 三种不同灭菌方法的效果

Table 2 Effects of three different sterilization methods

灭菌方法	接种数量	染菌数量	染菌率/%	存活率/%
70%乙醇20 s+0.1%升汞5 min	30	23	87.7	10.0
70%乙醇20 s+0.1%升汞6 min	30	2	6.7	73.3
70%乙醇20 s+4% NaClO 6 min	30	30	100.0	0

3 6-BA和2,4-D组合对崖白菜愈伤组织诱导的影响

将崖白菜子房接种到附加不同6-BA和2,4-D组合的MS培养基上。在不同诱导培养基上培养7 d, 子房开始膨大; 再过5 d后, 逐渐出现愈伤组织(图1-A), 长出的愈伤组织有浅绿色和浅黄色2种, 且比较致密。诱导培养30 d后进行统计分析, 结果(表3)表明, 培养基MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+2,4-D 0.2 mg·L⁻¹和MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+2,4-D 0.1 mg·L⁻¹的诱导效果较好, 愈伤组织诱导率分别为82.83%和66.13%。

表3 6-BA和2,4-D对崖白菜愈伤组织诱导的影响

Table 3 Effects of 6-BA and 2,4-D on callus induction of *R. rupestris*

培养基	6-BA浓度/ mg·L ⁻¹	2,4-D浓度/ mg·L ⁻¹	诱导率/%	生长情况
MS	1.0	0.2	82.83±0.25 ^a	生长量极大
MS	0.5	0.2	43.20±0.25 ^c	生长量中等
MS	1.0	0.1	66.13±0.25 ^b	生长量大
MS	0.5	0.1	27.17±0.25 ^d	生长量中等

不同小写字母表示经邓肯法检验在5%水平上差异显著性。下表同此。

4 6-BA和NAA组合对崖白菜诱导不定芽的影响

将崖白菜子房诱导产生的愈伤组织转接到附加6-BA和NAA的不定芽分化培养基上。培养初期愈伤组织继续膨大, 15 d左右部分愈伤组织开始分化不定芽芽点, 芽点为绿色细小颗粒状, 顶上有嫩芽(图1-B)生出; 经过30 d诱导培养后, 统计不定芽数量及其生长状况。结果(表4)表明, 培养基MS+6-BA 0.5 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹中不定芽发生率最高, 且不定芽生长健壮, 长势良好。

5 NAA对崖白菜诱导生根的影响

将2 cm左右的崖白菜不定芽接种至附加NAA的1/2MS生根培养基上, 7 d左右开始有白色根尖生出, 15 d后统计生根率及根系生长情况(图1-C)。结果(表5)表明, 培养基1/2MS+NAA 0.1 mg·L⁻¹中不定芽生根较好, 生根率达83.59%, 主侧根均比较发达, 再生植株生长健壮。崖白菜不定芽发生的根大部分生长在培养基表面, 只有少部分伸入培养基中, 可能与其本身生长在石壁悬崖的生境有关。

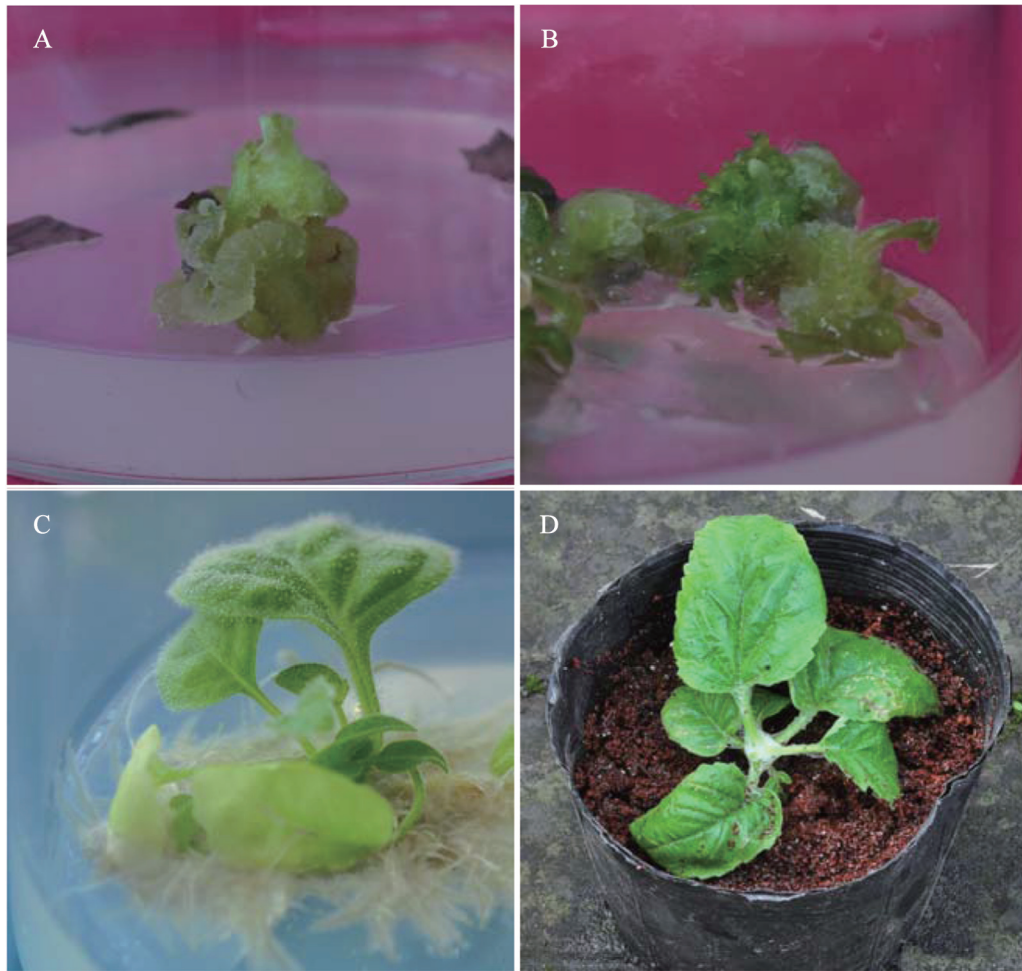


图1 崖白菜的愈伤组织诱导及植株再生

Fig.1 Callus induction and plant regeneration of *R. rupestris*

A: 幼嫩子房诱导产生的愈伤组织; B: 愈伤组织分化出不定芽; C: 不定芽的生根; D: 移栽。

表4 6-BA和NAA对崖白菜愈伤组织诱导不定芽的影响

Table 4 Effects of 6-BA and NAA on induction of adventitious buds of *R. rupestris*

培养基	6-BA浓度/mg·L ⁻¹	NAA浓度/mg·L ⁻¹	不定芽数量	生长状况
MS	0.5	0.05	18.00±1.68 ^e	出芽率低, 长势一般, 芽短小
MS	1.0	0.05	153.00±1.68 ^d	出芽率高, 长势好, 芽粗壮
MS	1.5	0.05	352.33±1.68 ^b	出芽率高, 长势好, 芽粗壮
MS	2.0	0.05	64.66±1.68 ^f	出芽率低, 长势一般, 芽短小
MS	0.5	0.1	376.33±1.68 ^a	出芽率高, 长势好, 芽粗壮较长
MS	1.0	0.1	346.66±1.68 ^c	出芽率高, 长势好, 芽粗壮
MS	1.5	0.1	5.33±1.68 ⁱ	出芽率低, 长势一般, 芽短小
MS	2.0	0.1	89.33±1.68 ^g	出芽率较高, 长势好, 但芽短小
MS	0.5	0.2	13.66±1.68 ^h	愈伤组织膨大, 但出芽率低, 芽短小
MS	1.0	0.2	11.66±1.68 ^h	愈伤组织膨大, 但出芽率低, 芽短小
MS	1.5	0.2	12.66±1.68 ^h	愈伤组织膨大, 但出芽率低, 芽短小
MS	2.0	0.2	1.33±1.68 ^j	愈伤组织膨大, 但出芽率低, 芽短小

表5 NAA对崖白菜诱导生根的影响

Table 5 Effect of NAA on rooting of *R. rupestris*

培养基	NAA浓度/mg·L ⁻¹	生根率/%	根系特点
1/2MS	0	17.98±2.76 ^d	主根发达, 侧根较少
1/2MS	0.1	83.59±2.76 ^a	主侧根均较发达, 基部少许愈伤化
1/2MS	0.2	46.55±2.76 ^b	部分根系侧根发达
1/2MS	0.4	27.50±2.76 ^c	主根变黄, 侧根基本死亡
1/2MS	0.6	15.86±2.76 ^d	基部愈伤化高, 且重新分化出小苗
1/2MS	1.0	0	基部愈伤化严重

6 炼苗与移栽

选取培养4周、根系健壮的生根苗, 将培养瓶移至光线较好的房间内, 松开封口膜在散射光下炼苗5~7 d, 再移至温室打开瓶口炼苗1 d (图1-D)。然后用镊子小心地将植株从培养瓶取出, 用自来水将根上粘附的琼脂清洗干净, 然后移栽到经灭菌的椰糠和河沙(2:1)混拌基质中。浇透水, 先将移栽苗放置在遮荫处, 注意保湿, 待成活后移至光线充足处生长。移栽成活率在90%以上。

讨 论

植物细胞或组织在离体培养条件下往往缺乏合成植物激素的能力, 为了达到促进细胞生长、分化和分裂的效果, 在多数情况下需要在培养基中补加外源生长素和细胞分裂素来诱导细胞生长、分化和形态建成(崔凯荣等2000)。本文分别以崖白菜的子房、叶片和茎段为外植体进行愈伤诱导及植株再生, 仅子房成功诱导出愈伤并再生出植株, 叶片可能是由于表面带有致密绒毛, 在进行灭菌处理时, 杀菌剂未能与叶片充分接触, 致使灭菌不彻底, 从而在培养的过程中极易染菌。而崖白菜的茎段在培养过程中褐变率极高, 褐变现象主要是由于酚类物质被多酚氧化酶(PPO)氧化成醌类物质, 并抑制多种酶的活性, 对外植体产生毒害作用从而影响其正常生长, 进而导致培养物褐变死亡(姚洪军等1999)。另一种可能的原因是在胁迫条件或其它不利条件影响所造成的细胞死亡(称为程序化死亡)而导致褐变(徐振彪等1997)。崖白菜茎段可能含有较多多酚氧化酶, 并且在培养过程中切口暴露空气中, 酚类物质被氧化而导致茎段褐化。子房可能含较少多酚氧化酶, 并且

切口小与培养基接触, 未与或较少与空气接触, 故而褐变率较低。

在愈伤组织诱导的过程中, 不同植物对生长调节剂的种类和浓度要求差别很大。对怀地黄来说, 单独使用生长素2,4-D即可诱导出愈伤组织, 但其生长迟缓且细胞易老化, 与细胞分裂素6-BA配合使用, 可促进愈伤组织的生长增殖(李明军等2005)。本文采用不同浓度的2,4-D和6-BA组合对崖白菜子房外植体进行愈伤组织诱导, 在2,4-D浓度一定时, 较高浓度的6-BA能够更好地促进愈伤组织的诱导发生, 这与赵楠等(2007)的研究结果相一致。本实验以不同浓度的6-BA和NAA组合对崖白菜愈伤组织分化生成不定芽, 发现低浓度的NAA有利于不定芽的分化, NAA浓度一定时随着6-BA浓度一定范围内的提高, 不定芽分化率提高。这与范小峰等(2009)的研究结果相类似。本实验以崖白菜的幼嫩子房为外植体, 筛选出愈伤组织诱导、不定芽分化及生根的最适培养基, 建立了一种较为稳定的组培再生体系, 为崖白菜的种质资源保存和栽培利用奠定了重要基础。

参考文献

- 崔凯荣, 邢更生, 周功克, 刘新民, 王亚馥(2000). 植物激素对体细胞胚胎发生的诱导与调节. 遗传, 22 (5): 349~354
- 范小峰, 郭小强, 肖朝霞, 刘灵霞(2009). 皱皮木瓜愈伤组织诱导与快速繁殖. 植物学报, 44 (6): 725~727
- 李明军, 张晓丽, 陈明霞, 徐鑫, 杜琳(2005). 怀地黄叶片愈伤组织的诱导形成及其可溶性糖含量变化的研究. 河南农业科学, (8): 72~75
- 李晓东, 李建强(2006). 地黄属(*Rehmannia*)和崖白菜属(*Trianaophora*)植物的叶表皮形态特征. 武汉植物学研究, 24 (6): 559~564
- 汪松, 解焱(2004). 中国物种红色名录(第1卷). 北京: 高等教育出版

- 社
- 徐振彪, 傅作申, 原亚萍, 杜娟, 张新生, 田立国, 贾玉峰, 母秋华 (1997). 植物组织培养过程中的褐化现象. 国外农学-杂粮作物, (1): 55~56
- 姚洪军, 罗晓芳, 田砚亭(1999). 植物组织培养外植体褐变的研究进展. 北京林业大学学报, 21 (3): 78~84
- 赵楠, 武雯, 闫坤, 刘思涵, 李宏庆, 王幼芳(2007). 不同植物生长调节物质对天目地黄组织培养及植株再生的影响. 河南农业大学学报, 41 (1): 33~37
- 中华人民共和国国务院(1999). 国家重点保护野生植物名录(第一批). 植物杂志, (5): 4~11
- 钟补求, 杨汉碧(1979). 中国植物志[67 (2)卷]. 北京: 科学出版社, 220
- Jensen S-R, Li HQ, Albach D-C, Gotfredsen C-H (2008). Phytochemistry and molecular systematics of *Triaenophora rupestris* and *Oreosolen wattii* (Scrophulariaceae). *Phytochemistry*, 69: 2162~2166
- Xia Z, Wang YZ, Smith JF (2009). Familial placement and relations of *Rehmannia* and *Triaenophora* (Scrophulariaceae) inferred from five gene regions. *Amer J Bot*, 96 (2): 519~530