

张磊

石刁柏花药培养研究及其进展

石刁柏 (*Aparagus officinalis* L.) 又称芦笋, 百合科天门冬属多年生宿根草本, 雌雄异株植物。石刁柏具有较高的营养价值, 被誉为世界十大名菜之一。雄株茎粗而雌株细小, 因此雄株产量高、品质好。如果田间全系统优良品质的雄株, 就可大幅度地提高石刁柏的产量。因此培育全雄系品种早已成为国内外石刁柏育种的重要目标。石刁柏的性别遗传特点是雌株纯合型, 基因型为 xx , 雄株杂合型, 基因型为 xy 。雌雄异株植物在正常育种程序上较难获得纯系, 而利用雄株的花药进行离体培养, 可以得到由 x 和 y 两种配子型花粉发育而来的单倍体植株, 这种植株经染色体加倍后, 获得 yy 的纯雄株即叫“超雄株”和 xx 的纯雌株。用超雄株和雌株杂交。 F_1 代全部为雄株 xy , 称“全雄系”。

1. 研究概况。Pelletier (1972) 首次利用石刁柏花药进行离体培养成功地获得了含有一定比例单倍体细胞的混倍体愈伤组织。Dore (1974, 1979) 在 Pelletier 工作的基础上, 利用花药离体培养技术, 首次获得超雄株 (yy) 和纯合的二倍体雌株, 然后用组织培养方法, 大量繁殖超雄株与纯系的雌株, 将两个纯系种植于田间进行杂交, 选育出早熟高产的杂交组合。利用此组合产生的杂交种子用以进行商业性生产, 从而获得全部是早熟高产的雄性植株 (xy)。Falavigna (1986) 得到的“全雄系”杂种比标准品种增产 60~100%。从此, 在法、德、意、美、日、中等国相继开展了这方面的研究。中国从 1981 年开始对利用花药培养培育超雄株技术进行了基础研究。北京农业大学、西北农业大学、天津农学院等单位均对花药培养的接种时期, 诱导方法及培养基配比, 控制体细胞干扰, 染色体自发加倍变化及根分化等方面进行了研究。已获得了花药培养的单倍体入地植株。

2. 花药培养的方法及研究进展。(1) 采花药的时期。Inagaki (1979) 认为花蕾 1.5~2.2mm 长, 花粉发育在四分孢子期, 单核期最为适宜。石刁柏雄花花期较长, 从最初的 4 月中旬到 9 月下旬。张磊等 (1990) 研究认为以 4 月中旬至 5 月上旬, 诱导率较高, 而以 5 月下旬起, 愈伤组织诱导率明显下降。Peters (1987) 的实验结果表明, 石刁柏花药在 6℃ 时处理 6 天, 愈伤组织诱导率最高达 21.7%。Falavigna (1981) 曾对四种不同基因型的石刁柏花药进行低温处理。7℃ 条件下处理 10 天, 发现其中只有一种基因型的花药其愈伤组织诱导率有所提高, 而其它三种基因型的花药均未产生愈伤组织。在 4℃ 条件下处理 5 天和 10 天, 成愈率变化不大。说明适宜的冷处理对一定基因型的存活花粉的进一步分裂有明显的促进作用。(2) 愈伤组织的诱导。将花药接种在 MS 培养基上, 蔗糖 3%, 琼脂 0.7%, PH 调至 5.8。在激素配比上, Yakuwa (1972) 在上述培养基中添加 6-BA 1.0mg/h/L, NAA 1.0mg/L 诱导愈伤组织。Torrey (1983) 认为附加 6-BA 1.0mg/L, NAA 5mg/L 诱导频率最高。张磊等 (1990) 年试验结果为 NAA 0.1~

0.5mg/L、6-BA 1.0~2.0mg/L、2.4-D 0.5~1.0mg/L 是适宜的。基因型不同的品种对花药培养反应能力, 愈伤组织分化能力和绿苗产率均不同。Qiao Yaomin 和 Falavigna (1989) 曾对 10 个不同基因型供体花药进行培养, 发现其中有两种基因型供体在愈伤组织诱导和植株再生方面存在着很大的差异。周维燕 (1991) 指出 5 个供试品种形成花粉愈伤组织的能力存在显著差异。(3) 诱导愈伤组织的分化。石刁柏的花药经 25~30 天的

培养。陆续产生愈伤组织,一类是松散型愈伤组织,其特点是质地疏松,为黄白色,分化成苗率较低;另一类是紧密型愈伤组织,此类愈伤组织质地紧密且坚硬,呈白色或黄白色,分化成苗率较高。当愈伤组织长至米粒大小时,转到分化培养基上。Torrey (1983) 报道当愈伤组织转接到含有 6-BA 0.5mg/L、NAA 1.0mg/L 培养基上可形成芽。张磊 (1990 年) 的试验认为在 NS 培养基中只加 6-BA 1mg/L 也可促使愈伤组织分化发芽,说明 6-BA 对芽的分化有促进作用。(4) 根的诱导。石刁柏试管苗生根比较困难。根的分化主导因子是植物激素,植株本身的基因型。根的分化状态因所使用的激素种类和激素配比不同有很大差异,而且也与不同品种基因型发根难易程度不同,分为易生根型、中间型和难生根型三类。Yang (1974 年) 以 NAA 0.1mg/L 和 KT 0.1mg/L 添加于培养基中,经 8 周培养,根的分化率可达 90% 以上,但形成的根细如毛发,同时伴随大量的愈伤组织形成,这类根称愈伤组织根,移栽成活率极低。Chin (1982) 指出,石刁柏茎尖生根形成的小植株,根颈较弱,各种浓度的生长素和细胞分裂素配比不能改善之,配合一定量的生长调节剂,能促进健壮根芽的发生,并首先使用噻啉醇 (Ancymidol) 取得试管苗生根率由 26% 提高到 100% 的结果。冯晓棠 (1991 年) 认为石刁柏试管苗生根困难不是绝对的,可以通过易根基因型的筛选和激素调控达到生根的效果,所用生根培养基为 MS,蔗糖 3%,KT 0.1mg/L 和 6-BA 0.01~0.05mg/L 的基础上再添加 IAA 0.5mg/L,IBA 0.2mg/L、NAA 0.1mg/L 对易根型材料生根率达 100%,生根迅速,根系健全,移栽成活率高。陈婉芬等 (1994 年) 的研究结果表明优康唑 (S_{3307}) 具有促进石刁柏不同品种发根的显著效应,这一效应在一定时间内可被外源 GA_3 所逆转。试验证明内源 GA_3 水平偏高是抑制石刁柏发根的主要原因, S_{3307} 则通过降低内源 GA_3 水平促进石刁柏发根。(5) 诱导胚状体的分化与增殖。由于石刁柏生根比较困难,Tsay (1981 年) 在基本培养基中添加 NAA 0.3mg/L 和 KT 0.1mg/L 可使花粉愈伤组织诱导形成胚状体,由这些胚状体直接发育形成正常的试管苗。周维燕 (1991 年) 研究将高激素下培养的愈伤组织,及时地转移至低激素 NAA 0.1mg/L + 6BA 0.1mg/L 下培养,可以得到 1.96% 根芽同时分化的植株,经根尖检查,证明这类植株是来自花粉的 $n=10$ 的单倍体植株。

3. 花药培养的染色体倍性及其影响因素。在离体培养条件下花粉愈伤组织及再生植株的染色体倍性及其影响因素已有许多学者进行了研究。石刁柏在离体

培养条件下,培养基中的多种激素极易引起细胞有丝分裂的不正常,核内复制,核融合,多极纺锤体的出现和染色体不分开或落后染色体的现象。Jensen (1978 年) 认为这种异常分裂现象是产生混倍体,染色体加倍及其它染色体变异的重要原因。Pelletier (1972 年) 对石刁柏花药愈伤组织进行培养,发现高浓度的细胞激动素会导致愈伤组织多倍化。Yakuwa (1972 年),Dore (1975 年),Falavigna (1983 年),Kroger (1985 年),张磊 (1990 年) 等进行石刁柏花药培养,所使用的植物激素包括 2,4-D、NNA、6-BA 和 KT,应用不同浓度配比的培养基,在所获得的花粉愈伤组织中均出现了不同程度上的混倍化。2,4-D 1mg/L 以上会使愈伤组织多倍化加重,为此应在诱导培养基中应尽量降低 2,4-D 的浓度或用其它外源激素代替。Dore (1974 年) 发现由石刁柏花粉愈伤组织所获得的再生植株,其染色体变异范围较大,包括 n 、 $2n$ 、 $3n$ 、 $4n$ 、 $6n$ 和 $8n$ 的细胞。此外,Falavigna (1989 年)、Renuther (1987 年)、Yakuwa (1972 年)、Torrey (1983 年) 所获的花粉植株均具有多重倍性。实验结果有一个明显的共性。即所获得的二倍体植株的频率都在 60% 左右。单倍体植株出现的频率偏低,说明石刁柏再生植株倍性变化复杂。实验结果表明,在培养过程中不同激素和浓度对花粉植株的后效作用可能是引起这种变异的重要原因之一,其二,在诱导花药培养过程中,体细胞干扰也是一个不容忽视的问题。为此,应控制体细胞干扰和通过调节愈伤组织培养基激素配比来达到控制再生植株的染色体倍性的目的。

4. 石刁柏的性染色体和超雄株鉴别。石刁柏是一个二倍体 ($2n=20$),其染色体组是 $x=10$ 。Thuseen (1960 年) 注意到石刁柏有一对染色体不同,并提出可能是性染色体。但他的结果被 Zilm (1961 年)、Franker (1969 年) 的实验所否定。Loptien (1979 年) 对石刁柏性染色体进行了鉴别,指出石刁柏的染色体有 5 个长染色体,1 个中间染色体和 4 个短染色体,通过三体杂交鉴定出第 5 染色体即 L_s 为控制性别的染色体。An (1992 年) 指出石刁柏有 9 对常染色体和一对性染色体所组成。1、2、3、4、5 是长染色体,6、7、8、9 是短染色体。结果与 Loptien (1979 年) 有些不同。Loptien 认为的第 2 染色体 An (1992 年) 认为是第 5 染色体。主要是对第 5 染色体长臂上随体的处理不同。An 在所有染色体长度中没有包括随体,而 Loptien 包括了。An (1992 年) 指出石刁柏雌株有两个相同的具亚端着丝点的 x 染色体,核型公式是 $2n=18A (10Sm+6m) +xx (2st)$ 。雄株是异质型,性染色体中一个是

北方园艺 (总 111) 45

具亚端着丝点的x染色体,而另一个是长的具中间着丝点的y染色体。核型公式是 $2n=18A(10sm+6m)+xy(1st+1m)$ 。An认为石刁柏的性别决定是xy型。因此,可以通过细胞学的方法来鉴定区别雄株和超雄株。

Colby(1988年)利用同工酶标记鉴别石刁柏花药培养产生的加倍单倍体。研究认为对于由石刁柏花药培养获得配子基因型而言,用过氧化物酶(PER)作为遗传标记比目前采用的雌雄鉴别和后代测验法更有效。

5. 石刁柏花药培养中存在的问题及解决办法。石刁柏花药培养过程中,提高诱导花粉单倍体植株的频率,减少体细胞干扰,仍是应该重视的问题。目前在花药培养过程中尽量少用或不用2,4-D来诱导花药形成愈伤组织,而采用NAA和6-BA配合使用,但仍没能解决体细胞干扰问题。最直接的途径应进行花粉粒培养,因此利用花粉粒离体培养再生植株是进一步研究的课题。通过调节各种激素水平控制染色体的自发加倍。另外也可利用花粉植株的染色体倍性变化大的特点,可在较短的时间内获得大量的染色体结构和数量变异的材料,为染色体工程育种提供原始材料。石刁柏根的分化仍是阻碍快速繁殖的一个突出问题。利用花粉愈伤组织直接诱导胚状体的发生是解决生根难的一个有效研究途径。石刁柏花药培养过程中对“超雄株”的快速鉴定技术仍是急需解决的难题。利用分子生物学的方法,构建石刁柏性染色体DNA文库和筛选控制性别的特异性DNA探针,可对石刁柏进行早期的性别鉴定和筛选超雄株。(参考文献15篇略 回稿时间1996年9月1日)

3. 刺楸:别名刺儿楸,为高大落叶乔木。是我国珍贵稀有的用材树种,木质坚硬、纹理优美,可昂高级家具。根及根皮为民间常用药,根、茎、叶、花中含有皂甙和香豆素,对治疗慢性气管炎、肾炎水肿、风湿症、腰膝疼痛的作用很好。因有小毒、所以在应用时应注意。刺楸喜生于土壤深厚较湿润,光照充足的林缘或山谷坡地,这为栽培提供了有力条件。利用种子进行育苗然后造林,建成楸子林,在医药业和工业上都大有益处。

4. 龙牙楤木:别名刺老芽。落叶小乔木。喜生于杂木林、阔叶或针阔混交林缘。叶和根中含有皂甙,甙元为齐墩果酸,齐墩果酸具有强心、免疫、消炎和防癌之作用。医药上主要应用根补气、活血、止痛、利尿,而其嫩茎又是山珍食品,营养价值高,深受国内外人们喜爱,其是一种药食兼优的植物。目前在日本龙牙楤木木已形成了生产力,实行集约化的管理。我国近几年虽有大量栽培,但也不能满足人们的需要。因此在开发利用这一野生资源的同时,即要加强野生资源的保护,又要尽快扩大人工抚育,可利用断枝育新株、扦插、根插分株,种子等手段扩大繁育,同时加强田间管理,主要是病虫害的防治和株形的修剪,选出少刺的优良品种。

5. 长白楤木:别名东北土当归。为高大草本。根及根皮为药,根皮茎有皂甙反应,叶和茎有黄酮、香豆素反应,主治风湿性腰腿痛,腰肌劳损等症。其贮量低于龙牙楤木。

6. 人参:别名棒槌。我国是生产古国,长白山区是人参主产区。野山参储量达6吨之多。人工栽培量也是手屈一指。人参的药用时间之早,药效之佳。主要成分为人参皂甙和多种维生素及人体所需的微量元素。其作用主要是调节神经,心血管及内分泌系统,具有抗疲劳、抗肿瘤、抗衰老等作用,是一种“扶正固本”的强化剂。

随着科学的发展,目前利用人参茎、叶、花入药的产品不断涌现,长白山区的人参及人参制品远销海内外。能够合理综合开发和利用五加科药用植物对挖掘长白山区野生药源定会起到积极的作用。(吉林省通化市园艺研究所)

长白山五加科药用植物

张俊兰 赵占英 王殿芝

长白山区的五加科植物,其药理作用可以抗衰老,调理机体,抗肿瘤,延年益寿等,久用不衰。药效好,应用面广,人们称之为“五加药业”。

1. 刺参:别名东北刺人参。根茎均可入药,具有滋补强壮的作用,主要治疗神经衰弱、低血压、糖尿病、精神分裂等症。其茎、叶、花与根均含有皂甙和黄酮等有效部分,有类似人参的功效。刺参的储量狭小,呈小片状生长在针叶林和针阔混交林排水良好而腐殖层深厚的半阴坡。目前在人工驯化过程中有一定的难度,所以应严加保护资源,逐步进行家植的研究工作。

2. 刺五加:别名刺拐棒。历史早有记载五加的药效,而当今对刺五加的研究又进入了一个新的领域。利用茎皮可作五加皮入药,利用全株由其根制各种冲剂,片剂,糖浆等产品也相继问世。利用嫩茎可以做为招待贵宾的美味佳肴。根含多种甙类,有类似人参之功效,故可增强机体的防御机能“扶正固本”,对神经衰弱、气虚无力、高低血压及心血管疾病有较强的作用。由于刺五加的用途越来越广泛,用量越来越大,资源日渐减少,只有在采伐抚育后的针阔混交林或杂木林的林下及林缘生长茂盛,呈密集片状。目前虽有少量地区人工栽培,并不能满足市场需要,所以应形成生产基地。短梗五加只是在形态上于刺五加略有不同,但是生境与药理及应用同于刺五加。为了合理保护野生资源,目前科学研究正在利用茎、叶逐步代替根茎。