

蕨麻组织培养的初步研究

沈宁东¹, 韦梅琴¹, 马国良¹, 李 宁¹, 汤青川¹, 李军乔²

(1. 青海大学 农牧学院 农林系, 青海 西宁 810016 2. 青海民族学院, 青海 西宁 810007)

摘要: 试验研究了蕨麻不同外植体离体培养芽的形成和生长情况, 结果表明: 以茎尖为外植体, 芽诱导率最高平均可达 75.3%, 块根为 56.5%, 匍匐茎段为 11.1%, 叶片为 0%。以 NAA 0.5 mg/L+BA 1.0 mg/L 对茎尖诱导成芽的效果最好, 而以 NAA 0.5 mg/L+KT 0.5 mg/L 对块根诱导成芽的效果最优。

关键词: 蕨麻; 外植体; 离体培养; 芽诱导

中图分类号: S 563.203.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2008)05-0185-03

蕨麻学名鹅绒委陵菜 (*Potentilla anseriue* L.), 属蔷薇科, 委陵菜属, 又名蕨麻委陵菜、曲尖委陵菜、人参果、延寿草。分布极广, 常生长于海拔 500~4 100 m^[1] 的河岸、路边、山坡草地。蕨麻的全草富含营养物质, 可加工为干草及粉制饲料; 蕨麻的根(表皮)富含鞣质, 可提取栲胶, 用于皮革工业; 而茎叶可提取黄色染料; 蕨麻是较好的蜜源植物; 早春幼嫩茎叶可作蔬菜; 由于其耐践踏, 生长迅速, 色泽艳丽, 可作为草坪的草种等。在甘肃、青海、西藏等高寒地区, 蕨麻的根块肥厚^[2,3], 富含蛋白质、脂肪、淀粉、纤维、维生素、尼克酸及 Fe、Mg、Zn、K、Ca 等元素, 营养价值高, 可食用、药用^[4,6]。但在收获块根时, 常常会导致植被大面积破坏, 毁坏生态环境, 且常年的过度采集野生种群已濒于灭绝。采用组织培养方法, 再辅以人工驯化, 则对资源的保护和开发利用有一定的参考意义。

1 材料与方法

1.1 材料

采自青海省门源县蕨麻的植株和块根。

1.2 方法

1.2.1 不同外植体材料的制备 于 2006 年 7 月将材料的植株, 田间采挖后保鲜带回实验室, 分别切取 0.5 mm 左右的茎尖, 长约 5 mm 的匍匐茎和 3~5 mm² 的叶片, 经消毒后接种到已制备好的添加不同生长调节剂的 MS 培养基上。同时将在冰箱中保鲜贮藏的蕨麻块根, 在自来水下冲洗 30 min 左右, 用 70%乙醇消毒 40 s, 投入 0.1%升

汞溶液中消毒 7 min, 无菌水中洗 5 次。灭菌后的块根切成约 5 mm 的切段, 也接种于已制备好的培养基上。

1.2.2 培养基和培养条件 基本培养基是 MS 琼脂培养基, 添加不同浓度及配比的生长调节剂: 6-苄基腺嘌呤(BA), 激动素(KT)和萘乙酸(NAA), 蔗糖 30 g/L, 琼脂 6.5 g/L, pH 5.8~6.0。培养室温度(24±2)℃, 湿度 65%, 光照 1 400~1 600 lx, 10~12 h/d。每种处理 10~20 瓶, 每瓶接种 3~4 个材料, 重复 3 次, 每隔 10 d 观察记录 1 次, 60 d 后对结果进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同外植体在离体培养中的反应

2.1.1 茎尖 茎尖接种后, 在培养基中的反应大约有以下几种情况: 茎尖接种后经培养可形成 1~2 个芽, 这部分外植体占 75.3%; 茎尖接种后, 先形成带有红色的愈伤组织, 继续培养有的愈伤组织可分化形成芽, 有的分化为根, 这部分外植体占 7.8%; 茎尖培养后体积不断增大, 且组织疏松透明, 呈玻璃化, 不能进一步分化形成根或芽, 这部分外植体占 6.4%; 还有 10.5%的茎尖死亡。

2.1.2 匍匐茎段 匍匐茎段接种后, 有 11.1%切段能在培养 20 d 后分化形成 1 个芽, 在芽产生后约 20 d 又可在芽基部分化形成根, 且根形成的数量较多, 一般是 3~5 条; 有 3.7%的切段在培养 20 d 后, 其体积膨大, 可达接种时的 3 倍, 并在切口处产生结构疏松呈水浸状的愈伤组织, 但这些愈伤组织没有进一步分化; 大部分的匍匐茎切段接种后逐渐变褐死亡。

2.1.3 叶片 叶片接种后, 经培养, 首先体积增大, 约为接种时的 1.5~2 倍, 继续培养叶色由绿色转为黄绿色, 再转变为褐色, 外植体死亡。所有外植体均不能分化形成芽、根或产生愈伤组织。

2.1.4 块根 块根接种后, 经培养有 56.5%的块根在培养 10~20 d 内直接分化形成 2~3 个芽, 在芽产生后 10 d 左右均可在芽基部分化形成 2~5 条根; 有 34.8%

第一作者简介: 沈宁东(1972-), 女, 江苏滨海人, 副教授, 主要从事植物学教学及植物组织培养工作。E-mail: xnsnd@126.com。

通讯作者: 李军乔。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30660019); 青海省科技攻关资助项目(2005-N-158)。

收稿日期: 2008-01-01

的块根在培养 20 d 后, 形成直径 2~5 mm 的愈伤组织, 这些愈伤组织约有 80% 可分化形成芽, 但大多数芽生长极慢, 经 60 d 培养长度不到 1 cm, 这些芽必须要经过转接才可以刺激其生长。还有 20% 的愈伤组织可分化形成根; 有 8.7% 的块根接种后一直未萌动。

2.2 生长调节剂对芽形成的影响

2.2.1 细胞分裂素对芽形成的影响 由表 1 可见, 加入一定量的细胞分裂素时, 对芽的诱导效应好于对照。BA 对茎尖外植体芽诱导的有效浓度范围在 0.1~0.5 mg/L 而 KT 对茎尖外植体芽诱导的有效浓度范围在 0.1~1.0 mg/L。BA 在 0.5 mg/L 时, 对茎尖芽的诱导率为 69.1%。芽数达 2.0 个, KT 浓度 1.0 mg/L, 芽诱导率为 64.2%, 芽数为 1.7 个。当 BA 和 KT 的浓

度分别超过 0.5 mg/L 和 1.0 mg/L 时, 则表现出对芽形成的抑制作用。BA 和 KT 对块根外植体芽的诱导的浓度高于茎尖。BA 在 1.0 mg/L 时, 对芽的诱导率为 58.3%。芽数达 3.5 个, KT 浓度在 1 mg/L, 芽诱导率为 56.9%, 芽数为 3.0 个。且各浓度梯度间对芽的诱导率的差异不大。

2.2.2 生长素与细胞分裂素配合使用对芽形成的影响

生长素和细胞分裂素配合使用时, 对芽的诱导效果好于细胞分裂素单独作用时(见表 2), 即在细胞分裂素一定浓度下, 添加适量生长素可有效提高芽的诱导率。以 NAA 0.5 mg/L+BA 1.0 mg/L 对茎尖诱导成芽的效果最好, 而以 NAA 0.5 mg/L+KT 0.5 mg/L 对块根诱导成芽的效果最好。

表 1 细胞分裂素 6-BA 和 KT 对茎尖和块根诱导形成芽的影响

培养基/mg·L ⁻¹	茎 尖				块 根			
	萌芽率/%	芽数 个	叶长/cm	叶数(芽)/片	萌芽率/%	芽数/个	叶长/cm	叶数(芽)/片
0	47.0	1.0	1.87	1.3	38.9	1.8	2.19	2.0
BA 0.1	56.9	1.2	2.35	2.4	45.8	2.4	3.08	2.7
BA 0.5	79.1	2.0	3.55	4.0	51.4	2.9	4.27	3.5
BA 1.0	67.0	1.8	2.51	3.3	58.3	3.5	6.58	6.0
BA 1.5	59.4	1.5	2.23	2.9	54.2	3.1	5.97	5.7
KT 0.1	50.1	1.0	1.65	1.5	47.2	2.5	3.40	2.3
KT 0.5	68.0	1.4	2.43	2.8	50.0	2.7	4.53	4.1
KT 1.0	74.2	1.7	3.27	3.7	55.6	3.0	5.87	5.8
KT 1.5	66.9	1.2	2.98	3.4	56.9	3.0	6.12	5.4

表 2 NAA 与 6-BA 或 KT 配合使用对茎尖和块根诱导形成芽的影响

培养基/mg·L ⁻¹	茎 尖				块 根			
	萌芽率/%	芽数 个	叶长/cm	叶数(芽)/片	萌芽率/%	芽数/个	叶长/cm	叶数(芽)/片
0	37.0	1.0	1.87	1.3	38.9	1.8	2.19	2.0
NAA0.5+BA0.1	84.4	1.5	2.56	2.9	58.0	2.9	4.07	3.7
NAA0.5+BA0.5	87.3	1.7	3.09	3.7	61.8	3.1	5.76	4.5
NAA0.5+BA1.0	92.1	2.3	3.84	4.5	63.7	3.4	6.83	5.8
NAA0.5+KT0.1	83.2	1.4	2.49	2.7	57.5	2.7	3.95	4.9
NAA0.5+KT0.5	87.6	1.7	3.09	3.5	68.9	3.7	7.33	6.4
NAA0.5+KT1.0	89.8	1.9	3.57	3.8	62.7	3.4	6.74	5.0

3 结论与讨论

3.1 不同外植体对芽的形成影响很大

蕨麻不同外植体离体培养的试验中, 茎尖培养诱导成芽的平均比例是 75.3%, 块根的是 56.5%, 匍匐茎段的是 11.1%, 叶片的是 0%。因此采用茎尖培养效果最好。因为茎尖从结构上看, 有生长点、叶原基和腋芽原基, 在离体培养时, 只要条件适宜易于分化成芽⁷。但在实际的离体培养中茎尖成芽有不同的情况, 这可能与茎尖剥制过程中受损伤程度、茎尖大小和培养的环境条件等有关。

3.2 生长调节剂的加入可有效促进外植体芽的产生

因为细胞分裂素有促进细胞分裂、分化, 增强蛋白质合成, 促进腋芽生长的作用, 生长素有促进芽的生长⁸⁻⁹的作用。但当在 MS 培养基中加入细胞分裂素时, 在同一浓度下, BA 对芽的诱导效果优于 KT, 说明 BA 比

KT 对芽的诱导活性高, 这与王冬梅⁸、曹孜义⁹的研究结果一致。当在培养基中同时加入生长素和细胞分裂素时, 其对芽的诱导效果要优于仅用细胞分裂素时。以 NAA 0.5 mg/L+BA 1.0 mg/L 对茎尖诱导成芽的效果最好, 而以 NAA 0.5 mg/L+KT 0.5 mg/L 对块根诱导成芽的效果最好。

参考文献

- [1] 中国科学院西北高原生物研究所. 青海经济植物志[M]. 西宁: 青海人民出版社, 1987: 270-273.
- [2] 周华坤 周兴民. 鹅绒委陵菜的生长特征[J]. 西北植物学报, 2002, 22(1): 9-17.
- [3] 石定燧 秦明. 野生地被植物 鹅绒委陵菜研究初报[J]. 草业科学, 1999, 16(6): 9-14.
- [4] 王晋, 张坚. 青海产蕨麻营养成分的研究[J]. 青海医药杂志, 1998(2): 52-53.
- [5] 林娜, 李建荣. 蕨麻对免疫功能低下小鼠免疫功能的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 1999(2): 35-36.

牡丹 ACC 氧化酶基因的克隆与反义载体的构建

杨英军¹, 刘保国¹, 卢军刚¹, 柳 叶²

(1. 河南科技大学 林学院, 河南 洛阳 471003; 2. 河南新安县磁涧镇政府, 河南 洛阳 471822)

摘要: 根据报道的牡丹 ACC 氧化酶基因(DQ337251)cDNA 序列, 设计一对特异引物, 以牡丹品种“洛阳红”基因组 DNA 为模板, 用 PCR 扩增方法克隆出牡丹 ACC 氧化酶基因的部分片段, 并将其连接到 pMD18-T 载体上进行测序。结果表明, 克隆的序列全长为 467 bp, 其中包括一个长度为 157 bp 的序列, 推测它可能是一个内含子, 其它序列与已报道序列同源率为 98.2%; 用 SacI 和 XbaI 对重组质粒和载体 pBI 121 酶切、连接, 构建牡丹 ACC 氧化酶基因的反义表达载体。

关键词: 牡丹; ACC 氧化酶基因; 克隆; 反义载体

中图分类号: S 685.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2008)05-0187-04

牡丹(*Paeonia suffruticosa*)属毛茛科芍药属(*Paeonia*)牡丹组(*sect. Montan*)植物, 是中国的特产名花, 曾被评为我国十大传统名花之首, 享有“国色天香”、“花群之王”的美誉, 是吉祥、幸福、富贵、和平、友谊和繁荣昌盛的象征, 是国花的唯一候选花卉, 深受人们喜爱。

我国对牡丹的深入研究主要集中于资源的收集、整理、评价^[1-2]、栽培技术的探讨^[3]、组织培养及快速繁殖^[4-7]和对花期的调控方面等。其中对花期的调控研究

最为重要, 因为在自然条件下, 牡丹花期一般 7~10 d 且比较集中, 不利于观赏和经济发展, 如果能人为地调控花期, 将对旅游业的发展有重大的意义。在这方面已有许多学者进行了调控花期研究和抑制栽培研究^[8,9], 已经实现了牡丹花期周年开放, 周年供应, 基本满足了人们对鲜花的要求^[10-13]。

乙烯是高等植物中促进器官衰老和果实成熟的激素, 牡丹是典型的乙烯致衰植物。ACC 氧化酶, 又称乙烯合成酶(EFE), 是乙烯合成途径中的关键酶, 它催化乙烯合成的最后一步(即催化 ACC 生成乙烯)。应用 ACC 氧化酶基因的反义 RNA 技术, 可望有效抑制乙烯生物合成, 从而延长鲜切花植物寿命。目前国外已从番茄、苹果、豌豆、桃、矮牵牛、香石竹、猕猴桃等植物中克隆到 ACC 氧化酶基因 cDNA^[14-17], 澳大利亚将香石竹 ACC 氧化酶基因 cDNA 导入香石竹后, 使香石竹花瓣衰老明显

第一作者简介: 杨英军(1968), 男, 河南孟津人, 副教授, 从事园艺植物分子生物学研究工作。

基金项目: 河南省自然科学基金资助项目(0611030700); 河南省科技攻关资助项目(072102140015); 河南科技大学人才科学研究基金资助项目(05018)。

收稿日期: 2007-12-30

[6] 贾守宁, 杨卉. 蕨麻抗缺氧作用的试验研究[J]. 中国民族医药杂志, 1999(1): 37.

[7] 黄学林, 李筱菊. 高等植物组织离体培养的形态建成及其调控[M]. 北京: 科学出版社, 1995.

[8] 曹汝义, 刘国民. 实用植物组织培养技术教程[M]. 兰州: 甘肃科学技术出版社, 1996: 14-18.

[9] 王冬梅, 黄学林, 黄上志. 细胞分裂素类物质在植物组织培养中的作用机制[J]. 植物生理学通讯, 1996, 32(5): 373-377.

Preliminary Study on Tissue Culture of *Potentilla anserina*

SHEN Ning-dong¹, WEI Mei-qin¹, MA Guo-ling¹, LI Ning¹, TANG Qing-chuan¹, Li Jun-qiao²

(1. Agriculture and Animal Husbandry College of Qinghai University, Xining, Qinghai 810016 China; 2. Qinghai Nationalities College, Xining, Qinghai 810007, China)

Abstract: Bud regeneration on different explants period the tissue culture of *P. anserina* was investigated. The results showed: the rate of the bud regeneration on stem apex of *P. anserina* was best, it was 75.3%, tuberous was 56.5%, creeping stem was 11.1% and leaf was the worst, it was 0%. On tissue culture, the optimum combination was NAA 0.5 mg/L and 6-BA 1.0 mg/L for stem apex and NAA 0.5 mg/L and KT 0.5 mg/L for tuberous.

Key word: *Potentilla anserina* L.; Explant; Tissue culture; Bud regeneration