

防风愈伤组织培养研究

张家菁, 于元杰

(山东农业大学 农学院, 山东 泰安 271018)

摘要:以防风为试材,研究不同外植体、激素组合对愈伤组织诱导及不定芽分化的影响。结果表明:茎段是防风组织培养较为合适的外植体。茎段在添加 2,4-D 2.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L 的 MS 培养基上愈伤组织诱导率最高可达 100%,叶片在添加 2,4-D 1.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L 的 MS 培养基上愈伤组织诱导率可达 75%;继代后的愈伤组织转到 6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L 的 MS 分化培养基上进行分化,其分化率达 72%。

关键词:防风;愈伤组织;组织培养

中图分类号:S 567.23⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)02-0183-03

防风(*Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk.) 又名山芹菜、白毛草、北防风、关防风、东防风等,为伞形科多年生草本植物,主产于我国东北和华北地区。防风以未抽花植株的根入药,味辛甘,性温,能解表祛风,胜湿,止痉。用于感冒头痛,风湿痹痛,风疹瘙痒,破伤风^[1]。防风含有挥发油、多糖类、无机元素、有机酸、聚乙炔类、色原酮、香豆素、汉黄芩素、腺甙等成分,具有解热镇痛、镇静、抗菌、抗过敏作用,并具有抗肿瘤作用及抗凝血作用^[2]。

近年来国内外市场对防风的需求量不断增加,野生资源采集已远远不能满足市场需求,而人工栽培易受外界环境影响,因此应用组织培养技术进行防风愈伤组织培养研究,对防风优良无性系的快速繁殖具有重要意义。该研究以防风茎段和叶片为外植体,研究不同激素配比对愈伤组织诱导和不定芽分化的影响,筛选出最佳激素组合,以期对防风优良无性系的繁殖奠定理论基础。

1 材料与方法

将材料经流水冲洗 12 h 后,在 70% 的酒精中漂洗 30 s,再用 0.1% 升汞消毒 5~7 min,无菌水冲洗 5~6 次。将茎段切成约 1 cm 长,叶片切成 0.5 m² 大小,接种到诱导愈伤组织的培养基上。采用 MS 基本培养基,添加 0.8% 琼脂、3% 蔗糖及各种激素,pH 5.8~5.9,在

121℃ 高压灭菌 30 min。诱导愈伤时,为暗培养,培养温度为(25±1)℃。诱导不定芽时,光照强度为 2 000 lx,光暗各 12 h,培养温度为(25±1)℃。接种 30 d 后统计愈伤组织诱导率。愈伤组织继代培养 3 次后转入分化培养基中诱导不定芽。数据分析采用统计软件 DPS 和 Excel 完成。

2 结果与分析

2.1 不同外植体及生长调节剂对愈伤组织诱导的影响

将不同的外植体接种到愈伤组织诱导培养基上,愈伤组织的诱导率和生长差异很大。试验表明,防风的茎切断暗培养 7 d 后,其两端开始膨大,在接种 2 周后,膨大长出少量黄绿色的颗粒状愈伤组织,继续培养 2 周后,在绝大多数培养基中都能观察到较多的愈伤组织(图 1)。其中在 5 号和 6 号培养基上除了有愈伤组织的出现外,还有不定芽的产生。生长素和细胞分裂素的不同配比可调控器官的发生,5 号和 6 号培养基上细胞分裂素比例较大,有利于不定芽的产生。防风的叶片接种约 7 d 后,部分叶片开始卷曲膨大,约 2 周后,在切口周围形成少量黄白色、质地紧密的愈伤组织(图 2)。未卷曲膨大的叶片,则变黄变褐,逐渐枯死。

由表 1 可看出,植物生长调节剂的种类和浓度组合对愈伤组织诱导的影响显著。在不添加任何激素的 1 号 MS 培养基上,防风茎段和叶片的出愈率均为 0。在不添加 2,4-D,单独使用 6-BA 的 2 号培养基上,茎段和叶片的出愈率也都为 0,而 2,4-D 单独使用时却有少量的愈伤组织出现,说明 2,4-D 是防风愈伤组织形成的关键因素。从表 1 可看出,防风茎段易诱导出愈伤组织,是防风组织培养较为合适的外植体。其中 11 号培养基上,即组合 2,4-D 2.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L 的出愈率最高,为 100%,其次是 8 号培养基,出愈率为

第一作者简介:张家菁(1987-),女,在读硕士,研究方向为植物生物技术及其育种应用。E-mail:zhangjj0721@126.com。

通讯作者:于元杰(1954-),男,硕士,教授,硕士生导师,现主要从事植物生物技术及其在育种上的应用研究工作。E-mail: yuanjie@sdau.edu.cn。

收稿日期:2010-11-19

91.7%。由方差分析可知,11号培养基与其它诱导培养基上的出愈率都达到了显著水平。叶片则在8号培养基,即在组合2,4-D 1.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L的诱导培养基上出愈率最高,为75%。由表1还可看出,在

2,4-D浓度一定的情况下,随着6-BA浓度的增大,茎段和叶片的出愈率都有所增加,但6-BA浓度较高时(2.0 mg/L),对愈伤组织的诱导却有一定的抑制作用。

表1 不同植物激素组合处理的愈伤组织诱导率

培养基编号	植物生长调节剂/mg·L ⁻¹		茎段			叶片		
	2,4-D	6-BA	外植体数/个	出愈数/个	出愈率/%	外植体数/个	出愈数/个	出愈率/%
1	0	0	24	0	0 h	24	0	0 g
2	0	0.5	24	0	0 h	24	0	0 g
3	0.5	0	24	3	12.5 g	24	1	4.2 g
4	0.5	0.5	24	15	62.5 f	24	10	41.7 e
5	0.5	1.0	24	17	79.2 bc	24	12	50.0 d
6	0.5	2.0	24	19	70.8 de	24	11	45.8 de
7	1.0	0.5	24	16	66.7 e	24	15	62.5 c
8	1.0	1.0	24	22	91.7 b	24	18	75.0 a
9	1.0	2.0	24	20	79.2 bc	24	17	70.8 b
10	2.0	0.5	24	18	75.0 cd	24	8	33.3 f
11	2.0	1.0	24	24	100.0 a	24	14	62.5 c
12	2.0	2.0	24	19	83.3 b	24	15	58.3 c

注:邓肯新复极差测验,不同字母表示差异显著(P=0.05%)。下同。

2.2 愈伤组织的继代培养

将愈伤组织转入继代培养基进行增殖。每次继代20 d,继代培养基激素组合如下。(1) 6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.75 mg/L;(2) 6-BA 1.5 mg/L+NAA 1.0 mg/L;(3) 6-BA 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L;(4) 6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.75 mg/L;(5) 6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L。愈伤组织在5种不同激素组合的MS培养基中,其增长速度和所得愈伤质量是不同的。3号培养基,即6-BA 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L的激素组合,愈伤增殖速度最快,愈伤质量最好,愈伤为黄绿色且质地紧密(图3)。在2号和4号培养基中,易变褐。5号培养基上,愈伤增殖速度次之。继代3次后,保留长势好的愈伤组织作进一步的分化试验。

2.3 愈伤组织分化结果

由表2可看出,愈伤组织在9种培养基上均有不同程度的分化。将愈伤组织接种到分化培养基上,1周后,愈伤组织开始变绿,愈伤组织表面逐渐出现绿色突起,2周后可以看见绿色的芽点,培养约1个月,有丛生芽形成(图4)。从表2可看出,不同激素组合对不定芽的诱导率影响显著。其中5号培养基的诱导效果最好,分化率达72%。经方差分析,5号培养基与其它处理间差异达显著水平。由表2还可看出,当6-BA和NAA浓度均适宜时诱导率较高,浓度过高或过低都会导致诱导率的下降。因此,MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L为最佳不定芽诱导培养基。试验中发现,在某些分化培养基上,对叶片诱导出的愈伤组织进行分化时,部分愈伤组织直接长出完整的植株,植株比较瘦小(图5)。说明由叶片诱导出的愈伤组织中含有胚性愈伤组织,为以后外源

激素诱导防风胚性愈伤组织的研究奠定了基础。

表2 不同激素组合对再生苗诱导的影响

培养基编号	植物生长调节剂/mg·L ⁻¹		再生苗分化率/%
	6-BA	NAA	
1	0.5	0.2	30.3 e
2	0.5	0.5	50.0 d
3	0.5	1.0	34.0 e
4	1.0	0.2	44.7 d
5	1.0	0.5	72.0 a
6	1.0	1.0	63.7 b
7	2.0	0.2	35.0 e
8	2.0	0.5	62.3 b
9	2.0	1.0	55.3 c

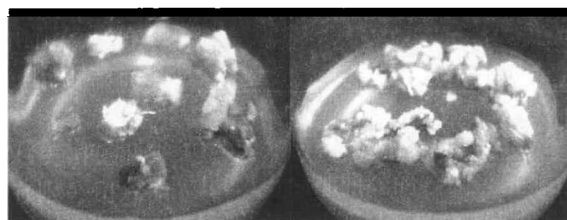


图1 幼嫩茎段开始形成愈伤组织

图2 幼嫩叶片开始形成愈伤组织

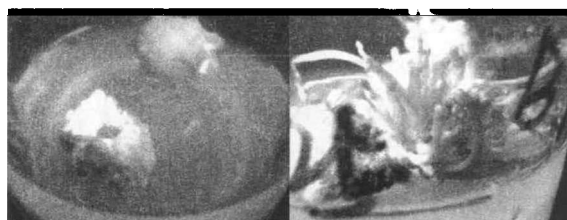


图3 茎段愈伤组织的继代培养

图4 分化形成的丛生芽



图5 防风叶片直接分化出的完整小植株

3 讨论与结论

3.1 组织培养中的褐化问题

褐化现象是植物组织培养中的三大难题之一,在组织培养过程中普遍存在。当外植体被切割时,破损的切面细胞中酚类物质被氧化成醌,使培养物的切面变成褐色而发生褐变。醌逐渐扩散到培养基中,抑制其它酶的活性,毒害整个组织^[3-5],使愈伤组织死亡。该试验发现,6-BA 浓度越高,褐化程度越高,具体机理还有待进一步的研究。将接种的材料置于黑暗条件下培养,对褐化的发生能起到一定的抑制效果。黑暗条件下,与褐化有关的酶减少,从而使褐化得到控制。低温能降低多酚氧化酶的活性,减少酚类化合物的合成,从而减轻褐化。暗培养中没有光线的直接照射,培养物表面的温度有所下降,从而减少了酚类化合物的合成,减轻褐化现象。试验中,通过提高转瓶速度,及时更换新的培养基,改善培养条件,有效的减轻了褐化现象的发生。

3.2 防风愈伤组织和再生苗的诱导及增殖

该研究利用防风的茎段和叶片均能诱导出愈伤组织,茎段的出愈率高且愈伤组织生长情况优于叶片愈伤组织。下一步试验将探讨其它外植体的组织培养情况,及防风再生体系的建立。

激素水平是影响防风组织培养的关键因素之一。该研究表明,2,4-D 对愈伤组织的诱导是必不可少的。在分化过程中,6-BA 起主要作用。孙红炜等^[6]认为适宜浓度的 6-BA 对愈伤组织分化有一定的促进作用,该研究表明 1.0 mg/L 6-BA 配合使用 0.5 mg/L NAA 可以促进愈伤组织分化,高浓度 6-BA (2.0 mg/L) 对愈伤组织分化存在抑制作用。生长素和细胞分裂素的比例调控器官的发生。在茎段愈伤组织的诱导时,可以通过提高细胞分裂素的比例直接诱导不定芽,进而建立防风的再生体系。生长素和细胞分裂素对防风体细胞胚的发生有一定的影响作用,可以通过调控两种激素的比例,来诱导防风胚性愈伤组织,加快防风的繁殖速度。

该研究筛选出的诱导茎段愈伤组织最佳培养基为:MS+2,4-D 2.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L,诱导叶片愈伤组织的最佳培养基为:MS+2,4-D 1.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L;最佳分化培养基为:MS+6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:中国医药科技出版社,2005(1):102.
- [2] 高咏莉. 生药防风的化学成分与药理作用研究进展[J]. 山西医科大学学报,2004,35(2):216-218.
- [3] 晏本菊,李焕秀. 梨外植体褐变与多酚氧化酶及酚类物质的关系[J]. 四川农业大学学报,1998,16(3):310-313.
- [4] 吴震先,韩冬梅,季作梁,等. SO_2 对贮藏龙眼果皮酶促褐变的影响[J]. 园艺学报,1999,26(2):91-95.
- [5] 张数鑫,周录英,于元杰,等. 穿上龙愈伤组织培养研究[J]. 中国农学通报,2005,21(7):77-78,114.
- [6] 孙红炜,尚佑芬,杨崇良,等. 影响玉米愈伤组织诱导和植株再生的有关因素研究[J]. 山东农业科学,2002(6):30-31.

Study on Callus Culture of *Saposhnikovia divaricata*

ZHANG Jia-jing, YU Yuan-jie

(College of Agronomy, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271018)

Abstract: Different explants were used to study the influence of different hormone combinations on callus induction and plant regeneration of *Saposhnikovia divaricata*. The results showed that stem was the optimal explant and the optimal medium for stem callus induction was MS medium adding 2.0 mg/L 2,4-D and 1.0 mg/L 6-BA on which the callus-forming rate could reach to 100%, and the optimal medium for leaf callus induction was MS medium adding 1.0 mg/L 2,4-D and 1.0 mg/L 6-BA on which the callus-forming rate could reach to 75%. The optimal medium for regenerated seedlings was MS medium adding 1.0 mg/L 6-BA and 0.5 mg/L NAA and the highest induction rate reached to 72%.

Key words: *Saposhnikovia divaricata*; calli; tissue culture