

颠茄植株再生体系的建立

邹利娟, 吴庆贵, 谢沐杉, 刘丹丽, 罗明华

(绵阳师范学院 生命科学与技术学院, 生态安全与保护四川省重点实验室, 四川 绵阳 621000)

摘要:以颠茄种子萌发的无菌苗为试材,采用组织培养方法,以MS为基本培养基,研究IAA、NAA、6-BA、KT对愈伤组织诱导及分化的影响,探索适宜颠茄愈伤组织诱导和分化的培养基。结果表明:在MS+KT 0.5 mg/L+6-BA 1.0 mg/L和MS+KT 1.0 mg/L+6-BA 0.5 mg/L培养基上,愈伤诱导率较高达100%,KT、6-BA添加生长素配比诱导愈伤组织效果不佳。KT单独诱导的愈伤组织宜在20 d后转接,KT和6-BA配合使用诱导出的愈伤组织宜在40 d后转接。生根适宜培养基为1/2MS+NAA 0.2~0.4 mg/L。该研究建立了颠茄的植株再生体系,为颠茄的组织培养提供了技术体系。

关键词:颠茄;愈伤组织;分化;植株再生

中图分类号:S 567.23⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)14-0102-04

颠茄(*Atropa belladonna*)属茄科属草本植物,原产于欧洲中南部及小亚细亚,20世纪30年代引进中国。颠茄全草入药,含颠茄碱、莨菪碱以及东莨菪碱等,莨菪碱和东莨菪碱是临床上广泛使用的2种基本药物,是我国药典规定的唯一莨菪碱类生物碱源植物^[1],可用于镇静、麻醉、止痛、镇痉等,近年来在戒除毒瘾和网瘾上取得了显著疗效^[2]。目前,国内对颠茄的研究多集中在药理和临床应用方面。通过构建颠茄特定基因的高效植物表达载体,通过遗传转化的方法提高颠茄中莨菪碱的产量方面有较为深入的研究^[3-5],组织培养方面尚鲜见报道^[6-7]。近年来野生颠茄资源受到严重破坏,对野生药材的产量和质量都造成不同程度的影响。植物组织培养技术体系是一种简单快捷并能保持优良性状的方法,可扩大颠茄资源量,为我国开发这一宝贵药用资源开辟了一条新途径。该研究利用颠茄种子萌发无菌苗的茎尖和茎段为外植体,系统的探讨了不同激素与浓度对比对愈伤组织及不定芽诱导的影响,选择出颠茄愈伤组织诱导、分化及生根的最佳培养基,从而建立了颠茄完整的植株再生体系,大大缩短了培养时间,提高了

增殖系数,降低了成本,为其建立简便、有效的大规模生产提供重要技术支持,同时也为保护其种质资源提供重要手段。

1 材料与方法

1.1 试验材料

颠茄种子于2013年实地采集于绵阳森林公园,种子经绵阳师范学院罗明华教授鉴定。

1.2 试验方法

1.2.1 无菌苗的获得 将成熟的颠茄果实挤出种子后,分别用自来水、无菌水冲洗干净备用。用75%的酒精消毒30 s,0.1% HgCl₂溶液灭菌5~7 min,无菌水冲洗5次,无菌滤纸吸去多余水分,接种到不加激素的MS培养基上进行萌发,培养条件为24℃,光照强度2 000 lx,光照时间为10 h/d。待植株长成2~3 cm高时备用。

1.2.2 不同细胞分裂素和生长素对比对颠茄愈伤组织诱导的影响 待植株长成2~3 cm高时,剪取顶芽和茎段并切碎,接种到MS培养基上,并按不同处理方案添加不同类型和浓度的IAA、6-BA、KT(表1),每处理培养10罐,每罐6~10个外植体,3次重复。高压(121℃)灭菌20 min。以上培养基均附加蔗糖(30 g/L)、琼脂(9 g/L)、pH 5.8,于24℃条件下进行培养。15 d后观察结果,并称取形成的愈伤量(g)。诱导率(%)=(诱导出愈伤组织的外植体数/接种的外植体数)×100%。

1.2.3 不同转接时间对不同愈伤组织分化不定芽的影响 选取质地较好的愈伤组织,分别在其形成20、40 d后将所选的愈伤组织切成约5 mm²的小块,转接到分化

第一作者简介:邹利娟(1983-),女,硕士,讲师,现主要从事植物生理及植物组织培养等研究工作。E-mail:ljzhou66@163.com.

责任作者:罗明华(1964-),男,博士,教授,现主要从事药用植物资源学等研究工作。E-mail:mhemei@126.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31100246);四川省科技厅资助项目(2013JY0078);四川省教育厅资助项目(13ZB0120, 13ZB0121);绵阳师范学院校级资助项目(2012A08, 2011A09)。

收稿日期:2015-01-22

培养基(图 1)上每罐转接 3 块愈伤组织,诱导不定芽的分化,20 d 后统计结果。

1.2.4 生根培养 待分化出的芽长到 1~2 cm 时,选择生长良好的单芽从基部切下,在添加 NAA 激素的 1/2MS 培养基上进行生根培养,每种培养基接种 30 个,重复 3 次,20 d 后统计结果。

1.3 数据分析

试验数据采用统计软件 SPSS 13.0 进行分析。

2 结果与分析

2.1 不同细胞分裂素和生长素对比对颠茄愈伤组织诱导的影响

由表 1 可知,不同细胞分裂素和生长素配比均诱导形成了愈伤组织。当 6-BA 与 KT 浓度一定时,IAA 浓度的增加降低了愈伤组织诱导率。且细胞分裂素与生长素配比中愈伤组织量较少,总体上看,细胞分裂素与生长素配比诱导愈伤组织效果不佳。当单独使用细胞分裂素诱导愈伤组织时,均诱导形成愈伤组织,其中单独使用 KT 诱导的愈伤组织数量较多,由表 1 可知,KT 对愈伤量影响较大,且随着 KT 浓度增加,愈伤量增加。单独使用 6-BA 诱导率偏低,且愈伤量少,从愈伤组织颜色上看,6-BA 诱导的愈伤组织质地好,颜色为绿色或浓绿色,说明 6-BA 对形成愈伤组织的颜色有一定的影响。总之,单独使用细胞分裂素诱导的愈伤组织,无论从愈伤质地还是从愈伤量上,诱导的效果都比使用细胞分裂素配比生长素的效果好。当 KT 0.5 mg/L+6-BA 1.0 mg/L 和 KT 1.0 mg/L+6-BA 0.5 mg/L 愈伤组织诱导率为 100.0%,愈伤组织质地较好,愈伤量较大,为浓绿色致密。

表 1 不同细胞分裂素和生长素对比对颠茄愈伤组织诱导的影响

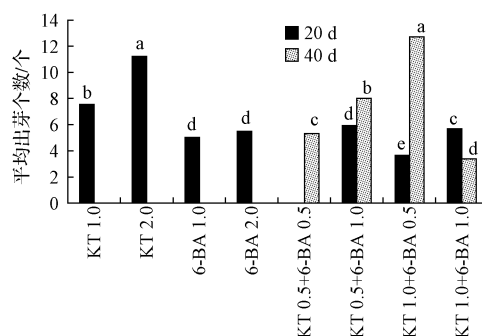
激素种类 /(mg·L ⁻¹)	诱导率 /%	愈伤 质地	愈伤量 /g
6-BA 1.0+IAA 1.5	62.9 ^g	绿色致密	0.25 ^f
6-BA 2.0+IAA 1.5	78.3 ^e	绿色致密	0.27 ^f
6-BA 1.0+IAA 3.0	52.4 ^h	绿色致密	0.21 ^g
6-BA 2.0+IAA 3.0	74.1 ^{ef}	绿色致密	0.24 ^f
KT 3.0+IAA 1.5	81.2 ^d	浅绿色致密	0.32 ^e
KT 3.0+IAA 3.0	72.4 ^{ef}	浅绿色致密	0.36 ^d
KT 4.0+IAA 1.5	85.2 ^c	浅绿色致密	0.39 ^d
KT 4.0+IAA 3.0	71.8 ^f	浅绿色致密	0.37 ^d
KT 1.0	80.2 ^d	浅黄绿色致密	0.52 ^a
KT 2.0	85.4 ^c	浅黄绿色致密	0.56 ^a
6-BA 1.0	78.9 ^e	绿色致密	0.31 ^e
6-BA 2.0	81.3 ^d	绿色致密	0.35 ^d
KT 0.5+6-BA 0.5	92.2 ^b	浓绿色致密	0.45 ^c
KT 0.5+6-BA 1.0	100.0 ^a	浓绿色致密	0.51 ^b
KT 1.0+6-BA 0.5	100.0 ^a	浓绿色致密	0.46 ^c
KT 1.0+6-BA 1.0	90.1 ^b	浓绿色致密	0.42 ^c

注:相同小写字母表示数据间无显著差异 ($P>0.05$)。

2.2 不同转接时间对不同愈伤组织分化不定芽的影响

由图 1 可知,2.0 mg/L 的 KT 诱导的愈伤组织 20 d 后转接,平均出芽数为 11.23 个,分化出的不定芽茎秆粗壮。6-BA 诱导的愈伤组织 40 d 后转接,分化能力与 KT 相比较弱,分化出的丛生芽苗部分呈现玻璃化,且基部伴随不定根生成(图 3-A),当 6-BA 浓度为 2.0 mg/L 时,平均出芽数为 5.49 个,分化出的不定芽茎秆纤细。KT 1.0 mg/L+6-BA 0.5 mg/L 时诱导的愈伤组织 40 d 后转接,平均分化芽数最高,达 12.72 个,显著高于其它处理,和其它处理均存在显著差异。KT 2.0 mg/L 20 d 后转接和 KT 1.0 mg/L+6-BA 0.5 mg/L 40 d 后转接诱导出的愈伤组织,分化出的不定芽数,相差不大,不存在显著差异。综上所述,KT 单独诱导的愈伤组织宜在 20 d 后转接,KT 和 6-BA 配合使用诱导出的愈伤组织宜在 40 d 后转接。

将诱导出不定芽的愈伤组织切割成 1 cm×1 cm 的方块(图 3-B),转接到丛生芽的增殖培养基 KT 1.0 mg/L+6-BA 0.5 mg/L 中,在此培养基上继续进行增殖培养可获得大量不定芽(图 3-C)。



注:各处理间的激素浓度均为 mg/L;相同的字母表示数据间无显著差异 ($P>0.05$)。

图 1 转接时间对不同愈伤组织分化芽数的影响

2.3 丛生芽的生根培养

从图 2 可以看出,供试的培养基均能诱导颠茄生根,在未添加任何生长素的 1/2MS 培养基上也可诱导生根,但诱导率较低;生根率随着 NAA 浓度的增加而增加,当 NAA 浓度为 0.2 mg/L 或 0.3 mg/L 时,生根率可达 100%,平均根数在 NAA 浓度为 0.2~0.4 mg/L 时,无显著差异;当 NAA 浓度高于 0.4 mg/L 时,生根率和平均根数随着浓度的增加而降低。结合根生长情况,综上所述,生根最佳培养基为 1/2MS+NAA 0.2~0.4 mg/L,根生长状况良好(图 3-D)。当苗在生根培养基中根长至约 3 cm 时,小心洗净根部琼脂,移栽至混合基质上(草炭:蛭石=2:1),浇足水,成活率达 100%,且植株生长良好。

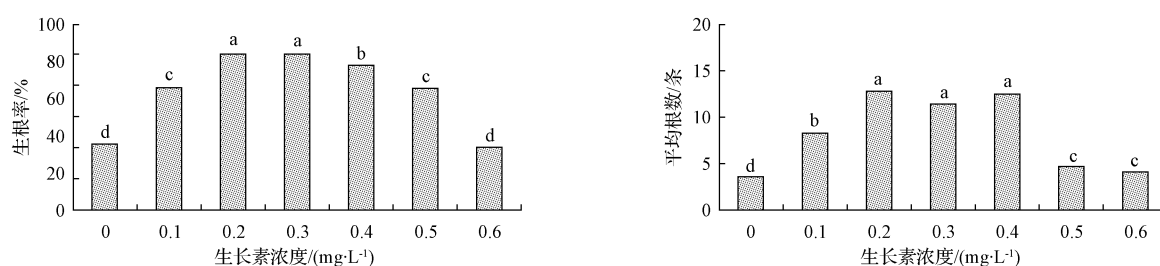
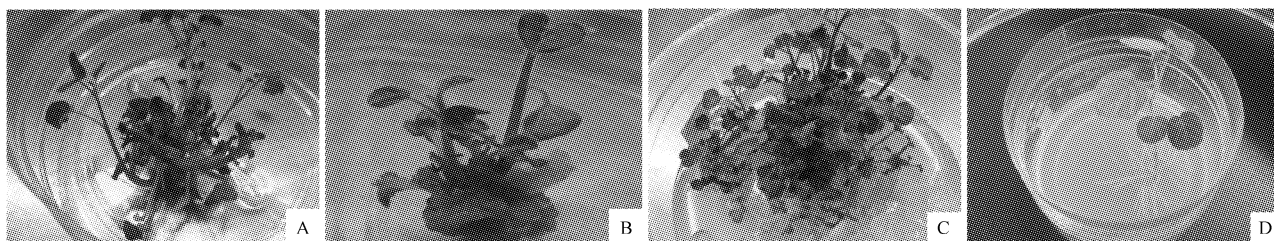


图2 不同培养基和生长素对颠茄生根培养的影响



注:A. 部分玻璃化的丛生芽、基部有根生出;B. 诱导出丛生芽的愈伤组织;C. 大量增殖的丛生芽;D. 颠茄的生根培养。

图3 颠茄的不定芽及生根

3 讨论

在植物组织培养过程中,以茎尖或茎段为外植体进行离体繁殖,方法简便,繁殖快速,成功率高,是目前快速繁殖中最常用的方式,已广泛应用于农林果树和药用植物的离体快繁^[8-9]。但有所不同的是,该试验采用茎尖和茎段为外植体,是将茎尖和顶芽切碎接种到培养基中诱导愈伤组织形成,并非直接将茎尖和茎段切割成1 cm左右培养,从培养时间上看,培养时间短,仅需15 d就可以培育出愈伤组织;产生的愈伤组织量多,最多可达0.56 g;此种方法处理外植体,缩短了培养时间,降低了成本,为其它物种的组织培养奠定了一定的基础。

在组织培养中,人为添加植物激素(包括细胞分裂素和生长素)将调节和影响细胞的生长和分化及组织形态的形成,内、外源激素共同作用下将决定植物细胞总的生长状态。诱导愈伤组织是植物组织培养中的关键,一般来说,愈伤组织的诱导需要较高水平的生长素^[10],但该研究结果表明,生长素的添加对愈伤组织的形成效果不佳,在含有2种细胞分裂素6-BA和KT的培养基上,形成的愈伤组织质地较好,愈伤组织量较多,其中细胞分裂素KT对愈伤量的影响较大,且随着KT浓度的增加,愈伤量增加。而在添加了生长素的培养基上,愈伤组织在质地和产量上均不好。细胞分裂素KT在颠茄不定芽分化中也起着至关重要的作用,因此,寻找适宜的生长调节物质种类及配比对颠茄愈伤组织诱导及

分化非常重要。

利用组织培养技术能生产优质的种苗,但组培苗能否在生产上迅速应用推广,与其移栽的成活率、培养成本等有密切关系。该试验结果表明颠茄容易诱导愈伤组织及丛生芽分化,通过增殖和生根培养能产生大量优质种苗,移栽成活率可达100%。因此,该技术体系生产的组培苗具有扩繁系数大、成活率高、成本低等优点,可在生产上规模化。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(第一部)[M]. 北京:化学工业出版社,2005:262,284,655.
- [2] 汪开始. 有毒药用植物颠茄[J]. 植物杂志,2003(2):26-27.
- [3] 杨春贤,周启贵,陈敏,等. PMT和H6H双基因共转化颠茄发根的植株再生[J]. 中草药,2007,38(10):1548-1551.
- [4] 杨春贤,陈敏,廖志华,等. 基于颠茄发根的外源基因表达系统的建立[J]. 园艺学报,2006,33(5):1103-1105.
- [5] 成瑜,杨春贤,王贵君,等. 颠茄PMT TR1和H6H基因植物高效表达载体的构建[J]. 安徽农业科学,2010,38(14):7211-7213.
- [6] 李慧,吴松,孙其文,等. 颠茄的离体培养与快速繁殖研究[J]. 北方园艺,2007(12):192-194.
- [7] 聂振朋,温明霞,李晓林,等. 颠茄的组织培养与快速繁殖[J]. 江苏农业科学,2006(1):106-107.
- [8] 刘金英,徐有明,李双来,等. 佛手薯蓣的组织培养技术研究[J]. 植物研究,2006,26(3):323-328.
- [9] 王雯雯,马秋月,朱俊义,等. 苞叶杜鹃的快速繁殖和种质保存技术研究[J]. 植物研究,2009,29(2):198-203.
- [10] 谭文澄,戴策刚. 观赏植物组织培养技术[M]. 北京:中国农业出版社,1996:265-268.

链格孢属小孢子种 ISSR 和 RAPD-PCR 最佳反应体系的建立

刘振亚¹, 熊仁次^{1,2}, 朱天生^{1,2}

(1. 塔里木大学 植物科学学院, 新疆 阿拉尔 843300; 2. 新疆农业有害生物综合治理重点实验室, 新疆 阿拉尔 843300)

摘 要:以 13 个链格孢属小孢子种菌株为试材, 采用正交实验设计的方法, 研究 Mg^{2+} 、dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶和引物 4 个因素在 4 个水平上对链格孢属小孢子种的 ISSR 和 RAPD 反应体系的影响。结果表明:链格孢属小孢子种 ISSR 和 RAPD 的最佳反应体系为 25 μ L 的 ISSR-PCR 反应体系中, $10\times$ PCR Buffer 2.50 μ L, Mg^{2+} 浓度为 2.50 mmol/L, dNTPs 浓度为 0.10 mmol/L, 引物浓度为 0.30 μ mol/L, *Taq* DNA 聚合酶用量为 1.25 U; 在 RAPD-PCR 反应体系中, $10\times$ PCR Buffer 2.50 μ L, Mg^{2+} 浓度为 2.00 mmol/L, dNTPs 浓度为 0.15 mmol/L, 引物浓度为 0.60 μ mol/L, *Taq* DNA 聚合酶用量为 1.25 U; 在此基础上, 对最佳反应体系的退火温度进行了筛选确定; 在确定退火温度后, 采用最佳反应体系, 用 ISSR 引物 UBC808 和 RAPD 引物 OPE07 进行稳定性和通用性验证, 结果表明该优化反应体系具有较好的稳定性和通用性。

关键词:链格孢属小孢子种; ISSR; RAPD; 正交设计; 体系优化

中图分类号:S 432.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)14-0105-06

红枣作为环塔里木盆地治理塔克拉玛干沙漠防风固沙的经济林树种, 明显改善了当地的生态环境, 扬沙

第一作者简介:刘振亚(1987-), 男, 硕士研究生, 研究方向为果树病理学。E-mail: liuzhenya_sm@126.com.

责任作者:朱天生(1974-), 男, 硕士, 副教授, 现主要从事植物病理学等研究工作。E-mail: ztszky@163.com.

基金项目:兵团产学研重大合作科技专项资助项目(2013AA001-1); 北京市援助和田科技攻关资助项目(201106)。

收稿日期:2015-01-22

扬尘天气减少, 空气湿润度增加, 空气质量得到改善, 同时整个红枣产业链的发展, 能够带动当地的就业, 促使南疆各族人民的的生活质量提高, 将会进一步改善边疆社会稳定的现状。但近几年, 由链格孢属小孢子种引起的黑斑病、缩果病等病害发生越来越严重, 造成了较大的经济损失, 而目前有关这些病害的病原种级分类是不确定的, 给该类病害的防治工作带来一定的困难, 因此对链格孢属小孢子种病原种级分类单位的准确鉴定显得尤为重要。但是种级分生孢子具有多型现象, 特别是小

Establishment of Regeneration System of *Atropa belladonna*

ZOU Lijuan, WU Qinggui, XIE Mushan, LIU Danli, LUO Minghua

(Ecological Security and Protection Key Laboratory of Sichuan Province, College of Life Science and Technology, Mianyang Normal University, Mianyang, Sichuan 621000)

Abstract: Taking seedlings of *Atropa belladonna* as explants, by tissue culture methods, MS as basic culture medium with different concentrations of IAA, NAA, 6-BA and KT were used to establish the optimal media for callus induction and differentiation. The results showed that 100% of calli induction rate was obtained on MS medium with KT 0.5 mg/L + 6-BA 1.0 mg/L and KT 1.0 mg/L + 6-BA 0.5 mg/L. Calli could not be induced on MS medium with the combination of auxin and KT or 6-BA. The induced calli on MS media with KT or KT with 6-BA were subcultured optimally at 20 days and 40 days. 1/2MS + NAA 0.2–0.4 mg/L was the optimal medium for plants' rooting. This study would provide the technological system of tissue culture for *Atropa belladonna* regeneration.

Keywords: *Atropa belladonna*; callus; differentiation; plant regeneration