

西洋参胚轴愈伤组织诱导培养条件研究

胡选萍^{1,2}

(1. 陕西理工学院 生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723000; 2. 陕西省资源生物重点实验室, 陕西 汉中 723000)

摘 要:以汉中西洋参萌胚种子为试材,研究了不同培养条件对西洋参胚轴外植体脱分化愈伤诱导的效果。结果表明:不同培养条件下西洋参胚轴外植体脱分化启动与愈伤组织诱导效果存在明显差异($P < 0.01$);西洋参胚轴外植体的愈伤组织诱导存在“集体式”快速脱分化与“个体式”逐步积累脱分化2种基本方式。当培养条件为MS+2,4-D 3.0 mg/L+NAA 2.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L,西洋参胚轴外植体脱分化诱导愈伤组织效果相对最佳。

关键词:西洋参;胚轴;愈伤组织;培养条件

中图分类号:S 567.5⁺3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)11-0097-04

西洋参(*Panax quinque folium* L.)属五加科人参属(Araliaceae)多年生草本植物,原产美洲,后引入中国北京、吉林、陕西、山东等地栽培^[1]。我国自20世纪80年代成功大面积引种西洋参以来,已发展成为继美国、加拿大后世界第三大西洋参生产国和世界第一大消费国。西洋参中含有皂苷、多糖、黄酮类等多种化学活性物质^[2],由于其对人体有补益作用,在免疫调节、抗癌与抗衰老等方面的效果尤为独特,因此常用于保健药物与食品加工^[3]。目前利用西洋参愈伤组织细胞培养生产有效代谢产物已有相关报道^[4-5],但是由于西洋参初始愈伤组织的品质与特性差异,往往生产量偏低,很难满足实际需要。根据西洋参种子胚的胚轴愈伤组织形成相对较快且品质较好的特点^[6],现以汉中留坝西洋参胚轴为试材,分析不同培养条件对西洋参胚轴外植体脱分化启动与愈伤诱导的效应方式与效应大小,为提升西洋参愈伤组织诱导效率,促进其大规模细胞悬浮培养生产有效次生代谢产物提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验以从陕西汉中留坝西洋参栽培地区当年采集并在沙土中保藏良好的成熟西洋参种子作为基础研究试材。

1.2 试验方法

1.2.1 材料预处理 挑选沙土中保藏的饱满、圆润并出现裂口的露胚西洋参种子,去掉外种皮,用自来水冲洗

掉供材表面杂质,并在流水下冲洗1~2 h。在超净工作台上,对去种皮西洋参种子采用乙醇与升汞配合消毒。70%的乙醇漂洗30 s,0.1%的升汞浸泡10 min,并用无菌蒸馏水冲洗5~6次。将经过消毒处理的西洋参去皮种子接种在MS+GA₃ (2.0 mg/L)的培养基上,每个三角瓶中接种15个外植体,(25±2)℃培养20 d。

1.2.2 愈伤组织诱导培养条件筛选 以MS为基本培养基,内含蔗糖30 g/L,琼脂粉6 g/L,附加以不同种类与浓度配比的激素。其中2,4-D选择1.0、2.0、3.0 mg/L 3个水平,NAA选择1.0、2.0、3.0 mg/L 3个水平,IBA选择0、0.5、1.0 mg/L 3个水平,6-BA选择0、0.5、1.0 mg/L 3个水平,按照L₉(3)⁴正交表设计9种激素组合配比(表1),调节pH为5.8。无菌操作条件下,在铺有滤纸的培养皿中将西洋参胚轴切分为长度约为0.5 cm的切段,随机接种在试验设计的9种培养基中,在光照强度1500~2000 lx,温度(25±2)℃,相对湿度50%~60%条件下培养,定期统计外植体膨大数与出愈数,并依此计算出相应的二级变量。膨大率=膨大外植体数/接种外植体总数×100%;膨大速度=(M_x-M_y)/[(X-Y)×K];M_x代表第X天膨大的外植体数,M_y代表第Y天膨大的外植体数,K代表接种外植体总数。出愈率=诱导出愈组织的外植体数/接种外植体总数×100%;出愈速度=(N_x-N_y)/[(X-Y)×K];N_x代表第X天出愈的外植体数,N_y代表第Y天出愈的外植体数,K代表接种外植体总数。

1.3 数据分析

采用SPSS 16.0 统计分析软件对试验数据进行单因素方差分析,探索不同培养条件对西洋参胚轴愈伤组织诱导的效应方式与效应大小。

作者简介:胡选萍(1975-),女,硕士,讲师,现主要从事植物细胞工程研究工作。E-mail:huxuanping@163.com。

基金项目:陕西省教育厅重点实验室科研计划资助项目(09JS048)。

收稿日期:2013-01-17

表 1 西洋参胚轴愈伤组织诱导正交实验设计

Table 1 The theoretical experiment on callus induction from embryonic axis

培养基编号 No. of medium	激素组合配比 Growth-regulator category and concentration			
	2,4-D /mg · L ⁻¹	NAA /mg · L ⁻¹	IBA /mg · L ⁻¹	6-BA /mg · L ⁻¹
1	1.0	1.0	0	0
2	1.0	2.0	0.5	0.5
3	1.0	3.0	1.0	1.0
4	2.0	1.0	0.5	1.0
5	2.0	2.0	1.0	0
6	2.0	3.0	0	0.5
7	3.0	1.0	1.0	0.5
8	3.0	2.0	0	1.0
9	3.0	3.0	0.5	0

2 结果与分析

2.1 不同培养条件下西洋参胚轴愈伤诱导基本情况

将西洋参胚轴接种到试验设计的不同培养基后,外植体组织细胞逐渐脱分化,第3天部分外植体出现明显可见膨大,第7天外植体膨大比较普遍,同时茎段表面呈现紫色色素积累,随着培养时间的延长与愈伤组织的形成色素逐渐消退。对于不同试验处理,胚轴外植体膨大效果与愈伤诱导方式不尽相同。多数情况下,胚轴一端膨大或两端同时膨大,膨大部位逐渐脱分化形成愈伤组织;少数外植体并无明显膨大,但在外植体切口处直接形成愈伤组织。从总体上而言,胚轴愈伤组织形成速度相对较快,大约7~10 d左右在胚轴一端或两端形成乳白色或淡绿色愈伤组织,且质地疏松。不同试验处理条件下,外植体的膨大比率、膨大速度、愈伤诱导率与愈伤形成速度等差异较大(表2)。

表 2 不同培养条件西洋参胚轴外植体愈伤组织诱导

Table 2 Callus induction of embryonic axis under different culture conditions

编号	接种数	7 d 膨大	14 d 膨大	14 d 出愈数	35 d 出愈数	出愈位置	愈伤生 长量
1	17	2	12	9	14	一端	+
2	19	3	10	6	10	多在两端	+
3	18	5	14	12	18	一端或两端	++
4	18	3	9	7	18	一端或两端	++
5	24	6	9	8	12	多在两端	++
6	19	6	19	18	18	一端或两端	+++
7	18	1	8	16	17	多在两端	+
8	22	13	22	21	22	一端或两端	+++
9	24	4	20	14	20	一端	++

2.2 不同培养条件对西洋参胚轴外植体膨大的效应

膨大是外植体对特定培养条件所作出的最初的形态反应特征,它在一定程度上反映外植体细胞启动脱分化的潜力与能力。以不同培养条件为自变量,分别以膨大率与膨大速度为因变量作单因素方差分析,结果见表3。

表 3 不同培养条件对西洋参胚轴膨大效应的 F 检验

Table 3 F test of different culture mediums having on the expanding of embryonic axis explant

单因素	膨大率				膨大速度			
	平方和	均方	F	P 值	平方和	均方	F	P 值
组间变异	0.574	0.072	64.661	0.000	0.005	0.072	18.229	0.000
组内变异	0.010	0.001			0.000	0.000		
总变异	0.584				0.006			

由表3可知,培养条件对西洋参胚轴膨大启动脱分化的效应极其显著($F=64.661, P<0.01$),即在不同培养条件下,西洋参胚轴外植体膨大率存在明显的差异。从各个处理的培养效果对比分析,8号处理条件下胚轴外植体膨大效果最好,可以达到外植体的完全脱分化,即膨大率为100%(图1)。培养条件对西洋参胚轴膨大速度这个因变量,也表现出类似的显著性效应($F=18.229, P<0.01$),其中处理9的膨大速度相对最快(0.105个/d)。另外,从总体上看,西洋参胚轴膨大效应的静态指标(膨大率)与动态指标(膨大速度)之间并未表现出较好的一致性。例如8号膨大率达到最大,但膨大速度却处在相对较低水平;相反,9号处理虽然膨大率方面并未表现出明显优势,但是膨大速度却达到最高效应水平。

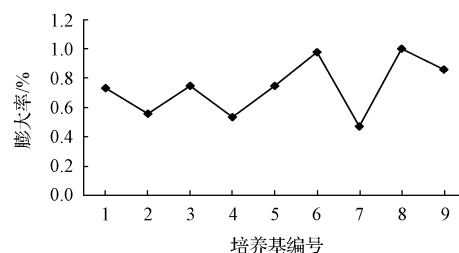


图 1 不同培养条件下西洋参胚轴的膨大率

Fig. 1 The rate of expanding under various conditions

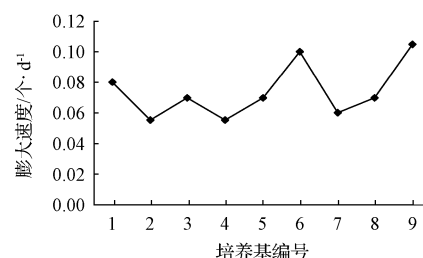


图 2 不同培养条件下西洋参胚轴膨大速度

Fig. 2 Expanding velocity under various conditions

2.3 不同培养条件对西洋参胚轴出愈率的影响

出愈率是衡量外植体愈伤组织诱导效果的一项重要指标,它能够从数量角度确定愈伤组织发生的最佳条件^[7];出愈速度则是从动态变化的角度来衡量外植体愈伤形成与积累快慢程度。以不同培养条件为自变量,以

出愈率与出愈速度为因变量,进行单因素方差分析,研究培养条件对西洋参胚轴外植体的效应大小(表4)。

表4 不同培养条件对西洋参胚轴愈伤诱导效应的F检验

Table 4 F test of different culture mediums having on the inducing of callus from embryonic axis

单因素	愈伤诱导率				平均出愈速度			
方差分析	平方和	均方	F	P值	平方和	均方	F	P值
组间变异	0.439	0.055	21.801	0.000	0.003	0.000	54.079	0.000
组内变异	0.023	0.003			0.000	0.000		
总变异	0.462				0.003			

由表4可知,不同培养条件对西洋参胚轴外植体出愈率与出愈速度的效应极其显著($F=21.801, P<0.01$; $F=54.079, P<0.01$),图3、4则直观地反映出这种外植体脱分化诱导愈伤组织的差异性表现。从总体上看,除2号与5号处理之外,其它激素组合培养条件下西洋参种子胚轴的外植体出愈率均在85%以上,由此可见,西洋参胚轴外植体相对比较容易脱分化,是愈伤组织诱导的良好材料来源。但是,以动态变化为主要特征的平均出愈速度与出愈率之间并未表现出良好的一致性,表现出明显的“反差”状态。例如,8号处理出愈水平非常高,出愈率达到97.5%,即在合适培养条件下几乎可以全部启动脱分化形成愈伤组织,但是其出愈速度却表现出极低的水平状态(0.01个/d)。

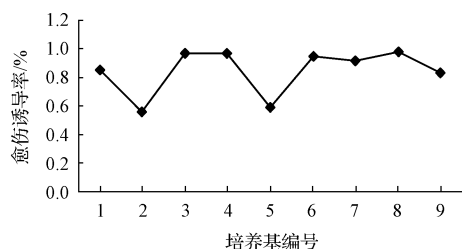


图3 不同培养条件下西洋参胚轴的外植体出愈率

Fig. 3 The rate of callus induction from embryonic axis

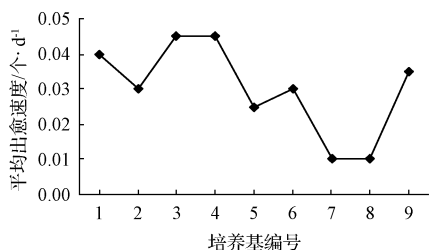


图4 不同培养条件下西洋参胚轴的平均出愈速度

Fig. 4 Callus induction velocity of embryonic axis

3 讨论

愈伤组织的诱导形成是西洋参离体组织培养过程中脱分化并进一步分化成苗的关键环节。相关研究报道植物生长物质对植物离体培养中的细胞分化和形态建成具

有明显的调节作用^[8],尤其是生长素类和细胞分裂素类的平衡对于诱导原基的形成非常重要^[9-10]。现以2,4-D、NAA、IBA与6-BA 4种生长调节因子为自变量,每个变量选择3个水平进行正交实验设计,分析不同培养条件对西洋参胚轴外植体脱分化诱导的效应程度与效应大小。结果表明不同培养条件下西洋参胚轴外植体脱分化启动与愈伤组织诱导效果存在明显差异,这也为外植体脱分化合适条件的选择提供了前提。在西洋参胚轴愈伤组织诱导过程中,外植体的静态出愈率与动态出愈速度之间表现出明显的“反差”状态,可能是由于在该处理条件下西洋参胚轴外植体,启动脱分化非常迅速,外植体几乎全部在短时间内“集体式”快速完成脱分化过程,而后脱分化外植体数目始终处于一个相对稳定状态,因此出愈速度表现出相对较低水平。而对于3号与4号处理则表现出愈伤组织诱导的另外一种情形:出愈率高水平(95%以上),出愈速度也处于高水平状态。这种“高度一致”状态在一定程度上反映出愈伤组织诱导的另外一种方式:外植体启动脱分化相对较缓,其脱分化表现出“个体式”积累性增长完成脱分化过程,一段时间内脱分化外植体数目前后变化较大,因此表现出相对较高的动态出愈速度。由于“集体式”脱分化方式,在短时间内快速形成大量的目标产物,因此能够很好地满足植物快速增殖与规模扩繁的宏观要求,加之进一步结合西洋参胚轴愈伤组织自身的积累与生长量状态,可以得出8号处理是西洋参胚轴启动脱分化的合适条件,即当培养条件为MS+2,4-D 3.0 mg/L+NAA 2.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L时,西洋参胚轴外植体脱分化诱导愈伤组织效果最佳。

参考文献

- [1] Liu T C. Introduction and cultivation of American ginseng in China[J]. J Chin Med Mater, 1990, 13: 42-45.
- [2] 王蕾,王英平,许世泉,等. 西洋参化学成分及药理活性研究进展[J]. 特产研究, 2007(3): 73-75.
- [3] 黄亚伟,王加华, Jacqueline J Shan, 等. 近红外光谱测定人参西洋参的主要皂甙总量[J]. 分析化学, 2011(3): 377-381.
- [4] 张美萍,王义,孙春玉,等. 不同培养基及其元素组成对西洋参愈伤组织悬浮培养物生长和皂苷含量的[J]. 植物资源与环境学报, 2003, 12(2): 14-16.
- [5] 张美萍,王义,孙春玉,等. 西洋参愈伤组织悬浮培养物细胞分化与皂苷合成关系的研究[J]. 核农学报, 2004, 18(2): 152-154.
- [6] 胡选萍,曹小勇,秦公伟,等. 西洋参不同外植体诱导愈伤组织研究[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(3): 48-50.
- [7] 胡选萍. 山药不同外植体诱导愈伤组织研究[J]. 江苏农业科学, 2009(4): 75-76.
- [8] 吕冬霞,曲长福. 植物生长调节剂对愈伤组织培养的影响[J]. 北方园艺, 2004(5): 68.
- [9] 朱青松,梅康凤,王沙生. 外源生长素对烟草髓愈伤组织分化和内源IAA含量的影响[J]. 北京林业大学学报, 1999, 12(1): 22-25.
- [10] 熊国胜,李家洋,王永红. 植物激素调控研究进展[J]. 科学通报, 2009, 54(18): 2718-2733.

尖孢镰孢菌番茄专化型的鉴定研究

王小哲, 高增贵, 张 硕, 周艳波, 王 敏, 孔婷婷

(沈阳农业大学 植物免疫研究所, 辽宁 沈阳 110866)

摘 要:以 27 株镰孢菌菌株为试材, 采用菌株形态学观察、rDNA-ITS 序列分析以及寄主专化型鉴定相结合的方法, 鉴定了尖孢镰孢菌番茄专化型。结果表明: 经形态学和 rDNA-ITS 测序筛选, 最后筛选出 10 株尖孢镰孢菌。将尖孢镰孢菌交叉接种到不同寄主植物, 确定菌株编号 YH070001 和 DL070009 的镰孢菌为尖孢镰孢菌番茄专化型。与单一的传统方法相比, ITS rDNA 方法有着较高的灵敏度, 所以采取形态学、现代分子生物学以及传统交叉接种相结合的鉴定方式, 能够使菌株专化型的鉴定更加准确、完善。

关键词:尖孢镰孢菌; 番茄枯萎病; rDNA-ITS; 交叉接种

中图分类号:S 436.412.1⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)11-0100-04

番茄枯萎病是由枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. *lycopersici*(sacc)snyder et Hansen)引起的一种维管束素疾病^[1]。病原为半知菌亚门镰孢属的番茄萎蔫病菌。自 20 世纪初发现番茄枯萎病以来, 现已遍及世界各地, 使番茄生产受到严重影响, 成为番茄生产上的重要病害。据国外研究报道, 番茄枯萎病菌主要存在 2 个生理小种^[2-4]。1 号生理小种和 2 号生理小种广泛分布于美

国大部分地区以及以色列、日本、加拿大、澳大利亚等地, 我国以 1 号生理小种为主, 且在我国的黑龙江、辽宁、山东、四川、广西等省市地区普遍发生。近年来番茄枯萎病在辽宁省有蔓延的势头, 其中在辽阳、辽中、开原、义县等地发生严重。番茄枯萎病在苗期即可染病, 染病初期幼苗明显矮化, 叶片尚不萎蔫^[5]。在开花结果期始发, 病初期致一侧叶片发黄, 变褐后枯死, 剖开病茎, 维管束变褐。番茄枯萎病菌的专化性极强, 只危害番茄。目前, 番茄枯萎病主要采取综合防治措施, 其中生物防治方法与施用化学农药带来的环境污染和农药残留问题相比, 具有安全、经济、高效等优势^[6]。

目前 rDNA-ITS 序列分析已用于镰孢菌的分子鉴定^[7-8]。随着分子生物学的发展, 分子生物学方法越来越多地被应用于真菌系统学研究和分类鉴定, 其中核糖体基因(rDNA)序列分析已被应用于真菌各个等级水平

第一作者简介:王小哲(1986-), 男, 硕士, 研究方向为蔬菜病害。E-mail: wangxiaoxi1986@163.com.

责任作者:高增贵(1966-), 男, 内蒙古准格尔旗人, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向为玉米病害和蔬菜病害生物防治。E-mail: gaozenggui@sina.com.

基金项目:辽宁省科技攻关资助项目(2011214002); 沈阳市科技攻关专项资助项目(F12-119-3-00)。

收稿日期:2013-01-17

Study on Culture Conditions of Callus Induction from Embryonic Axis Explants of *Panax quique folium* L.

HU Xuan-ping^{1,2}

(1. College of Biological Science and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong, Shaanxi 723000; 2. Shaanxi Key Laboratory of Bio-resources, Hanzhong, Shaanxi 723000)

Abstract: Taking the seeds of *Panax quique folium* L. as materials, the effect that different culture conditions exerted on the callus induction from embryonic axis explants of *Panax quique folium* L. were studied. The results showed that culture conditions had significant influence on callus induction from embryonic axis explants ($P < 0.01$). The two ways that embryonic axis were fast 'community' and slow 'individuality' respectively. Moreover, it took the best effect of callus induction when the culture condition was MS+2,4-D 3.0 mg/L+NAA 2.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L.

Key words: *Panax quique folium* L.; embryonic axis; callus; culture conditions