菘蓝叶片离体培养与试管无性系的建立

陈秋芳，黄群策，秦广雍
（郑州大学 河南省离子束生物工程重点实验室，河南 郑州 450052）

摘要：以菘蓝幼嫩叶片为外植体，研究了不同激素及其组合对菘蓝离体叶片的分化方向及不定芽诱导效率的影响，建立了菘蓝叶片高效不定芽发生、植株再生体系。结果表明，在 MS 基本培养基中单纯添加 2，4－D，不能诱导离体叶片发生不定芽，只诱导愈伤组织发生。如果在 MS 基本培养基中加入 2，4－D 和 6－BA，也无不定芽发生，而添加 NAA 和 6－BA，可以诱导其发生不定芽。在激素组合为 NAA 1.0mg/L＋6－BA 0.5mg/L 时，不定芽的诱导率达到 95％，在单纯加入 NAA 1.0mg/L的 MS 基本培养基上，菘蓝叶片也可以发生不定芽，不定芽诱导率为 93％，且不定芽生长健壮，不易老化，经过一段时间的培养可以直接生根并移栽成活。

关键词：菘蓝；离体叶片培养；不定芽；再生
中图分类号：S567.9　　文献标识码：A　　文章编号：1004－3268(2007)12－0098－03

Regeneration System and *in Vitro* Culture of Leaves from *Isatis indigotica* Fort.

CHEN Qiu-fang，HUANG Qun-ce，QIN Guang-yong
(Henan Provincial Key Laboratory of Ion Beam Bio-engineering，Zhengzhou University，Zhengzhou 450052，China)

Abstract: High frequent adventitious shoot formation and plant-let regeneration system was established through *in vitro* culture of *Isatis indigotica* Fort. leaves. The results showed that leaf adventitious shoots could not be induced on basal MS medium only supplemented with 2，4－D or 2，4－D and 6－BA，but calli were induced. However，the adventitious shoots could be induced on basal MS medium with the addition of NAA and 6－BA. When the portions of hormones were NAA 1.0mg/L＋6－BA 0.5mg/L，the induction rate of adventitious shoots attained 95％. The adventitious shoots could also be induced on basal MS medium only supplemented with NAA 1.0 mg/L，with an induction rate of 93％. Meanwhile，the adventitious shoots induced by this kind of hormone were vigorous，not easy senescence，and could generate sturdy root and form integrated plants after a period of culture. This plants could be transplanted easily and successfully.

Key words: *Isatis indigotica* Fort.；Leaf culture *in vitro*；Adventitious shoot；Regeneration

菘蓝(*Isatis indigotica* Fort.)属于十字花科菘蓝属植物，其干燥根医学上称之为板蓝根，具有清热解毒、凉血利咽之功效，医学上用板蓝根治疗伤风感冒、发热、头痛、咽喉肿痛、扁桃体炎、急性腮腺炎、咳嗽痰多等多种上呼吸道感染疾病[1]；其叶片（大青叶）具有抗菌和清热解毒的功效。以往对菘蓝的研究多集中于其根——板蓝根化学成分和药理作用[2~4]。通过低能离子束生物技术对植物体进行遗传改良已有一些研究报道[5~7]。为了将此项技术应用于菘蓝的遗传改良，迫切需要建立菘蓝的无性繁殖体系。有关菘蓝的组织培养前人已经做了一些阶段性研究[8,9]，而利用离子束生物技术对其进行遗传改良的研究则有待于探索。本试验以菘蓝幼嫩叶片为外植体进行培养，试图建立更加适合于应用离子束技术进行遗传改良的试管无性系，为进一步利用低能离子束生物技术对菘蓝进行遗传改良奠定基础。

收稿日期：2007－06－27
基金项目：国家“863”项目(SZ－01－01－03)；国家“十五”科技攻关项目(2001BA302B)
作者简介：陈秋芳(1972－)，女，河南伊川人，工程师，硕士，主要从事离子束生物技术研究。

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

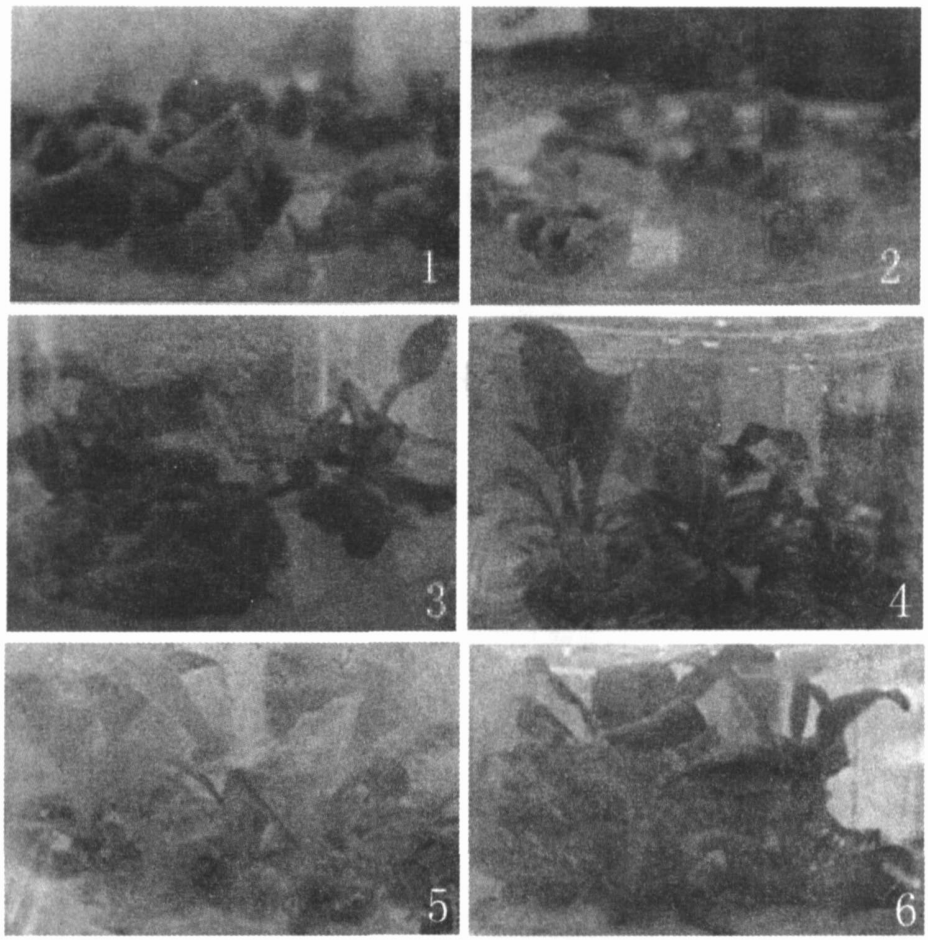
1 材料和方法

取河南省离子束生物工程重点实验室种植的菘蓝幼嫩叶片为外植体。用稀的洗洁精水冲洗后再用自来水清洗干净，之后在超净工作台上用 70%的酒精消毒 30 s，无菌水冲洗 3 次，再用 10%的次氯酸钠消毒 3 min，无菌水冲洗 5 次，将叶片切成 0.5 cm^2 的小块，接种于不同激素配比的 MS 基本培养基上，每瓶接种 10 块叶片，每处理 10 瓶，2 次重复。MS 基本培养基均附加蔗糖 30 g/L，琼脂 8.0 g/L，pH 5.8，常规高压灭菌。培养温度为 25 ℃左右，光照 12 h/d，光照强度 1500～2000 lx。

2 结果与分析

2.1 2，4—D 和 NAA 对菘蓝离体叶片分化方向的影响

菘蓝离体叶片经过两周的培养后，在添加不同的激素组合的培养基上，叶片的分化方向不同。在处理 1 和处理 2 培养基上，单纯添加了 2，4—D，培养 20 d，菘蓝离体叶片的叶缘上卷，有白色愈伤颗粒出现（图 1—1），进一步培养，这些小的愈伤组织颗粒逐渐干枯，不能形成大块愈伤，也无不定芽发生。处理 3 和处理 4 培养基上，添加了不同浓度的 2，4—D 和 6—BA，情况没有得到改善，依然是只能



1. 单纯加入 2，4—D 的培养基，培养 20 d，外植体愈伤组织化；2. 加入 2，4—D 和 6—BA，外植体只能分化出愈伤组织，而无不定芽发生；3. 加入 NAA 和 6—BA，培养培养 20 d，不定芽直接从外植体上再生；4，5. 加入 NAA 和 6—BA，外植体不定芽生长情况；6. 单纯加入 NAA 1.0 mg/L，外植体不定芽生长健壮，不易老化

图 1 菘蓝离体叶片培养

诱导出少量愈伤，而无不定芽形成（图 1—2）。而在处理 5～10 中，只有 NAA 或 NAA 与 6—BA 组合，可以诱导出不定芽（表 1）。

2.2 不同浓度的 NAA 与 6—BA 配比对菘蓝离体叶片不定芽诱导效率的影响

菘蓝幼嫩叶片在添加了 NAA 和 6—BA 的 MS 基本培养基中培养 10 d 左右，叶片开始增厚—肿胀—鼓起，20 d 左右有不定芽原基从叶片边缘产生（图 1—3），30 d 不定芽高度可以达到 3～4 cm。培养基中不同种类的激素和激素配比对菘蓝幼嫩叶片的分化效率有一定的影响。在 NAA 为 1.0 mg/L 时，改变 6—BA 浓度可以改变叶片的分化效率，当 6—BA

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1　不同激素及其配比对菘蓝离体叶片分化方向及分化效果的影响

处理编号	2,4－D（mg/L）	NAA（mg/L）	6－BA（mg/L）	不定芽诱导率（%）	外植体形态变化
1	1.0	0	0	0	愈伤组织
2	2.0	0	0	0	愈伤组织
3	1.0	0	0.2	0	愈伤组织
4	1.0	0	0.5	0	愈伤组织
5	0	1.0	0	93	不定芽大、多、壮，老化慢
6	0	1.0	0.2	78	不定芽少、大
7	0	1.0	0.5	95	不定芽多、大
8	0	1.0	1.0	82	不定芽多、小
9	0	0.5	1.0	42	不定芽少、小
10	0	0.2	1.0	59	不定芽少、小

为0.5mg/L时，不定芽诱导率达到 95%（图 1－4），6－BA浓度为 0.2mg/L 和 1.0mg/L 时，不定芽诱导率虽有下降，但是不定芽个体较大（图 1－5）。在单纯添加 NAA 1.0mg/L 的 MS 基本培养基中，不定芽诱导率也可以达到 93%，且诱导出的不定芽健壮，个体大，不易老化（图 1－6）。在 6－BA 为 1.0mg/L时，随着 NAA 浓度的下降，不定芽诱导率有下降趋势（表 1）。

2.3　不定芽的生根培养与驯化移栽

选择生长健壮的不定芽，接种于生根培养基 MS＋NAA 1.0mg/L 中，20～30d 可形成完整的根系，生根率达到 100%，将生根的无菌苗炼苗 3～4d，小心洗去根部琼脂块，移栽至花卉营养土上，注意保持温、湿度，加强水肥管理，移栽成活率在 90% 以上。如果处理 5 培养基中的不定芽在原来的培养基上继续培养，45d 左右就可以形成完整的根系，而且不定芽产生的根系较大且多，移栽成活率可以达到 95%以上。

3　讨论

植株再生技术是植物组织培养的重要方面，是植物生物工程技术研究的基础，而植株再生是一个复杂的技术体系，与植株本身的激素水平和培养基中的生长调节剂浓度密切相关。在组织培养中，人们常用生长素和细胞分裂素诱导已分化细胞脱分化。2,4－D 一般有利于愈伤组织的形成，但对芽的分化有强烈的抑制作用，本试验材料也不例外，在加入 2,4－D 的培养基上，不能诱导出不定芽，即使再加入 6－BA 也不行。NAA 和 2,4－D 都是生长素类物质，但是对菘蓝叶片的诱导分化方向不同，单纯的 NAA 或与 6－BA 组合，都可以诱导不定芽的分化。一般认为，随着培养基中 6－BA 与 NAA 相对比例的升高，不定芽的分化率会增高。在本试验中，当 NAA 1.0mg/L，6－BA 0.5mg/L 时分化率最高，6－BA 为 0.2mg/L 和 1.0mg/L 时的诱导率均低于 6－BA 为 0.5mg/L 时分化率。而在单纯添加 NAA 的 MS 基本培养基中，不定芽的分化率可以达到 93%，且不定芽生长健壮，不易老化，可以直接诱导生根移栽成活。

试验结果表明，菘蓝叶片不易通过愈伤组织发生不定芽，可以不经过愈伤组织阶段直接诱导发生不定芽，在诱导不定芽时，不但要考虑诱导分化率的问题，同时也应该考虑诱导分化出的不定芽的健壮程度。在以菘蓝幼嫩叶片为外植体诱导不定芽时，以添加 NAA 1.0mg/L＋6－BA 0.5mg/L 的 MS 基本培养基为佳，也可以用只添加 NAA 1.0mg/L 的 MS 基本培养基，后者激素配比简单，不定芽诱导效果好，生长健壮，不易老化，而且在一种培养基上就可以完成不定芽的诱导和生根两个过程，减少了操作程序，进而减少了污染几率，因此是一个很好的试管无性体系，是进一步利用离子束生物技术进行菘蓝遗传改良的首选组织培养体系。

参考文献：

[1] 金玉松. 板蓝根的新用途[J]. 开卷有益. 求医问药, 2003(5): 32－33.

[2] 刘云海, 秦国伟, 丁水平, 等. 板蓝根化学成分的研究(Ⅲ)[J]. 中草药, 2002, 33(2): 97－99.

[3] 刘海利, 吴立军, 李华, 等. 板蓝根的化学成分研究[J]. 沈阳药科大学学报, 2002, 19(2): 93－96.

[4] 陈民, 张晓锋, 顾振纶. 板蓝根药理作用和临床应用研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2002, 21(2): 3－6.

[5] 李红, 吴丽芳, 余增亮. 低能离子束介导水稻遗传转化的研究[J]. 核农学报, 2001, 15(4): 199－206.

[6] 焦浈, 秦广雍, 霍裕平. 烟草叶片再生体系的建立及低能铁离子注入烟草叶片的同工酶分析[J]. 激光生物学报, 2003, 12(5): 373－376.

[7] 梁秋霞, 王付转, 刘磊安, 等. 低能离子束辐照番茄种子的初步研究[J]. 河南农业科学, 2003(7): 40－42.

[8] 彭菲, 王凤翱. 菘蓝子叶和下胚轴组织培养再生植株的研究[J]. 湖南农学院学报, 1994, 20(5): 450－456.

[9] 傅翔, 张汉明, 丁如贤, 等. 激素对菘蓝器官分化的影响[J]. 中药材, 1997, 28(10): 618－620.

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net