

三裂叶野葛茎段和叶柄培养成再生植株

华南师范大学生物系(广州 510631) 施和平*

摘 要 三裂叶野葛的叶柄和茎段外植体在含有 6-BA 1.0 mg/L 和 NAA 0.1 mg/L 的 MS 培养基上产生愈伤组织,愈伤诱导率分别为 100% 和 94%,并进一步分化出芽,芽再生率分别为 100% 和 33.3%。而在添加 6-BA 3.0 mg/L 和 NAA 1.0 mg/L 的 MS 培养基中叶柄和茎段外植体的愈伤诱导率分别为 100% 和 64.3%,芽再生率分别为 57.1% 和 21.4%。芽长成嫩枝后转移至添加 0.1 mg/L NAA 的 MS 培养基后分化出根,形成小植株。再生植株的移栽成活率达 90%。

关键词 三裂叶野葛 植株再生 愈伤组织

Plantlet Regeneration from the Petiole and Stem of *Pueraria phaseoloides*

Department of Biology, South China Normal University (Guangzhou 510631) Shi Heping

Abstract The callus induction rates on MS medium containing 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L were 100% for petiole explant and 94% for stem explant. Callus could differentiate buds on the same medium, shoot regeneration rates were 100% and 33.3% respectively. While cultured in the medium supplemented with 6-BA 3.0 mg/L and NAA 1.0 mg/L, the callus induction rates were 100% and 64.3% respectively, and the shoot regeneration rates were 57.1% for petiole explant and 21.4% for stems. When the shoots were transferred onto MS medium containing 0.1 mg/L NAA, they differentiated into roots and formed regenerated plants. The survival rate was 90%.

Key words *Pueraria phaseoloides* (Roxb.) Benth. plantlet regeneration callus

三裂叶野葛 *Pueraria phaseoloides* (Roxb.) Benth 是豆科葛属的药用植物,其块根为解暑退热、生津解渴的常用生药。药理实验表明,其块根有效成分葛根素等异黄酮类化合物具有抗氧化、抗心律失常、增强机体免疫力和降血糖等多种功能^[1~3]。目前野葛的生药来源主要是靠挖掘野生资源,不仅不能满足医药工业的需要,还会破坏生态环境,造成水土流失。国外曾利用野葛愈伤组织来生产葛根素等异黄酮类化合物,但未能获得再生植株^[4]。我们曾成功地从三裂叶野葛子叶得到了再生植株^[5]。本文报道利用三裂叶野葛无菌苗茎段和叶柄为外植体诱导形成愈伤组织,并得到再生植株的实验结果。

1 材料和方法

1.1 植物材料和培养基:三裂叶野葛的新鲜种子萌发的无菌苗,在 MS 培养基上继代培养 1 月后,分别取其茎段和叶柄进行培养。所用的培养基配方为: M1: MS + 6-BA 1.0 mg/L (单位下同) + NAA 0.1; M2: MS + 6-BA 3.0 + NAA 1.0, M3: MS + KT 0.2 + 2,4-D 1.0 + 6-BA 0.5. M4: MS

+ NAA 0.1. 上述培养基均加 3% 蔗糖、0.8% 琼脂, pH 5.8~6.0, 在 2 000 lx 光强、每天 12 h 光照, (25 ± 1) °C 培养。

1.2 根的诱导及再生植株的移栽:将愈伤组织上再生的芽切下置于 M4 培养基上诱导生根。当再生植株的根长至 3~4 cm, 株高 8~12 cm 时,将锥形瓶移至同外界气温一致的室内靠窗处接受自然光,打开封口塑料薄膜,2 d 后取出小苗、小心洗去根上的培养基,移栽至盛有蛭石-椰糖-菜园土(1:1:2)的塑料盆中,用保鲜膜袋分别覆盖保温保湿 3 d 后置于温室中盆栽。

2 结果分析与讨论

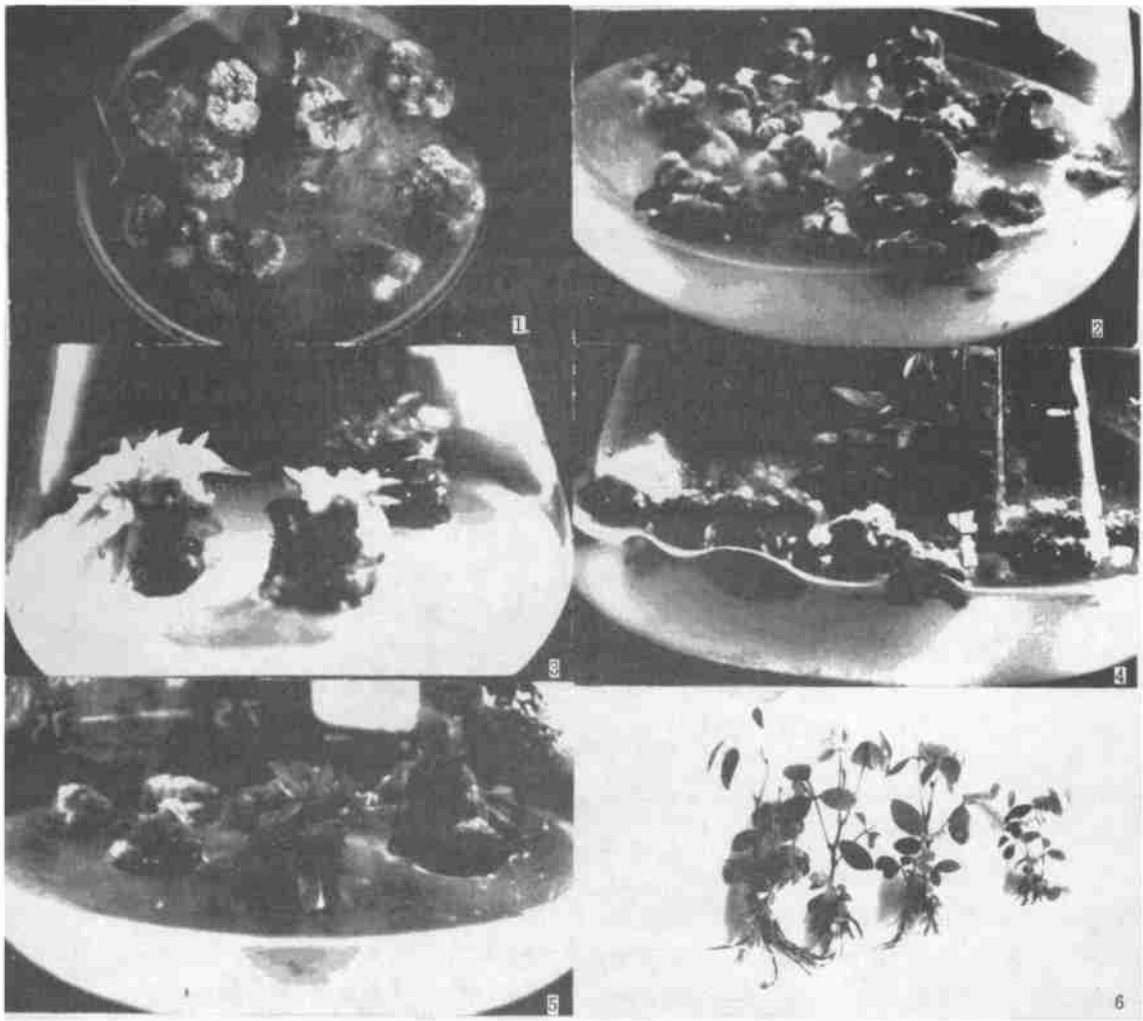
2.1 愈伤组织的诱导和芽的再生:三裂叶野葛叶柄和茎段外植体在 M1 培养基上培养一周后开始形成浅绿色或浅黄绿色或灰白色、表面被白色短绒毛的致密愈伤组织(图 1-1, 2),愈伤诱导率分别为 100% 和 94%,所产生的愈伤组织在 M1 培养基上继代 2 周后分散成黄绿色的或灰白色的圆球形或瘤状愈伤组织,并逐渐分化出芽、芽簇生(图 1-3, 4):三裂叶

* Address: Shi Heping, Department of Biology, South China Normal University, Guangzhou
施和平 男,1990 年毕业于中山大学,获理学硕士学位;1996 年毕业于华南师范大学,获理学博士学位。现任华南师范大学生物系植物生理研究室、广东省植物发育生物工程重点实验室副研究员。主要从事发根农杆菌对植物遗传转化机理和应用以及植物生长发育调控方面的科研和教学工作。现承担国家自然科学基金项目、广东省科技攻关项目和省自然科学基金项目等计 4 项。并在《植物学报》和《云南植物研究》等核心期刊上发表论文 10 多篇。
广州市科委资助项目(1999-J-00701)

野葛叶柄和茎段愈伤组织的芽再生频率分别为100%和33.3%。并观察到贴近培养基的愈伤组织呈暗褐色,可分泌黄褐色或黄色油状分泌物,不产生芽的分化。当三裂叶野葛叶柄和茎段外植体在M2培养基上培养时,虽然可诱导出被白色短绒毛的黄

绿色或灰色致密的愈伤组织,但它们的愈伤组织分化芽的频率明显降低,分别为57.1%和21.4%(表1);平均每块愈伤组织上产生芽的数目分别为7条和3条(图1-5)。

三裂叶野葛叶柄和茎段外植体在M3培养基上



1-叶柄外植体产生的愈伤组织 2-茎段外植体产生的愈伤组织 3-叶柄愈伤组织在MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L培养基上产生的不定芽 4-茎段愈伤组织在MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L培养基上产生的不定芽 5-叶柄愈伤组织在MS + 6-BA 3.0 mg/L + NAA 1.0 mg/L培养基上产生的不定芽 6-三裂叶野葛再生植株

图1 三裂叶野葛茎段和叶柄培养成再生植株

表1 激素组合对茎段和叶柄外植体愈伤组织产生及芽分化的影响				
外植体	培养基	愈伤诱导率 (%)	芽再生频率 (%)	每块愈伤组织产生的平均芽数
叶柄	M ₁	100	100	15
	M ₂	100	57.1	8
茎段	M ₁	94	33.3	7
	M ₂	64.3	21.4	3

培养两周后,在叶柄和茎段两端均形成浅绿色的致密愈伤组织,其贴近培养基表面的愈伤组织呈褐色,

不断分泌黄色或褐色的分泌物,35 d后从愈伤组织上长出白色不定根。如果把产生的愈伤组织在M3培养基上进行反复继代(隔周继代1次)时,愈伤组织会增殖,不产生不定根,但始终未见幼芽的分化,愈伤组织逐渐褐化变黑,死亡。

2.2 根的诱导和试管苗的移栽:将三裂叶野葛叶柄和茎段愈伤组织产生的幼芽切下,接至添加0.1 mg/L NAA的M4培养基上,10 d后长出根,形成再生植株,生根率为100%,每株有6~15条根(图

1-6)。根系发达, 根的生长很快, 15 d 后长达 8 ~ 10 cm。三裂叶野葛再生植株经锻炼后, 在移栽基质中的移栽成活率达 90 % 以上。

有关三裂叶野葛叶柄和茎段的组织培养和植株再生的研究目前尚未见正式报道。我们的结果表明, 三裂叶野葛叶柄的组织培养和植株再生效果比其茎段更好。比较野葛不同外植体再生植株的效果, 我们认为野葛组培快繁材料以选取叶柄最合适。本文结

果为我们利用细胞工程技术来生产葛根的药有效成分提供了基础材料。

参 考 文 献

1 郭建平, 周 全, 孙其荣. 中草药, 1995, 27(3): 163

2 石昌顺. 中草药, 1994, 25(4): 496

3 范礼理, 赵德化, 赵敏崎, 等. 药学报, 1985, 20(9): 647

4 Takaya K, Itokawa H. Chem Pharm Bull, 1982, 30(4): 1496

5 施和平, 潘瑞炽. 植物生理学通讯, 1998, 34(6): 444

(1999-05-13 收稿)

用同工酶技术鉴定滇产菟丝子

云南农业大学农学院(昆明 650201) 郭凤根*

南京农业大学农学系 李扬汉

摘 要 采用过氧化物酶同工酶和谷草转氨酶同工酶分析技术鉴定了产于云南的 3 种 7 份菟丝子材料, 结果表明用同工酶技术鉴定菟丝子是一种新的行之有效的方法。

关键词 过氧化物酶同工酶 谷草转氨酶同工酶 菟丝子鉴定

Identification of *Cuscuta* L. by Isozyme Analysis

College of Agronomy, Yunnan Agricultural University (Kunming 650201) Guo Fenggen

Department of Agronomy, Nanjing Agricultural University Li Yanghan

Abstract 7 samples of 3 species of Yunnan dodders were identified by peroxidase isozyme and glutamic oxalacetate transaminase isozyme analysis. The results showed that isozyme analysis was a new and effective method to identify these dodders.

Key words peroxidase isozyme isozyme of glutamic oxalacetate transaminase dodder identification

菟丝子 *Cuscuta* spp. 是一类重要的中草药资源, 具有补肝肾、益精、明目、安胎等功效^[1]。关于菟丝子种类的鉴定, 已报道过花粉形态^[2]、种子表面超微结构^[3]、种皮显微特征^[4]、薄层层析^[5]、紫外光谱法^[6]和蛋白质纸上电泳^[7]等方法或技术, 但用同工酶技术鉴定菟丝子尚未见报道。作者进行了用同工酶技术鉴定菟丝子的尝试, 效果很好。现将结果作一报道。

1 材料与方法

1.1 材料及其处理: 从云南各地收集到 3 种 7 份菟丝子种子(表 1), 用浓硫酸处理 20 ~ 30 min 以打破休眠, 用清水漂洗干净后把种子置于垫有潮湿滤纸的培养皿中, 于 25 ℃ 生化培养箱中培养, 每天光照

12 h。约 3 d 后待菟丝子茎尖从种皮中伸出时取幼苗制样。

表 1 供试菟丝子材料

编号	中名	拉丁学名	产地
1	菟 丝 子	<i>Cuscuta chinensis</i> Lam.	云南省宾川县
2	金 灯 藤	<i>C. japonica</i> Choisy	云南省景洪市
3	大花菟丝子	<i>C. reflexa</i> Roxb.	云南省玉溪市
4	大花菟丝子	<i>C. reflexa</i> Roxb.	云南省大理市
5	大花菟丝子	<i>C. reflexa</i> Roxb.	云南省昆明市
6	大花菟丝子	<i>C. reflexa</i> Roxb.	云南省呈贡县
7	大花菟丝子	<i>C. reflexa</i> Roxb.	云南省路南县

1.2 聚丙烯酰胺凝胶的制备: 按胡能书等介绍的方法^[8]制备聚丙烯酰胺凝胶, 规格为 13.5 cm × 23.5 cm × 0.1 cm, 每板 12 个点样槽, 浓缩胶浓度 4%, 分离胶浓度因酶而异: 过氧化物酶同工酶(POD) 7

* Address: Guo Fenggen, Agricultural College of Yunnan Agricultural University, Kunming

郭凤根 男, 1964 年 6 月生于浙江平湖。1998 年 7 月从南京农业大学农学系植物学专业毕业, 并获理学博士学位。1996 年 11 月起任云南农业大学农学院副教授。主要从事资源植物学的教学和科研工作, 曾主持或参与了 8 项国家自然科学基金课题或省部级科研课题的研究工作, 在各级学术刊物上发表学术论文 30 篇, 许多论文被《Aggris》、《Weed Abstracts》、《Biocontrol News and Information》、《Chemical Abstracts》、《中国生物学文摘》和《中国农业文摘》等中外检索刊物收录。