

李庆伟,梁明勤,樊亚敏,等.不同取材时期和处理方法对瓦松无菌体系建立的影响[J].江苏农业科学,2014,42(1):55-58.

# 不同取材时期和处理方法对瓦松无菌体系建立的影响

李庆伟,梁明勤,樊亚敏,刘荣宁,贺爱利

(河南农业职业学院现代农业工程系,河南郑州 451450)

**摘要:**以瓦松植株为外植体进行组织培养,探索不同取材时期、处理方法、消毒时间、激素配比等对其无菌体系建立的影响,结果表明,无菌体系建立的材料以5月上旬取材、取材后对材料进行假植处理、剪去新萌生的茎段作为外植体为宜;材料用0.1%的HgCl<sub>2</sub>溶液消毒10 min后接种,污染率在5%以下,存活率在92%以上;在MS+NAA 0.1 mg/L+6-BA 0.5 mg/L的启动培养基中,芽启动率为99.78%,外植体并没有出现愈伤组织、玻璃化等现象。

**关键词:**瓦松;取材时期;处理方法;无菌体系

**中图分类号:** Q945.52 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)01-0055-03

瓦松(*Orostachys fimbriatus*)别称瓦花、瓦塔、瓦玉等,为景天科瓦松属2年生草本肉质植物,在河南、江苏等省及朝鲜、日本等国家和地区有分布<sup>[1]</sup>。瓦松植株中含有多种酸类、景天庚酮糖苷及异丙叉基景天庚酮糖苷等物质<sup>[2-5]</sup>,主要用于药物合成,目前,利用瓦松参与合成的药品不下27种。在临床上,主要用于治疗宫颈糜烂、肾性皮肤病、痔疮、口腔溃疡等症<sup>[6-9]</sup>。随着研究深入,以瓦松为原材料加工而成的药品,将更多地应用在临床上。自然条件下,瓦松生存完全依靠自生自灭。近年来,由于受气候异常变化、花期采药、生境发生变化等影响,瓦松资源受到严重破坏,保护瓦松资源刻不容缓。目前,国内外并没有发现关于瓦松繁殖,尤其是快速繁殖的研究报道。探索并利用生物技术手段,对瓦松进行种苗繁育技术研究,对深度挖掘瓦松的潜在药用价值,进一步加快瓦松的开发利用具有十分重要的意义。

## 1 材料与与方法

### 1.1 试验材料

供试材料采于当地农村15年以上的瓦房上,分别在2月上旬、5月上旬、7月上旬、10月上旬拔取全株瓦松,用带叶茎段作为接种材料。

### 1.2 外植体消毒

采用2种外植体选择方法进行消毒。方法1为直接消毒接种:在自来水下清洗表面泥土与灰尘,后剪成3~5 cm长茎段,用自来水冲洗30 min,对2月上旬采集的材料,去根、留莲座状叶和芽,直接用水冲洗;置于超净工作台上用0.1% HgCl<sub>2</sub>分别浸泡2、4、6、8、10、12、14 min,无菌水冲洗4次,沥干水于无菌纸上。方法2为假植后消毒接种:材料假植于花盆中,套塑料袋,于室内25℃下培养5~7 d;剪新萌生嫩茎直接用0.1% HgCl<sub>2</sub>消毒,消毒时间同上。

消毒后茎段,剪成带叶的茎段接种于初代培养基中,每瓶接种1个茎段,每个处理均接种15瓶。

### 1.3 材料培养

初代培养基,以MS培养基为基本培养基,采用2因素完全随机设计(表1)。培养基采用高压蒸汽灭菌,在121℃、1.1 kg/cm<sup>2</sup>压力下灭菌15 min。接种材料置于温度24~26℃、光照时间14 h/d、光照强度30 μmol/(m<sup>2</sup>·s)的条件下进行培养。

表1 瓦松初代培养基的组合设计

水平	A: NAA (mg/L)	B: 6-BA (mg/L)
1	0	0
2	0.1	0.1
3	0.3	0.5
4	0.5	1.0

### 1.4 数据统计与分析

接种后2 d开始调查,后每隔3 d调查1次,记载污染发生的时间、类型、部位,外植体受伤害情况,腋芽初始萌动时间、腋芽萌动程度、材料的生理状态等,接种后22 d统计污染情况,接种后30 d统计材料存活、伤害情况、腋芽萌动等。根据统计结果计算污染率、存活率、启动率等,公式如下:污染率=污染外植体数/接种总数×100%;存活率=存活个体数/接种总数×100%;启动率=萌芽个体数/接种总数×100%。

数据用SPSS 13.0软件进行方差分析,采用邓肯氏新复极差测验进行多重比较。试验中全部处理小于1的百分数,经反正弦转换后,进行分析和比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 取材时期和方法对无菌体系建立的影响

由图1可见,瓦松取材时期和方法不同,组培苗污染率存在很大差异;2月上旬取材后直接消毒接种(方法1)污染率最高,达100%,10月上旬、7月上旬取材次之;5月上旬取材污染率最低,2种方法平均污染率22.2%。这可能是由于5月瓦松种子萌动后刚开始大量生长,生命力较旺盛,且外植体在空气中暴露时间较短,随着在空气中暴露时间的增加,外植体表面汇集大量微生物,组织培养时直接进行消毒,并不能将表面的微生物全部杀死;进入冬季,瓦松植株为适应环境条件变化,进入休眠,整个植株生长停止,叶片紧紧闭合,体内积累大量微生物,消毒时,消毒剂只能将裸露在表面的微生物杀

收稿日期:2013-05-09

基金项目:河南农业职业学院重点项目(编号:HNAC2011KY002)。

作者简介:李庆伟(1979—),男,河南封丘人,硕士,讲师,研究方向为种苗繁育与大蒜生产。E-mail:liqingwei2003@163.com。

死,并不能杀死植株内的微生物,从而造成2月份污染率居高不下。从选用不同的外植体进行消毒接种看,在同一时期,直接消毒接种的组培苗污染率均高于假植后消毒接种的(方法2)。5月份是瓦松最佳的取材时期,外植体假植后,选取植株上萌生的新茎段作为外植体,可使组培苗污染率最低。

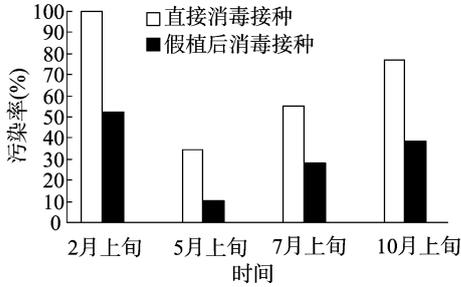


图1 不同取材时期和方法对瓦松无菌体系建立的影响

## 2.2 消毒时间对无菌体系建立的影响

由表1可见,随着 $\text{HgCl}_2$ 消毒时间的增加,外植体的污染率明显降低;对于选用不同外植体进行消毒接种,方法1组培苗的污染率和 $\text{HgCl}_2$ 消毒时间成负相关性,消毒时间越长,污染率越低,2、4 min处理的污染率最高(100%),12、14 min处理的污染率最低(0),且外植体的存活情况不受影响,这说明外植体表面存在大量保护组织,能避免受伤害,方法2组培苗的污染率和 $\text{HgCl}_2$ 消毒时间也表现为负相关性,其外植体的存活情况(存活率)和消毒时间也成负相关关系,消毒时间越长,受伤害的外植体材料越多,存活率越低,这说明假植处理后,新萌生的茎段表面缺乏保护性组织;对于在相同的消毒时间条件下,方法2组培苗的污染率要明显低于方法1,这可能与二者的生长环境有关,方法1的植株长期暴露在自然环境下,其体表携带大量的微生物,而方法2新萌生的茎段,可能携带微生物含量少,但对于存活率,消毒时间较短时表现不明显,随着消毒时间的增长,方法2组培苗的存活率明显低于方法1,这可能与二者的生理状态有关,经过假植的瓦松苗组织相对更幼嫩一些。

表1 0.1%  $\text{HgCl}_2$  不同消毒时间对瓦松无菌体系建立的影响

消毒时间 (min)	选用外植体方法	接种数 (个)	污染数 (个)	污染率 (%)	杀死数 (个)	存活率 (%)
2	方法1	55	55	100	0	100
	方法2	55	50	90.9	0	100
4	方法1	55	55	100	0	100
	方法2	55	46	83.6	0	100
6	方法1	55	51	92.7	0	100
	方法2	55	20	36.4	1	98
8	方法1	55	40	72.7	0	100
	方法2	55	6	10.9	3	95
10	方法1	55	26	47.3	0	100
	方法2	55	2	3.6	6	89
12	方法1	55	16	29.1	0	100
	方法2	55	0	0	40	17
14	方法1	55	13	23.6	0	100
	方法2	55	0	0	51	7

综合瓦松外植体的污染率、存活率及其处理方法等指标,认为采用假植后剪取新生茎段,0.1%  $\text{HgCl}_2$  浸泡10 min作

为瓦松无菌体系建立外植体消毒的最佳时间。

为检验0.1  $\text{HgCl}_2$  消毒10 min对假植后新生茎段的效果,通过消毒较长茎段或消毒后每瓶接种多个材料进行验证(图2),发现材料的存活率在92%以上,污染率在5%以下。



a. 直接消毒较长茎段; b. 每瓶接种多个消毒后的茎段

图2 0.1%  $\text{HgCl}_2$  消毒10 min 茎段生长状态

## 2.3 激素组成对瓦松外植体启动培养的影响

初代培养中以MS培养基为基本培养基,培养基中添加不同的浓度NAA和6-BA,瓦松外植体的启动培养结果如表2和图3所示。

从表2可以看出,瓦松的腋芽最早在接种1周后才开始萌动。腋芽的萌动时间受培养基中激素配比的影响而不同:培养基仅含有NAA时,芽的初始萌动时间随NAA浓度的增加而延长,在NAA浓度为0.5 mg/L时,接种后30 d,没有观察到腋芽萌动;仅含有6-BA的培养基,随6-BA浓度的增加,腋芽萌生时间也明显延迟,6-BA浓度为1.0 mg/L时,接种后30 d同样也没有发现腋芽萌动;当NAA和6-BA同时存在于培养基中,在培养基中6-BA浓度为0.1 mg/L, NAA浓度为0.1、0.3 mg/L时,瓦松腋芽萌动的时间都明显提早;培养基中6-BA浓度提高为0.5 mg/L,无论培养基中NAA浓度是高是低,瓦松腋芽萌动的初始时间都明显提前,最早接种后8 d腋芽开始萌动;当培养基中NAA浓度为0.5 mg/L, 6-BA浓度为0.1、1.0 mg/L时,接种后30 d均没有观察到瓦松腋芽的萌发;培养基中不添加任何激素,腋芽初始萌生时间为接种后20 d。瓦松外植体在不同的培养基中,其腋芽的初始萌生时间呈现不同,这可能与所添加生长调节剂的特性有关:NAA是生长素类物质,能明显促进材料体内细胞的生长,它在低浓度时,可以促进材料不定根产生;浓度较高时,则会产生愈伤组织,抑制芽的发生。6-BA为细胞分裂素类物质,能促进细胞分裂,促进不定芽和丛生芽的形成;过高浓度时,会出现玻璃化等不良现象,抑制芽的发生。

另外,瓦松腋芽的启动率在添加一种激素的培养基中随添加激素浓度的增加而降低;在同时添加2种激素的培养基中,在6-BA浓度为0.1、0.5 mg/L时,随NAA浓度的提高,芽启动率降低;当6-BA浓度为1.0 mg/L时,NAA浓度过低(0.1 mg/L)或过高(0.5 mg/L)出现腋芽启动率反而没有0.5 mg/L的芽启动率高;培养基中不添加任何激素,瓦松的腋芽也全部萌发,芽萌发后生长缓慢,没有根系发生(表2)。

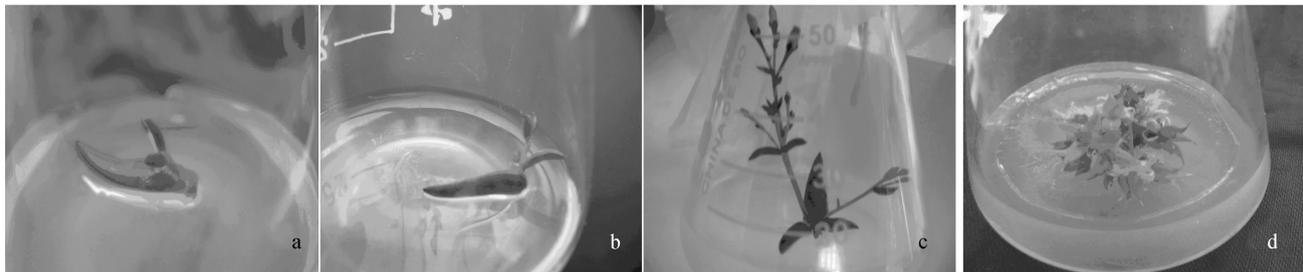
对各处理进行显著性分析发现,不同处理间达到显著水平,处理组合7( $A_2B_3$ )和处理组合5( $A_2B_1$ )极显著高于其他组合,处理组合16( $A_4B_4$ )、13( $A_4B_1$ )、4( $A_1B_4$ )最差,处理组合8( $A_2B_4$ )、14( $A_4B_2$ )效果也比较差。

综合外植体接种后的萌生速度、启动率、生理状态等基本表现,瓦松初代培养的培养基以MS+NAA 0.1 mg/L+6-BA

表2 不同激素配比对瓦松外植体启动培养的影响

处理	激素(mg/L)		芽始萌生 时间(d)	启动率(%)				试管苗生理状态	差异 显著性
	NAA	6-BA		I	II	III	平均值		
1	0	0	20	98	100	97	98.33	芽生长缓慢,无根产生	ab
2	0	0.1	16	97	96	95	96.00	无根发生	bc
3	0	0.5	22	72	70	74	72.00	初在伤口处生少量愈伤,后芽萌动	e
4	0	1.0	—	0	12	10	7.33	切口生淡黄松散愈伤,材料玻璃化	i
5	0.1	0	15	100	99	99	99.33	萌芽后,切口处产生较粗1~3条根	ab
6	0.1	0.1	13	100	98	97	98.33	芽生长健壮	ab
7	0.1	0.5	10	100	100	99	99.67	芽健壮,无根产生	a
8	0.1	1.0	21	56	54	54	54.67	从外植体切口处萌生愈伤	f
9	0.3	0	25	96	98	98	97.33	萌生大量绒毛状短根	abc
10	0.3	0.1	12	98	99	98	98.33	产生大量绒毛状根,个别根粗壮	ab
11	0.3	0.5	8	91	92	90	91.00	有少量较粗根产生	cd
12	0.3	1.0	17	81	83	80	81.33	无根产生,有少量愈伤产生	de
13	0.5	0	—	0	6	9	5.00	外植体产生愈伤组织块	i
14	0.5	0.1	—	35	36	36	35.67	切口产生绿色愈伤,掩盖材料腋芽	h
15	0.5	0.5	15	76	73	79	76.00	有愈伤组织出现	e
16	0.5	1.0	—	0	7	4	3.67	伤口处产生淡绿色愈伤,无芽产生	i

注:“—”为接种后30 d观察,未发现腋芽萌发。



a、b为当年生材料上芽苗,节间短; c、d为翌年材料上芽苗,茎长、有蕾、开花

图3 初代培养

0.5 mg/L 为最佳。此时,芽萌生速度快,芽平均启动率为99.67%,外植体并没有出现愈伤组织、玻璃化等现象,萌生芽生长健壮。

### 3 小结与讨论

材料消毒是建立植物组织培养无菌再生体系的第一步,它直接关系到无菌体系能否建立,因此格外关键。许多研究指出,不同的植物种类、外植体类型、不同的生理状态及取材季节,所采用的外植体处理和消毒方式均不相同<sup>[10-14]</sup>。朱淑颖等在研究野生草珊瑚快繁体系建立时,发现直接使用消毒剂对外植体材料进行消毒,初代培养的污染率几乎为100%,其指出,选取的外植体材料源自野外的植株,叶表面孳生着大量微生物,并附着大量的霉菌孢子和细菌芽孢,甚至一些菌丝体进入表皮薄壁细胞,直接消毒难以奏效<sup>[10]</sup>。王丽萍等在进行番木瓜组织培养时,指出以大田番木瓜作外植体,很难控制污染,如果在番木瓜外植体使用消毒剂前用热水进行浸泡处理10 min,污染率同比降低了28.62%<sup>[11]</sup>。德庆措姆以西藏林芝地区野生银白杨萌蘖苗为材料,研究银白杨的消毒技术时发现,其体表密被白绒毛,直接影响消毒剂的渗入和减低消毒效果<sup>[12]</sup>。宋会访研究桂花的植物组织培养时,发现桂花茎段腋芽表面吸附大量杂菌,且枝条内部有内生菌存在,消毒难

以控制,而新生的枝条和叶片中杂菌较少,容易消毒处理<sup>[13]</sup>。王延玲等在仙客来花药培养中,同样也指出材料表面的微生物难以消除彻底,不利于消毒处理<sup>[14]</sup>。本试验以野生瓦松茎段为外植体材料,比较了直接消毒接种和经过假植后剪新萌茎段接种2种处理方式对污染、存活率等的影响,发现假植后消毒虽能降低污染率,但材料的存活率大幅度下降,这和前人研究基本一致。主要原因是材料表面存在大量微生物,消毒剂难以将有些芽孢孢子杀死,通过假植后选取茎段,则能明显降低污染率,说明材料暴露空气中的时间越短,其携带微生物含量越少,也验证了前人的研究<sup>[12-15]</sup>。

瓦松为2年生植物,野生状态下,其生长状态受自然环境制约很大,华北地区春季3—4月多缺乏雨水,继而瓦松种子不能很好进行发芽产生新植株,1年生植株同时也因缺乏水分而生长受限,因此,应结合瓦松的生物学特性和环境条件来合理取材。马翠萍在1年中1月、3月、6月、9月、11月等5个时期分别对冬枣、一品红、杨树、樱桃、草莓进行取材研究,指出取材时应注意避免高温季节和材料的休眠期,尽量根据材料生物学特性和季节结合进行选择<sup>[15]</sup>,这和本试验结果基本相同。郭晓东以桃树1年生萌蘖和当年生上部枝条为试材,研究了3月、8月和11月取材对污染的影响,发现11月污染率最低、8月最高,但材料的启动率却以8月最高、11月

李媛媛,王冰林,韩佳,等.萝卜下胚轴高效再生体系的建立[J].江苏农业科学,2014,42(1):58-60.

# 萝卜下胚轴高效再生体系的建立

李媛媛<sup>1</sup>,王冰林<sup>2</sup>,韩佳<sup>1</sup>,郑慧敏<sup>1</sup>,何珊<sup>1</sup>,胡玉荣<sup>1</sup>,张军<sup>1</sup>

(1.山东省高校生物化学与分子生物学重点实验室/潍坊学院生物与农业工程学院,山东潍坊 261061;

2.山东省潍坊市农业科学院,山东潍坊 261071)

**摘要:**以7个萝卜品种为试材,开展下胚轴离体培养研究,通过基因型筛选确定具有较高再生频率的萝卜品种进行后续试验,探讨AgNO<sub>3</sub>浓度、激素配比、琼脂浓度等因素对萝卜下胚轴再生的影响。结果表明:萝卜下胚轴再生的最适培养基为改良MS+1.8 mg/L 6-BA+0.8 mg/L NAA+5 mg/L AgNO<sub>3</sub>+0.9%琼脂+30 g/L蔗糖,不定芽再生率高达78.3%,玻璃化率仅为2.8%。

**关键词:**萝卜;下胚轴;离体再生;AgNO<sub>3</sub>;激素配比

**中图分类号:** S631.104.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)01-0058-03

萝卜是一种重要的营养保健蔬菜,在我国蔬菜栽培和供应中占有重要地位,近几年种植面积不断扩大,产量也在逐步提高,目前全国萝卜栽培面积约为120万hm<sup>2</sup>/年,总产量达2683万t/年<sup>[1]</sup>。萝卜生产以应用杂交种为主,自交不亲和和雄性不育系利用是萝卜杂交育种的重要途径,而其传统的保存方法局限性较大。随着生物技术的快速发展,组织培养成为保存和快繁自交不亲和和雄性不育系的有效途径,同时也是利用基因工程技术选育优良品种的重要前提。萝卜

为再生顽拗型植物,再生频率普遍较低<sup>[2]</sup>,所以建立高效、实用的离体再生体系和组培快繁体系成为萝卜生物技术育种的关键限制因素。因此,笔者选用7个萝卜品种,从基因型、激素配比、AgNO<sub>3</sub>浓度、琼脂浓度等方面对萝卜下胚轴再生的影响进行了研究,旨在建立高效的萝卜离体再生体系,为利用生物技术与常规育种方法相结合开展萝卜遗传育种和良种繁育提供技术支撑。

## 1 材料与方

### 1.1 试验材料

供试7个萝卜品种由山东省潍坊市农业科学院提供,分别为杂交种红光102、白玉冠军、潍萝卜1号、潍萝卜2号、潍萝卜3号,常规种潍县萝卜、改良潍县萝卜。

### 1.2 试验方法

1.2.1 无菌苗培养 挑选颗粒饱满的萝卜种子,用蒸馏水清洗干净后用滤纸吸干。在超净工作台上用70%乙醇处理

收稿日期:2013-05-16

基金项目:山东省优秀中青年科学家科研奖励基金(编号:2007BS06024);山东省农业良种工程重大课题。

作者简介:李媛媛(1979—),女,山东桓台人,博士,讲师,从事蔬菜遗传育种研究。Tel:(0536)8785690;E-mail:yyilove@126.com。

通信作者:王冰林,博士,副研究员,从事蔬菜遗传育种与栽培生理研究。Tel:(0536)2118661;E-mail:binglinwang@126.com。

最低,综合分析以3月外植体作为材料最好<sup>[16]</sup>,这也说明瓦松的取材在考虑季节因素和生物学特性时,应结合试管苗的生理状态来判定最佳的取材时期。

## 参考文献:

[1]傅书遐,傅坤俊.中国植物志[M].北京:科学技术出版社,1984:42-43.

[2]江苏新医学院.中药大辞典[M].北京:人民卫生出版社,1997:398.

[3]张维经,毛宗渊.瓦松的CAM活性[J].西北植物学报,1987,7(1):17-22.

[4]Choi S Y, Chung M J, Seo W D, et al. Inhibitory effects of *Orostachys japonicus* extracts on the formation of N-nitrosodimethylamine [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(16):6075-6078.

[5]苏敬,长孙无忌,许孝崇,等.新修本草(辑复本)[M].尚志钧,辑校.合肥:安徽科学技术出版社,1981:295-296.

[6]赵玉山,崔维初,苗得足,等.瓦松栓及其制备方法:中国, CN1436525A[P]. 2003-08-20

[7]周清发.瓦松煎水外洗治疗肾性皮肤瘙痒[J].中国皮肤性病学杂志,1994,8(4):262.

[8]刘渝陵,赵存仙.瓦松消肿止痛液治疗痔疮的临床研究[J].云南中医中药杂志,2001,22(2):33-34.

[9]蔡玉英,韦兴光,张伟,等.瓦松膜剂治疗复发性口腔溃疡初步临床研究[J].时珍国医国药,1999,10(10):720.

[10]朱淑颖,陆颂规,梁承邨,等.草珊瑚组培中外植体消毒方法的研究[J].福建林业科技,2007,34(4):82-86.

[11]王丽萍,黄家河,李柳娟,等.番木瓜(*Carica papaya* L.)外植体消毒方法[J].亚热带农业研究,2008,4(3):181-183.

[12]德庆措姆,布穷.银白杨组织培养中外植体消毒时间初探[J].辽宁林业科技,2000,4(04):29-37.

[13]宋会访.桂花组织培养体系技术研究[D].武汉:华中农业大学,2004.

[14]王延玲,丰震,赵兰勇,等.仙客来花药培养外植体消毒研究[J].山东林业科技,2004(4):8-9.

[15]马翠萍.植物组培污染防治的研究[D].泰安:山东农业大学,2002:51.

[16]郭晓东.预防和控制植物组织培养污染的研究[D].山西太谷:山西农业大学,2005.