

余磊磊,周京龙,高中南,等.野生白芨再生体系的建立及抗性筛选[J].江苏农业科学,2017,45(1):43-46.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.01.012

野生白芨再生体系的建立及抗性筛选

余磊磊,周京龙,高中南,聂倩文,周 燚

(长江大学农学院,湖北荆州 434025)

摘要:建立白芨的再生体系和优化抗性筛选的最佳条件,为野生白芨高效遗传转化体系的建立奠定基础。以野生白芨种子为外植体,研究野生白芨种子在萌发、愈伤组织诱导、丛生芽分化和增殖以及不定根诱导的最佳培养基,并利用梯度筛选出其对卡那霉素(Kan)和氨苄青霉素(Amp)的抗性。种子萌发最佳培养基为 $1/2MS + 0.8 \text{ mg/L NAA} + 0.2 \text{ mg/L 6-BA} + 100 \text{ g/L 马铃薯}$;不定芽分化最佳培养基为 $MS + 1.0 \text{ mg/L 6-BA} + 0.5 \text{ mg/L NAA} + 8 \text{ mg/L 硝酸银} + 50 \text{ g/L 马铃薯}$,诱导率高达 95%;诱导生根最佳培养基为 $1/2MS + 0.8 \text{ mg/L NAA} + 0.2 \text{ mg/L 6-BA} + 100 \text{ g/L 马铃薯}$ 。100 mg/L Kan 和 100 mg/L Amp 为野生白芨遗传转化的最佳筛选压;培养过程中添加外源有机物可以有效地促进愈伤组织和不定芽的分化与增殖。建立了野生白芨种子的再生体系,发现了野生白芨种子的第 3 条发育途径——愈伤组织分化途径,并筛选出了适宜于野生白芨遗传转化体系的 Kan 和 Amp 筛选压。

关键词:白芨;愈伤组织分化途径;再生体系;抗性筛选

中图分类号:S567.23*9.043 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)01-0043-04

白芨为兰科(Orchidaceae)白芨属(*Bletilla*)多年生草本植物。因其花色和形状等形态的不同,又被分为黄花白芨(*B. ochracea*)、华白芨(*B. sinensis*)、小白芨(*B. formosana*)和白芨(*B. striata*)4 种^[1]。在我国白芨主要分布于长江流域地区,其独特的药用价值,使其遭遇多年的掠夺式采挖,野生资源日益减少,濒临灭绝边缘,现已被国家列为重点保护的野生药用植物资源。白芨果荚内种子多呈纺锤形,仅仅由几个发育不完全的胚细胞构成,无胚乳,无贮藏的营养物质供给种子萌芽^[2],因而其在自然条件下萌发率极低。构建其再生体系,可以初步有效解决育苗难题。白芨属植物因其花色艳丽多彩,花型引人注目而具有较高观赏价值和经济价值,其地下假鳞茎中含有的白芨胶具有收敛止血、清热解毒、消肿生肌之功效^[3],同时还具有较强的抗氧化和抗衰老作用,可用于保健、护肤及美容养颜等^[4-5]。而野生白芨资源本身稀缺,加之含有的药用成分白芨胶较少,野生采挖的白芨假鳞茎根本无法满足目前的提取需求。现有的研究大多集中在其再生体系的建立上,很少通过生物技术增加白芨胶的含量,因此要以白芨种子为基础,筛选出叶芽对卡那霉素(Kan)、氨苄青霉素(Amp)的抗性临界点,通过基因工程途径构建其遗传转化体系,培育白芨胶含量更高的白芨品种。

1 材料与方法

1.1 试验材料

白芨蒴果采自湖北神龙架林区,蒴果采期为花期结束后

约 120 d,蒴果未开裂且内部白芨种子成熟。

1.2 蒴果消毒及种子萌芽

将果荚用自来水冲洗 10 min,在超净工作台上先用 75% 乙醇消毒 30 s,再用 4% 次氯酸钠溶液浸泡 10 min,消毒期间不停地翻动果荚,使其消毒彻底,无菌水漂洗 3 次,然后用无菌滤纸吸干果荚表面的水分待用。在无菌条件下剖开蒴果,将种子均匀地抖落到培养基表面。本实验室筛选的白芨种子萌芽培养基: $1/2MS + 0.8 \text{ mg/L NAA} + 0.2 \text{ mg/L 6-BA}$ (pH 值 5.8),然后置于温度为 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ 的恒温培养室中培养^[6],前 2 周为暗培养,2 周之后转为光暗交替培养,光照度为 2 000~2 500 lx,光—暗周期 14 h—10 h。

1.3 白芨愈伤组织的诱导

愈伤组织的形成有 2 种方式,一是在种子萌发培养基中,有部分种胚直接发育形成愈伤组织。二是将培养 60 d 的野生白芨的无菌幼苗切去根部和子叶,留下原球茎或者根状茎,切成 $0.3 \sim 0.5 \text{ cm}^2$ 小块,用不同质量浓度的细胞分裂素 6-BA 与生长素 NAA 组合诱导形成愈伤组织,愈伤诱导培养基在预试验的基础上设计如下: (1) $1/2MS + 0.8 \text{ mg/L NAA} + 0.2 \text{ mg/L 6-BA} + 2 \text{ mg/L 硝酸银} + 50 \text{ g/L 马铃薯}$; (2) $1/2MS + 0.8 \text{ mg/L NAA} + 0.2 \text{ mg/L 6-BA} + 4 \text{ mg/L 硝酸银} + 50 \text{ g/L 马铃薯}$; (3) $1/2MS + 0.8 \text{ mg/L NAA} + 0.2 \text{ mg/L 6-BA} + 6 \text{ mg/L 硝酸银} + 100 \text{ g/L 马铃薯}$; (4) $1/2MS + 0.8 \text{ mg/L NAA} + 0.2 \text{ mg/L 6-BA} + 8 \text{ mg/L 硝酸银} + 100 \text{ g/L 马铃薯}$;所有培养基的 pH 值均为 5.8,愈伤组织的诱导在黑暗条件下进行。

1.4 白芨不定芽的分化诱导

当愈伤组织长到约 1 cm^3 左右,可进行丛生芽的诱导。丛生芽的诱导培养基在预试验的基础上设计如下: (1) $MS + 1.0 \text{ mg/L 6-BA} + 0.5 \text{ mg/L NAA}$; (2) $MS + 1.0 \text{ mg/L 6-BA} + 0.5 \text{ mg/L NAA} + 4 \text{ mg/L 硝酸银}$; (3) $MS + 1.0 \text{ mg/L 6-BA} + 0.5 \text{ mg/L NAA} + 8 \text{ mg/L 硝酸银}$; (4) $MS + 1.0 \text{ mg/L 6-BA} +$

收稿日期:2016-04-01

基金项目:湖北省农业创新基地项目(编号:2010CBB03801);湖北省重点基金项目(编号:2015000384)。

作者简介:余磊磊(1990—),男,湖北襄樊人,硕士研究生,从事植物病害生物防治研究。E-mail:461309772@qq.com。

通信作者:周 燚,博士,教授,研究生导师,主要从事植物病害抗病生防菌研究。E-mail:zhouyi@yangtzeu.edu.cn。

0.5 mg/L NAA + 12 mg/L 硝酸银; (5) MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA + 8 mg/L 硝酸银 + 50 g/L 马铃薯; (6) MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA + 8 mg/L 硝酸银 + 100 g/L 马铃薯; (7) MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA + 8 mg/L 硝酸银 + 200 g/L 马铃薯; 所有培养基的 pH 值均为 5.8, 不定芽的分化诱导在光照条件下进行, 光照度为 2 000 ~ 2 500 lx。

1.5 白芨的生根培养

待丛生芽生长到 2 ~ 3 cm 时切下, 放置在下列培养基进行生根诱导: (1) 1/2MS + 2.0 mg/L NAA; (2) 1/2MS + 1.5 mg/L NAA; (3) 1/2MS + 1.0 mg/L NAA; (4) 1/2MS + 0.5 mg/L NAA + 0.1 mg/L 6-BA; (5) 1/2MS + 0.5 mg/L NAA + 50 g/L 马铃薯; (6) 1/2MS + 0.5 mg/L NAA + 100 g/L 马铃薯; 共 6 种不同的培养基进行诱导生根, 所有培养基的 pH 值均为 5.8。在光暗交替下进行诱导生根, 光照度为 2 000 ~ 2 500 lx, 光—暗周期 14 h—10 h。

1.6 培养条件的优化

由于野生白芨种子为不完全结构, 其种子中仅有胚, 而不含有胚乳, 且种子表面被 1 层透明的种皮包被, 使得外源营养物质很难进入到种皮内, 因此对于几乎没有营养物质贮藏的野生白芨种子来说, 添加其他物质于培养基中就可能会有助于其愈伤组织的分化增殖和防止褐化现象。本试验以最佳芽诱导培养基为基础添加以下物质, 外源有机物马铃薯过滤液: 10、50、100 g/L; 硝酸银: 4、6、8、10 mg/L; 活性炭 0.8 g/L。

1.7 野生白芨对抗生素敏感性的测定

将白芨愈伤组织切成 0.5 cm³ 左右的小块, 分别放置到不同浓度氨苄青霉素 (Amp) 和卡那霉素 (Kan) 的再生培养基 1/2MS + 3% Surcose + 0.3% Phytigel + 1.0 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA + 100 g/L 马铃薯上, 观察不同浓度的 Amp 和 Kan 对白芨愈伤组织诱导和分化的影响, 以确定最优的筛选压, 筛选出适宜的浓度用于遗传转化。Amp 的浓度梯度为 0、20、50、100、150 mg/L, Kan 的浓度梯度为 0、25、50、75、100、125、150 mg/L, 培养 30 d 后统计筛选的效果。

2 结果与分析

2.1 种子的有胚率分析

成熟野生白芨的果荚颜色为黄褐色, 野生白芨种子的结构, 多呈纺锤形, 由 1 层透明的种皮和乳白色的胚组成, 且无胚乳, 几乎没有营养物质的贮藏^[6], 有些种子显微镜下观察还可以发现其残留的胚柄, 而且经试验统计发现有一些种子只有种皮而没有胚, 这是因为采自神龙架林区的野生白芨果荚未完全成熟所致, 这与张建霞等报道的白芨种子的胚龄为 20 周 (140 d) 后, 胚基本停止发育, 有胚率不再明显提高, 而胚的成熟度达到最佳^[7]基本一致。在组织培养条件下培养 7 d 后, 含有胚的种子会逐渐膨大且转为绿色。显微观察和统计结果 (表 1) 表明, 本次试验所用野生白芨种子的有胚率为 57.5%。

2.2 野生白芨种子发育情况分析

白芨种胚如图 1 所示, 主要以 2 种途径发育成小苗, 第 1 种是种胚转绿膨大形成小球体, 进而发育成原球茎; 第 2 种是种胚膨大形成小球体, 小球体先形成根状茎, 然后顶端逐渐转绿分化出芽, 形成叶片^[8]。本试验发现野生白芨种胚在培养

表 1 种子发育情况分析

培养基添加物		接种数 (个)	有胚数 (个)	有胚率 (%)	不同种胚发生途径 的百分比 (%)		
硝酸银 (mg/L)	马铃薯 (g/L)				原球茎	毛状根	愈伤组织
2	50	100	59	59	45.7	41.0	13.3
4	50	100	60	60	51.6	26.6	21.7
6	100	100	54	54	64.8	9.2	26.0
8	100	100	57	57	59.6	17.6	22.8

注: 基础培养基为 1/2MS + 0.8 mg/L NAA + 0.2 mg/L 6-BA; 种子有胚率公式: 有胚率 = (有胚的种子数 / 总种子数) × 100%^[7]。

基上, 还存在除了张燕等报道的 2 种主要的发育途径^[5]以外的第 3 种次要发育途径: 由种胚直接发育为淡绿色的愈伤组织, 而后不断增殖, 发育为丛生芽, 进而生长成完整植株。试验初步推测愈伤组织发育途径可能与培养基中的外源添加有机物和种子的呼吸作用有关, 其发生机理有待进一步研究。对所有试验中种胚的发生情况进行统计分析, 在基本培养基相同且马铃薯的含量都为 100 g/L 的情况下, 当硝酸银的含量为 6、8 mg/L 时, 种胚的愈伤组织为浓绿色 (图 2), 其愈伤组织发育率分别为 26.0% 和 22.8% (表 1), 表明 6 mg/L 的硝酸银是种胚愈伤组织发育的最佳含量, 且当硝酸银含量在 6 mg/L 以下时, 其种胚的愈伤组织发育率与硝酸银的含量呈正相关。由表 1 可知种胚的愈伤组织发育率和马铃薯的含量呈正相关。

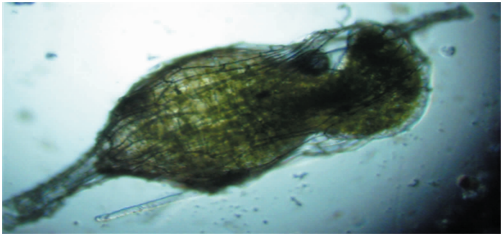


图1 种胚发育7 d



图2 愈伤组织

2.3 不同激素浓度对野生白芨丛生芽的诱导

试验结果 (表 2) 表明不定芽的诱导率最高的培养基为 A3 培养基 (MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA + 8 mg/L 硝酸银 + 50 g/L 马铃薯), 其诱导率高达 95%, 增殖系数为 3.24, 诱导的丛生芽较多, 呈浓绿色, 较粗壮, 但生长缓慢, 有褐化现象出现。而 A4 培养基 (MS + 1.5 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA + 10 mg/L 硝酸银 + 100 g/L 马铃薯) 中不定芽的诱导率为 85%, 丛生芽增殖系数最高, 为 6.03, 诱导的丛生芽, 多为青绿色, 生长较快且很粗壮, 较少有玻璃化现象出现 (图 3)。

A1 培养基 (MS + 0.2 mg/L 6 - BA + 1.5mg/L NAA + 4 mg/L 硝酸银 + 50 g/L 马铃薯) 和 A2 培养基 (MS + 0.5mg/L 6 - BA + 1 mg/L NAA + 6 mg/L 硝酸银 + 100 g/L 马铃薯) 的分化效率和增殖系数较低,诱导率分别为 22.5% 和 67.5%,增殖系数

分别为 2.12 和 3.11,且玻璃化现象和褐化现象严重。统计分析可知,A4 培养基虽然丛生芽诱导率未达到最高,为 85%,但其增殖系数高达 6.03,可有效诱导叶芽分化和增殖,能更好地满足植物基因工程研究的需要。

表 2 不同培养基对不定芽诱导的影响

编号	培养基类型				接种数 (个)	诱导数 (个)	诱导率 (%)	丛生芽诱导活力		
	6 - BA (mg/L)	NAA (mg/L)	硝酸银 (mg/L)	马铃薯 (g/L)				丛生芽长势	芽发生 总数	增殖系数
A1	0.2	1.5	4	50	40	9	22.5	瘦弱,淡绿色	19	2.12
A2	0.5	1.0	6	100	40	27	67.5	生长快且绿色	84	3.11
A3	1.0	0.5	8	50	40	38	95	生长缓慢且绿色	123	3.24
A4	1.5	0.2	10	100	40	34	85	生长快、芽粗壮且绿色	131	6.03

注:基本培养基为 MS 培养基,且 4 种培养基中均含有 0.8 g/L 的活性炭。

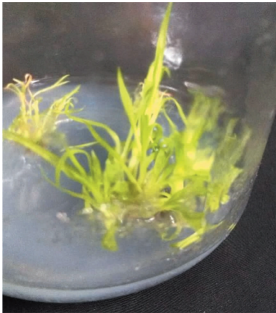


图3 丛生芽



图4 无菌苗

在野生白芨无菌苗的根状茎上进行间接愈伤组织诱导发现,青绿色的愈伤组织质地较紧密,可诱导分化出粗壮的丛生芽,且分化效率更高(图 4)。由表 2 数据分析可知,愈伤组织的分化诱导率和丛生芽的增殖系数与 NAA 的浓度、6 - BA/NAA 的浓度配比以及外源有机物马铃薯的含量呈正相关,在硝酸银浓度不超过 8 mg/L 时,愈伤组织的分化诱导率和丛生芽的增殖系数会随着其浓度的增加而提高,但当硝酸银的浓度为 10 mg/L 时,其愈伤组织的分化诱导率出现下降,说明过高的硝酸银浓度不利于其愈伤组织的诱导分化。外源有机物可以有效提高其丛生芽的增殖系数,有利于芽的生长^[9]。

2.4 不定根的诱导

不定根的诱导对于植株再生体系的建立至关重要^[10],在本研究中采用的 4 种生根培养基中,B4 培养基(1/2MS + 0.8 mg/L NAA + 0.2 mg/L 6 - BA + 100 g/L 马铃薯)为最佳诱导生根培养基,其不定根诱导率高达 97.5%,不定根发生密集,生长速度快且粗壮,为白色或者绿色(图 5)。B1 培养基(1/2MS + 1.0 mg/L NAA + 50 g/L 马铃薯)的诱导率较高,为 85%,但

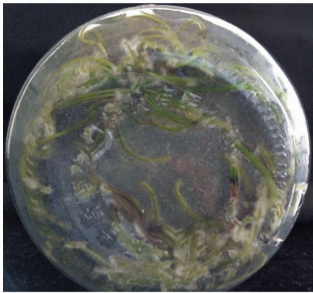


图5 不定根诱导

其不定根的发生量较少。其他 2 种培养基 B2 和 B3 也能有效诱导不定根的分化,但也存在不定根较瘦弱的不足。经分析发现,NAA 可以有效促进不定根的诱导和分化,对不定根的生长有着决定性的作用,而细胞分裂 6 - BA 会极大抑制不定根的发生。而添加了马铃薯的培养基中不定根生长更为健壮,且生长速度更快,说明马铃薯可以提高不定根的诱导效率(表 3)。

表 3 不同培养基对根诱导的影响

编号	培养基类型			接种数 (个)	诱导数 (个)	诱导率 (%)	生长状态	
	6 - BA (mg/L)	NAA (mg/L)	马铃薯 (g/L)				根的数量及颜色	毛状根
B1	0.5	0.8	50	40	34	85%	较少且粗壮,生长快,白色	发生密集
B2	1.0	0.5	0	40	30	75%	根多,生长快,白色	发生较少
B3	0.8	0.2	0	40	26	65%	根少,生长缓慢,白色	无
B4	0.2	1.0	100	40	39	97.5%	根多且粗壮,生长快,白色	发生密集

注:基本培养基为 1/2MS 培养基。

2.5 Kan 和 Amp 抗性浓度的筛选

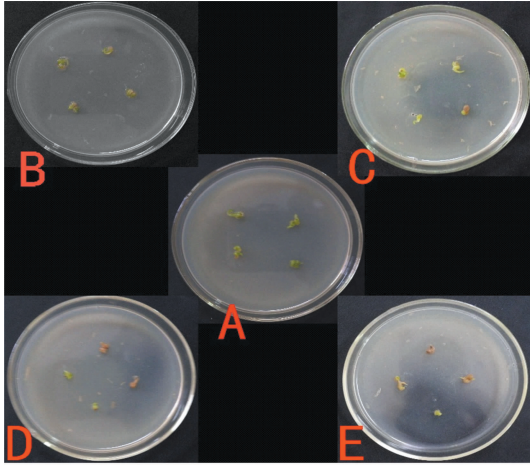
将叶芽分别置于含有不同浓度 Kan 和 Amp 的 MS + 0.5 mg/L 6 - BA + 1.0 mg/L NAA + 100 g/L 马铃薯培养基上培养

40 d 后观察致死率(图 6、图 7),叶芽的致死率与 Amp 和 Kan 的浓度都成反比,当 Amp 浓度为 20 mg/L,其致死率仅为 12.2%,分化率高达 87.8%;当 Amp 浓度增加到 150 mg/L

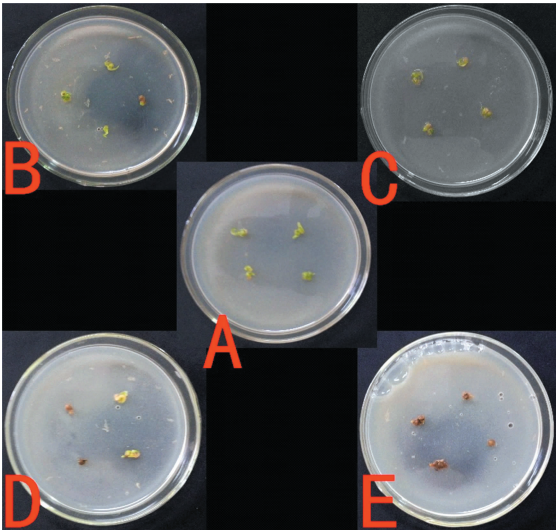
表 4 不同抗生素及其浓度对叶芽分化的影响

编号	Amp 浓度 (mg/L)	叶芽致死率 (%)	叶芽分化率 (%)	编号	Kan 浓度 (mg/L)	叶芽致死率 (%)	叶芽分化率 (%)
C1	0	0	100	C1	0	0	100
C2	20	12.2	87.8	C2	50	15.1	84.2
C3	50	37.2	62.8	C3	100	75.2	24.1
C4	100	68.9	31.1	C4	200	98.7	0.8
C5	150	98.6	1.4	C5	300	100	0

注:浓度为 0 mg/L 的即为对照;叶芽致死率 = (死亡块数/接种总块数) × 100%;叶芽分化率 = (分化不定芽的块数/接种总块数) × 100%。



A—0 mg/L Kan; B—50 mg/L Kan; C—100 mg/L Kan;
D—200 mg/L Kan; E—300 mg/L Kan
图6 Kan 的抗性筛选



A—0 mg/L Amp; B—20 mg/L Amp; C—50 mg/L Amp;
D—100 mg/L Amp; E—150 mg/L Amp
图7 Amp 的抗性筛选

时,其致死率高达 99.2%,分化率仅为 0.6% (表 4)。综合试验的其他因素考虑,100 mg/L 的 Amp 和 100 mg/L 的 Kan 是最佳的抗性浓度。

3 讨论

野生白芨为兰科植物,其种子发育不完整,且种子表面包被 1 层种皮,对于仅有种胚的种子的发芽是极大的障碍,这也使得野生白芨种子很难在自然条件下发芽。而合适的培养基

和培养环境便成了其萌发的关键。在本试验采用的培养基中,发现了野生白芨种胚发生的第 3 条途径——愈伤组织途径。对于野生白芨种胚直接从种子发育成愈伤组织的现象,初步猜想可能是以下原因造成的:(1)种子的不完全胚被种皮限制,种胚无法进行正常生长;(2)由于采收的种子中种胚的发育程度和成熟度不一致,导致部分种子不能提供种胚正常发育的营养物质。这也正好可以解释白芨在野外自然条件下萌发率不足万分之一,但是其愈伤组织途径的发生机理还有待更进一步的研究。

兰科植物的整个生活史中均有共生菌参与其中,这种生长的特异性也使得兰科植物组织培养过程的各个阶段都需要外源有机物。在野生白芨的再生体系中,马铃薯过滤液对野生白芨种子再生体系各个阶段的生长都有着极大的促进作用,在培养基中添加 100 g/L 的马铃薯过滤液等外源有机物和硝酸银等可以极大促进愈伤组织的分化和丛生芽的增殖,从而为野生白芨的再生体系建立更为优越的条件。

在本研究中成功筛选出野生白芨的叶芽对 Kan 和 Amp 抗性的浓度分别为 100 mg/L 和 100 mg/L。本研究结果为野生白芨应用于植物基因工程,尤其是为培育白芨胶含量更高的优质白芨品种提供了参考。

参考文献:

[1] 朱 英,刘永翔,黄永会,等. 白芨属种质资源的 SRAP 标记分析[J]. 贵州农业科学,2012,40(9):10-13.
[2] 闫新房,丁林波,丁 义,等. LED 光源在植物组织培养中的应用[J]. 中国农学通报,2009,25(12):42-45.
[3] 扬春澍. 药用植物学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1998:321-327.
[4] 芮海云,吴国荣,陈景耀,等. 白芨中性多糖抗氧化作用的实验研究[J]. 南京师大学报(自然科学版),2003,26(4):94-98.
[5] 刘光斌,黄 忠,黄长干,等. 天然植物白芨胶的功能及在化妆品中的应用[J]. 日用化学品科学,2005,28(8):22-24.
[6] 张 燕,黎 斌,李汝娟,等. 白芨种子的无菌萌发过程观察和组培快繁研究[J]. 北方园艺,2013(03):158-160.
[7] 张建霞,付志惠,李洪林,等. 白芨胚发育与种子萌发的关系[J]. 亚热带植物科学,2005,34(4):32-35.
[8] 张 燕,黎 斌,李思锋. 不同培养基上白芨的种子萌发与幼苗形态发生[J]. 西北植物学报,2009,29(8):1584-1589.
[9] 李海菊. 简述玉米体细胞组织培养中影响愈伤组织诱导的因素[J]. 吕梁教育学院学报,2011,28(3):44-45.
[10] Sivakumar G, Yu K W, Paek K Y. Production of biomass and ginsenosides from adventitious roots of *Panax ginseng* in bioreactor cultures[J]. Engineering in Life Sciences,2005,5(4):333-342.