

蓼蓝组织培养再生体系的建立

周江波, 陈家鸿, 李会会 (凯里学院环境与生命科学学院, 贵州凯里 556011)

摘要 [目的]建立蓼蓝组织培养再生体系。[方法]以半野生蓼蓝种子、幼叶和茎段为外植体,探讨不同浓度植物激素配比的培养基对其愈伤组织诱导、继代、分化及生根的影响。[结果]以蓼蓝茎段为外植体进行组培是适宜的;诱导和继代最佳培养基为 MS + 6-BA 1.0 mg/L + 2,4-D 2.0 mg/L, 平均诱导率可达 73.33%;分化最佳培养基为 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L, 平均分化率可达 51.67%;生根适宜的培养基为 1/2 MS + NAA 0.5 mg/L, 生根后移栽成活率达 100%。[结论]该研究为优良蓼蓝快速繁殖提供了新的途径,并为其种质资源的保存与利用提供了依据。

关键词 蓼蓝;组织培养;茎段;愈伤组织

中图分类号 S574 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)19-0123-03

Establishment of Regeneration System for Tissue Culture of *Polygonum tinctorium*

ZHOU Jiang-bo, CHEN Jia-hong, LI Hui-hui (College of Environment and Life Science, Kaili University, Kaili, Guizhou 556011)

Abstract [Objective] To establish regeneration system for tissue culture of *Polygonum tinctorium*. [Method] Its seeds, young leaves and stems were used as explants to explore influences of media with different concentration hormone on callus induction, subculture, differentiation and rooting. [Result] Stems of *P. tinctorium* were ideal explants. The optimum medium for callus induction and subculture was MS + 6-BA 1.0 mg/L + 2,4-D 2.0 mg/L, the corresponding average induction rate was 73.33%. The optimum medium for callus differentiation was 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L, the corresponding average differentiation rate was 51.67%. The optimum medium for seedlings rooting was 1/2 MS + NAA 0.5 mg/L. The surviving rate after transplanting attained to 100%. [Conclusion] The study provided a new way for *P. tinctorium* rapid reproduction, and provided theoretical basis for the preservation and utilization of germplasm resources.

Key words *Polygonum tinctorium*; Tissue culture; Stem; Callus

蓼蓝(*Polygonum tinctorium*),亦略称为蓝或靛青,为蓼科蓼属一年生草本植物,是自然界中含靛蓝较多的一种植物。蓼蓝被认为起源于印度,后被传入中国、日本及欧洲,被广泛用于天然植物染色^[1-2]。目前蓼蓝在我国南北地区均有分布,呈零星栽培或半野生状态^[3]。至今蓼蓝仍是一些地区主要天然植物蓝色染料的原材料^[4-5],苗、侗、瑶、布依等少数民族仍在大量使用蓼蓝加工扎染^[6]和蜡染民族工艺品^[7]等。另外,蓼蓝还是常用的药用植物,蓼蓝种子和叶的甲醇-乙酸乙酯提取物表现出很强的抗氧化活性和抗癌效应^[8]。Yu等^[9]报道了蓼蓝发酵的叶片提取物对 HIV-1 和 HSV-1 病毒有很强的抗性;Heo等^[10]通过体外试验揭示了蓼蓝提取物可有效地抑制癌细胞的增殖;近年,韩国研究人员 Park等^[11]研究表明,经过超亚处理的蓼蓝叶片有机溶剂提取物对人体的血清白蛋白有更高的抗氧化性和结合能力。

为保护蓼蓝优异种质资源,满足人们对其优质栽培及生产实践的需求,探究蓼蓝高效组织培养再生体系是有效途径之一。目前国内外已有对蓼蓝化学成分、生理功效及药理作用分析等方面的报道,但其组织培养再生体系的建立鲜见报道。该研究建立了蓼蓝组织培养再生体系,以期为优良蓼蓝快速繁殖提供新的途径,为其种质资源的保存与利用提供依据,并对保留传承和保护民族地区天然植物染料民族传统工艺起到积极作用。

1 材料与方 法

1.1 材料及消毒处理 供试蓼蓝取自贵州省凯里经济开发

基金项目 贵州省科学技术基金项目(黔科合J字[2014]2154);国家级大学生创新创业训练项目(201510669020);贵州省教育厅优秀科研创新团队项目(黔教合人才团队字[2013]26);凯里学院院级规划学生课题([2014]16号x1423)。

作者简介 周江波(1981—),男,湖北天门人,副教授,博士,从事民族植物种质资源开发与利用研究。

收稿日期 2017-04-28

区觉雅村山坡地(107.97° E,26.59° N),为自然生长的半野生植株。分别选用蓼蓝不同时期种子、幼叶和茎段作为外植体,接种前将外植体在无菌超净工作台上用蒸馏水冲洗干净,在滤纸上沥干,将其转移至已灭菌的 50 mL 离心管中,用 75% 乙醇消毒 2 min,无菌水清洗 3 次,再将 3 种外植体分别用 0.1% 的 HgCl₂ 溶液消毒处理 10~12 min,无菌水冲洗 5 次,转移至滤纸上沥干,待接种。

1.2 培养条件 以 MS 为基本培养基,分别添加不同种类和质量浓度的植物激素,筛选蓼蓝组织培养生长各阶段的最佳培养基。诱导和继代培养基中添加不同配比的 6-BA、2,4-D、6-BA 质量浓度分别设为 0.5、1.0、2.0、3.0 mg/L;2,4-D 质量浓度分别设为 0、0.5、1.0、2.0、3.0 mg/L,培养基 pH 5.8,广口瓶中接种后于培养室暗培养,室内培养温度为(25±1)℃,湿度为 50%~60%。分化培养基中的植物激素用 6-BA 和 NAA 组合,6-BA 质量浓度分别设为 1.0、2.0、3.0 mg/L;NAA 质量浓度分别设为 0、0.5、1.0 mg/L,光照周期为 16 h/8 h(光/暗)。每个处理接种 20 个(块),3 次重复。

1.3 生根和移栽 蓼蓝的生根培养,以 1/2 MS 为基本培养基,分别添加质量浓度为 0、0.5、1.0 mg/L 的 NAA。待生根至 1~2 cm 后炼苗 1~2 d,移栽至湿润的营养土钵中生长。

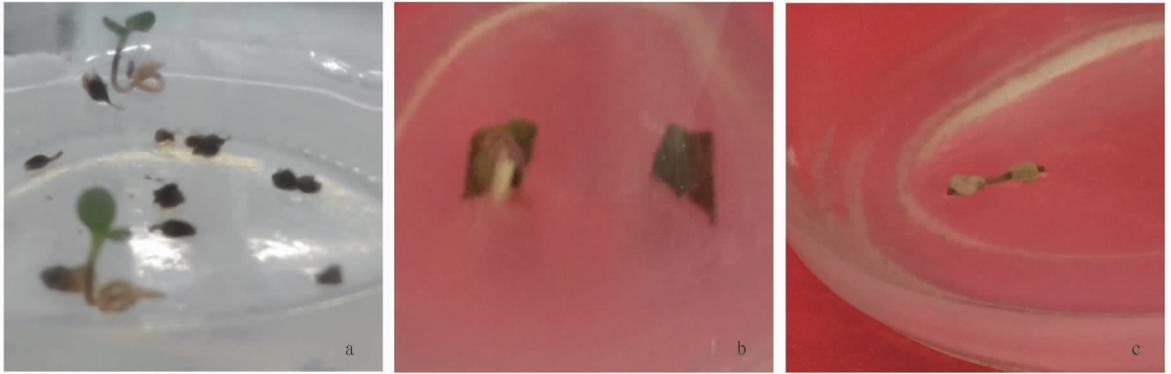
1.4 数据分析 数据采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同外植体对蓼蓝诱导愈伤组织的影响 对蓼蓝种子、幼叶和茎段 3 种外植体分别消毒处理后,将其接种在诱导培养基上,暗培养一段时间后观察各自的长势。有些种子萌发出芽(图 1a),难以诱导出愈伤组织;幼叶诱导的愈伤组织较少且白色疏松(图 1b);6 d 后有些茎段两端开始膨大,生长成纺锤体形状,逐渐生长形成淡黄色致密的愈伤组织,茎段诱导的愈伤有些呈黄色致密结构,有些部位呈浅

绿色,长势较为缓慢(图1c)。对外植体消毒处理相比较,种子颗粒过小,有壳,来自半野生植株的种子无菌操作污染率相对较高;幼叶取材时效性强;而茎段虽然诱导愈伤组织

生长缓慢,但愈伤组织活力较好,且茎段消毒处理容易操作,效果较好。可见茎段是蓼蓝诱导愈伤组织合适的外植体。



注:a.种子;b.幼叶;c.茎段

Note:a. seeds;b. young leaves;c. stems

图1 蓼蓝不同外植体诱导愈伤组织比较

Fig.1 Comparison of callus induced by different explants of *Polygonum tinctorium*

2.2 不同培养基配比对蓼蓝愈伤组织诱导的影响 从表1可看出,植物生长激素6-BA和2,4-D都对茎段愈伤组织的诱导起促进作用,2,4-D浓度对诱导效果有更大的影响,愈伤组织在添加2,4-D的培养基上发生得快,最早在诱导6d后茎段两端开始出现愈伤。不添加2,4-D时,茎段几乎难以诱导出愈伤,而是形成不定芽。当2,4-D浓度为0~2.0 mg/L时,其对茎段愈伤组织的发生起促进作用,同时出芽率有所下降。茎段在培养基9(MS+6-BA 1.0 mg/L+2,4-D 2.0 mg/L)中诱导培养,平均诱导率达到最大(73.33%),且与其他培养基中的平均诱导率分别在0.05和

0.01水平差异显著。当2,4-D浓度继续增大时,其愈伤组织受到了抑制,平均诱导率开始下降。6-BA浓度增大时,其对平均诱导率均有所抑制。综合比较,适合蓼蓝茎段诱导愈伤组织的培养基配方为MS+6-BA 1.0 mg/L+2,4-D 2.0 mg/L。

将诱导得到的愈伤组织转至继代培养基生长,继代培养基采用与初代相同的诱导培养基配比(培养基9)。愈伤组织经过继代培养块状增大,生长致密,呈一簇一簇的颗粒状,颜色淡黄,生长旺盛。也有极少量愈伤块出现褐化,少量颜色变得浅白,失去了分化再生出芽的能力。

表1 不同培养基配比对蓼蓝愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effects of different culture medium proportions on induction of *Polygonum tinctorium* callus

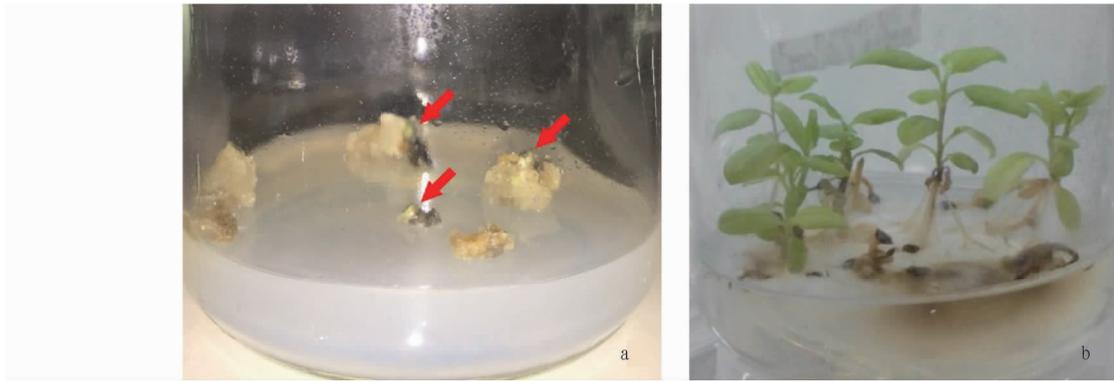
编号 No.	6-BA 浓度 6-BA concentration // mg/L	2,4-D 浓度 2,4-D concentration // mg/L	接种数 Number of vaccination	平均诱导率 Average induction rate // %		
				种子 Seeds	幼叶 Young leaves	茎段 Stems
1	0.5	0	20	5.00 dC	1.67 dC	0 eC
2	0.5	0.5	20	13.33 bB	21.67 cB	35.00 cB
3	0.5	1.0	20	16.67 bB	35.00 bA	33.33 cB
4	0.5	2.0	20	26.67 aA	40.00 bA	51.67 bA
5	0.5	3.0	20	26.67 aA	23.33 cB	58.33 aA
6	1.0	0	20	0 dC	1.67 dC	21.67 cB
7	1.0	0.5	20	26.67 aA	15.00 cB	43.33 bA
8	1.0	1.0	20	30.00 aA	40.00 bA	56.67 bA
9	1.0	2.0	20	26.67 aA	53.33 aA	73.33 aA
10	1.0	3.0	20	26.67 aA	43.33 aA	41.67 bA
11	2.0	0	20	1.67 dC	0 dC	16.67 dB
12	2.0	0.5	20	18.33 bB	30.00 bA	40.00 bA
13	2.0	1.0	20	31.67 aA	40.00 bA	31.67 cB
14	2.0	2.0	20	18.33 bB	15.00 cB	23.33 cB
15	2.0	3.0	20	10.00 cB	23.33 cB	18.33 dB
16	3.0	0	20	1.67 dC	0 dD	18.33 dB
17	3.0	0.5	20	20.00 bB	31.67 bA	13.33 dB
18	3.0	1.0	20	13.33 bB	18.33 cB	13.33 dB
19	3.0	2.0	20	16.67 bB	15.00 cB	21.67 cB
20	3.0	3.0	20	10.00 cB	18.33 cB	21.67 cB

注:同列数据后小写字母不同表示差异显著($P < 0.05$),同列数据后大写字母不同表示差异极显著($P < 0.01$)

Note:Different small letters within the same column mean significant differences($P < 0.05$),different capital letters within the same column mean extremely significant differences($P < 0.01$)

2.3 不同培养基配比对蓼蓝愈伤组织分化的影响 为了获得蓼蓝再生植株的主苗,对继代培养后的愈伤组织转入分化培养基进行光照培养。经过28d的培养,愈伤组织开始出现

绿点(图2a),致密饱满,培养63d后大部分胚性愈伤组织分化出苗(图2b)。



注: a. 出现绿化的愈伤组织; b. 分化出苗的蓼蓝

Note: a. the greening callus; b. the differentiated *P. tinctorium*

图2 分化培养的蓼蓝愈伤组织

Fig.2 *Polygonum tinctorium* callus under differentiation culture

由表2可知,随着6-BA浓度的升高,分化率先增加,后逐渐降低,NAA浓度为0.5 mg/L时,分化率相对较大,愈伤组织平均分化率达51.67%,与其他培养基中的平均分化率

分别在0.05和0.01水平上差异显著。结果表明,适合蓼蓝愈伤组织分化的培养基是6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L。

表2 不同培养基对蓼蓝愈伤组织分化的影响

Table 2 Effects of different culture medium proportions on differentiation of *Polygonum tinctorium* callus

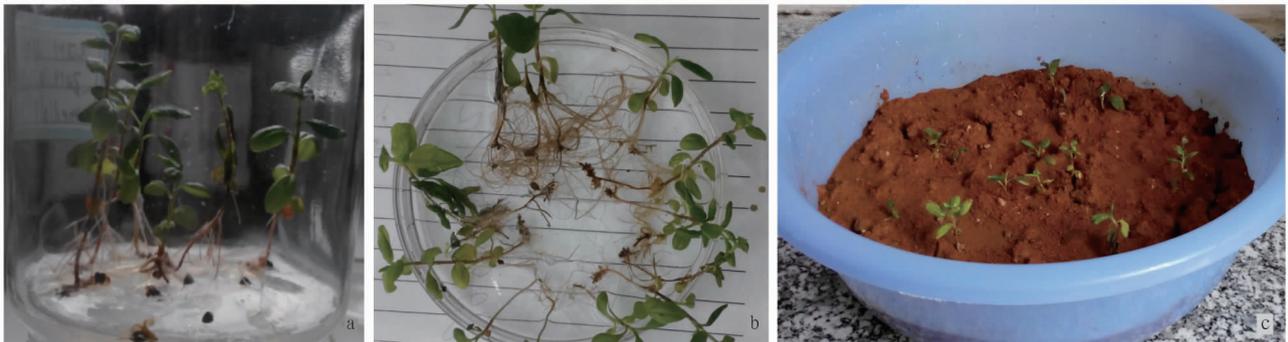
编号 No.	6-BA 浓度 6-BA concentration mg/L	NAA 浓度 NAA concentration mg/L	接种数 Number of vaccination	分化出绿芽块数 Number of differential green buds	平均分化率 Average differentiation rate//%
1	1.0	0	20	0	20.00 bB
2	1.0	0.5	20	12	51.67 aA
3	1.0	1.0	20	8	28.33 bB
4	2.0	0	20	0	6.67 cB
5	2.0	0.5	20	6	18.33 bB
6	2.0	1.0	20	5	25.00 bB
7	3.0	0	20	0	8.33 bB
8	3.0	0.5	20	5	16.67 bB
9	3.0	1.0	20	3	21.67 bB

注:同列数据后小写字母不同表示差异显著($P < 0.05$),同列数据后大写字母不同表示差异极显著($P < 0.01$)

Note: Different small letters within the same column mean significant differences ($P < 0.05$), different capital letters within the same column show extremely significant differences ($P < 0.01$)

2.4 生根与移栽 蓼蓝愈伤组织分化的芽在1/2 MS + NAA 0.5 mg/L培养基中培养5~8 d开始生根,生根率达100% (图3a),平均根长达1.8 cm,即可移出培养瓶炼苗1~

2 d (图3b),移栽至湿润的钵土中种植(图3c),补充水分以保温保湿。移栽后5 d对幼苗统计,定植成活率达100%。移栽21 d后,幼苗开始长出多片新叶,保持良好的生长优势。



注: a. 生根; b. 炼苗; c. 移栽

Note: a. rooting; b. exercising seedling; c. transplanting

图3 蓼蓝愈伤组织的生根、炼苗及移栽

Fig.3 Rooting, exercising seedling and transplanting of *Polygonum tinctorium* callus

- [4] 金焰,张咏,姜晟. EOS/MODIS 数据在太湖蓝藻水华时空分布规律提取中的应用研究[J]. 环境科技,2009,22(S2):9-11,14.
- [5] 翁建中,李继影,梁柱,等. 太湖蓝藻水华时空分布与预警监测响应的分析[J]. 环境监控与预警,2010,2(3):1-4.
- [6] SOLANO R, DIDAN K, JACOBSON A, et al. MODIS vegetation indices (MOD13) C5 user's guide[M]. Tucson, AZ, USA: University of Arizona, 2010.

- [7] 罗伯特·海宁. 空间数据分析理论与实践[M]. 李建松,秦昆,译. 武汉: 武汉大学出版社,2009.
- [8] ORNL DAAC. MODIS collection 5 land products global subsetting and visualization tool[Z]. Oak Ridge, Tennessee, USA: ORNL DAAC,2008.
- [9] 尚琳琳,马荣华,段洪涛,等. 利用 MODIS 影像提取太湖蓝藻水华的尺度差异性分析[J]. 湖泊科学,2011,23(6):847-854.

(上接第125页)

3 讨论与结论

以天然染料植物为材料进行组织培养,不仅有利于保护山地少数民族地区植物的遗传多样性,民族药用植物资源的可持续利用,而且可为优良种质资源鉴评和品种改良奠定基础。贵州黔东南地处苗岭山区,属中亚热带季风湿润气候区,具有冬无严寒,夏无酷暑,雨热同季的特点,年平均气温 $14\sim 18\text{ }^{\circ}\text{C}$,适宜蓼蓝种植生长。蓼蓝可持续利用对苗岭山区少数民族文化的传承有着重要的意义。但当前蓼蓝野生或半野生分布零散,产量低,生长速度缓慢,种质资源良莠不齐,很大程度上制约了蓼蓝在民族工艺上的规模化应用,而组织培养是蓼蓝快繁的有效技术途径之一。该试验比较选用了蓼蓝茎段为外植体进行组织培养,建立了蓼蓝组织培养再生体系,从外植体的消毒及其愈伤组织的诱导、继代增殖、分化再生及生根培养各个阶段,比较分析了其生长适宜的最佳培养基配方。

蓼科植物以不同的外植体来进行组织培养目前均有报道,其中以茎段和幼叶作为外植体较为常见。柴瑞娟等^[12]比较了荞麦的幼茎和幼叶作为外植体诱导愈伤组织,结果表明幼茎在偏软的培养基上诱导愈伤组织较为理想。刘明珍等^[13]以酸模叶蓼带腋芽茎段作为外植体进行离体培养,研究了进一步诱导生成完整植株的快繁技术。刘晓东等^[14]以香蓼带芽茎段为外植体,初步建立了香蓼组织培养快繁体系。该试验中蓼蓝种子较小,消毒接种易受污染,往往需去宿被再消毒而使操作效率降低,幼叶取材又受时间限制。综合考虑,选用蓼蓝茎段作为外植体较为适合,茎段取材便捷,便于消毒,易操作,污染率低,且愈伤组织诱导率较高。

该研究表明,植物激素 $6-BA$ 、 $2,4-D$ 均能促进愈伤组织的诱导,其中 $2,4-D$ 浓度对愈伤组织的诱导有着更大的影响,且表现出明显的质量浓度效应,适宜的植物激素浓度对愈伤组织起促进作用,而超过一定浓度,起抑制作用。这一结果与王鹏姬等^[15]对蓼科荞麦植物研究结果一致。刘晓东等^[14]诱导香蓼腋芽诱导的最适培养基为 $MS + 6-BA 2.0\text{ mg/L} + NAA 0.1\text{ mg/L}$,刘明珍等^[13]比较筛选出酸模叶蓼最适的增殖培养基为 $MS + NAA 1.0\text{ mg/L} + 6-BA$

0.05 mg/L 。该试验中蓼蓝茎段诱导愈伤组织的最佳培养基配方为 $MS + 6-BA 1.0\text{ mg/L} + 2,4-D 2.0\text{ mg/L}$,愈伤组织分化的最佳培养基为 $6-BA 1.0\text{ mg/L} + NAA 0.5\text{ mg/L}$ 。综合比较来看, $6-BA$ 、 $2,4-D$ 在蓼蓝愈伤组织诱导、增殖方面有着更大的影响, NAA 在对蓼蓝分化、生根方面有着很大的影响。

蓼蓝愈伤组织的诱导及再生体系研究的建立,有望改善常规种植产量低、生长速度慢,少数民族地区需求量大的矛盾,可为蓼蓝种质资源保护鉴评和品种遗传改良提供物质基础,并对利用天然植物染料的民族工艺起到保护和传承的作用。

参考文献

- [1] COOKSEY C J. Indigo: An annotated bibliography [J]. Biotechnol & histochemistry, 2007, 82(2): 105-125.
- [2] SIVA R. Status of natural dyes and dye-yielding plants in India [J]. Current science, 2007, 92(7): 916-925.
- [3] 李维贤,陈卫华. 明至民国时期广东蓝靛植物的种植状况[J]. 中国农史, 2013(6): 46-57.
- [4] 淳于步,李玲. 贵州少数民族植物染色主染源的生长环境调查[J]. 凯里学院学报, 2014, 32(6): 46-49.
- [5] 余强. 青,取之于蓝而胜于蓝: 植物蓝靛染色的生态性选择[J]. 中国美术馆, 2013(10): 115-117.
- [6] 贾煜洲. 贵州从江县岫沙苗族枫香染工艺考察与研究札记[J]. 美与时代, 2015(4): 106-110.
- [7] 王祖远. 在黔东南品味蜡染大餐[J]. 老人世界, 2013(9): 38-39.
- [8] JANG H G, HEO B G, PARK Y S, et al. Chemical composition, antioxidant and anticancer effects of the seeds and leaves of indigo (*Polygonum tinctorium* Ait.) plant [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2012, 167(7): 1986-2004.
- [9] YU Z, YOSHINAKA Y, TAKEDA T, et al. Highly potent anti-HIV-1 activity isolated from fermented *Polygonum tinctorium* Aiton [J]. Antiviral research, 2005, 66(2/3): 119-128.
- [10] HEO B G, PARK Y J, PARK Y S, et al. Anticancer and antioxidant effects of extracts from different parts of indigo plant [J]. Industrial crops and products, 2014, 56: 9-16.
- [11] PARK Y J, SHIN C S, KIM B E, et al. Antioxidant and binding properties of methanol extracts from indigo plant leaves [J]. Chemical papers, 2014, 68(10): 1421-1427.
- [12] 柴瑞娟,吴先林. 植物激素对荞麦组织培养的研究[J]. 安徽工程科技学院学报, 2006, 21(2): 19-21.
- [13] 刘明珍,陈乃富,李坤,等. 酸模叶蓼的组织培养快繁技术[J]. 中国林副特产, 2010(4): 7-9.
- [14] 刘晓东,刘娇,何淼. 香蓼带芽茎段的组织培养和快速繁殖[J]. 草业科学, 2014, 31(1): 89-94.
- [15] 王鹏姬,高金锋,苏旺,等. 培养条件对荞麦愈伤组织生长及黄酮合成的影响[J]. 核农学报, 2013, 27(5): 591-597.