

中国菟丝子离体再生体系的建立

李东霄^{1,2}, 杨晓波¹, 张国广¹, 常景玲², 陈亮¹

(1. 厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005; 2. 河南科技学院, 河南 新乡 453003)

摘要: 选取萌发 3~5 d、长度 3~5 cm 的中国菟丝子(*Cuscuta chinensis* Lam.)幼苗,将其分为上、中、下 3 部分并作为外植体进行离体培养与植株再生研究。结果表明,其上、中部片段更适宜愈伤组织诱导;诱导培养基以添加 1 mg L⁻¹ NAA 和 1 mg L⁻¹ BA 的 MMS 培养基效果最好,此培养基也可用于愈伤组织的继代培养,愈伤组织在上述培养基中已生长一年之久。分化培养基为添加 1 mg L⁻¹ BA 的 MMS 培养基,平均每块愈伤组织可以产生 2.8 株植株。

关键词: 中国菟丝子; 离体培养; 愈伤组织; 植株再生

中图分类号: Q943.1

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2008)03-0279-04

Plant Regeneration *in vitro* of *Cuscuta chinensis* Lam.

LI Dong-xiao^{1,2}, YANG Xiao-bo¹, ZHANG Guo-guang¹,
CHANG Jing-ling², CHEN Liang¹

(1. School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China)

Abstract: An efficient method of callus induction and plant regeneration of *Cuscuta chinensis* was established. The seedlings germinated for 3~5 d and about 3~5 cm length were selected as explants, and then divided into three parts, upper, middle and lower. Callus were inducted from upper or middle parts of seedlings on a modified Murashige and Skoog (MMS) medium supplemented with 1 mg L⁻¹ NAA and 1 mg L⁻¹ BA. The calli have been subcultured on such medium for over a year. Shoot regeneration from callus was achieved on MMS medium containing 1 mg L⁻¹ BA and could obtain 2.8 shoots per callus.

Key words: *Cuscuta chinensis* Lam.; *In vitro*; Callus; Shoot regeneration

菟丝子属(*Cuscuta*)隶属于旋花科(Convolvulaceae),为寄生草本植物;无根、叶或叶退化成小的鳞片,茎细长缠绕,大多数种类呈黄色,尽管部分菟丝子种类含有叶绿素,可以进行有限的光合作用,但仍然不能维持其进行自养生活,必须依靠茎缠绕寄主,并通过产生吸器与寄主的维管组织相连,进而从寄主体内获取养分。

菟丝子的寄主范围非常广泛,而且又多为豆科等经济植物,因而,危害极大。另一方面,在我国,一些菟丝子种类(如中国菟丝子 *Cuscuta chinensis* Lam.)的种子常用作补益中药,具有滋补肝肾、固精缩尿、安胎、明目等功效^[1]。此外,利用菟丝子寄主

范围广泛、生长迅速、寄生后能大量吸收寄主养分最终导致寄主因养分不足而生长受到抑制甚至死亡的生物学特性,近年来成功将其应用于防治一些外来入侵物种,如对薇甘菊的生物防治^[2]。

目前,有关菟丝子离体培养的研究报道很少。Maheshwari 和 Baldev^[3]报道从头柱菟丝子(*C. reflexa*)的合子胚诱导出愈伤组织。Baldev^[4]报道一定光照条件下可以诱导培养的头柱菟丝子开花。Maheshwari等^[5]研究了植物激素对中国菟丝子离体茎尖的作用效果。章毓英和李扬汉^[6]报道了日本菟丝子(*C. japonica*)的离体培养以及对花芽的诱导。Furuhashi^[7]在诱导日本菟丝子茎段开花时,偶尔也

会产生愈伤组织,但由于褐化导致产生的愈伤组织不能维持长久。目前,采用头柱菟丝子和三叶草菟丝子(*C. trifolii*)^[8-9]成功诱导出愈伤组织,并进行继代培养,随后又诱导愈伤组织分化产生新的植株。

建立菟丝子组织培养与再生体系,可进一步用于原生质体培养和细胞生物学的研究,同时也是实现基因转化的前提。目前,随着一些涉及菟丝子寄生机制基因的分离克隆,以基因转化体系作为平台,对基因功能及菟丝子相应生理机制的研究将具有重要的理论和实践意义。此外,作为一种传统的中药材,构建其组织培养体系有助于获得一些有重要价值的药用成分或代谢中间产物,这对中药活性成分的开发利用及工业化生产具有重大意义。本文对中国菟丝子愈伤组织的诱导及植株再生进行研究,为开展基因功能和寄生机制研究,以及开发利用其药用成分提供研究基础。

1 材料和方法

1.1 植物材料

中国菟丝子(*Cuscuta chinensis* Lam.)种子采自厦门大学校园。种子采集后保存在 4 ~ 6℃ 冰箱中。种子消毒参照 Furuhashi 的方法^[7]并略加改动:将中国菟丝子种子在浓硫酸中浸泡 30 min,中间搅动 3 次;无菌水冲洗干净后,用 3% 的次氯酸钠浸泡 10 min;无菌水冲洗干净,将消毒的种子接种在添加 3 g L⁻¹琼脂且只包含 MS 无机盐成分的固体培养基中(pH 5.7)。

1.2 愈伤组织诱导及生长

中国菟丝子种子萌发 3 ~ 5 d,选取长度约在 3 ~ 5 cm 的幼苗,切成上、中、下 3 段,同时,切除上部片段的顶端分生组织,使每个片段长约 1 ~ 1.5 cm。将上述片段转入添加不同激素组合的 MMS^[9]或 MB₃^[8]诱导培养基中,每瓶接种 12 个,各部分片段各 4 个,而每种培养基中的茎段总数为 72 个。

用于愈伤组织诱导的 MMS 系列培养基见表 1。而 MB₃系列诱导培养基中添加的激素分别为 0.75 mg L⁻¹ 2,4-D 结合 2、3、4、5 或 6 mg L⁻¹ KT,或者 5 mg L⁻¹ KT 结合 0.25、0.5、0.75、1 或 1.25 mg L⁻¹ 2,4-D;此外,添加 0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5 或

5 mg L⁻¹ KT 以及添加 0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4 或 4.5 mg L⁻¹ 2,4-D 的 MB₃系列培养基也用于愈伤组织的诱导。

愈伤组织形成后,用同样的培养基进行愈伤组织的继代培养;此外,取部分愈伤组织在添加 1 mg L⁻¹ BA 的 MMS 培养基中培养,观察愈伤组织生长增殖的情况。另外,在部分培养基中还使用蔗糖或葡萄糖和甘露醇(1:1)组合以观察其对愈伤组织生长增殖的影响。

1.3 植株再生

愈伤组织形成后,将部分愈伤组织移入添加不同激素的 MMS 分化培养基中,以诱导愈伤组织分化。上述分化培养基的激素组成为:2 或 3 mg L⁻¹ NAA 分别结合 0.5、1、2、3、4 或 5 mg L⁻¹ KT,或者,1 mg L⁻¹ NAA 分别结合 0.5、1、2 或 3 mg L⁻¹ KT。部分培养基中只添加了 1、2、3、4 或 5 mg L⁻¹ KT。

培养基制备时,用 NaOH 调 pH 值至 5.8,121℃ 高压灭菌 20 min。培养基每 15 ~ 30 d 更新一次。培养时的光照条件为 14 h 白光/10 h 黑暗,白光光源为普通日光灯(F36W T8 DAYLIGHT),光强为 2 000 Lx,培养温度为 23 ± 2℃。及时观察、统计愈伤组织形成、生长及分化情况和结果。

2 结果和讨论

2.1 愈伤组织诱导

在将中国菟丝子幼苗片段转入诱导培养基约 2 周时,在包含不同激素浓度的 MMS 系列培养基中,幼苗片段开始膨大,绿色也逐渐加深。不久,幼苗片段发育形成团块状组织,有不定芽逐渐分化形成;稍后形成的不定芽逐渐发育形成幼苗。

继代培养时,将发育形成的幼苗、新形成的不定芽以及褐化死亡的团块状组织除去;大约 6 周后,可以观察到有致密愈伤组织形成,在其表面有生长旺盛的细胞团形成(图 1a);此后,细胞团增长速度加快,体积不断增大,结构变得松散,颜色也逐渐变淡,而且,不定芽的形成数目也逐渐减少至几乎不再有不定芽产生。大约在培养 70 ~ 90 d 时,细胞团发育形成为浅黄色、松散均匀、发育良好的愈伤组织(图 1b)。

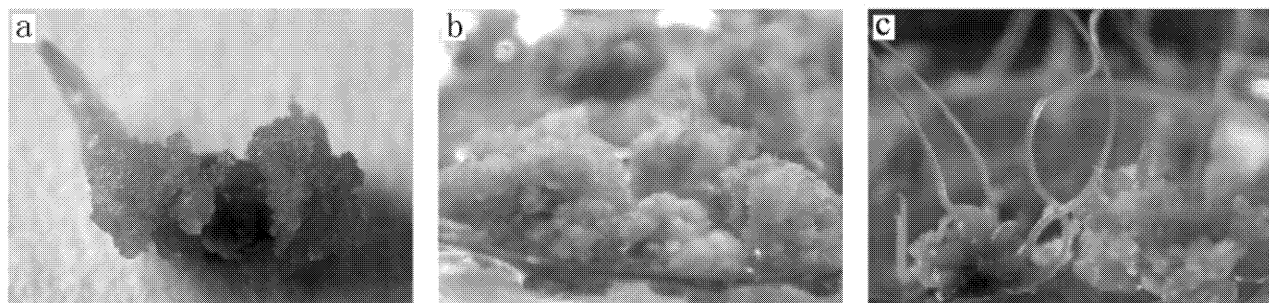


图1 中国菟丝子愈伤组织的诱导和分化

Fig. 1 Callus induction and differentiation of *Cuscuta chinensis*

a: 在 NAA 和 BA 均为 1 mg L^{-1} 的 MMS 培养基中已培养 6 周的幼苗片段 A seedling segment cultured on MMS medium supplemented with 1 mg L^{-1} NAA and 1 mg L^{-1} BA for 6 weeks; b: 在 NAA 和 BA 均为 1 mg L^{-1} 的 MMS 培养基中培养 12 周的愈伤组织 Calli cultured on MMS medium supplemented with 1 mg L^{-1} NAA and 1 mg L^{-1} BA for 12 weeks; c: 在添加 1 mg L^{-1} BA 的 MMS 培养基中培养 6 周后愈伤组织的分化情况 Calli differentiation cultured on MMS medium supplemented with 1 mg L^{-1} BA for 6 weeks.

上述培养基中,包含 1 mg L^{-1} BA 和 1 mg L^{-1} NAA 的 MMS 培养基最适宜愈伤组织的诱导生长,愈伤组织的诱导率可高达 86%(图 1b,表 1)。而在添加 1 mg L^{-1} BA 的 MMS 培养基中培养的中国菟丝子幼苗片段,虽然在继代培养过程中除去了不定芽以及由不定芽分化形成的幼苗,但生长的团块状组织不断分化形成新的不定芽及幼苗,这种现象在持续了 24 周之后逐渐减弱。尽管最终没有发育形成良好的愈伤组织,但因为在培养过程中表现出持续的不定芽再生能力以及分化能力,因而,可用于构建直接分化再生系统。类似于 Srivastava 等报道^[9],在具有较高 NAA/BA 比值的培养基中,愈伤组织生长较慢,而且容易发生褐化。Srivastava 等^[9]报道,在培养基中添加 0.1 mg L^{-1} GA 可以防止愈伤组织褐化,但也限制了愈伤组织的生长率。本研究发现,含有 1 mg L^{-1} NAA 和 1 mg L^{-1} BA 的 MMS 培养基同样可用于愈伤组织的快速生长增殖。培养初期,培养基每个月更换一次;3 个月后,快速生长的愈伤组织常常在 15~20 d 内开始褐化死亡。为此,将继代时间调整为 15~20 d,而且在继代时切除已褐化的愈伤组织,便可以有效地避免褐化发生。我们按照此方法继代培养愈伤组织已长达一年之久。

与头柱菟丝子和三叶草菟丝子的诱导过程相比^[8-9],中国菟丝子幼苗片段诱导形成愈伤组织需要的时间稍长,这可能是因为植物材料的不同引起的。此外,与 Srivastava 等^[9]报道头柱菟丝子幼苗基部容易形成愈伤组织不同,中国菟丝子幼苗的中、上部更容易形成愈伤组织,而下部片段在愈伤

组织形成过程中,发生膨大及形成团块状组织需要更长的时间,并且更容易发生褐化死亡(数据未列),这可能与根的生长发育特点有关。有关报道^[10-11]指出,菟丝子在胚胎发育的鱼雷胚时期,根原细胞已经退化,而萌发后形成的根部,已特化为贮存水分的结构。不久,初生根开始退化,细胞器等解体成可溶性物质,连同贮存的营养物质通过中柱转运到幼苗上部。这可能是难以从菟丝子根部诱导愈伤组织形成的原因。

通过在培养基中添加不同糖类物质,我们观察了糖类物质对中国菟丝子愈伤组织生长的影响,结果表明,葡萄糖比蔗糖更利于愈伤组织的旺盛生长,

表 1 NAA 和 BA 浓度对愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effects of concentrations of NAA and BA on callus induction

NAA (mg L^{-1})	BA (mg L^{-1})	外植体数 Number of explants	诱导率(%) Callus induced frequency
0	1	46	0
1	1	44	86
2	1	48	42
3	1	48	65
4	1	48	25
5	1	48	23
3	0.5	48	44
3	1.5	47	53
3	2	48	69
3	2.5	47	57

数据统计基于幼苗上、中部片段,于诱导培养后 12 周统计。

The data were determined by the numbers of the explants of upper and middle part of seedlings cultured for 12 weeks.

与 Srivastava 等^[9]的报道类似。曾有研究^[12]报道,在寄生植物木质部中,糖的浓度 5 倍于寄主,主要成分是甘露醇。本研究还尝试使用了葡萄糖和甘露醇(1:1)组合,发现同时使用葡萄糖和甘露醇(1:1)与单独使用葡萄糖对中国菟丝子愈伤组织的生长没有明显的差异。

Bakos 等^[8]在诱导三叶草菟丝子愈伤组织时添加不同浓度 KT/2,4-D 的 MB₃ 培养基。而在相同或类似成分的培养基中,却无法成功诱导中国菟丝子幼苗片段形成愈伤组织。这与 Srivastava 等^[9]报道在同样培养基上也无法诱导头柱菟丝子形成愈伤组织的结果相同。在添加不同浓度 KT 的 MB₃ 培养基中,培养 15 d 后,中国菟丝子幼苗片段出现膨大并且颜色变深,包含有芽原基和不定芽的团块状组织逐渐形成,但在 6 个月的培养过程中,最终也没能形成松散均匀、发育良好的愈伤组织;而且,培养过程中,材料很容易褐化死亡。而中国菟丝子幼苗片段在添加不同浓度 2,4-D 的 MB₃ 培养基中培养 4~6 周便逐渐开始死亡。在整个培养期间,幼苗片段几乎没有明显的膨大及变绿,类似 Bakos 等^[8]的报道。

2.2 植株再生

在愈伤组织形成 4 周后,将中国菟丝子愈伤组织移入添加 1 mg L⁻¹ BA 的 MMS 培养基中进行培养,30~40 d 后不断有不定芽形成,大约 2 周内这些不定芽逐渐发育形成新的植株(图 1c)。在培养的 50 块愈伤组织中,共分化形成 140 株幼苗,平均每块可以产生 2.8 株。

有研究者认为,上述培养基尽管有利于头柱菟丝子愈伤组织分化形成芽原基,但是要完全分化形成新植株,还需要添加低浓度的 KT^[9]。在三叶草菟丝子愈伤组织的分化诱导过程中也有类似报道^[8]。尽管在含不同浓度 NAA/KT 或 KT 上的培养基中都有芽原基的形成,但是,这些芽原基几乎都无法分化形成新的植株。

总之,本研究在添加不同浓度 NAA 和 BA 的 MMS 培养基上,均能诱导中国菟丝子幼苗片段形成愈伤组织,其中,以 NAA 和 BA 浓度均为 1 mg L⁻¹

时的诱导效果最好。添加 1 mg L⁻¹ BA 的 MMS 培养基,不仅可以用于诱导中国菟丝子愈伤组织分化形成新的植株,而且,由于中国菟丝子幼苗片段在此培养基中可以持续产生不定芽和新的植株,所以,也可用于构建直接分化再生系统。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典一部 [M]. 北京:化学工业出版社,2000:253.
- [2] Liao W B(廖文波), Fan Q(凡强), Wang B S(王伯荪), et al. Discovery of three species of *Cuscuta* harming *Mikania micrantha* in south China and their taxonomical identification [J]. Acta Sci Nat Univ Sunyatseni(中山大学学报:自然科学版), 2002, 41(6): 54-56. (in Chinese)
- [3] Maheshwari P, Baldev B. Artificial production of buds from the embryos of *Cuscuta reflexa* [J]. Nature, 1961, 91: 197-198.
- [4] Baldev B. *In vitro* studies of floral induction on stem apices of *Cuscuta reflexa* Roxb. — A short-day plant [J]. Ann Bot, 1962, 26: 173-180.
- [5] Maheshwari R, Shailini C, Veluthambi K, et al. Interaction of gibberellic acid and indole-3-acetic acid in the growth of excised *Cuscuta* shoot tips *in vitro* [J]. Plant Physiol, 1980, 65: 186-192.
- [6] Zhang Y Y(章毓英), Li Y H(李扬汉). The floral induction of *Cuscuta japonica* *in vitro* cultivation [J]. J Nanjing Agri Univ(南京农业大学学报), 1988, 11(2): 24-29. (in Chinese)
- [7] Furuhashi K. Establishment of a successive culture of an obligatory parasitic flowering plant, *Cuscuta japonica*, *in vitro* [J]. Plant Sci, 1991, 79: 241-246.
- [8] Bakos A, Fari M, Toldi O, et al. Plant regeneration from seedling-derived callus of dodder (*Cuscuta trifolii* Bab. et Giggs) [J]. Plant Sci, 1995, 109: 95-101.
- [9] Srivastava S, Dwivedi U N. Plant regeneration from callus of *Cuscuta reflexa* — an angiospermic parasite — and modulation of catalase and peroxidase activity by salicylic acid and naphthalene acetic acid [J]. Plant Physiol Biochem, 2001, 39: 529-538.
- [10] Huang J Z(黄建中), Li Y H(李扬汉). Development and deterioration of primary root of parasitic plant dodder [J]. J Nanjing Agri Univ(南京农业大学学报), 1993, 2: 12-17. (in Chinese)
- [11] Bakos A, Borsics T, Toldi O, et al. Evidence for somatic embryogenesis during plant regeneration from seedling-derived callus of dodder (*Cuscuta trifolii* Bab. et Gibs) [J]. Plant Cell Rep, 2000, 19: 525-528.
- [12] Li T R(李天然). Seed physiology of parasitic angiosperms and interaction between parasites and host plants [J]. Plant Physiol Commun(植物生理学通讯), 1996, 32(6): 450-457. (in Chinese)