

Establishment of Tissue Culture Rapid Propagation System for *Solanum nigrum*

Xiaoyun Wu¹, Weilong Kang², Minghua Luo^{2,3*}, Di Yang²

¹College of Resources and Environmental Engineering, Mianyang Normal University, Mianyang Sichuan

²College of Life Science and Technology, Mianyang Normal University, Mianyang Sichuan

³Ecological Security and Protection Key Laboratory of Sichuan Province, Mianyang Sichuan

Email: *973946564@qq.com

Received: Jun. 21st, 2018; accepted: Jul. 10th, 2018; published: Jul. 17th, 2018

Abstract

The stems and leaves of asparagus seedlings were used as explants, and the optimal induction medium was selected through induction of adventitious buds and rooting culture. The results showed that the best induction medium for stems was MS + NAA 0.5 mg/L + 6-BA 2.0 mg/L, and the induction rate was 92.5%; the optimal induction medium for leaves was MS+NAA 0.1 mg/L + 6-BA 2.0 mg/L, and the induction rate was as high as 100%; the most suitable rooting medium was 1/2MS + NAA 0.5 mg/L, and the survival rate of the transplanted plants was 98%. Conclusion: Through the research on tissue culture rapid propagation of *Solanum nigrum*, it provides the theoretical basis for the industrial production of high-quality seedlings to meet the requirements of large-scale production.

Keywords

Solanum nigrum, Plant Tissue Culture, Rapid Propagation, MS Medium

龙葵组织培养快繁体系的建立

巫小云¹, 康卫龙², 罗明华^{2,3*}, 杨迪²

¹绵阳师范学院资源环境工程学院, 四川 绵阳

²绵阳师范学院生命科学与技术学院, 四川 绵阳

³生态安全与保护四川省重点实验室, 四川 绵阳

Email: *973946564@qq.com

收稿日期: 2018年6月21日; 录用日期: 2018年7月10日; 发布日期: 2018年7月17日

*通讯作者。

摘要

以龙葵无菌苗茎段和叶片为外植体,通过不定芽的诱导及生根培养,筛选出最佳诱导培养基。结果表明:茎段最佳诱导培养基为MS + NAA 0.5 mg/L + 6-BA 2.0 mg/L,其诱导率为92.5%;叶片最佳诱导培养基为MS + NAA 0.1 mg/L + 6-BA 2.0 mg/L,诱导率高达100%;最佳生根培养基为1/2MS + NAA 0.5 mg/L,炼苗移栽成活率98%。结论:通过对龙葵组培快繁体系的研究,为实现优质种苗的工厂化生产提供理论依据,以满足大规模生产的需求。

关键词

龙葵, 植物组织培养, 快速繁殖, MS培养基

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

龙葵(*Solanum nigrum* L.),茄科(Solanaceae)茄属(*Solanum*)一年至多年生的草本植物[1]。别名野辣虎、野海椒或小苦菜,株高30~60 cm,茎直立,叶互生,浆果球形,熟时呈紫黑色[2],具有清热解毒,消肿止痛等功效[3],是一种药、食、观赏价值兼备的植物[1]-[6]。此外,龙葵还被报道为重金属镉污染土壤的超积累植物,在对镉污染土壤的耐性机制及富集机制方面具有十分重要的研究价值[7][8]。在一些新兴应用领域,如生物医药及矿山的生态修复等方面也表现出良好的应用价值[9][10],已经成为新的研究热点。

目前野生龙葵资源不能满足市场需求,在生产过程中多为播种繁殖,对其个体优良性状的保持极其不利,容易导致优良品种的流失。而且关于龙葵组织培养的研究报道甚少,主要集中在对龙葵叶片和果肉愈伤组织的诱导培养[11][12],关于龙葵茎段诱导的研究尚未见报道,且研究时间距今已有一定年份,不具有太大参考价值。本实验主要选用龙葵的茎段及叶片作为外植体,筛选出最佳诱导培养基。从而提高组培的效率,并保证其优良品质的遗传。

2. 材料与方法

2.1. 试验材料

龙葵种子购自绵阳市安州区花卉市场。

2.2. 试验方法

2.2.1. 龙葵无菌苗的培养

在25℃恒温水浴锅中浸种12 h,去除浮于水面的种子,在超净工作台用0.1%升汞消毒3 min,用无菌水冲洗5~8次[13],再用灭菌滤纸吸收种子表皮水分,最后将种子均匀接种于MS固体培养基上,共接种30罐。移入恒温恒光培养室,控制培养温度25℃,光照强度1500 lx,定时光照12 h/d [14]。

2.2.2. 诱导丛生芽培养基

根据组培的基本原则,进行不同浓度激素配比设计[15][16][17]。在预实验阶段设置了6-BA 1 mg/L、

2 mg/L、3 mg/L 三个浓度梯度, NAA 设为 0 mg/L、0.1 mg/L、0.5 mg/L 和 1 mg/L 四个浓度, 每组重复 3 次。发现组培苗在 6-BA 为 1 mg/L 和 3 mg/L 诱导率明显低于 2 mg/L, 与熊友华等的发现基本一致[18]。

剪取 1.0 cm 无菌苗茎段及完整叶片, 在叶片上剪切 2~3 条 0.5 cm 的伤口, 再接种于 4 个不同浓度的诱导培养基中(表 1)。每个重复接种 4 个外植体, 每个浓度配制 20 罐, 共 80 罐, 其中茎段和叶片每个浓度 10 罐。

2.2.3. 诱导生根培养基

选择长势良好的丛生芽移至生根培养基(表 3), 为保证茎直立生长, 将其插入 50 ml 生根培养基内 0.5 cm。每罐重复接种 3 株, 每个浓度接种 10 罐。

2.3. 数据记录与分析

数据采用 Excel 和 SPSS 22.0 进行分析处理, 利用单因素方差分析中的 LSD 多重比较检验不同处理间的差异显著性。一周观察两次, 定期拍照记录。计算其诱导率、增殖系数及生根率, 计算公式如下:

$$\text{诱导率(\%)} = \text{诱导出不定芽的外植体数/接种的外植体数} \times 100\% \quad (2-1)$$

$$\text{增殖系数} = \text{增殖的丛生芽总数/接种外植体总芽数} \times 100\% \quad (2-2)$$

$$\text{生根率(\%)} = \text{诱导产生根的外植体数/接种外植体数} \times 100\% \quad (2-3)$$

3. 研究结果与分析

3.1. 茎段诱导培养

龙葵的离体培养和植株再生情况如图 1 所示。接种后几天茎段伤口处出现组织膨大, 12 d 后愈伤组织开始分化出浅绿色小芽, 30 d 后植株长至 4 cm 左右(图 1(a)、图 1(b))。由表 1 可知, 3 号培养基龙葵茎段诱导率最高为 92.5% (见图 1(c)), 有效芽个数最多为 488 个, 植物激素 6-BA 是决定龙葵茎段分化的关键因素, 而不同浓度的 NAA 对茎段诱导培养影响并不明显。综上, MS + NAA 0.5 mg/L + 6-BA 2.0 mg/L 为龙葵茎段最佳诱导培养基。

3.2. 叶片诱导培养

以叶片为外植体接种到愈伤组织诱导培养基中(表 2), 接种 7 d 后, 带柄全叶伤口有卷曲和瘤状物形成。接种 20 d 左右, 所有浓度均有部分愈伤组织产生, 叶柄处最为明显, 并分化出不定芽。其中 2 号产生的愈伤组织最大且为乳白色, 而 1 号产生的愈伤组织较少, 3 号产生的愈伤组织呈绿色, 4 号产生的愈伤组织出现了褐化(见图 1(c)~(f))。40 d 后带柄全叶都形成嫩绿色愈伤组织, 茎段粗壮, 叶片卷曲。由表 3 可知, 带柄全叶在 2 号浓度的培养基中的诱导率最高为 100%, 3 号浓度次之, 4 号浓度最低, 且

Table 1. Effects of different concentration of hormone combination on stem induction

表 1. 不同浓度激素组合对茎段诱导的影响

茎段培养基编号	植物激素(mg/L)		接种数	长出丛生芽的外植体数	诱导率/%	有效芽总个数	增殖系数
	6-BA	NAA					
1	2.0	0	40	26	65.00 ± 1.23d	168	4.20 ± 0.13c
2	2.0	0.1	40	32	80.00 ± 1.25c	260	7.50 ± 0.15b
3	2.0	0.5	40	37	92.50 ± 1.67a	488	12.20 ± 0.22a
4	2.0	1.0	40	34	85.00 ± 1.46b	276	6.90 ± 0.23b

Note: Each value in table represented Mean ± SE, and the difference between different letters in the same column is significant (P < 0.05). 注: 表中数据表示平均数 ± 标准误差, 同列中不同字母表示差异显著性(P < 0.05)。

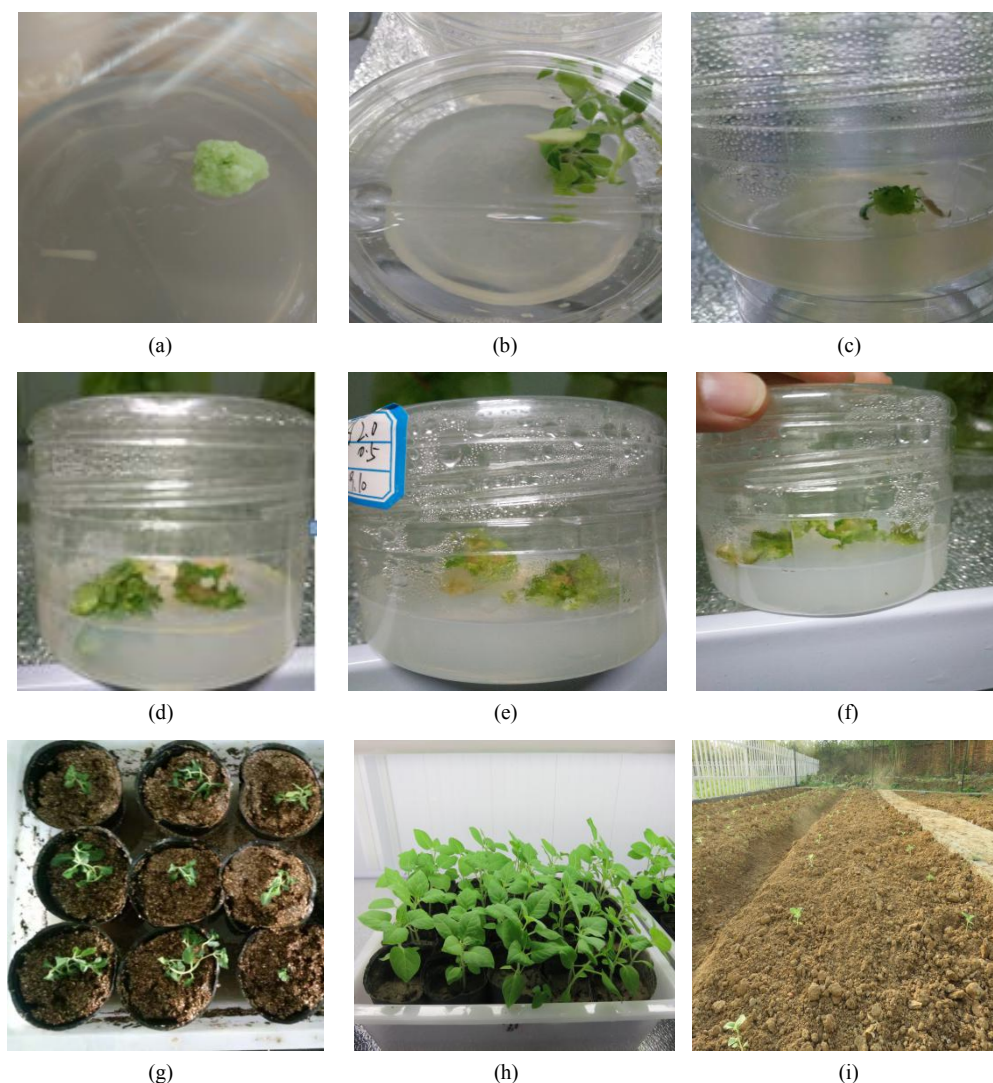


Figure 1. Exotic culture and regeneration of *Solanum nigrum*. (a) 20 days after inoculation of the stem segment; (b) 30 days after vaccination; (c) callus formed by number 1; (d) callus formed by number 2; (e) callus formed by number 3; (f) callus formed on 4; (g) 1 d after transplantation; (h) 15 days after transplantation; (i) 20 days after transplantation

图 1. 龙葵离体培养及再生植株情况。(a) 茎段接种后 20 d; (b) 接种后 30 d; (c) 1 号形成的愈伤组织; (d) 2 号形成的愈伤组织; (e) 3 号形成的愈伤组织; (f) 4 号形成的愈伤组织; (g) 移栽后 1 d; (h) 移栽后 15 d; (i) 移栽后 20 d

Table 2. Effects of different concentrations of hormone-inducing medium on leaves

表 2. 不同浓度激素诱导培养基对叶片的影响

编号	植物激素(mg/L)		接种数	长出丛生芽的外植体数	诱导率	有效总芽个数	增殖系数
	6-BA	NAA					
1	2.0	0	40	37	92.50 ± 1.21bc	210	5.25 ± 0.28c
2	2.0	0.1	40	40	100.00 ± 0.00a	668	16.70 ± 0.32a
3	2.0	0.5	40	38	95.00 ± 1.05b	430	10.75 ± 0.30b
4	2.0	1.0	40	36	90.00 ± 1.32c	250	6.40 ± 0.25c

Note: Each value in table represented Mean ± SE, and the difference between different letters in the same column is significant ($P < 0.05$). 注: 表中数据表示平均数 ± 标准误差, 同列中不同字母表示差异显著性($P < 0.05$)。

Table 3. Effects of different concentrations of hormone-inducing medium on root formation**表 3.** 不同浓度激素诱导培养基对生根形成的影响

编号	激素 NAA (mg/L)	接种数	出现新根时间/d	平均生根数	平均根长(cm)	生根率/%
1	0	30	20	0.6	2.30 ± 0.51bc	30b
2	0.4	30	14	6.4	3.50 ± 0.44a	100a
3	0.8	30	10	4.5	2.10 ± 0.28c	100a
4	1.0	30	16	4.1	2.60 ± 0.36b	100a

Note: Each value in table represented Mean ± SE, and the difference between different letters in the same column is significant ($P < 0.05$). 注: 表中数据表示平均数 ± 标准误差, 同列中不同字母表示差异显著性($P < 0.05$).

在 MS + NAA 0.1 mg/L + 6-BA 2.0 mg/L 培养基中, 诱导叶片产生的不定芽均能达到 40 个以上, 与其他浓度诱导出的增殖系数存在显著差异。故叶片以 MS + NAA 0.1 mg/L + 6-BA 2.0 mg/L 为最佳诱导培养基。

3.3. 生根培养

龙葵丛生芽的生根统计结果见表 3, 其中 1~4 号平均生根数依次为 0.6、6.4、4.5、4.1; 平均根长分别为 2.3 cm、3.5 cm、2.1 cm、2.6 cm。可见其根长相差不大, 对于生根数而言, 2 号培养基效果最好, 2 号、3 号、4 号生根培养基的生根率均达到了 100%。数据表明: 添加适量 NAA 有助于诱导生根。可见 MS + NAA 0.4 mg/L 为丛生芽的最佳生根培养基。

3.4. 驯化炼苗及移栽

当龙葵根系发展成为完整植株时, 可进行炼苗。在组培室中将组培罐盖半敞着放置 3 d, 将空气的相对湿度控制在 90%左右并逐渐降低, 用镊子取出完整的龙葵组培幼苗, 用清水洗净根上黏附的琼脂[18]。再将其移栽至蛭石: 营养土为 1:1 的基质炼苗盘中, 培养 15 d 左右。最后将经过驯化的龙葵苗转移到室外自然环境下适应 7 d 左右移栽于土壤中, 注意保持土壤湿润。在室外环境下, 需进行适当遮光处理, 慢慢让龙葵组培苗适应外界光强, 以保证存活率[18], 移栽后存活率高达 98% (见图 1(g)-(i))。

4. 结论与讨论

龙葵种子多具有休眠特性[19], 生产生活中龙葵繁殖常采用播种方式, 种子萌发慢, 且萌发率较低。本研究采用龙葵种子萌发无菌苗的茎段和叶片作为外植体, 有效减少了培养基及外植体与外界环境的接触, 染菌率大大降低, 种子的萌发率得以提高。

从研究结果来看, 激素浓度的高低对龙葵外植体的诱导分化、生根都有直接影响。其中茎段诱导培养结果表明: 由于组培苗高度在 3~8 cm, 茎尖细小且优势不明显, 而底端茎段粗而茁壮, 故茎段底端比茎尖的诱导率和增值系数大, 与孙诚志等[20]得出的结论相同。本试验研究的是茎段综合诱导丛生芽数, 所以不分茎尖和茎底端的诱导差异, 只求平均值。但对于茎段底端效果好于茎尖这一结论可为后续研究提供更便捷的方向。许良政等研究发现诱导分化的培养基中 MS + NAA 0.5 mg/L + 6-BA 2 mg/L [21]与本试验茎段诱导培养基效果一致。在叶片诱导培养研究中表明: 全叶带柄有伤口的叶片诱导率和增值系数高, 且较高浓度的 6-BA 与较低浓度的 NAA 配合使用时, 能快速诱导出愈伤组织, 这与朱有光等[22]以龙葵的茎尖为外植体的 LS 培养基保持一致。在龙葵叶愈伤组织中, 3 号培养基中的愈伤组织为乳白色, 分化芽的能力较高; 1 号与 2 号愈伤组织呈深绿色、质地坚硬、分化芽能力低。这与张世瑜[11]在龙葵果肉培养植株再生的研究中描述的愈伤组织状态相吻。

实验结果表明: 茎段的诱导效果相对较差, 诱导出的不定芽数量较少, 带柄全叶诱导丛生芽效果最好,

可能是因为叶片形成的愈伤组织面积大于茎段。试验中所用的 6-BA 浓度高于 NAA 时可提高龙葵诱导率及增殖系数,但浓度过高,则会抑制丛生芽的增殖。与熊友华等研究圆瓣姜花种子胚的组培结果相同[23]。

通过本实验研究,最终得出茎段最佳诱导培养基为 MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L; 叶片最佳诱导培养基为 MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L; 最佳生根培养基为 1/2MS + NAA 0.5 mg/L。本实验研究结果可为龙葵组培快繁体系的建立提供理论依据,为实现优质种苗的工厂化生产提供技术支持,以满足大规模生产的需求。

基金项目

生态安全与保护四川省重点实验室科研启动项目(QD2014A001); 绵阳师范学院创新团队培育项目(编号: 07134214); 绵阳师范学院研究生创新实践项目(XYCCX201804); 绵阳师范学院大学生创新创业项目(2017cxxy022)。

参考文献

- [1] 张海洋, 徐秀芳, 张菊芬. 龙葵的营养成分及其开发利用[J]. 中国野生植物资源, 2004, 23(1): 44-46.
- [2] 刘利国, 郭喜宝, 姜小晶. 龙葵的研究进展[J]. 中医药学刊, 2006, 24(3): 1375.
- [3] 张海洋, 徐秀芳. 龙葵浆果的开发利用[J]. 北方园艺, 2005(5): 52-53.
- [4] 黄华, 周建华. 龙葵开发研究新进展及应用[J]. 食品工业科技, 2009(1): 315.
- [5] 巩江, 倪士峰, 邱莉惠, 等. 龙葵素的药理·毒理及药用研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(9): 4108-4109.
- [6] 安磊, 唐劲天, 刘新民, 等. 龙葵抗肿瘤作用机制研究进展[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(15): 1225-1226.
- [7] 魏树和, 周启星, 王新, 等. 一种新发现的镉超积累植物龙葵(*Solanum nigrum* L.) [J]. 科学通报, 2004, 49(24): 2568-2573.
- [8] Wei, S.H., Zhou, Q.X. and Koval, P.V. (2006) Flowering Stage Characteristics of Cadmium Hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. and Their Significance to Phytoremediation. *Science of the Total Environment*, **369**, 441-446. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.06.014>
- [9] 方楚凝, 吴剑, 侯涛. 不同管理模式下龙葵对 cd 污染土壤的修复效果实验研究[J]. 安全与环境工程, 2016, 23(1): 47-50.
- [10] 曹溪敏, 范翠丽. 野生龙葵的开发研究进展[J]. 广东农业科学, 2011(3): 40-42.
- [11] 张世瑜. 龙葵果肉培养植株再生的研究[J]. 植物学通报, 1985(2): 28-29, 31.
- [12] 刘莲芬, 钱关泽. 龙葵叶的组织培养[J]. 植物生理学通讯, 2005(4): 492.
- [13] 戴莹, 杨世海, 赵鸿峥, 等. 药用植物组织培养中褐化现象的研究进展[J]. 中草药, 2016, 47(2): 344-351.
- [14] 左艇. 桔梗离体培养和快速繁殖方法研究[J]. 河南中医学院学报, 2008, 23(5): 40-41.
- [15] 王光远, 夏镇澳. 从龙葵叶肉细胞原生质体再生植株[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 1983, 25(2): 111-113.
- [16] 程海涛, 孙伟, 李敬. 龙葵规范化种植及资源的开发利用[J]. 中国野生植物资源, 2014, 33(3): 67-69.
- [17] 巩振辉, 申书兴. 植物组织培养[M]. 北京: 化学工业出版社, 2013.
- [18] 曾思思, 彭豹, 刘清波, 等. 桔梗快繁体系的建立[J]. 农业与生物技术, 2014, 4(4): 158-161.
- [19] 谢桂英, 游秀峰, 孙淑君, 杨艳红, 吴少英. 龙葵种子休眠解除方法研究[J]. 杂草科学, 2013, 31(1): 37-39.
- [20] 孙诚志, 刘伟清, 陈雄进. 顶端优势现象在香蕉组培苗中的应用研究[J]. 广西农业科学, 2006(1): 75-77.
- [21] 许良政. 少花龙葵的组织培养与植株再生研究初报[C]//中国植物生理学会. 中国植物生理学会第九次全国会议论文摘要汇编. 2004: 1.
- [22] 朱有光, 奚惕. 外源激素对龙葵愈伤组织形成和器官发生的影响[J]. 东北师大学报(自然科学版), 1989(4): 81-85.
- [23] 熊友华, 马国华, 刘念, 黄邦海. 圆瓣姜花种子胚的组织培养与快速繁殖[J]. 广西植物, 2005(3): 241-244, 296.

知网检索的两种方式：

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择：[ISSN]，输入期刊 ISSN：2168-5665，即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入，输入文章标题，即可查询

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：br@hanspub.org