

海石竹的离体快繁及核型分析

潘俊松, 蔡 润*, 刘艳芳, 何欢乐, 吴爱忠

(上海交通大学植物科学系, 上海 201101)

摘 要: 以海石竹(*Armeria maritima*)的叶片为外植体,经离体培养诱导产生愈伤组织,再分化形成不定芽,并经过继代增殖和壮苗生根,获得完整的再生植株,最后对其再生植株进行核型分析。结果表明,海石竹叶片的愈伤组织诱导和分化的适宜培养基为 MS+BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L,诱导初期进行 7 d 暗培养,最佳增殖培养基为 MS+BA 1.0 mg/L+ NAA 0.1 mg/L,生根培养基为 MS+NAA 0.2 mg/L。以上培养基均含蔗糖 30 g/L,琼脂 5 g/L,pH 5.8。海石竹的核型公式为 $2n=2x=18=10m+8sm$,存在染色体数目变异的现象。

关键词: 海石竹; 离体培养; 快繁; 核型分析

中图分类号: Q943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2004)01-0033-04

Propagation *in vitro* and karyotype analysis of *Armeria maritima*

PAN Jun-song, CAI Run*, LIU Yan-fang,
HE Huan-le, WU Ai-zhong

(Department of Plant Science, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 201101, China)

Abstract: The calli induction, redifferentiation to adventitious buds and propagation *in vitro* from leaves of thrift (*Armeria maritima* (Mill.) Willd) were described. After rooting the full plantlets were obtained. The regenerated plants were used for karyotype analysis. The optimal medium for calli induction and redifferentiation from leaves was Murashige and Skoog's basal medium (MS), supplied with 1.0 mg/L 6-benzylaminopurine (BA), 0.2 mg/L α -naphthalene acetic acid (NAA), 30 g/L sugar and 5 g/L agar (pH 5.8). To culture firstly in dark for 7 days was better for inducing callus in the medium. Micropropagation medium was MS+BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L. Rooting medium was MS+NAA 0.2 mg/L. All media above contained sucrose 30 g/L, agar 5 g/L, pH 5.8. Chromosome analysis of the regenerated plants showed that the karyotype formula of *A. maritima* was $2n=2x=18=10m+8sm$. Aberrance of chromosome number was observed.

Key words: *Armeria maritima* (Mill.) Willd; culture *in vitro*; micropropagation; karyotype analysis

海石竹(*Armeria maritima* (Mill.) Willd)属蓝雪科(Plumbaginaceae),英文名 Thrift,多年生草本,簇生,叶线型,聚伞花序,广泛分布于欧洲和北美,且变异复杂,对生长环境要求不高,耐盐碱、耐寒、耐旱(Woodell 和 Dale,1993)。由于其整齐的植株、美丽的花型及花色而被欧美许多国家用作花园植物。

目前国外对海石竹的研究较多,如种群结构和变异(Philipp 等,1992)、花数和种子大小(Baker, 1994)、耐盐及耐寒机理(Buckland 等,1991;Kohl, 1997a)和锌离子的影响(Kohl,1997b)等方面。不同地理分布和土壤压力的海石竹种群有差异,其核型($2n=18$)不太稳定(Coulaud 等,1999)。而国内对海石竹的研究很少,目前尚未发现有关报道。

收稿日期: 2003-03-31 修订日期: 2003-05-26

作者简介: 潘俊松(1971-),男,福建松溪人,讲师,硕士,从事植物生物技术研究。*为通讯联系人 cairun@sjtu.edu.cn

据了解,海石竹引入上海已有 20 a 左右,别名荷兰草,花期为 3~6 月份,单朵花可持续开放 20 多天,无保护条件下可越冬,但越夏困难,分株繁殖周期长,繁殖倍数低(5 个月繁殖倍数为 11~12)。鉴于以上特性,若解决好越夏问题,则可对其进行大面积推广,装饰园林,绿化城市。本实验目的在于建立海石竹的离体快繁体系,提高其繁殖系数,并对其进行了核型分析,为进一步离体培养诱变,培育新品种打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

海石竹植株由上海交通大学农业与生物学院胡雪华教授提供,其花为紫红色。

1.2 方法

1.2.1 外植体的表面消毒 从海石竹植株上剪取叶片,在洗衣粉溶液中浸泡 1~2 min,自来水冲洗 2~4 h,然后用 75% 酒精消毒 30 s,再用饱和漂白精片溶液消毒 15~20 min,用无菌水冲洗 3~4 次。在超净工作台上将叶片切成 1 cm 左右的切段,背面朝下接种到培养基上进行培养。

1.2.2 愈伤组织的诱导和芽的再生 将外植体接种到含不同浓度 BA(6-苄基腺嘌呤)和 NAA(萘乙酸)的 MS 培养基(本文的培养基均含蔗糖 30 g/L,琼脂 5 g/L, pH 值为 5.8)上,进行愈伤组织的诱导培养。叶片接种后分两部分培养:一部分直接在光条件下(光照强度为 $25 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,光照时间为 16 h,下同)培养,培养温度为 $25 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (下同);另一部分先在黑暗条件下培养 7 d,再转为光培养。愈伤组织形成后,直接在原培养基上分化出不定芽。30 d 后分别统计和分析两种处理下愈伤组织诱导率及其分化率。

1.2.3 继代增殖 将高 0.7~1.2 cm 丛生芽切成单芽,转接到继代增殖培养基 MS+BA(1.0, 2.0) mg/L+NAA(0.1, 0.2) mg/L 中,培养 30 d,统计形成的芽数,由此计算增殖系数(增殖系数=总芽数/接种芽数)。据增殖系数和增殖芽的长势确定快繁最佳培养基。

1.2.4 壮苗生根 将继代增殖形成的丛生苗(高 1.5~2.0 cm)从基部分株后,接入壮苗生根培养基中,培养 25 d 和 35 d 后分别统计生长率和生根率,以确定较适宜的壮苗生根培养基。

1.2.5 炼苗移栽 经过壮苗生根的再生植株(高 3~5 cm),打开瓶盖,在室内炼苗 2~3 d 后,从瓶中取出,洗净根部培养基,将苗栽入基质中,保湿,常规苗期管理,2 周后统计成活率。

1.2.6 染色体核型分析 采用常规根尖压片技术(朱激,1982),对海石竹再生植株进行染色体核型分析。选取田间栽培 6 个月以上的再生植株,水培一周后,取其根尖,压片,改良苯酚品红染色。以 50 个核板为基数确定染色体数,并对其进行染色体核型分析。对 5 个染色体分散较好的分裂相进行显微摄影和测量染色体的长臂和短臂,求出相对长度和臂比。根据各染色体的相对长度绘制核型模式图(Idiogram),根据染色体臂比及相对长度用 Photoshop 做核型图,着丝点类型和核型分类按李懋学等标准(李懋学等,1985)。

2 结果与分析

2.1 外植体的表面消毒

石竹叶片用饱和漂白精片溶液消毒,然后切成 1 cm 左右切段,接种到 MS+BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L 培养基上,培养 5 d 即发现有污染,培养 30 d 后统计污染率。不同消毒时间产生的污染率不同,消毒 15、18、20 min 的外植体污染率分别为 5.1%、3.7% 和 3.5%,而愈伤组织诱导率分别为 61.5%、57.3% 和 44.2%。外植体污染率 5.1% 属于消毒较好范围,根据愈伤组织诱导率高低,饱和漂白精片溶液处理 15 min 为适宜的外植体消毒时间。

2.2 愈伤组织的诱导和分化

将经过消毒的叶段分别接种到 MS+BA(0.5、1.0、2.0) mg/L+NAA(0.1、0.2) mg/L 培养基上,将其中一部分先暗培养 7 d 后,再转到光条件下培养,另一部分直接置于光条件下培养。直接进行光培养的外植体 10 d 后在切口处产生愈伤组织,而经过 7 d 暗培养的外植体在培养 6 d 时就有愈伤组织出现。形成的愈伤组织中,有些不断膨大,形状致密,颜色深绿,继续培养 4~5 d 后开始分化出丛生芽(图版 I:图 1),有些愈伤组织出现后不再继续膨大,2~3 d 后褐化死亡,还有少量的愈伤组织先分化出根后,再分化出芽或分化出根后就褐化死亡。

实验结果(表 1)表明,与直接进行光培养相比,先暗培养 7 d 能大幅度提高外植体的愈伤组织诱导率和分化率。在含较高浓度 BA 和 NAA 的培养基

中,愈伤组织诱导率和分化率相对提高。但 BA 2.0 mg/L 时,愈伤组织分化出的不定芽普遍比 BA 0.5 mg/L 和 1.0 mg/L 时要小,且叶色发黄。根据叶片愈伤组织诱导率和分化率,以及分化出的不定芽长势,海石竹叶片愈伤组织诱导和分化的适宜培养基为 MS+BA1.0 mg/L+NAA0.2 mg/L(配合 7 d 暗培养)。

2.3 继代增殖培养

将愈伤组织分化出的丛生芽切成单芽,转接到继代培养基进行增殖培养。实验结果表明,在培养

基 MS+BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L 上,芽的增殖系数最高,达到 40,芽生长较为整齐,但芽均偏小,多且密,无法从基部正常分株。在培养基 MS+BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L 上,芽的增殖系数为 38,但增殖芽生长不整齐,小芽偏多,叶色稍黄。在培养基 MS+BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L 上,增殖系数 25,芽基本整齐壮大,有少数苗特别大。在培养基 MS+BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L 上,芽的增殖系数为 30,而且增殖芽长势健壮均一,大小适中,叶色绿,基本可正常分株,因此选为最

表 1 海石竹叶片愈伤组织的诱导和分化
Table 1 Calli induction, and differentiation from leaves of *Armeria maritima*

培养基 Media ¹⁾ (mg/L)	光培养 Cultured in light			7 d 暗培养 Cultured in dark for 7 d		
	外植体数 No. of explants	愈伤组织诱导率 Callus induction percentage(%)	愈伤组织分化率 Callus differentiation percentage(%)	外植体数 No. of explants	愈伤组织诱导率 Callus induction percentage(%)	愈伤组织分化率 Callus differentiation percentage(%)
BA0.5+NAA0.1	31	54.8	26.5	32	87.5	56.0
BA0.5+NAA0.2	29	82.8	23.9	32	93.8	73.3
BA1.0+NAA0.1	28	71.4	47.1	28	85.7	65.2
BA1.0+NAA0.2	28	85.7	60.9	28	100	82.0
BA2.0+NAA0.1	27	40.7	80.9	30	70.0	87.5
BA2.0+NAA0.2	31	58.1	61.8	30	80.0	93.8

¹⁾ 基本培养基为 MS,培养时间 30 d。 The basal medium was MS, cultured for 30 d.

佳培养基。

2.4 壮苗生根

将增殖培养基上形成的丛生苗从基部分株后接种到生根培养基上,15 d 后苗基部有根形成。经过 35 d 培养,分别含 NAA、IBA、IAA(浓度均为 0.2 mg/L)的 MS 培养基中苗的生根率均达到 100%,株高增长 1 倍以上,其中 NAA 0.2 mg/L 的株高增长最快(增长 1.7 倍),平均株高达 4.0 cm 左右。当 NAA 浓度为 0.4 mg/L 时,生根率为 78.1%,生长较慢。1/2 MS 培养基上的生根率为 87.0%。在以上 5 种生根培养基中,培养 25 d 的生根率分别为 72.7%、80.0%、66.7%、32.8% 和 51.9%。可见 NAA 和 IBA 的诱导生根效果好于 IAA。在不同培养基中形成的根在形态上也有所不同,在培养基 MS+NAA 0.2 mg/L 上,再生苗的根较为粗壮,长度为 2 cm 左右,后期在根的周围有褐色分泌物出现,但不妨碍苗的正常生长;在培养基 MS+IBA 0.2 mg/L 上形成的根较为粗壮,根较长(4~5 cm),后期根转变为红色;在培养基 MS+IAA0.2 mg/L 和 1/2 MS 上,再生苗的根均属细长型,看上去较弱。最终选择 MS+NAA 0.2 mg/L 作为生根培养

基。

2.5 组培苗的驯化移栽

再生苗经过壮苗生根后,室内炼苗,洗净根部培养基后移栽,该苗对栽培基质无特殊要求,初期注意遮荫,4 d 后,苗基本转绿,7 d 后可正常生长,常规苗期管理,有根苗成活率为 100%,无根苗为 89.2%。再生苗经冬季低温春化后,翌年 3 月初开始开花(图版 I:图 2)。观察发现在 MS+NAA 0.2 mg/L 上生根的苗开花最早,有根苗比无根苗早 7 d 左右开花。

2.6 海石竹的核型分析

核型分析的结果表明,海石竹再生植株的染色体数为 18(统计 50 个核板,染色体数为 18 的细胞占 100%),染色体核型为 2n=2x=18=10m+8sm,其随体不明显。这与 Woodell 和 Dale(1993)报道相一致。根据染色体相对长度和臂比配成 9 对,染色体 1、2、7、8 和 9 都是中部着丝点(m)染色体,染色体 3、4、5 和 6 是近中部着丝点(sm)染色体(图版 I:图 3-1,图 3-2)。由核型参数(表 2)数据绘出核型模式图(图版 I:图 3-3),该染色体较为对称,长、短臂长度相差不大。染色体的相对长度变异范围为

9.07%~13.75%，核型中最长与最短染色体的长度比值为 1.52，臂比范围为 1.06~2.55。臂比大于 2 的染色体占 0.33，是 Stebbins(1971)核型分类中的 2A 型，属于基本对称型。

经观察发现海石竹再生植株中染色体数会发生变化，其中有 1 棵再生植株的染色体数为 $2n=16$ (统计 50 个核板，染色体数为 16 的细胞占 88%)，初步判断，此植株丢失了正常染色体中的 1 号染色体(图版 I：图 4)。

表 2 海石竹的染色体核型参数
Table 2 Karyotype parameter of *Armeria maritima*

染色体序号 Chromosomes No.	相对长度 Relative length(%)			臂比 Arm ratio	类型 Type
	长臂 Long arm	短臂 Short arm	全长 Full length		
1	8.48	5.27	13.75	1.61	m
2	8.11	4.85	12.96	1.67	m
3	8.26	3.67	11.93	2.25	sm
4	7.19	3.99	11.18	1.80	sm
5	7.50	3.59	11.09	2.09	sm
6	7.75	3.04	10.79	2.55	sm
7	5.03	4.74	9.77	1.06	m
8	5.90	3.56	9.46	1.66	m
9	5.19	3.88	9.07	1.34	m

3 讨论

在海石竹叶片愈伤组织诱导的实验中，曾用含 BA、KT、2,4-D 的培养基，如 MS+BA(0.5,1.0,2.0) mg/L;MS+KT(0.5,1.0,2.0) mg/L+NAA 0.2 mg/L 等，在整个诱导过程中均未有愈伤组织和不定芽的产生；在添加了 2,4-D 的 MS 培养基上诱导 4 d 有愈伤组织出现，但愈伤组织 3 d 后就死亡，无法分化出芽，由此可见这几种培养基对海石竹的叶片离体培养不适宜。

初期暗培养有利于外植体产生愈伤组织，齐力旺等(1996)在研究樟子松胚乳单倍体愈伤组织诱导的实验中，初期暗培养可使其愈伤组织诱导率提高 10%~30%。由于海石竹叶段外植体产生愈伤组织的时期不完全一致，而且从愈伤组织出现到分化出芽之间的间隔较短，仅为 4~5 d，在愈伤组织形成阶段及愈伤组织分化初期，外植体叶段仍呈现绿色，随分化的不定芽的不断生长，叶段逐渐失绿死亡。愈伤组织由于很快过渡到分化出芽阶段，故在纯愈伤组织阶段，愈伤组织自身不进行增殖，所以愈伤组织

块较小。鉴于以上原因，在愈伤组织诱导阶段和愈伤组织分化出芽阶段之间不更换培养基，而是直接让外植体在同一培养基上产生愈伤组织并且分化出芽。在愈伤组织分化过程中还发现，有少量愈伤组织不直接分化出芽，而是先分化出根，然后再分化出芽；还有少量愈伤组织分化出根后，就褐化死亡。大部分愈伤组织均可直接分化出芽。

由于海石竹不耐热，实生苗未能安全越夏，而经观察组培育与实生苗之间在外部形态上没有差异，故选取经过半年田间栽培的组培再生植株的根尖做核型分析。在染色体分析中，发现了再生植株的染色体数目变异，染色体数为 16，初步判定缺失了正常染色体中的 1 号染色体。缺失染色体植株与其他植株的性状之间是否有差异，还需进一步观察研究。

非常感谢中国科学院植物研究所李振宇研究员给予的帮助；张国华、陆萍等同学参加部分工作，在此表示感谢。

参考文献：

朱 激. 1982. 植物染色体及染色体技术[M]. 北京：科学出版社，69—83.

齐力旺，杨云龙，韩素英，等. 1996. 樟子松胚乳单倍体愈伤组织发生与分化的研究[J]. 林业科技通讯，8：17—18.

Baker K, Richards AJ, Tremayne M. 1994. Fitness constraints on flower number, seed number and seed size in the dimorphic species *Primula farinose* L. and *Armeria maritima* (Miller) Willd[J]. *New Phytologist*, 128(3): 563—570.

Buckland Sarah M, Price Adam H, Hendry George AF. 1991. The role of ascorbate in drought-treated *Cochlearia atlantica* Pobed. and *Armeria maritima* (Mill.) Willd[J]. *New Phytologist*, 119(1): 155—160.

Coulaud J, Barghi N, Lefebvre C, et al. 1999. Cytogenetic variation in populations of *Armeria maritima* (Mill.) Willd. in relation to geographical distribution and soil stress tolerances[J]. *Canadian J Botany*, 77(5): 673—685.

Kohl KI. 1997a. NaCl homeostasis as a factor for the survival of the evergreen halophyte *Armeria maritima* (Mill.) Willd. under salt stress in winter[J]. *Plant Cell Environ*, 20(10): 1 253—1 263.

Kohl KI. 1997b. Do *Armeria maritima* (Mill.) Willd. ecotypes from metalliferous soils and non-metalliferous soils differ in growth response under Zn stress A comparison by a new artificial soil method[J]. *J Exp Bot*, 48(316): 1 959—1 967.

(下转第 60 页 Continue on page 60)

品,洗涤香精的添加剂,对于开发研制除菌油膏、香皂、牙膏、洗涤香精等方面具有广大开发利用的价值。全草总黄酮含量较高,在抗菌抗炎药物的开发方面具有利用的价值。至今,文章报道的多是关于植物精油方面的资料,至于其它化学成分:黄酮、黄酮苷等,还待进一步深入研究。

参考文献:

- 中山大学生物系生化微生物教研室. 1978. 生化技术导论 [M]. 北京: 人民教育出版社.
- 中国科学院中国植物志编辑委员会. 1977. 中国植物志 (第 66 卷) [M]. 北京: 科学出版社, 297—298.
- 王淑丽, 陈济民. 1995. 苏子油与 α -亚麻酸 [J]. 沈阳药学院学报, 12 (3): 228—232.
- 朱甘培, 冯 晰, 石晋丽. 1992. 紫花香薷挥发油化学成分研究 [J]. 北京中医学院学报, 15 (6): 57—59.
- 吴文珊, 纪小苹, 王扬飞, 等. 2000. 蒺藜叶及花序托中总黄酮的提取工艺 [J]. 植物资源与环境学报, 9 (2): 55—56.
- 张少艾, 徐炳声. 1989. 长江三角洲石芥苳属植物的精油成分及其与系统发育的关系 [J]. 云南植物研究, 11 (2): 187—192.
- 柴之芳, 祝汉民. 1994. 微量元素化学概论 [M]. 北京: 原子能出版社, 207—213.
- 贾身茂, 张金霞. 1997. 食用菌标准汇编 (一) [M]. 北京: 中国标准出版社.
- 黑龙江大学英语辞书研究室编写组. 1987. 英汉科技大词库 (二、四卷) [M]. 哈尔滨: 黑龙江人民出版社, 282—296, 682—716, 724.
- 林文群, 陈 忠, 刘剑秋. 2001. 野生香料植物小鱼仙草资源开发利用 [J]. 中国野生植物资源, 21 (6): 28—30.
- GB5490—5539——1985, 粮食、油料及植物油脂检验 [S].
- Heller SR, Mioline GWA. 1978. EPA/NIH Mass Spectral Date Base [M]. Washington: U. S. government printing office, 2 042—3 032.
- Heller SR, Mioline GWA. 1980. EPA/NIH Mass spectral Date Base Supplement 1 [M]. Washington: U. S. government printing office, 3 960—5 228.
- Lin WQ (林文群). 2001. Studies on the chemical constituents of volatile oil of mosladianthera maxim grown in Fujian Province (福建产小鱼仙草挥发油的含量及其化学成分的研究) [J]. Journal of Wuhan Botanical Research (武汉植物学研究), 19 (1): 35—38.
- Lin WQ (林文群), Zhang QQ (张清其), Chen ZQ (陈祖祺). 1998. Studies on chemical constituents of mosla punctulata essential oil and its content precent (石芥苳挥发油的含量及其化学成分的研究) [J]. Jourual of Fujian Teachers University (Natural Science) (福建师范大学学报 (自然科学版)), 14 (2): 70—74.
- Yuan XM (元晓梅), Jiang MW (蒋明蔚), Hu ZZ (胡正芝). 1996. Colorimetric determination of Flavones in Hawthorn and its products (聚酰胺吸附—硝酸铝显色法测定山楂及山楂制品中的总黄酮含量) [J]. Food and Fermentation Industries (食品与发酵工业), (4): 27—32.

(上接第 36 页 Continue from page 36)

- Li MX(李懋学), Chen RY(陈瑞阳). 1985. A suggestion on the standardization of karyotype analysis in plants (关于植物核型分析的标准化问题)[J]. Journal of Wuhan Botanical Research(武汉植物学研究), 3(4): 297—302.
- Philipp M, Madsen HES, Siegismund HR. 1992. Gene flow and population structure in *Armeria maritima*[J]. Heredity, 69(1): 32—42.
- Woodell SRJ, Dale A. 1993. Biological Flora of the British Isles, *Armeria maritima* (Mill.) Willd. (*Statice armeria* L, *S. maritima* Mill.) [J]. J Ecology, 81(3): 573—588.