

美洲商陆高频再生体系的建立

吴豪杰¹, 杨 杰¹, 徐亚莉¹, 杨子仪¹, 郑铁松², 陆长梅¹

(1. 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210023)
(2. 南京师范大学金陵女子学院, 江苏 南京 210097)

[摘要] 美洲商陆为商陆科多年生草本植物,在工业、农业和医药上具有很高的应用价值. 本实验拟从外植体选择、激素组合、GA₃ 和 AgNO₃ 等物质应用角度进行试验,分析各条件对愈伤组织诱导,不定芽分化、伸长以及不定根诱导等方面的影响,旨在构建美洲商陆稳定高效的再生体系. 实验结果表明:愈伤组织诱导和不定芽分化的最适外植体为茎节;将无菌苗的上部经诱导培养基转接、壮苗后,再取茎节进行愈伤组织诱导和不定芽分化,可以显著提早不定芽分化、提高芽增殖系数;不定芽诱导分化最佳培养基为 MS+6-BA(3.0 mg/L)+NAA(0.01 mg/L)+TDZ(0.02 mg/L),增殖系数达 12.7;不定芽伸长的最佳培养基为 MS+TDZ(0.02 mg/L)+6-BA(3.0 mg/L)+NAA(0.01 mg/L)+GA₃(2.0 mg/L);生根最佳培养基为 1/2MS+NAA(0.4 mg/L),生根率可达 91.7% 以上. AgNO₃ 处理抑制了美洲商陆不定芽的分化.

[关键词] 美洲商陆,再生体系,外植体,不定芽,生根,培养基

[中图分类号] Q945.5 [文献标志码] A [文章编号] 1001-4616(2013)03-0074-07

Establishment of High Frequency Regeneration System of *Phytolacca Americana*

Wu Haojie¹, Yang Jie¹, Xu Yali¹, Yang Ziyi¹, Zheng Tiesong², Lu Changmei¹

(1. School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)
(2. Ginling College, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: *Phytolacca americana* Linn., which belongs to Phytolaccaceae, is a kind of perennial herb with high application value in industry, agriculture and medicine. In order to establish a stable and efficient regeneration system for *P. americana*, efficiency of callus induction, adventitious bud differentiation and elongation, and adventitious root induction etc. were analyzed from aspects of explants selection, hormones combination and applications of GA₃ and AgNO₃ etc.. Results show that, the optimal explants for callus induction and bud differentiation are stem sections; the method of transplanting shoots in induction medium to sound seedling can significantly advance adventitious bud differentiation and promote bud proliferation coefficient. The optimal medium for adventitious bud differentiation is MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.01 mg/L+TDZ 0.02 mg/L with a multiplication coefficient up to 12.7. The optimal medium for adventitious buds elongation is MS+TDZ 0.02 mg/L+6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.01 mg/L+GA₃ 2.0 mg/L. The optimal rooting medium is 1/2MS+NAA 0.4 mg/L with a rooting rate up to 91.7%. AgNO₃ treatment inhibited the adventitious bud differentiation of *P. americana*.

Key words: *Phytolacca americana* Linn., regeneration system, explants, adventitious buds, rooting, medium

民间统称为“商陆”的植物在中国有 4 种,分别为商陆(*Phytolacca acinsa* Roxb.)、美洲商陆(*P. americana* Linn.)、多雄蕊商陆(*P. batalin.*)和日本商陆(*P. japonica* Makino.)。它们共同为商陆属(*Phytolacca* Linn.)、商陆科(Phytolaccaceae)的多年生草本植物,被广泛用于医药、病虫害防治、食品着色及环境修复等多个方面,在工业、农业和医药上具有重要价值. 国内外对商陆属植物的研究主要集中在以下 4 个方面:(1)抗病毒蛋白高产基因的研究^[1]; (2)进行单细胞培养,获取色素高产细胞株^[2]; (3)诱导

收稿日期:2012-11-05.
基金项目:国家 863 项目(2007AA021404)、国家基础科学人才培养基金(J1103507).
通讯联系人:陆长梅,博士,副教授,研究方向:植物逆境与植物资源学. E-mail:luchangmei@ njnu. edu. cn

形成毛状根^[3],以利于提取药物;(4)对重金属,尤其对 Mn 的超富集作用及超富集机理^[4,5]. 这些研究激发了人们认识和开发利用“商陆”资源的积极性. 我国野生的“商陆”资源以美洲商陆分布最为广泛,资源最为丰富,可利用和开发的价值也最大. 但是野生型美洲商陆具有生长周期较长、具有毒性等特点^[6],使得美洲商陆资源没有得到合理的开发利用.

组织培养是在人工控制条件下培养外植体再生器官或植株的方法. 该方法不仅可以在不受植株体其他部分干扰下研究被培养部分的生长、分化等规律,而且还可以被广泛应用于快速繁殖、遗传育种、分子改良和功能基因研究等等. 虽然已有利用美洲商陆的营养器官进行快速繁殖研究的报道^[7-9],但却存在分化周期长、再生频率低、重复性差等一系列问题. 现有的再生体系无法满足快速繁殖以及以转基因为手段的新品种的培育和改良等多方面的需求. 鉴于此,本实验拟从美洲商陆外植体取材、培养基激素组合、GA₃ 和 AgNO₃ 物质应用等方面进行试验,分析以上条件对愈伤组织诱导、不定芽分化伸长以及不定根诱导等方面的影响,探讨构建美洲商陆高频再生体系的最佳条件,为下一步开展美洲商陆的资源开发和应用研究奠定基础.

1 材料与方法

1.1 材料

美洲商陆(*P. americana* Linn.)种子于2010年9月底采自河南卢氏山区.

1.2 方法

1.2.1 无菌苗准备与外植体获取

取成熟饱满的美洲商陆种子,用浓硫酸处理12 min后,再用无菌水冲洗6~8次,然后接种到MS培养基中,于(26±1)℃下暗培养3 d,待种子萌发后,置于2 000 Lux光强、14 h L/10 h D光暗周期下培养. 待约2~3周后长成长约4 cm高六叶期的无菌苗时,分别取无菌苗的叶片、茎节(带腋芽茎段)为外植体供体,叶片切成5 mm²左右的小块,茎节切成5 mm~8 mm左右的小段备用.

1.2.2 培养基和培养条件

以MS、1/2MS为基本培养基,以不同激素组合(6-BA、NAA、IBA、TDZ、2,4-D等)、不同浓度组合分别设计愈伤组织诱导、不定芽增殖以及生根培养基,所有培养基中均添加30 g/L蔗糖、7 g/L琼脂,培养温度为(26±1)℃,光照强度为2 000 Lux,光暗周期为14 h L/10 h D.

1.2.3 愈伤组织和不定芽诱导

分别取无菌苗叶片、茎节剪切后放在加入不同激素和浓度组合以及添加了GA₃或AgNO₃等的MS培养基上进行培养,观察愈伤组织和不定芽的诱导和生长情况,30 d后统计各处理组的出愈率、不定芽分化率和增殖系数.

愈伤诱导率(%)=产生愈伤块数/接种外植体数×100;

不定芽分化率(%)=具芽分化的外植体数/接种外植体数×100;

增殖系数=不定芽数/接种外植体数.

1.2.4 不定芽伸长诱导

配制MS+TDZ 0.02 mg/L+6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.01 mg/L+GA₃(0、0.5、1.0、2.0)mg/L培养基,将不定芽接种其中,15 d后观察不定芽的生长和伸长状态,确定促进不定芽伸长的最佳GA₃浓度.

1.2.5 生根诱导

当不定芽长至2 cm左右时,切下不定芽,以1/2MS为基本培养基,添加不同浓度的NAA(0、0.3、0.4、0.5)mg/L或IBA(0.1、0.2、0.3、0.4)mg/L,比较不同浓度的NAA或IBA对不定芽生根诱导的影响. 10 d后统计生根率、比较根生长状况.

生根率(%)=生根不定芽数/接种不定芽数×100.

2 结果与分析

2.1 外植体与激素组合筛选

按1.2中的方法,分别切取无菌苗的叶片、茎节接种于含不同种激素以及不同浓度组合的培养基中.

3 d~4 d 后可以观察到:叶片绿色变淡、拱起,茎节增粗、失绿.7 d 左右浅粉色颗粒状愈伤组织先从切口处长出(图 1A、B),继而长满外植体表面,使叶片、茎段均发生不同程度的膨大.

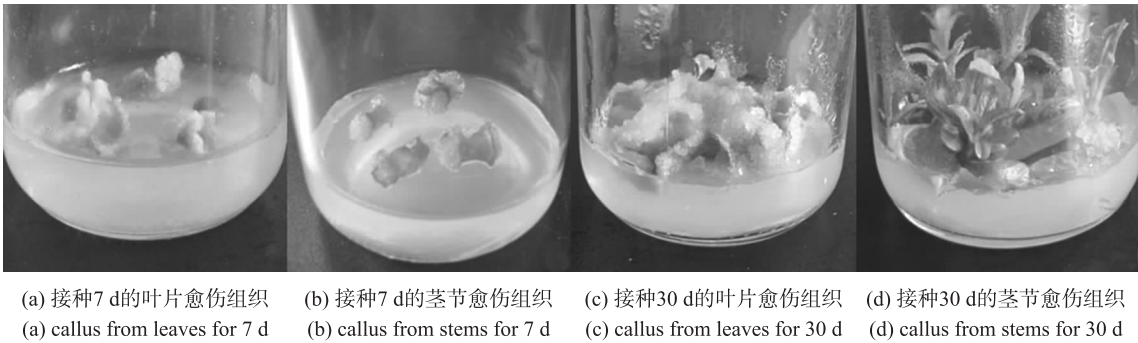


图 1 美洲商陆叶片和茎节来源的愈伤组织比较

Fig. 1 Comparison of callus derived from leaves and stems of *P. americana*

2.1.1 不同激素组合对美洲商陆叶片愈伤组织诱导和不定芽分化的影响

从表 1 可以看出:一定浓度范围内,美洲商陆叶片在不同组合的生长素(NAA、IBA、2,4-D)和细胞分裂素(6-BA)的培养条件下均可诱导出愈伤组织,但不同条件下的愈伤组织诱导率差异较大.6-BA/IBA 为 2/0.4 mg/L 时,愈伤组织诱导率达 100%,且愈伤长势最好(图 1C),但愈伤组织上没有发现不定芽的分化.

表 1 不同激素组合对美洲商陆叶片愈伤组织诱导和不定芽分化的影响

Table 1 Effects of different hormone combinations on the callus induction and bud differentiation of <i>P. americana</i> leaves								
激素组合/(mg·L ⁻¹)				接种数/个	出愈数/个	愈伤诱导率/%	愈伤长势	芽点
6-BA	IBA	2,4-D	NAA					
1.0	0.2			24	20	83.3	+	无
1.0	0.4			24	18	75.0	+	无
2.0	0.2			24	22	91.7	+	无
2.0	0.4			24	24	100	+++	无
2.5	0.2			24	23	95.8	+	无
2.5	0.4			24	24	100	++	无
0.5			0.1	24	15	62.5	+	无
0.5			0.2	24	22	91.7	+	无
1.0			0.2	24	24	100	+	无
1.0			0.5	24	24	100	++	无
2.0			0.2	24	24	100	+	无
2.0			0.5	24	24	100	++	无
0.2		1.0		24	14	58.3	+	无
0.5		1.0		24	16	66.7	+	无
0.2		2.0		24	24	100	++	无
0.5		2.0		24	24	100	++	无
1.0		0.1	0.1	24	24	100	++	无
1.0		0.2	0.1	24	24	100	++	无
2.0		0.1	0.2	24	24	100	+	无
2.0		0.2	0.2	24	24	100	++	无

注:+++;愈伤长势好,直径大于 15 mm,白绿色,质地疏松;+:愈伤长势较好,直径 1 mm~15 mm,白色或绿色,质地较疏松;+:愈伤长势差,量少,白色,质地致密.

2.1.2 不同激素组合对美洲商陆茎节愈伤组织诱导和不定芽分化的影响

综合表 2 结果与实验过程中的现象观察显示:(1)单独使用细胞分裂素(6-BA)或生长素(IBA、2,4-D),美洲商陆茎节有少量愈伤组织产生;单独使用 6-BA 时,未诱导出愈伤组织的茎节 7 d 后褐化死掉,而诱导出愈伤组织的外植体 14 d 后愈伤组织也开始褐化;若单独使用 IBA 或 2,4-D,茎节的愈伤组织的长势相对较好,但愈伤组织诱导率较低且易直接诱导生根.(2)在配合使用细胞分裂素(6-BA、KT)和生长素(NAA、IBA、2,4-D)的培养基中,愈伤组织的诱导率均达到 100%,且愈伤长势明显好于表 1 中叶片愈伤组织(图 1A、B),说明美洲商陆茎节较叶片更易诱导出愈伤组织.其中 2,4-D/KT 为 2/0.5 mg/L 时,愈伤

组织生长旺盛,颜色鲜艳,长势最好.(3)在6-BA 和 IBA 及 6-BA 和 NAA 配合使用的培养基中外植体均生成了绿色芽点,说明美洲商陆茎节可作为诱导愈伤组织生成和不定芽分化的外植体(图 1D). 同时根据不定芽的分化表现初步判断 6-BA 和 NAA 的激素组合更适宜于美洲商陆的不定芽诱导. 至此初步分析得出适合美洲商陆茎节愈伤组织诱导和不定芽分化的培养基为 MS+6-BA(2.0 mg/L)+NAA(0.2 mg/L).

表 2 不同激素组合对美洲商陆茎节愈伤组织诱导和不定芽分化的影响

激素组合/(mg·L ⁻¹)					接种数/个	出愈数/个	愈伤诱导率/%	愈伤长势	芽点
6-BA	KT	NAA	IBA	2,4-D					
1.0					24	21	87.5	+	有
1.0		0.1			24	24	100	++	有
1.0		0.2			24	24	100	++	有
2.0		0.1			24	24	100	++	有
2.0		0.2			24	24	100	++	有
0.5			0.1		24	24	100	++	无
0.5			0.2		24	24	100	+++	无
1.0			0.1		24	24	100	+++	有
1.0			0.2		24	24	100	+++	有
2.0			0.2		24	24	100	++	有
2.0			0.4		24	24	100	++	有
			1.0		24	15	62.5	++	无
	1.0		0.05		24	24	100	++	无
	2.0		0.05		24	24	100	++	无
	1.0		0.1		24	24	100	+++	无
	2.0		0.1		24	24	100	+++	无
	2.0		0.2		24	24	100	+++	无
	3.0		0.2		24	24	100	+++	无
				2.0	24	13	54.2	++	无
	0.5			1.0	24	24	100	++	无
	1.0			1.0	24	24	100	+++	无
	0.5			2.0	24	24	100	+++	无
	1.0			2.0	24	24	100	+++	无
0.1				0.5	24	24	100	++	无
0.2				0.5	24	24	100	++	无
0.1				1.0	24	24	100	++	无
0.2				1.0	24	24	100	+++	无
0.2				2.0	24	24	100	+++	无
0.4				2.0	24	24	100	++	无

注:+++;愈伤长势好,直径大于 10 mm,颜色鲜艳,为粉红色,质地疏松;+:愈伤长势较好,直径介于 1 mm~10 mm,颜色粉红,质地较疏松;+:愈伤长势差,量少,颜色较浅.

2.2 外植体获取方式优化

虽然美洲商陆茎节可以作为诱导不定芽分化的最适外植体,但美洲商陆无菌苗茎较细,生成愈伤组织及不定芽所需的时间较长,芽增殖系数也不高(表 3). 鉴于此,我们进一步对外植体的获取方式进行了优化,具体结果见表 3. 表中显示,2 种方式获取的外植体在 MS+6-BA(2.0 mg/L)+NAA(0.2 mg/L)培养基上均能分化出不定芽;但用无菌苗茎节直接进行不定芽诱导时,不定芽最早分化时间需要 30 d,芽增殖系数为 5.4(表 3);而将无菌苗茎间距较短的上部接于 MS+6-BA(1.0 mg/L)+NAA(0.2 mg/L)的诱导培养基上培养 15 d,待茎间距稍长且茎秆较粗壮时,再取茎节作为外植体供体,接入 MS+6-BA(2.0 mg/L)+NAA(0.2 mg/L)分化培养基中,其最早出芽时间出现在 22 d,芽增殖系数也升高至 8.8.

表 3 不同外植体获取方式对不定芽分化的影响

取材方式	接种数/个	分化数/个	不定芽分化率/%	最早出芽时间/d	增殖系数
茎节直接诱导分化	48	48	100	30	5.4
茎节转接后诱导分化	48	48	100	22	8.8

2.3 不定芽诱导条件优化

经过初步的激素组合优化和取材方式优化,不定芽的最大增殖系数已达 8.8. 表 4 和表 5 对激素组合

作了进一步的优化,以期进一步提高增殖系数.

由表 4 可以看出,当 NAA 浓度不变,一定范围内,随 6-BA 浓度的增大,不定芽分化率也随之增大;当保持 6-BA 浓度不变,NAA 浓度从 0 mg/L 提高到 0.2 mg/L 时,不定芽分化率和增殖倍数都大幅度提高,而 NAA>0.2 mg/L 时,不定芽分化率和增殖倍数呈现降低趋势. 这说明低浓度的 NAA(0 mg/L ~0.2 mg/L)对不定芽诱导起促进作用,稍高浓度的 NAA(0.3 mg/L ~0.5 mg/L)则会抑制不定芽分化. 外植体在 MS+6-BA (2.0 mg/L)+NAA(0.2 mg/L)培养基上的不定芽分化效果最好,不定芽分化率达 100%,增殖系数也最高,达 10.8. 不足之处在于,此时外植体基部易生成大量愈伤组织,需及时切除多余愈伤组织并及时转接.

表 4 不同 6-BA/NAA 组合对美洲商陆不定芽分化的影响

激素组合/(mg·L ⁻¹)		接种数/个	分化数/个	不定芽分化率/%	增殖系数
6-BA	NAA				
1.0	0.0	72	56	77.8	1.1
1.0	0.1	72	58	80.6	1.3
1.0	0.2	72	72	100.0	7.6
1.0	0.4	72	65	90.3	5.7
2.0	0.0	72	72	100.0	1.7
2.0	0.1	72	72	100.0	6.8
2.0	0.2	72	72	100.0	10.8
2.0	0.4	72	68	94.4	5.2
2.0	0.5	72	67	93.1	2.1

近年来,TDZ,一种人工合成的苯基脲衍生物,由于具有生长素和细胞分裂素双重作用而在植物组织培养中得到了广泛应用^[10,11]. 在表 4 的基础之上,以 MS 为基本培养基,分别采用三因素三水平的正交设计法,研究不同浓度的 6-BA、NAA、TDZ 组合对美洲商陆不定芽分化的影响. 最终统计结果见表 5.

表 5 不同 6-BA/NAA/TDZ 组合对美洲商陆不定芽分化的影响

激素组合/(mg·L ⁻¹)			接种数/个	分化数/个	不定芽分化率/%	增殖系数
6-BA	NAA	TDZ				
1.0	0.01	0	72	67	93.1	0.9
1.0	0.02	0.01	72	72	100	1.1
1.0	0.05	0.02	72	72	100	1.7
2.0	0.01	0.01	72	72	100	3.3
2.0	0.02	0.02	72	72	100	3.6
2.0	0.05	0	72	72	100	6.4
3.0	0.01	0.02	72	72	100	12.7
3.0	0.02	0	72	0	0	0
3.0	0.05	0.01	72	0	0	0

实验结果表明,不同浓度的激素组合,不定芽的增殖系数存在较大差异. 6-BA 浓度在 1.0 mg/L ~2.0 mg/L 时,随 NAA 浓度的增大,增殖系数明显增大;随 TDZ 浓度的增大,增殖系数也逐步增大(6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L+TDZ 0 mg/L 组除外);当 6-BA 浓度达到 3.0 mg/L 后,随 NAA 浓度的增大,增殖系数则明显下降;当激素与浓度组合为 6-BA(3.0 mg/L)+NAA(0.01 mg/L)+TDZ(0.02 mg/L)时,增殖系数最大,达 12.8.

综合表 4、表 5 的实验结果,诱导美洲商陆不定芽分化的最佳培养基最终确定为:MS+6-BA(3.0 mg/L)+NAA(0.01 mg/L)+TDZ(0.02 mg/L),此时不定芽增殖系数达到 12.8.

2.4 AgNO₃ 对美洲商陆不定芽分化的影响

植物细胞在离体培养过程中,尤其在密封的培养器中,往往伴随着乙烯的产生. 而乙烯的大量积累会直接影响外植体生长和芽的分化^[12,13]. AgNO₃ 可以在一定程度上抑制乙烯的生成,对一些植物的形态发生有促进作用^[14,15]. 因此为了进一步提高美洲商陆不定芽的增殖倍数,以 MS+TDZ(0.02 mg/L)+6-BA (3.0 mg/L)+NAA(0.01 mg/L)为基本培养基,分别添加(0、0.5、2.5、5.0 和 10.0)mg/L 的 AgNO₃,统计 AgNO₃ 处理对不定芽增殖的影响. 结果发现,实验涉及的 4 个 AgNO₃ 浓度处理组中,仅见腋芽长大,未见不定芽分化(图 2).

2.5 GA₃ 对美洲商陆不定芽伸长的影响

在美洲商陆不定芽的诱导分化过程中,发现随着培养时间的加长,在基部有大量不定芽生成,但多数不定芽生长细弱而不能正常伸长.为促进不定芽的生长和伸长,参照沈海龙的方法^[16],截取 1 cm~1.5 cm 长的细弱不定芽,接种到 MS+TDZ(0.02 mg/L)+6-BA(3.0 mg/L)+NAA(0.01 mg/L)+不同浓度 GA₃ 的培养基中,20 d 后观察不定芽的生长、伸长状况.结果发现,在一定浓度范围内,随 GA₃ 浓度的增大,美洲商陆不定芽的生长状况越好,当 GA₃ 浓度为 2.0 mg/L 时,芽体伸长较快,且芽体健壮(表 6).

表 6 不同浓度 GA₃ 对美洲商陆不定芽伸长、生长的影响

Table 6 Effects of different concentrations of GA₃ on the adventitious buds elongation and growing of *P. americana*

GA ₃ /(mg·L ⁻¹)	芽苗生长状况
0.0	芽体短小纤细
0.5	芽体伸长,较细弱,芽黄绿色
1.0	芽体伸长,较粗,芽浅绿色
2.0	芽体伸长,健壮,芽绿色



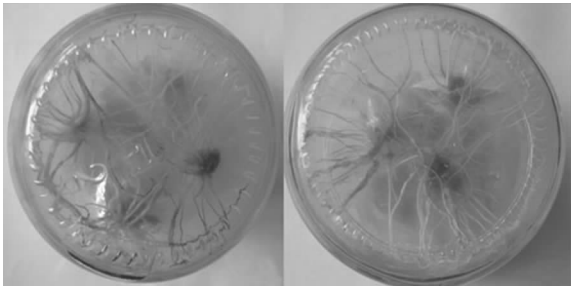
(a) 0 mg/L AgNO₃ (b) 10 mg/L AgNO₃

图 2 不同浓度 AgNO₃ 处理对美洲商陆不定芽分化的影响

Fig. 2 Effects of different concentrations of AgNO₃ on the adventitious buds differentiation of *P. Americana*

2.6 生根诱导

NAA 和 IBA 广泛用于不定芽的生根诱导^[17].当美洲商陆不定芽长至 2 cm~3 cm 时,截取并分别接种于表 7 所示的含有不同 NAA 或 IBA 浓度的生根培养基中(1/2MS)进行单株生根诱导.结果显示,不定芽在不加生长素的 1/2MS 培养基中也能生根,但所生成的根稀疏且细长;添加 IAA 或 NAA 后,生根时间提早,生根率加大,其中 0.4 mg/L NAA 组中的生根时间由 9 d 提早到 5 d,生根率也由 37.5% 提高到 91.7%,且此时形成的不定根较其他组的长且健壮,须根也较多(图 3A).0.1 mg/L~0.3 mg/L 范围内,随 IBA 浓度的升高,美洲商陆不定芽的生根率逐渐增大,根系质量也逐步提高;当 IBA 为 0.3 mg/L 时生根率达到 83.3%,根健壮,须根较多(图 3B);0.4 mg/L IBA 组的生根率仅为 25%,不仅较对照组低,且根粗短,须根少.综合生根时间和根系质量考虑,美洲商陆最佳生根培养基为 1/2MS+NAA(0.4 mg/L).



(a) 0.4 mg/L NAA (b) 0.3 mg/L IBA

图 3 不同激素对美洲商陆不定芽生根的影响

Fig. 3 Effects of different hormones on the rooting of *P. americana* adventitious buds

表 7 不同激素和激素浓度对美洲商陆不定芽生根的影响

Table 7 Effects of different hormones and different hormone concentrations on the rooting of *P. americana* adventitious buds

激素与浓度/(mg·L ⁻¹)	接种数/个	生根数/个	最早生根时间/d	生根率/%	根系特征
NAA	0	24	9	37.5	根细长,稀疏
	0.3	24	16	66.7	须根较少
	0.4	24	22	91.7	根长,健壮,多须根
	0.5	24	14	58.3	根健壮,须根较少
	0.1	24	14	58.3	根细,少量须根
IBA	0.2	24	16	66.7	根细长,一定量须根,
	0.3	24	20	83.3	根长,多须根,
	0.4	24	6	25.0	根粗短

3 结论

根据外植体的筛选、不定芽分化、不定芽的生根诱导等一系列实验结果,归纳出如下美洲商陆再生体系构建的最佳条件:

(1)外植体获取:将无菌苗培养至六叶期,截取节间距较短的上部接种于 MS+6-BA(1.0 mg/L)+NAA

(0.2 mg/L)的诱导培养基上培养15 d,待节间距稍长且茎杆较粗壮时,再分割成多个带腋芽的茎段作为外植体供体。

(2)不定芽诱导:采用MS+6-BA(3.0 mg/L)+NAA(0.01 mg/L)+TDZ(0.02 mg/L)+蔗糖(30 mg/L)+琼脂(7 g/L)诱导大量不定芽生成;芽增殖系数高达12.8。

(3)不定芽伸长:截取1 cm~1.5 cm长的细弱不定芽接种于MS+TDZ(0.02 mg/L)+6-BA(3.0 mg/L)+NAA(0.01 mg/L)+GA₃(2.0 mg/L)+蔗糖(30 mg/L)+琼脂(7 g/L)中培养20 d进行不定芽伸长诱导。

(4)不定根诱导:待不定芽长至3 cm~4 cm时,截取并转接到1/2MS+NAA(0.4 mg/L)+蔗糖(25 mg/L)+琼脂(7 g/L)生根培养基中进行生根培养,生根率达90%以上。

[参考文献]

- [1] 陈国菊,石丽,雷建军,等. 中国商陆抗病毒蛋白基因的克隆及其转化辣椒[J]. 园艺学报,2008(6):847-852.
- [2] 李景原,王太霞,杨相甫,等. 商陆单细胞平板培养及色素高产细胞株的筛选[J]. 天然产物研究与开发,2000(4):62-65.
- [3] 施和平,梁朋,权宏. 商陆毛状根的诱导、培养及其皂甙的产生[J]. 生物工程学报,2003(1):46-49.
- [4] 薛生国,陈英旭,骆永明,等. 商陆(*Phytolacca acinosa* Roxb.)的锰耐性和超积累[J]. 土壤学报,2004(6):889-895.
- [5] 徐向华,施积炎,陈新才,等. 锰在商陆叶片的细胞分布及化学形态分析[J]. 农业环境科学学报,2008(2):515-520.
- [6] 刘庆,刘慧君. 商陆的应用及毒副作用[J]. 新疆中医药,2002(1):40-42.
- [7] 舒世坤,舒迎澜. 美洲商陆的组织培养[J]. 植物生理学通讯,1987(2):50-51.
- [8] 崔丽华,张海燕,张铁汉,等. 美洲商陆快速繁殖实验体系的建立[J]. 北京师范大学学报:自然科学版,2004(3):390-392.
- [9] 邹利娟,苏智先,胡进耀,等. 美洲商陆组培快速繁殖[J]. 中药材,2008(9):1 299-1 301.
- [10] 徐晓峰,黄学林. TDZ:一种有效的植物生长调节剂[J]. 植物学通报,2003(2):227-237.
- [11] 康培婧,李梅兰,李洪清. TDZ诱导的蓝猪耳根高效再生体系(简报)[J]. 亚热带植物科学,2005(2):64.
- [12] Metz T D, Dixit R, Earle E D. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) and cabbage (*Boleracea* var. *capitata*) [J]. Plant Cell Reports, 1995, 15: 287-292.
- [13] Kuvshinov V, Koivu K, Pehu E. Biotechnology and Genetic Resources Applied in Oil-seed and Vegetable *Brassica* Improvement [M]//Watanabe K N, Pehu E. Plant biotechnology and plant genetic resources for sustainability and productivity. USA: Academic Press, 1997: 197-206.
- [14] Palmer C E. Enhanced shoot regeneration from *Brassica campestris* by silver nitrate[J]. Plant Cell Reports, 1992, 11: 541-549.
- [15] 韦健琳,秦新民. 大白菜的组织培养研究[J]. 广西师范大学学报:自然科学版,2000(1):85-87.
- [16] 沈海龙. 植物组织培养[M]. 北京:中国林业出版社,2005:42.
- [17] 李浚明. 植物组织培养教程[M]. 北京:中国农业大学出版社,1992:79.

[责任编辑:黄 敏]