

# 辐射徐长卿愈伤组织的研究

王琳,关云

(辽宁师范大学 生命科学学院,辽宁 大连 116081)

**摘要:**为探讨辐射处理对徐长卿愈伤组织的影响,获得有利变异植株,采用不同剂量 $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ 射线处理徐长卿愈伤组织,研究了辐射处理对愈伤组织致死率和分化变异的影响,并对不定芽的分化率和变异率、变异不定芽生根及试管苗移栽和定植进行研究。结果表明:经过剂量为8、12、16和20 Gy 4种处理的愈伤组织死亡率随着辐射剂量的提高而增加;经过8、12、16 Gy 3种处理剂量处理的愈伤组织能使分化的不定芽发生变异,其变异率随着辐射剂量增加而提高;变异不定芽培养的试管苗生根率、平均生根数、移栽与定植的成活率随着辐射剂量增加而降低。从经8 Gy辐射处理的变异试管苗中筛选出1株长势非常旺盛的有利变异试管苗,试管苗的后代生长非常旺盛,有利变异保持不变。

**关键词:**徐长卿;愈伤组织; $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ 射线;变异

**中图分类号:**S567.23

**文献标识码:**A

**文章编号:**1002-2767(2014)04-0014-04

徐长卿(*Cynanchum paniculatum*)为萝藦科多年生草本植物<sup>[1]</sup>,在我国多地有分布<sup>[2-3]</sup>。因为徐长卿全草含牡丹酚等多种药用成分,使其全草均可入药,具有镇疼止咳、祛风解毒等功效;能治跌打损伤、毒蛇咬伤、风湿疹和湿疹等多种疾病<sup>[4-5]</sup>。鉴于徐长卿是一味极为常见的中药,需求量甚大,长期大量的采收出售和药用使徐长卿在大连地区几近濒危。为了保护野生资源,张松岩等对徐长卿进行了组织培养及再生体系建立的研究<sup>[6]</sup>,并获得了能保持徐长卿所有植物学性状,收获的药用全草单株均重比野生植株增加16%的定植试管苗。为探讨 $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ 射线辐射处理对徐长卿愈伤组织的影响,以获得有利变异植株,在张松岩等研究<sup>[6]</sup>的基础上,对徐长卿的愈伤组织进行了 $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ 射线辐射研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验以徐长卿愈伤组织为材料。

### 1.2 方法

1.2.1 培养条件 经过 $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ 射线辐射处理后的愈伤组织,除了培养恒温24℃、光照度2800 lx、固体培养基胨力强250 g·cm<sup>-2</sup>的条件外<sup>[7]</sup>,其它培养条件均参见徐长卿研究<sup>[6]</sup>。

1.2.2 愈伤组织辐射处理 将在MS+6-BA

0.3 mg·L<sup>-1</sup> + NAA 0.2 mg·L<sup>-1</sup> + 2,4-D 0.4 mg·L<sup>-1</sup>培养基上由子叶培养的绿色颗粒状愈伤组织从培养瓶取出后,将其分散成较均匀的块状,之后接种到下部相同成分培养基的培养皿中,进行愈伤组织的继续生长培养,培养至18 d愈伤组织开始旺盛生长时,再分别用0(CK)、4、8、12、16、20、24、28和32 Gy(剂量率为1 Gy·min<sup>-1</sup>)8种剂量的 $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ 射线进行辐射处理,之后转移到光照培养箱继续进行正常培养。培养到25 d时,对其致死率和成活愈伤组织的长势进行详细观察统计,每种辐射剂量处理愈伤组织为100块,试验重复3次。

1.2.3 不同剂量 $\gamma$ 射线辐射处理对愈伤组织分化不定芽的影响 将在MS+6-BA 0.3 mg·L<sup>-1</sup> + NAA 0.2 mg·L<sup>-1</sup> + 2,4-D 0.4 mg·L<sup>-1</sup>培养基上由子叶培养的绿色颗粒状愈伤组织从培养瓶取出后,用镊子分散成均匀块状,然后接种到下部为MS+6-BA 0.8 mg·L<sup>-1</sup> + NAA 0.1 mg·L<sup>-1</sup>的愈伤组织分化培养基中,培养8 d后愈伤组织块外观上处于旺盛状态时,再分别用0、4、8、12、16、和20 Gy 6种剂量的 $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ 射线进行处理,进行不同剂量的 $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ 射线处理对愈伤组织分化及变异的影响试验。在试验培养过程中对愈伤组织的变化进行观察。辐射处理后培养到第58天时对愈伤组织块的分化率、变异率和分化不定芽的长势进行详细观察统计。每种剂量每次处理150个愈伤组织块,试验重复3次。变异率为已分化的不定芽占愈伤组织块总数的百分率。

1.2.4 变异不定芽的生根培养 以用0 Gy辐射

收稿日期:2013-12-04

第一作者简介:王琳(1986-),女,辽宁省沈阳市人,在读硕士,从事植物技术研究。E-mail:13sapphire@163.com。

处理的不定芽作为对照组,每次试验每种辐射剂量分别生根培养 60 个不定芽。3 次试验,每种处理共用 180 个不定芽进行生根试验。把用 8、12、16 Gy 3 种辐射剂量处理分化的所有变异的不定芽均从基部切下,进行不同剂量<sup>60</sup>Co-γ 射线辐射处理对分化的变异不定芽生根培养的影响试验。以 1/2MS+NAA 2.0 mg·L<sup>-1</sup>+蔗糖 15 g·L<sup>-1</sup>为生根培养基。3 次试验共用于试验的变异不定芽数量分别是:8 Gy 12 个、12 Gy 45 个、16 Gy 56 个。培养到 30 d 时对试验结果进行全面统计观察。

1.2.5 变异试管苗的移栽和定植 把培养的 50 株对照试管苗经过剂量分别为 8、12、16 Gy <sup>60</sup>Co-γ 射线辐射处理后,分化培养的变异不定芽生根培养的所有变异试管苗生根培养到 25 d 时,放到温室的光照下炼苗 2 d 后,将试管苗移栽到上半层是干净河沙、下半层为肥沃园土的温室营养钵中,进行不同剂量<sup>60</sup>Co-γ 射线辐射处理对变异试管苗移栽的影响试验。移栽后前 13 d 保持没有直射光、温度 19℃ 以上、湿度 80%~90% 的环境条件。移栽试验进行 3 次。

表 1 不同剂量<sup>60</sup>Co-γ 射线辐射处理对愈伤组织致死率及长势的影响

Table 1 Effect of different radiation doses on fatality rate and growth of callus

辐射剂量/Gy Dose	接种愈伤组织块数 Number of callus	死亡率/% Fatality rate	长势 Growth
0(CK)	100	7	++
4	100	3	+++
8	100	23	+
12	100	59	+
16	100	75	+
20	100	91	+
24	100	100	-
28	100	100	-
32	100	100	-

注:+++为非常旺盛;++为长势旺盛;+为长势一般;-为死亡。下同。

Note:+++ means very strong; ++ means growing strong; + means growing generally; - means death. The same below.

2.2 不同剂量<sup>60</sup>Co-γ 射线辐射处理对愈伤组织分化不定芽的影响

对辐射处理后的培养结果进行观察统计,3 次试验的平均结果见表 2,在经过剂量为 4、8、12、16 Gy 4 种剂量射线处理的愈伤组织的分化率随着处理剂量的增加而降低;而其变异率随着处理剂量的增加而升高。分化出变异类型包括叶片增多、叶片减少并变小、白化、叶色深绿或具紫斑等。

2 结果与分析

2.1 不同剂量<sup>60</sup>Co-γ 射线辐射处理对愈伤组织致死率的影响

培养到 25 d 时观察统计,由表 1 可知,用不同剂量<sup>60</sup>Co-γ 射线对愈伤组织进行辐射处理,产生明显不同的结果。在所试验的 8 种剂量内,24、28、32 Gy 3 种辐射剂量的愈伤组织死亡率为 100%;而在 8、12、16、和 20 Gy 4 种辐射处理的范围内,愈伤组织死亡率随着辐射剂量的增加而升高。观察统计还表明,经过剂量为 4 Gy 处理的愈伤组织不仅死亡率比对照组低,而且处理后培养到 25 d 时其长势非常旺盛。培养的前期观察表明,辐射处理后培养的前 6 d,所有处理的愈伤组织外观上基本没有明显变化,而后迅速变褐,培养到 15 d 时,已经变褐的愈伤组织几乎都变成黑色死亡愈伤组织,重复试验观察统计的结果几乎一致。以上结果说明,对徐长卿子叶愈伤组织进行<sup>60</sup>Co-γ 射线进行处理,致死临界剂量为 24 Gy;用 4 Gy 的剂量进行处理,能提高成活率,并促进愈伤组织的生长。

观察还发现,经过剂量为 4 Gy 辐射处理的愈伤组织不仅分化率较高、分化的不定芽长势也非常旺盛,并且未见出现变异性状的不定芽。以上结果说明,用 4 Gy<sup>60</sup>Co-γ 射线对愈伤组织进行处理,能提高愈伤组织的分化率,而经过 8、12、16 Gy 3 种剂量辐射处理的愈伤组织,不仅能使分化的不定芽发生变异,而且变异率随着辐射剂量增加而提高。

表 2 不同剂量<sup>60</sup>Co-γ 射线辐射处理对愈伤组织分化及变异的影响  
Table 2 Effect of different radiation doses on differentiation and variation of callus

辐射剂量/ Gy Dose	接种愈伤 组织块数 Number of callus	分化不定芽个数 Number of differentiated adventitious bud	分化率/% Differentiation rate	分化不定芽长势 Growth of differentiated adventitious bud	分化变异不定芽个数 Number of variation adventitious bud	变异率/% Variation rate
0(CK)	450	420	93.3	++	0	0
4	450	437	97.1	+++	0	0
8	450	376	83.6	+	12	3.2
12	450	322	71.6	+	45	14.0
16	450	140	31.1	+	56	40.0
20	450	0	0	—	0	0

### 2.3 不同剂量<sup>60</sup>Co-γ 射线辐射处理对分化的变异不定芽生根培养的影响

由表 3 可知,在经过 8、12、16 Gy 3 种不同剂量处理并分化的变异不定芽培养的试管苗,其生根率与平均生根数随着辐射剂量增加而降低,并

且试管苗的长势都较弱,观察统计还表明,3 次重复试验的结果基本一致。结果表明,用 8、12、16 Gy 3 种剂量的<sup>60</sup>Co-γ 射线对徐长卿的愈伤组织进行辐射处理后,对变异的变异不定芽生根培养会产生一定的抑制作用。

表 3 不同剂量<sup>60</sup>Co-γ 射线辐射对分化的变异不定芽生根培养的影响  
Table 3 Effect of different radiation doses on rooting culture of variation adventitious bud

辐射剂量/ Gy Dose	生根培养不定芽个数 Number of adventitious bud	生根不定芽个数 Number of adventitious bud with root	生根率/% Rooting rate	平均单株生根条数 Rooting number per plant	试管苗长势 Growth of test-tube plantlet
0(CK)	180	171	95.0	8.1	+++
8	12	7	58.3	3.6	++
12	45	13	28.9	1.7	+
16	56	9	16.1	1.3	+

### 2.4 变异试管苗的移栽和定植

移栽后 29 d 统计观察,经过 8、12、16 Gy 3 种不同剂量 γ 射线处理的愈伤组织并分化培养的变

异试管苗,移栽的成活率随着辐射剂量的增加而降低,其变异试管苗长势也随着辐射剂量的增加而变弱。

表 4 不同剂量<sup>60</sup>Co-γ 射线辐射处理对变异试管苗成活率的影响  
Table 4 Effect of different radiation doses on survival rate of test-tube plantlet

辐射剂量/ Gy Dose	移栽试管苗株数 Number of transplantation test-tube plantlet	移栽成活数 Survival number of transplantation	成活率/% Survival rate	试管苗长势 Growth of test-tube plantlet
0(CK)	150	145	96.7	+++
8	7	5	71.4	++
12	13	6	45.2	+
16	9	2	20.2	+

移栽后 40 d 进行观察统计(见表 4),试验平均结果表明,移栽的 150 株对照试管苗成活率为 96.7%;经过 8 Gy 处理定植 7 株变异试管苗,成

活了 5 株,成活率为 71.4%;经过 12 Gy 处理移栽 13 株变异试管苗,成活了 6 株,成活率为 45.2%;经过 16 Gy 处理移栽 9 株变异试管苗,成

活了 2 株,成活率 20.2%;经过 8、12 Gy 两种剂量辐射处理移栽成活的试管苗中有 5 株变异试管苗,为 5 种变异类型,其中经过 8 Gy 剂量辐射处理的变异试管苗出现了 1 株生长非常旺盛的变异类型,为有利变异植株。

当这株有利变异试管苗生长到第 2 年时,以嫩茎为材料,按照张嵩岩的培养方法<sup>[6]</sup>培养试管苗,并移栽、定植,成活 125 株试管苗。对其进行观察,结果表明,这种具有有利变异的试管苗不仅保持了野生徐长卿的植物学特征,而且还保持了生长非常旺盛的有利变异性状。10 月中旬随机采收了 10 株这种试管苗的全株和 10 株野生徐长卿的全株,晒干后 10 株具有有利变异试管苗的干重比野生植株增重 43%,观察的结果也与重量分析结果相同。结果表明,经过 8 Gy 辐射剂量处理获得的有利变异试管苗,其有利变异性状能保持不变,具有遗传性,说明剂量为 8 Gy 的<sup>60</sup>Co- $\gamma$ 射线辐射处理的徐长卿愈伤组织能选育出有利变异性状的新类型。

### 3 结论与讨论

该研究表明,对徐长卿的愈伤组织进行剂量为 8、12、16 Gy 的<sup>60</sup>Co- $\gamma$ 射线辐射处理能引起变异,并分化培养出具有变异性状的不定芽和具有有利变异性状的试管苗。这也说明采用一定剂量的<sup>60</sup>Co- $\gamma$ 射线对徐长卿的愈伤组织进行辐射处理的方法不仅是愈伤组织进行诱变的一条有效途

径,也是选育徐长卿新类型的新途径。

在该研究中,出现了用 4 Gy 的<sup>60</sup>Co- $\gamma$ 射线辐射处理的愈伤组织死亡率降低、生长旺盛的结果。这一结果与前人的研究结果<sup>[9-11]</sup>基本一致。以较低剂量的<sup>60</sup>Co- $\gamma$ 射线对愈伤组织进行辐射处理,具有促进愈伤组织生长的作用。

### 参考文献:

- [1] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴(第 3 册)[M]. 北京:科学出版社,1987:480.
- [2] 李书心. 辽宁植物志(下册)[M]. 沈阳:辽宁科学技术出版社,1992:111.
- [3] 韩全忠,王正兴. 大连地区植物志(中册)[M]. 大连:大连理工大学出版社,1993:596.
- [4] 中医大辞典编辑委员会. 中医大词典(中药分册)[M]. 北京:人民卫生出版社,1982:314.
- [5] 南京中医药大学. 中药大辞典(上册)[M]. 上海:上海科学技术出版社,2006:2661-2663.
- [6] 张松岩,高扬,陈旸升,等. 徐长卿子叶组织培养及再生体系的建立[J]. 广西农业生物学,2007(3):247-249.
- [7] 姜长阳. 培养基琼脂用量的商榷[J]. 植物生理学通讯,1990,26(2):54.
- [8] 姜长阳,宁淑香,杨文新,等. 愈伤组织辐射诱变选育白玉兰新品系[J]. 园艺学报,2002,29(5):473-476.
- [9] 李洪艳,李建国,张耀芳,等. 辐射诱变愈伤组织选育耐寒蕨菜[J]. 辽宁大学学报,2010,37(3):274-277.
- [10] 张小全,平文丽,殷全玉,等. 烟草愈伤组织辐射诱变抗苯丙氨酸突变体筛选[J]. 中国烟草学报,2011,6(2):40-44.
- [11] 王洪庆,王关林,姜长阳,等. 辐射聚合草花药愈伤组织效应[J]. 中国草地,1988,9(6):35-37.

## Study on *Cynanchum paniculatum* Callus by Radiation

WANG Lin, GUAN Yun

(College of Life Science, Liaoning Normal University, Dalian, Liaoning 116081)

**Abstract:** In order to study the effect of radiation treatment on callus of *Cynanchum paniculatus* and obtain favorable variant plants, using different doses of <sup>60</sup>Co- $\gamma$  rays, the effects of radiation treatment on fatality rate and differentiation variation of callus were analyzed, differentiation rate and mutation rate of adventitious bud, variational adventitious bud rooting, transplanting and engraftment of tube seedlings were studied. The results showed that mortality rate increased with the increasing of radiation dose of 8, 12, 16, 20 Gy on callus; the 8, 12 and 16 Gy three kinds of treatments made differentiation adventitious bud mutation, and the mutation rate improved with the increasing of radiation dose. The rooting rate, average root number, survival rate of transplant and engraftment of the variational adventitious bud culture *in vitro* decreased with the increasing of radiation dose. Screening one strain variational tube seedlings which was strong and favorable for variation treated with radiation dose 8 Gy. It remained the favorable variation and the offspring tube seedlings grew strong.

**Key words:** *Cynanchum paniculatum*; callus; <sup>60</sup>Co- $\gamma$  rays; variation