

钩藤愈伤组织的诱导与植株再生

吴 顺,田维雅,周 凯,胡俊宏,伍信红,刘 坤
(中南林业科技大学生命科学与技术学院,长沙 410018)

摘要:为了建立钩藤愈伤组织诱导与植株再生体系。以药用植物钩藤[*Uncaria rhynchophylla* (Mip.) Jack]嫩茎、嫩枝、嫩叶为外植体,通过优化激素组合,进行愈伤组织诱导和分化、幼苗生根和移栽,初步建立了钩藤愈伤组织诱导和植株再生体系。结果表明,以钩藤嫩枝作为外植体出愈情况较好,污染率低,继代后愈伤组织生长快。培养基成分为WPM+2.0 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L 6-BA较适宜愈伤组织的诱导和增殖,诱导率可达83.3%。培养基成分为WPM+2.0 mg/L KT+0.2 mg/L NAA能分化出芽,愈伤组织率分化率达到82.3%;而1/2WPM+1.0 mg/L IBA适宜于试管苗生根,生根率达92.0%。以钩藤嫩枝为外植体诱导获得了质量良好的愈伤组织,并成功再生成植株,结果的获得可为解决钩藤人工栽培过程的资源和品质问题以及进行细胞培养和分子遗传改良奠定基础。

关键词:钩藤;愈伤组织;植物激素;植株再生

中图分类号:Q943.1,S567.19

文献标志码:A

论文编号:casb17070130

Uncaria rhynchophylla (Mip.) Jack: Callus Induction and Plantlet Regeneration

Wu Shun, Tian Weiya, Zhou Kai, Hu Junhong, Wu Xinhong, Liu Kun

(Life Science and Technology College, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410018)

Abstract: The paper aims to build callus induction and plantlet regeneration system for *Uncaria rhynchophylla* (Mip.) Jack. The authors took the fresh stems, shoots and leaves as explants to conduct the induction and differentiation of callus, and the rooting and transplantation of seedlings by optimizing hormone combination, to establish the callus induction and plantlet regeneration system of *Uncaria rhynchophylla* (Mip.) Jack. The results showed that: the callus of the fresh shoot of *Uncaria rhynchophylla* (Mip.) Jack as explant was better, its pollution rate was low, and the callus growth was faster after subculture; the optimal medium for callus induction was WPM+2.0 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L 6-BA; for re-differentiation WPM+2.0 mg/L KT+0.2 mg/L NAA; and for rooting 1/2WPM+1.0 mg/L IBA; the callus induction, re-differentiation and rooting rate was 83.3%, 82.3% and 92%, respectively. In conclusion, the callus is induced by the explants of fresh shoots and the plants are regenerated successfully, and the results obtained can be used to solve the resource and quality problems of the artificial cultivation of *Uncaria rhynchophylla* (Mip.) Jack, and to lay a foundation for cell culture and molecular genetic improvement.

Key words: *Uncaria rhynchophylla* (Mip.) Jack; callus; phytohormones; plantlet regeneration

0 引言

钩藤[*Uncaria rhynchophylla* (Mip.) Jack]为茜草科钩藤属多年生植物,以干燥带钩茎枝入药,主要活性成

分为钩藤生物总碱,如钩藤碱、异钩藤碱等^[1-3],具有降血压、镇静、抗惊厥、抗癌等作用,在临床上主要应用于头痛、高血压、眩晕、脑梗死等的治疗,均有较好的疗

基金项目:湖南省教育厅科学研究项目“钩藤毛状根的诱导及其代谢调控研究”(16C1677);中南林业科技大学大学生研究性计划与创新性项目“钩藤毛状根的诱导与植株再生”[(Z)2017-00983-10]。

第一作者简介:吴顺,男,1976年出生,副教授,博士,主要从事药用植物资源学及基因工程育种研究。通信地址:410018 中南林业科技大学生命科学与技术学院生物技术教研室,Tel:0731-85623490,E-mail:wushuncn@csuft.edu.cn。

收稿日期:2017-07-26,修回日期:2017-12-15。

效,且副作用少^[4-6]。然而,钩藤的药源目前多为野生,由于掠夺性的采收,野生资源大大减少,加快人工栽培研究已成为当前解决资源稀缺问题的主要途径之一。目前,钩藤主要依靠种子繁殖和传统扦插,但钩藤果期很长,种子小采收困难,发芽率很低且需用碱处理,优良性状难以保持,而扦插则繁殖系数低,成活率还不到50%,导致其应用具有较大局限性,而利用组培苗进行生产则可克服上述缺点^[9-12]。

目前,国内外关于钩藤的组织培养仅见于以种子和茎尖培养的无菌苗为外植体,经丛生芽诱导、增殖及生根,初步建立了钩藤快繁体系。毛堂芬等^[13]和龙祥友等^[14]以钩藤、华钩藤种子萌发出的幼苗嫩茎为外植体进行丛生芽诱导,建立了钩藤快速繁殖体系。而潘丽梅等^[15]则以钩藤无菌茎尖组培苗为试验材料,研究了生根壮苗的激素组合和移栽基质影响。然而,有关钩藤经愈伤组织诱导而进行植株再生的研究,笔者还

未见相关报道。笔者以钩藤幼嫩叶片、嫩枝和嫩茎作为外植体,探讨了钩藤愈伤组织的诱导与植株再生体系的建立,以期为全年大规模生产钩藤幼苗以及进行细胞培养和基因遗传改良奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验时间、地点

室内试验于2016年3月在中南林业科技大学植物组织培养室进行。

1.2 试验材料

将采集于贵州省贵阳市野外的钩藤种植于中南林业科技大学试验基地,经湖南中医药大学鉴定为钩藤原药材。2016年3—6月,从生长健壮的钩藤植株(见图1A)上剪取试验材料。

1.3 试验方法

1.3.1 外植体的处理 将外植体切成合适大小,用低浓度肥皂水浸泡20 min后,用自来水冲洗干净,70%酒精

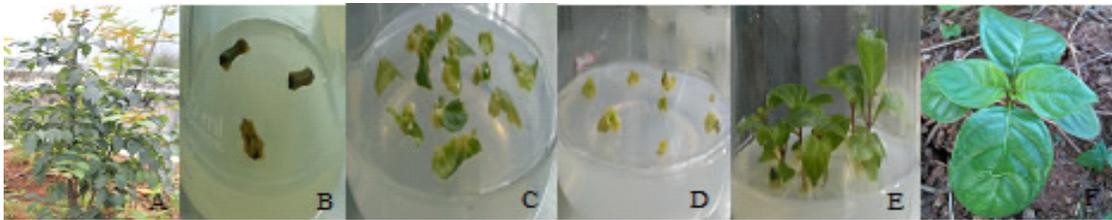


图1 钩藤愈伤组织诱导与植株再生

图1 钩藤愈伤组织诱导与植株再生

消毒30 s,无菌水冲洗3次,0.1% HgCl₂浸泡10 min,无菌水冲洗干净。在超净工作台上将叶片切成约0.5 cm²,嫩枝和嫩茎切成约0.8 cm长。

1.3.2 愈伤组织的诱导 将外植体分别接种在诱导培养基上,每组接种20瓶。以WPM为基本培养基,添加2,4-D、6-BA、NAA,pH 5.8。培养20天后,记录愈伤生长情况,统计愈伤状况、愈伤组织发生率和污染率,并进行继代,计算见公式(1)、(2)。

$$\text{出愈率} = \frac{\text{产生愈伤组织个数}}{\text{接种外植体个数} - \text{污染个数}} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{污染率} = \frac{\text{污染个数}}{\text{接种外植体个数}} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (2)$$

1.3.3 分化培养 将继代培养15天后生长良好的愈伤组织转入分化培养基,进行分化培养。以WPM为基本培养基,添加NAA、KT,pH 5.8。培养30天后统计最早出芽时间、出芽数目和出芽率公式(3)。

$$\text{芽发生率} = \frac{\text{长幼苗愈伤组织个数}}{\text{接种外植体个数}} \times 100\% \quad \dots (3)$$

1.3.4 生根培养 将生长健壮的幼苗转入生根培养基

中,进行生根培养。以1/2 WPM为基本培养基,添加IBA或NAA,pH 5.8。一段时间后,统计生根情况(最早生根时间、根数和生根率)。

以上培养基中附加蔗糖30 g/L,琼脂7~8 g/L。121℃,高压灭菌20 min。培养温度25℃,光照14 h/d,光强20~30 μmol/(m²·s),相对湿度80%。

1.3.5 炼苗和移栽 待试管苗根长3~4 cm时,将封口膜揭开,加入少量无菌水,培养条件下放置2~3天,移入温室放置3~4天。将幼苗从培养基小心取出,冲洗掉培养基,种植于灭菌腐殖质土壤中,并控制温度、湿度和光照。经过15天左右过渡移栽后,可转入田间。

1.4 统计分析

所获得数据利用SPSS 10.0统计学软件对数据进行统计学分析, $P < 0.05$ 表示显著性差异。

2 结果与分析

2.1 不同激素组合对愈伤组织诱导及生长的影响

不同外植体在WPM系列培养基上均能诱导出愈伤组织,但愈伤组织的颜色有一定差异,质地差异较为

明显(见表1和图1B~C)。接种5天后,嫩茎和嫩枝两端开始膨大,而叶片则出现皱缩变曲,叶片在9天后出现愈伤组织,而嫩茎和嫩枝则在12天后出现愈伤组织,但嫩茎污染率较高。从表1来看,外植体愈伤组织

诱导时对2,4-D和6-BA比较敏感,当6-BA浓度为0.5 mg/L, 2,4-D浓度为2.0 mg/L时,愈伤组织诱导率最高,分别达33.3%、83.3%和87.9%。但综合比较3种外植体的愈伤组织在所设培养基上的生长状况(见图1-B~C),

表1 不同激素配对外植体愈伤组织形成的影响

激素/(mg/L)			嫩茎			嫩枝			嫩叶		
2,4-D	6-BA	NAA	出愈率/%	污染率/%	愈伤状况	出愈率/%	污染率/%	愈伤状况	出愈率/%	污染率/%	愈伤状况
1.0	0.5	/	13.3 ^c	56.7 ^b	米黄,疏松粗糙	41.1 ^d	8.3 ^c	米黄,疏松粗糙	48.3 ^c	1.6 ^d	淡黄,较疏松
1.0	0.3	/	21.6 ^b	53.3 ^b	米黄,疏松粗糙	38.3 ^d	6.7 ^d	米黄,疏松粗糙	45.0 ^c	3.3 ^e	淡黄,较疏松
1.0	0.2	/	11.7 ^e	51.7 ^b	米黄,疏松粗糙	46.7 ^c	15.0 ^a	米黄,疏松粗糙	46.7 ^c	1.6 ^d	淡黄,较疏松
2.0	/	/	29.3 ^b	53.3 ^b	浅黄,疏松粗糙	63.3 ^b	6.7 ^d	浅黄,疏松粗糙	65.4 ^d	6.7 ^b	淡黄,较紧密
2.0	0.5	/	33.3 ^a	58.3 ^a	米黄,疏松粗糙	83.3 ^a	5.0 ^e	米黄,疏松粗糙	87.9 ^a	6.7 ^b	淡黄,较紧密
2.0	0.3	/	31.7 ^a	55.0 ^b	米黄,疏松粗糙	65.0 ^b	5.0 ^e	米黄,疏松粗糙	78.2 ^b	3.3 ^e	淡黄,较紧密
2.0	0.2	/	32.8 ^a	63.3 ^a	米黄,疏松粗糙	66.7 ^b	6.7 ^d	米黄,疏松粗糙	74.1 ^b	1.6 ^d	淡黄,较紧密
2.0	0.2	0.1	30.4 ^b	53.3 ^b	浅黄,疏松粗糙	44.4 ^c	8.3 ^c	浅黄,疏松粗糙	70.5 ^c	8.3 ^a	淡黄,较紧密
2.0	0.1	0.1	29.8 ^b	51.7 ^b	浅黄,疏松粗糙	47.5 ^c	6.7 ^d	浅黄,较疏松	71.2 ^c	1.6 ^d	淡黄,较紧密
2.5	0.5	/	22.2 ^d	48.3 ^c	浅黄褐,较疏松	42.0 ^d	11.7 ^b	浅黄褐,较疏松	65.4 ^d	3.3 ^e	浅黄褐,较紧密
2.5	0.2	/	25.6 ^c	50.0 ^c	浅黄褐,较疏松	45.6 ^c	6.7 ^d	浅黄褐,较疏松	66.1 ^d	3.3 ^e	浅黄褐,较紧密
/	2.0	1.5	3.4 ^f	55.0 ^b	浅黄绿,较疏松	5.6 ^e	5.0 ^e	浅黄绿,较疏松	10.2 ^f	6.7 ^b	浅黄绿,较紧密
/	2.0	1.0	8.7 ^e	51.7 ^b	浅黄绿,较疏松	11.1 ^f	11.7 ^b	浅黄绿,较疏松	14.3 ^f	3.3 ^e	淡黄绿,较紧密

注:同列数据进行两两比较,不同小写字母表示不同数据间的显著差异($P<0.05$)。“/”表示未添加。

可以认为钩藤愈伤组织诱导的最佳外植体为嫩枝,而最佳诱导培养基为WPM+2.0 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L 6-BA。

2.2 不同激素配对外植体再生的影响

将嫩枝诱导的愈伤组织转入分化培养基,愈伤组织快速生长,9天后愈伤组织表面开始变绿并出现芽点(见图1D)。在设计激素组合中(见表2),大部分都能诱导愈伤组织进行再分化,其中最佳激素组合为

2.0 mg/L KT+0.2 mg/L NAA,芽发生率达到82.3%。

2.3 生根培养与炼苗移栽

待试管苗长高到约3~4 cm时,将小植株切下,转接至附加IBA或NAA的培养基上,统计植株生根情况。结果表明(见表3和图1E),在添加IBA的1/2MS培养基上,约20天后即有根长出,而NAA诱导生根需要的时间则相对较长,且根数较少。以添加浓度为0.5 mg/L IBA的1/2MS培养基对其根生长最好,平均

表2 不同激素配对外植体再生的影响

激素/(mg/L)		最早生芽时间/d	单块平均出芽数/个	芽发生率/%
KT	NAA			
2.0	0.5	9	2.13 ^b	73.1 ^b
2.0	0.2	9	3.45 ^a	82.3 ^a
1.5	0.5	10	1.73 ^c	64.2 ^c
1.5	0.2	9	2.08 ^b	53.8 ^d
1.0	0.5	12	0.33 ^e	23.5 ^f
1.0	0.2	12	0.78 ^d	33.6 ^e

注:同列数据进行两两比较,不同小写字母表示不同数据间的显著差异($P<0.05$)。

表3 不同激素配对外植体生根的影响

激素/(mg/L)		最早生根时间/d	平均根数/条	生根率/%
IBA	NAA			
1.0	/	20	5.8 ^b	85.6 ^b
0.5	/	20	8.5 ^a	92.0 ^a
0.2	/	22	4.2 ^d	63.1 ^c
	1.5	23	4.3 ^d	54.2 ^d
	1.0	23	4.9 ^c	67.6 ^c
	0.5	25	2.2 ^e	32.5 ^e

注:同列数据进行两两比较,不同小写字母表示不同数据间的显著差异($P<0.05$)。

生根数达到8.5条,根系较白且浓密。待幼苗在生根培养中长至根长约2 cm时,打开瓶盖,加入少量无菌水,于培养条件下放置2天后,将幼苗从培养基中小心取出,去除根部培养基,移栽至灭菌的腐殖质土壤中,浇足水,保持温室室内湿度85%以上,温度控制在25℃左右。10天后转移到室外大棚,约20天后可以得到健壮生长的钩藤栽培苗(见图1F)。

3 结论与讨论

由于植物不同部位本身的生理状态以及内源激素合成与代谢的差异,在对其进行离体培养时也会存在各种差异性,如各部位的分化再生能力不同,接种后污染率不同等^[16-20]。笔者发现,不同钩藤外植体诱导愈伤组织表现出较大差异,嫩枝接种后第5天后就开始膨大,12天后出现愈伤组织,嫩叶尽管接种后9天就出现了愈伤组织,但愈伤组织质地致密,而嫩茎则出现较高的污染率。本研究以钩藤嫩枝为外植体在WPM+2.0 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L 6-BA培养基上获得了质量较高的愈伤组织,这为进一步建立细胞悬浮培养体系奠定了基础,但对愈伤组织中有效成分含量和变化,笔者将作进一步研究(待发表)。在WPM+2.0 mg/L KT+0.2 mg/L NAA培养基上愈伤组织具有较高的分化频率,芽再生率达82.3%,该成果将为遗传转化和品种选育打下良好基础。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[M].一部.北京:中国医药科技出版社,2015:257.
- [2] 黄小敏,刘方方,盖亚男,等.钩藤的本草学研究[J].中药材,2016,39(12):2906-2911.
- [3] 叶齐,齐荔红.钩藤的主要成分及生物活性研究进展[J].西北药学杂志,2012,27(5):508-510.
- [4] 雷冰坚,马健雄.钩藤生物碱类化学成分研究进展[J].华西医学,2014,29(3):592-594.
- [5] 王盟,刘卫.钩藤总生物碱的研究进展[J].实用医药杂志,2008,25(3):360-362.
- [6] 宋纯清,樊懿,黄伟晖,等.钩藤中不同成分降压作用的差异[J].中草药,2000,31(10):762-764.
- [7] 陈长勋,金若敏,李仪奎,等.钩藤碱抗血小板聚集和抗血栓形成的作用研究[J].医学研究通讯,1999,28(1):8.
- [8] 韦芳芳,曾常青,赵宇红,等.钩藤神经保护机制的研究进展[J].中国中药杂志,2014,39(14):2603-2607.
- [9] 刘涛,刘作易,贺定祥,等.野生中药材资源钩藤种子发芽研究[J].安徽农业科学,2008,36(33):14436-14437,14549.
- [10] 杨俊轶.钩藤的种子育苗技术[J].中国野生植物资源,2007,1(26):66-67.
- [11] Liu T, Liu ZY, He DX, et al. Study on germination rate of *Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Jacks[J]. Agricultural Science & Technology, 2008,9(4):96-98,117.
- [12] 韦树根,马小军,施力军,等.钩藤扦插繁殖试验[J].江苏农业科学,2011,39(6):415-416.
- [13] 毛堂芬,刘作易,贺定祥,等.钩藤的组织培养与植株再生[J].植物生理学通讯,2006,42(6):1127-1128.
- [14] 龙祥友,孙长生.华钩藤组织培养与快速繁殖[J].植物生理学通讯,2008,44(1):115.
- [15] 潘丽梅,马小军,韦荣昌,等.钩藤生根壮苗培养基优化及移栽基质的筛选[J].江苏农业科学,2014,42(11):83-85.
- [16] 施力军,苏建春,蒋向军,等.钩藤组培技术体系研究[J].安徽农业科学,2010,38(6):2937,2955.
- [17] 肖关丽,杨清辉.植物组织培养过程中内源激素研究进展[J].云南农业大学学报,2001,16(2):136-138.
- [18] 孙小兵,郭素娟.成龄板栗组培快繁体系的建立及影响因素的研究[J].中南林业科技大学学报,2015,35(4):51-55.
- [19] 吴顺,萧浪涛,刘清,等.水稻愈伤组织中内源激素水平与遗传转化的关系[J].核农学报,2009,23(2):257-261.
- [20] Gabriela R Luna- Palencia, Ariana A Huerta- Heredia, Carlos M Cerda- Garcia- Rojas, et al. Different alkaloid profile in *Uncaria tomentosa* micropropagated plantlets and root cultures[J]. Biotechnol Lett,2013,35:791-797.