

白术叶片再生植株和丛生芽快繁的研究

陈娟^{1,2}, 潘开文², 辜彬¹, 王进闯², 吴越华³, 万涛⁴

(¹四川大学生命科学院, 成都 610064; ²中国科学院成都生物研究所, 成都 610041;

³四川省西昌林业技校, 西昌 615000; ⁴四川省林木种苗站, 成都 610081)

摘要:白术是菊科的一种重要药用植物。为满足白术的药用需求, 扩大其资源供应, 避免传统开荒育苗种植模式对生态环境的破坏, 为白术的大规模工厂化育苗及获取药用次生代谢产物提供有效的途径和方法, 笔者以白术叶片为外植体经愈伤组织再生植株和丛生芽增殖两种方式建立了白术无菌苗的快速繁殖技术, 分析了不同植物激素种类和浓度对白术叶片再生植株及丛生芽增殖的影响, 研究了温度和光照条件对白术叶片愈伤组织褐变的影响。研究结果显示在培养基 MS+ 6-BA 1 mg/L+NAA 0.2 mg/L 上白术丛生芽增殖倍数最高, 可达 4.45 倍; 以白术的叶片愈伤组织诱导及再生植株的最佳培养基为 MS+KT 1 mg/L+NAA 0.2 mg/L, 愈伤组织诱导率可达 96.7%; 芽分化率为 90%。不同的细胞分裂素种类与浓度处理差异显著, 在白术叶片的愈伤组织诱导中, KT 的效果要优于 6-BA, 但在丛生芽增殖中则表现出高浓度的 6-BA 要优于 KT。白术叶片愈伤组织继代培养中褐变程度与温度、光照条件有关, 1000 lx 光照强度, 20±0.5℃ 的温度条件下继代培养能有效控制褐变。

关键词:白术快繁; 叶片愈伤组织; 再生植株

中图分类号:Q943 **文献标识码:**A

Atractylodes Macrocephala Rapid Propagation by Direct Shoot and Plant Regeneration by Leaf

Chen Juan^{1,2}, Pan Kaiwen², Gu Bin¹, Wang Jinchuang², Wu Yuehua³, Wan Tao⁴

(¹Department of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064; ²Chengdu Institute of Biology, CAS, Chengdu 610041;

³Sichuan Xichang Forestry College, Xichang 615000; ⁴Tree Seed and Seedling Station of Sichuan Forestry, Chengdu 610081)

Abstract: *Atractylodes macrocephala* is an important medicinal herb belonging to the family compositae. In order to provide efficient pathway for commercial production of *Atractylodes macrocephala*, obtain medicinal secondary metabolite to meet great demand in herbal medicine, and avoid environment destruction induced by tradition cultivation mode of destroying native vegetation, a method for rapid micropropagation of *Atractylodes macrocephala* through plant regeneration by leaf and direct shoot multiplication were established in the paper. The effect of different cytokinin and concentration on callus introduction from leaf and direct shoot multiplication and the influence of different light and temperature on subcultured callus browning were investigated. The results showed that the highest rate of direct shoot multiplication (4.55 per bud) was formed at MS+ 6-BA 1 mg/L +NAA 0.2 mg/L. The optimal substrate for callus introduction and plant regeneration from leaf was MS+KT 1 mg/L+NAA 0.2 mg/L where the highest callus introduction (96.7%) and proliferation (90%) were obtained. Different cytokinin and variable concentration had significant differences. The effect of KT on callus induction and proliferation was superior to 6-BA, whereas 6-BA was more efficient than KT at higher concentration of 2mg/L on direct shoot multiplication.

基金项目:中国科学院-乐山市院地合作项目、中国科学院西部之光联合学者项目、国家科技攻关项目子课题“几种重要经济植物无菌苗生产及病害生物防治技术研究”(2005BA807B09LA06、2001BA606A-05-04 和 2004BA606-05-03)、茂县生态站和瓦屋山生态站资助

第一作者简介:陈娟, 女, 1975 年出生, 湖南人, 硕士, 研究方向为植物生理生态学。通信地址: 610064 四川省成都市一环南路一段四川大学生命科学学院 2004 级研究生班 E-mail: cj-041698@163.com

通讯作者简介:潘开文, 男, 1968 年出生, 教授, 研究方向为植物生理生态与土壤生态学: E-mail: pankw@cib.ac.cn 或 pkaiwen@yahoo.com.cn

收稿日期: 2006-08-15, 修回日期: 2006-08-28。

Callus browning was related to different treatments of temperature and light, and it was availably controlled when cultured under 1000 lx light intensity and $20 \pm 0.5^\circ\text{C}$ temperature.

Key words: *Atractylodes macrocephala* rapid propagation, Callus induction of leave, Regeneration

白术 (*Atractylodes macrocephala* Koidz.) 系菊科 (Compositae) 苍术属 (*Atractylodes* DC.) 植物, 为中国传统药用植物, 具有健脾益气、燥湿利水、止汗安胎等功效。近年来的研究表明白术有利尿、抗肿瘤、抗菌消炎、抗糖尿病、抗衰老等作用^[1-3]。由于药用价值高, 市场需求量大, 统计显示其年用量居全国中药材第七位。白术的野生资源很少, 其市场供应主要来源于人工栽培, 但是白术栽培中面临种植周期长, 种质混杂, 病虫害较多, 从而降低了白术的产量和品质, 影响了资源供应。白术性喜凉, 适宜于海拔较高的山地生长, 又忌连作, 需不断开荒育苗, 因此对天然植被的破坏较大, 不利于种植地的生态环境保护。利用组织培养技术进行白术无菌苗的快速繁殖和工厂化生产, 一方面能够为白术人工栽培提供优质健康种源, 改变品种混杂状况和减少病虫害的侵袭, 提高白术种植的经济效益; 另一方面也能够避免对天然植被的破坏, 降低白术种植中的环境成本。此外, 建立白术的高效快繁技术, 也有利于利用生物工程技术进行白术药用次生代谢产物的开发与研究。虽然白术组织培养已有一定研究^[4-7], 但是均未达到工厂化生产的标准, 已有报道中仅下胚轴的愈伤组织诱导频率较高, 但分化频率并不高, 且下胚轴取材不如叶片方便, 需消耗种子, 成本较高, 不利于白术无菌苗的工厂化生产。对快繁而言较适宜的外植体是叶片, 但是叶片的愈伤组织诱导和分化的研究较少, 且已有报道中叶片的愈伤组织诱导和分化频率并不高, 因此笔者在前人研究的基础上, 探讨了白术叶片愈伤组织的增殖、分化以及生根情况, 筛选了白术丛生芽快繁的适宜培养基; 分析了不同细胞分裂素种类和浓度对白术叶片及丛生芽增殖的影响, 以及温度和光照对白术叶片愈伤组织增殖的影响。以期建立高效的离体快繁技术来获得性状稳定的白术苗, 为工厂化生产提供理论依据, 同时, 有助于抛弃传统的生态破坏型种植方式, 保护白术种植区的植被和生态环境。

1 材料和方法

1.1 材料来源

供试材料采自四川省乐山市沙湾区海拔 1600 m 的白术种植地, 2005 年 10 月选取白术健壮二年生植株的叶片和种子, 材料取回后在成都生物所组培室进行试验。

1.2 方法

1.2.1 叶片的愈伤组织诱导和分化 取幼嫩叶片, 用 75% 乙醇溶液漂洗 30 s, 加入 10% 次氯酸钠溶液浸泡消毒 5 min, 无菌水冲洗 3~4 次, 再置于 0.1% 氯化汞溶液中浸泡消毒 10 min, 无菌水冲洗 4~5 次后剪成 0.3~0.5 cm 大小, 叶背面向下接入培养基中, 每种培养基处理重复 5 次, 共接种 30 个外植体, 观察愈伤组织的生长情况, 统计愈伤组织诱导率。选取生长良好的愈伤组织转入分化培养基中分化不定芽, 每种培养基处理重复 5 瓶, 共接种 20 个愈伤组织块, 统计愈伤组织分化率。

1.2.2 丛生芽增殖 选取粒大、饱满的白术种子用水浸泡过夜, 2% 消洗灵浸泡 10 min, 无菌水冲洗 3 次后, 剥去种皮, 用 75% 乙醇溶液漂洗 30 s, 加入 10% 次氯酸钠溶液浸泡消毒 5 min, 无菌水冲洗 3~4 次, 再置于 0.1% 氯化汞溶液中浸泡消毒 15 min, 无菌水冲洗 4~5 次。将消毒好的白术种子在已灭菌的滤纸上吸干水分, 置于未添加植物激素的 MS 培养基中预培养。

一周后, 种子在培养基上萌发出幼苗, 待苗高 1~2 cm 时, 在无菌条件下用剪刀或解剖刀切割成带芽原基的小块, 转入添加了不同激素水平的 MS 培养基中培养, 每种培养基处理重复 5 次, 共接种 20 个外植体。30 d 后统计其增殖情况, 观察芽苗生长情况。继续切割丛生芽转入新鲜培养基中继代繁殖, 选取长势良好的丛生芽接入生根培养基中再生植株。所有的接种材料均置于温度为 $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 的生物气候室中培养, 光照时间为 12 h/d, 光照强度为 2000 lx。

1.2.3 白术叶片愈伤组织继代培养中褐变的控制 白术叶片诱导出的愈伤组织继代增殖过程中易褐变, 可能与材料体内次生代谢物的旺盛分泌有关。因此进行了不同光照、温度条件对白术叶片愈伤组织增殖中褐变程度的影响研究。将诱导出的直径约为 0.5 cm 的愈伤组织分别置于 4 种不同的培养条件处理下继代培养, 处理 1: 1000 lx 光照强度, 温度为 $20 \pm 0.5^\circ\text{C}$, 处理 2: 2000 lx 光照强度, 温度为 $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$, 处理 3: 2000 lx 光照强度, 温度为 $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$, 处理 4: 将愈伤组织置于暗培养, 温度为 $20 \pm 0.5^\circ\text{C}$; 每种处理重复 5 次, 共接种 30 个外植体。统计愈伤组织增殖与褐变情况。

1.3 移栽方法

待白术苗长有健壮发育良好的新根, 出苗高

3~4cm时,揭开封口膜,在光下炼苗2~3d,取出,洗净试管苗基部的琼脂,栽培于含珍珠岩和蛭石(1:1比例)的小钵中,浇透水,薄膜覆盖保湿,温度控制在22~26℃,1周后揭去薄膜,每隔7d左右喷1次营养液。

1.4 数据分析

所有数据用SPSS(10.0)统计软件进行单因素方

差分析。

2 结果与分析

2.1 不同激素组合对白术叶片愈伤组织和分化率、生根的影响

如表1和图1所示,白术的叶片除了在不添加任何激素的MS和MS+KT1+2、4D的培养基上不出愈外,在其余培养基上均有不同程度的愈伤组织生长。

表1 不同激素组合对叶片愈伤组织诱导和分化的影响

培养基编号	培养基	接种数	出愈数	出愈率	愈伤组织数	分化数	分化率
1	MS	30	0	0E	20	0	0D
2	KT0.1+NAA0.2	30	8	0.267D	20	8	0.4BC
3	KT0.5+NAA0.2	30	22	0.733B	20	15	0.75AB
4	KT1+NAA0.2	30	29	0.967A	20	18	0.9A
5	KT2+NAA0.2	30	15	0.5C	20	13	0.65B
6	6-BA0.1+NAA0.2	30	2	0.067E	20	4	0.2C
7	6-BA0.5+NAA0.2	30	10	0.333CD	20	9	0.45BC
8	6-BA1+NAA0.2	30	12	0.467CD	20	16	0.8A
9	6-BA2+NAA0.2	30	13	0.433CD	20	5	0.25C
10	6-BA1+KT0.1+NAA0.2	30	26	0.867AB	20	7	0.35BC
11	6-BA1+KT0.1+NAA1	30	27	0.9AB	20	13	0.65B
12	KT1+2、4D2	30	0	0E	20	0	0D

注:表中不同的字母表示处理间显著性差异,通过LSD检验获得。

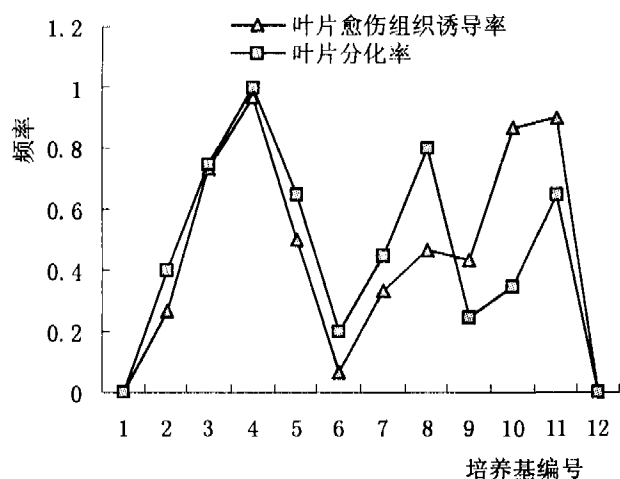


图1 培养基对白术叶片愈伤组织诱导和分化率的影响

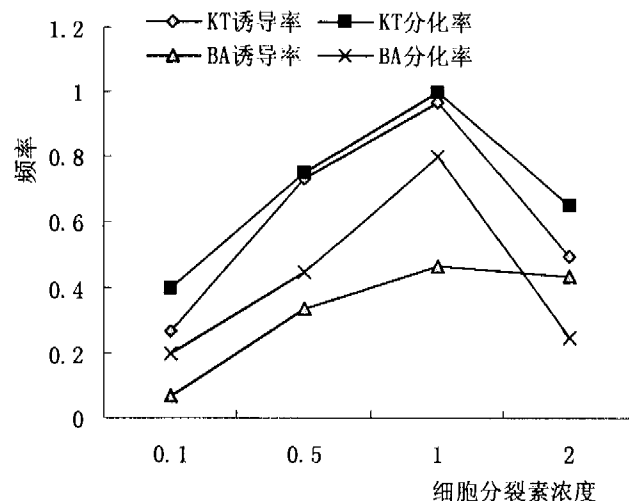


图2 不同浓度的KT与6-BA对白术叶片愈伤组织诱导和分化率的影响

生成的多为浅黄色、致密或半致密、表面呈颗粒状的愈伤组织块(见图3),但在MS+6-BA1+KT0.1+NAA1上生成黄白色,半透明,质地疏松的愈伤组织块,增殖速度快。不同激素组合对叶片愈伤组织诱导率差异显著($p<0.05$)。MS+KT1+NAA0.2、MS+6-BA1+KT0.1+NAA0.2和MS+6-BA1+KT0.1+NAA1与其它处理相比能显著促进叶片的出愈,但三者间的诱导效果差异不显著,因此它们都可以作为叶片愈伤组织诱导的适宜培养基,在实际工厂化培养中可核算用量和成本选取。在MS+KT1+NAA0.2培养基上,愈伤组织诱导和分化率最高,增殖速度较快,约50d左右分化不定芽(见图4),且不需转入生根培养基即可生根成苗(见图5)。如表1和图2所示,不同浓度的细胞分裂素KT和BA对白术愈伤组织的诱导和分化存在差

异,当NAA浓度为0.2mg/L时,低浓度的细胞分裂素表现出较低的诱导率和分化率,在0.1~1.0mg/L范围内随着KT和6-BA浓度的上升,诱导率和分化率上升,两者均表现出浓度为1mg/L时诱导率与分化率要高于其它浓度,高浓度(2mg/L)时则表现出下降趋势。方差分析显示,KT的叶片愈伤组织诱导率与分化率要显著高于6-BA($p<0.05$),KT浓度范围在0.1~2.0mg/L间的诱导效果经检验有显著差异,但分化效果无明显差异。

2.2 不同激素组合对白术丛生芽快繁的影响

如表2所示,MS+6-BA1+NAA0.2培养基能显著促进芽的增殖($p<0.05$),增殖倍数最高,达到4.5倍。在培养基MS+KT1+NAA0.2和MS+6-BA1+KT0.1+NAA0.2上的增殖倍数也较高,分别为3.75和3.5

倍,但两者间的增殖效果经方差检验无明显差异。细胞分裂素 KT 和 6-BA 的增殖效果差异显著,当 NAA 为 0.2 mg/L,低浓度(0.5~1 mg/L)的 6-BA 和 KT 间的增殖效果没有显著差异,但是在高浓度(2 mg/L)时 6-BA 的效果要显著高于 KT ($p<0.05$)。将从生芽转入生根培养基中即生成较多的根。也有一部分丛生芽在继代培养基中能直接生根成苗。

表 2 不同激素组合对白术丛生芽增殖的影响

培养基	接种芽数	出芽总数	芽增殖倍数
MS	20	21 E	1.05E
KT0.5+NAA0.2	20	49CD	2.45CD
KT1+NAA0.2	20	75B	3.75B
KT2+NAA0.2	20	39D	1.85D
6-BA0.5+NAA0.2	20	53C	2.65C
6-BA1+NAA0.2	20	89A	4.45A
6-BA2+NAA0.2	20	66C	3.3C
6-BA1+KT0.1+NAA0.2	20	70B	3.50B

注:表中不同的字母表示处理间显著性差异,通过 LSD 检验获得。

2.3 白术叶片愈伤组织增殖中褐变的控制

4 种处理方式对愈伤组织的增殖速率(以愈伤组织直径表示)、褐变的愈伤组织数及褐变时间的影响差异显著($p<0.05$),处理 2 和处理 3 显示在光照一致

(2000 lx) 的条件下,愈伤组织在 25℃ 培养时要较 30℃ 明显降低愈伤组织的褐化率,可见温度升高不利于愈伤组织的生长。与处理 2、3 比较,处理 1 和 4 显著降低了褐变的愈伤组织数($p<0.05$),出现褐变时间较晚。而处理 1 和 4 在温度一致(20℃)的条件下,处理 4 显著降低了愈伤组织的生长速度($p<0.01$),说明适宜的光照对愈伤组织的生长是必需,暗培养虽然显著降低愈伤组织的褐变数($p<0.05$),但对愈伤组织的生长不适宜。因此可认为处理 1 对白术叶片愈伤组织增殖的褐变控制效果最好,白术叶片在较强的光照(2000 lx)和较高温度(25℃)条件下诱导出愈伤组织后,增殖继代培养时可适当降低光强和温度,以利于愈伤组织的增殖和生长,提高分化成苗的基数。

2.4 移栽

白术无菌苗的根系只要发育良好,移栽成活率较高,在生根培养基 1/2MS+NAA0.1 和 1/4MS+NAA0.2 上均能达到 90% 以上。

3 讨论

实验显示不同的培养基组成对叶片愈伤组织诱导

表 3 不同温度与光照处理对叶片愈伤组织增殖及褐化的影响

处理	接种数	愈伤组织直径(cm)	褐变的愈伤组织数	褐变时间
1	20	2.9±0.303 AB	1B	45d
2	20	3.1±0.238 A	15A	30d
3	20	2.7±0.254B	18A	25d
4	20	1.5±0.148C	2 B	40d

注:表中愈伤组织直径以 30d 为统计所得的平均值±SD(n=5),不同的字母表示处理间显著性差异,通过 LSD 检验获得。

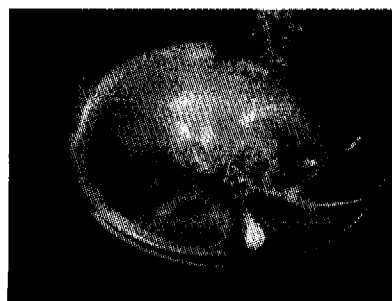


图 3 叶片诱导的愈伤组织



图 4 愈伤组织分化出不定芽



图 5 叶片再生植株

和分化率、丛生芽增殖的影响差异显著,对叶片愈伤组织诱导和分化适宜的培养基为 MS+KT1+NAA0.2,在培养基 MS+6-BA1 mg/L 上丛生芽增殖倍数最高。不同的细胞分裂素种类与浓度处理间差异显著,在白术叶片的愈伤组织诱导中,KT 的效果要优于 6-BA,但在丛生芽增殖中则表现出 BA 要优于 KT。这说明在白术中,BA 的芽分化效果更明显,而 KT 则更容易诱导愈伤组织的生长。不同的激素组合导致的诱导率和分化率的差异除了与不同激素本身的作用强度有关外,可能与植物内源激素的种类与数量有关。

白术叶片诱导的愈伤组织在继代培养时较易褐变,可能是叶片中多酚氧化酶(PPO)活性较高或是作为酶底物的次生代谢产物如酚类物质分泌过多所致,PPO 氧化酚类物质成红褐色的醌类物质,影响植物材料的正常生长,严重时导致植物材料的死亡^[9]。有研究认为温度过高、光照过强都会加重褐变^[9]。实验结果也显示白术叶片愈伤组织继代培养中褐变程度与温度、光照条件有关。在暗培养条件下,虽然褐变程度较轻,但不利于愈伤组织的快速增殖,光照条件以弱光为好;培养温度以 20℃ 左右为宜,温度过高会加重

褐变发生,这与李焕秀等人的研究结果一致,李焕秀等用6种不同的预处理来研究其对苍溪梨外植体褐变和成活的影响,结果发现低温处理对降低褐变有一定作用^[9]。

以叶片为外植体诱导愈伤组织速度快、特别是在MS+6-BA1+KT0.1+NAA1培养基上获取的愈伤组织疏松,增殖稳定且迅速,能够作为植物细胞悬浮培养和获取药用次生代谢产物的材料。

实验通过丛生芽增殖和叶片愈伤组织诱导和再生植株建立了白术无菌苗的快速繁殖体系,对白术实现工厂化育苗及药用次生代谢产物研究提供了实验依据,同时也有利于避免传统栽培模式对天然植被和生态环境的破坏。

参考文献

- [1] 刘思贞,邵玉芹,祝希娴.白术药理研究进展[J].时珍国医国药,1999,(8):634-637.
- [2] 陈华萍,吴万征.白术的研究进展.广东药学[J],2002,12(5): 19~21.
- [3] Zhang YQ,Xu SB,Lin YC,et al. Antagonistic effects of 3 sesquiterpene lactones from *Atractylodes macrocephala* Koidz on rat uterine contraction in vitro [J]. *Acta Pharmacol Sin*,2000,21(1):

91~96.

- [4] 彭菲,周日宝,张喜利.白术侧芽离体诱导的实验研究.湖南中医学院学报[J],2001,21(4):26-28.
- [5] 李慧.白术的组织培养.特种经济动植物[J],2002,27(7):27.
- [6] 周日宝,王朝晖.湖南道地药材白术组织培养及再生植株的试验.湖南林业科技[J],2001,28(4):79-80.
- [7] 沈银柱,孟庆春,周金树,等.白术侧芽培养和快速繁殖[J].植物生理学通讯,1987,(3):39-41.
- [8] 陈惠娟.植物组织培养中褐变的产生机理及克服措施.植物保护[J],2005,31(2):56-57.
- [9] 李焕秀,乔霓娇.降低苍溪梨外植体组织褐变途径的研究[J].西南农业大学学报,2000,23(6):524-526.

致谢:本文在完成过程中,毕世荣研究员给予了极大的指导和支持,特此致谢!

(责任编辑:杜 宏)