

白首乌的离体再生与快速繁殖

杜文亮¹, 吴汉光², 王广东¹, 王庆亚^{1*} (1. 南京农业大学生命科学学院, 江苏南京 210095; 2. 南京外国语学校, 江苏南京 210007)

摘要 [目的] 加快白首乌种苗生产速度及实现其生产的现代化。[方法] 以带侧芽白首乌茎段为外植体, 采用 MS 为基本培养基, 附加不同植物生长调节剂进行试验。[结果] 结果表明, 适宜于白首乌的初代培养基为: 1/2 MS + 6-BA 0.50 mg/L + NAA 0.05 mg/L; 增殖培养基: MS + 6-BA 0.20 mg/L + NAA 0.10 mg/L; 生根培养基: 1/2 MS + IBA 0.20 mg/L。移栽成活率达 100%。[结论] 采用白首乌的茎段作为外植体, 利用组织培养的方法能实现种苗的快速工厂化。

关键词 白首乌; 组织培养; 快速繁殖

中图分类号 S567.7+9 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)33-14431-02

Study on *in vitro* Culture and Rapid Propagation of *Cynanchum auriculatum*

DU Wen-liang et al (College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095)

Abstract [Objective] The purpose aimed to speed up seedling production of *Cynanchum auriculatum* and its modernization. [Method] With tissue culture method, primary culture of explants, bud multiplication and their rooting culture were conducted by medium treated with different hormones. [Result] The results indicated that the appropriate medium for different culture stages were 1/2 MS + 6-BA 0.50 mg/L + NAA 0.05 mg/L in primary culture, MS + 6-BA 0.20 mg/L + NAA 0.10 mg/L for bud multiplication, 1/2 MS + IBA 0.20 mg/L in rooting. The survival rate of transplanting could reach 100%. [Conclusion] Applying stem as explants, high frequency propagation of seedlings can be achieved with plant tissue culture in *Cynanchum auriculatum*.

Key words *Cynanchum auriculatum*; Tissue culture; High frequency propagation

白首乌是中国传统中药, 其主要来源为萝藦科植物匙羹藤(科鹅绒藤属植物耳叶牛皮消(*Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight))的块根, 具有滋补肝肾、益精血、抗衰老和乌须发等功效^[1], 在江苏省滨海县已有百余年的栽培史和食用历史。白首乌含磷脂、肌醇磷脂、乙醇胺磷脂及多量的 C₂₁ 甾武等^[1]。目前, 白首乌的人工栽培主要靠块根的营养繁殖, 易受病毒浸染, 导致种性退化, 产量和品质下降, 不能适应规模化和标准化生产的需要。利用组织培养技术, 可为加速繁殖、提供栽培用无病毒优质种苗开辟一条新的途径, 为中药材的标准化生产提供依据。目前, 关于白首乌的组织培养报道很少^[2-3], 未见比较系统深入的研究。笔者以白首乌茎段为外植体, 建立了高效的离体再生体系, 可为白首乌的工厂化生产提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料 供试材料为白首乌(*Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight)。

1.2 方法

1.2.1 无菌材料的获得。 取白首乌的顶芽和茎段, 流水冲洗 4 h; 在超净工作台上经 70% 酒精浸泡 30 s, 无菌水冲洗 2 次, 0.1% HgCl₂ 灭菌处理 8~10 min, 无菌水冲洗 5 次; 分割成 0.5~1.0 cm 带 1 个节的茎段或顶芽, 接种于 MS + 6-BA 0.50 mg/L + NAA 0.05 mg/L 的培养基上。

1.2.2 茎段增殖技术的研究。 选取生长一致的白首乌初代培养无菌苗, 切取顶芽或带腋芽茎段, 接种在诱导增殖的培养基中培养。增殖培养基以 MS + 0.10 mg/L NAA 为基本培养基, 分别附加 6-BA 和 KT 及其不同浓度的激素组合。20 d 后统计增殖情况。

1.2.3 生根培养。 选取在 MS + 0.20 mg/L 6-BA + 0.10 mg/L NAA 培养基上生长基本一致的约 2 cm 高的无根苗, 以茎节紧靠培养基接入 1/2 MS 加入不同生长素及其浓度培养基

上, 20 d 后观察统计生根情况。

以上培养基 pH 值为 5.8, 均含 3% 蔗糖, 0.6% 琼脂, 培养基在 121 °C 下湿热灭菌 17 min。每种培养基接种 6 瓶, 每瓶接入 6 株。

1.3 培养条件 培养温度 (25 ± 2) °C, 光照强度 1 400 lx, 光照时间 16 h/d。

表 1 不同激素对比对增殖培养的影响

Table 1 Effects of various hormone combinations on the proliferation culture

激素 // mg/L Hormones		增殖率 // %	平均株高 // cm
6-BA	KT	Proliferation rate	Average plant height
0	0	5.60	4.63
0.20		6.57	4.45
0.50		6.61	3.42
1.00		4.78	2.31
2.00		4.21	1.80
4.00		—	0.78
	0.20	5.34	4.72
	0.50	5.34	4.52
	1.00	4.05	3.88
	2.00	4.99	4.07
	4.00	3.48	1.55

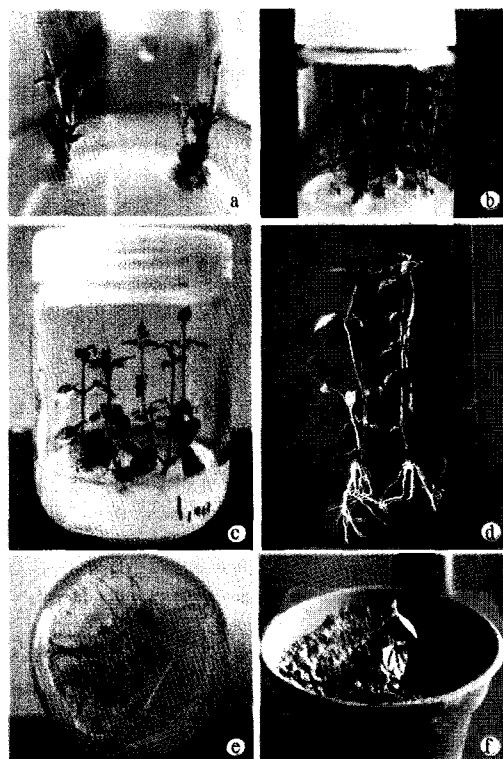
2 结果与分析

2.1 试管苗的诱导 将茎段接种在培养基上培养, 3 d 后茎有明显膨大, 7~8 d 后大部分腋芽开始萌动, 至 20 d 后观察腋芽无根苗高达 3.0~4.0 cm (图 1 a), 腋芽萌发率在 90% 左右。

2.2 白首乌的增殖培养 BA、KT 配合 0.10 mg/L NAA 对白首乌的增殖效果见表 1。由表 1 可知, 6-BA 0.20 mg/L 白首乌增殖效果最好, 培养 20 d 后, 每个节间各产生 2 个侧芽, 且芽苗生长迅速、健壮, 叶色浓绿, 培养 20 d 平均苗高可达 4.45 cm, 平均增殖率为 6.57 (图 1 b)。单加 NAA 的培养基上, 植株 20 d 后叶片发黄, 生长势弱。随着 6-BA、KT 浓度的增大, 增殖率和平均株高变小。当 6-BA 浓度超过 0.50 mg/L 时, 玻璃苗数量增多; 6-BA 为 2.00 mg/L 时, 苗生长畸形, 节间严重缩短; 6-BA 为 4.00 mg/L 时, 整个叶片变黄, 植株畸形, 矮化, 严重玻璃化。KT 浓度为 4.00 mg/L 时, 植株矮化, 有 25% 的玻璃苗。

作者简介 杜文亮 (1979-), 男, 江苏盐城人, 硕士, 助理实验师, 从事资源植物学的研究。* 通讯作者, E-mail: qy@njau.edu.cn。

收稿日期 2008-10-29



注:a.茎段芽萌发诱导;b.试管苗通过腋芽途径增殖;c.试管苗不定根诱导;d、e.试管苗根生长状况;f.试管苗移栽成活。

Note:a. Bud germination and induction of stem segment; b. The propagation of test-tube seedling by means of axillary bud; c. Adventitious root induction of test-tube seedlings; d and e. Root growth status of test-tube seedling; f. Survived test-tube seedling after transplanting.

图1 白首乌的离体再生与快繁

Fig.1 *In vitro* regeneration and rapid propagation of *Cynanchum auriculatum*

表2 不同激素及其浓度对生根的影响

Table 2 Effect of different kinds and concentrations of hormones on the rooting

激素//mg/L Hormones		生根率//% Rooting rate	平均根数//个 Average root number	根生长状态 Growth status of roots
IBA	NAA			
0	0	70.0	5.24	细长
0.05		75.6	6.84	细长
0.10		82.3	7.86	正常
0.20		88.5	8.53	正常
0.50		85.0	8.23	粗,轻度愈伤
1.00		61.1	4.32	过粗,大量愈伤
	0.05	41.5	3.37	粗、短
	0.10	28.1	2.89	过粗,畸形
	0.20	16.3	1.55	大量愈伤

2.3 生根 试验中发现,IBA 对白首乌根的诱导效果明显好于 NAA。其中以 IBA 浓度为 0.20 mg/L 时诱导的不定根生长最好,5~6 d 后可见不定根原基突起,20 d 后每株可形成 6~10 条不定根,生根率为 88.5% (图 1c、d 和 e)。当 IBA 浓度为 1.00 mg/L 时产生大量愈伤组织,根粗短,生长不正常。NAA 诱导的不定根短而粗,当浓度达到 0.20 mg/L 时,愈伤组织过大,根生长缓慢。

白首乌生根苗生长 20 d 后即可移栽。移栽前 2~3 d,打开瓶盖进行适应性锻炼。移栽时,取出小苗,自来水将苗基部琼脂洗净,移入温室的花盆内。栽培基质为腐殖土、珍珠岩按 3:1 混合。移栽后相对湿度保持在 90% 左右,逐步降低湿度至温室正常湿度,温度控制在 25℃ 左右。经过 20 d 左右的培养,即可长出新根成活,成活率达 100% (图 1f)。

3 讨论

离体培养中一般药用植物茎段增殖的方式是以丛生芽形式进行的,如山茱萸^[4]、白头翁^[5]等。但白首乌茎段是以腋芽-腋芽途径进行增殖,即植株的茎节处产生腋芽,再通过带腋芽茎段的切割、转接从而达到增殖的目的,这与香椿^[6]茎段的增殖方式相似。

一般认为,在试管苗生长与分化过程中,细胞分裂素有利于诱导芽,但在实际应用中不仅要考虑芽的增殖数量,更要注意分化芽苗的质量。该试验结果表明,加入细胞分裂素有利于白首乌茎段增殖,但高浓度的 6-BA、KT 会影响芽苗的生长,并且导致玻璃化苗的产生,因此,适宜白首乌茎段增殖的培养基为 MS + 6-BA 0.20 mg/L + NAA 0.10 mg/L。

参考文献

- [1] 刘成娣,龚树生.抗衰老中药白首乌研究的进展[J].北京中医学院学报,1990,13(1):45-47.
- [2] 李文丽,李欣.正交实验设计在白首乌生物工程研究中的应用[J].数理医药学杂志,2001,14(4):383-384.
- [3] 陈秀惠,符文英.白首乌离体快速繁殖的研究[J].海南大学学报:自然科学版,1995,13(2):134-137.
- [4] 薛建平,张爱民,王月辉,等.山茱萸组织培养技术的研究[J].中国中药杂志,2003(2):118-121.
- [5] 张子学,丁为群,唐勇,等.白头翁组织培养研究[J].中国中药杂志,2004,29(3):215-218.
- [6] 张小红,陈彦生,康冰,等.激素对香椿腋芽增殖生长的效应[J].西北植物学报,2001,21(4):756-760.
- [7] LUO Y H, LENG Q Y, MO R, et al. Asymbiotic germination and low temperature *in vitro* conservation of *Cymbidium dayanum* [J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(1): 67-69, 74.
- [8] 佟凤芹,栾岚.凤仙花茎段培养与快速繁殖[J].辽宁师专学报,2006, 8(3):107-108.
- [9] JIANG Q, DONG L, NING Z Y, et al. Establishment of somatic cell clones in *Thesium chinense* Turcz and its *in vitro* rooting technique [J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(5): 47-49.
- [10] and Technology Press, 1998.
- [11] LI D, MUNDEL H H. Safflower, *Carthamus tinctorius* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 7 [M]. Rome, Italy, IPGCPFR, Gatersleben/IPGRI, 1996.
- [12] YUE Q N, GE J, WANG L, et al. Genetic diversity in main cultivars of safflower in Xinjiang uighur autonomous region based on RAPD analysis [J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(4): 34-38.
- [13] 张晓波.野牛草种质资源遗传多样性的 RAPD 分析 [D]. 太古:山西农业大学, 2005.
- [14] XU H X, ZHANG X, WANG S M, et al. Genetic diversity of *Achnatherum splendens* [J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(1): 21-23, 28.

(上接第 14419 页)

- [24] 张英,柏干荣,黄明辉,等.植物基因组 DNA 提取方法学评析与验证 [J]. 药品评价, 2004(4): 292-297, 289.
- [25] 汪小全,邹喻苹,张大明,等. RAPD 应用于遗传多样性和系统学研究中的问题 [J]. 植物学报, 1996, 38(12): 954-962.
- [26] WEEDEN N F, TIMMERMAN G M, HEMMAT M, et al. Inheritance and reliability of RAPD markers [C]. Joint Plant Breeding Symposia Series, 1 November 1992, Minneapolis, Minnesota. Applications of RAPD Technology to Plant Breeding, 1992: 12-16.
- [27] 贺学勤,刘庆昌,翟红,等.用 RAPD, ISSR 和 AFLP 标记分析系谱关系明确的甘薯品种的亲缘关系 [J]. 作物学报, 2005, 31(10): 1300-1304.
- [28] GUO H J, LONG C L. Biodiversity in Yunnan [M]. Kunming: Yunnan Science