

温郁金愈伤组织培养及快速繁殖

王晓慧^{1,2}, 杨恩秀², 庞实锋², 汤晓闯², 姜成曦^{1,2}, 李校堃^{1,2}

(1. 温州医学院 药学院, 浙江 温州 325035; 2. 吉林农业大学 教育部生物反应器与药物开发工程研究中心, 吉林 长春 130118)

摘要: 为了提纯复壮温郁金资源, 快速繁殖良种苗木, 满足市场供不应求的现状, 对温郁金外植体培养及愈伤组织的诱导、继代、分化和再生进行研究。结果表明: 莖术外植体在以 MS 培养基为基本培养基, 附加 6-BA 3.0 mg/L+IAA 1.0 mg/L 适于丛生芽的诱导与增殖; 附加 2,4-D 2.0 mg/L+KT 5.0 mg/L 适于愈伤组织的诱导; 附加 2,4-D 1.0 mg/L+KT 0.5 mg/L 适于愈伤组织的继代培养; 附加 KT 5.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L 适于愈伤组织的分化, 生根的最佳培养基为 MS+IAA 1.0 mg/L。因此, 可以通过组织培养的方式提纯复壮温郁金资源, 进行温郁金的快速繁殖。

关键词: 温郁金; 丛生芽; 组织培养; 快速繁殖

中图分类号: Q 943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2008)10-0143-04

姜科植物温郁金(*Curcuma aromatica* Salisb)是浙江省著名道地药材, 为中国药典多版收载品种, 根茎干燥后为温莖术, 药用功能非常广泛, 其性味辛、苦、温。归肝、脾经, 具行气破血, 消积止痛功效。临床用于治疗癥瘕痞块、瘀血经闭、食积胀痛、早期宫颈癌等症。药理研究显示, 其具有抗炎、镇痛、抗肿瘤、抗早孕、抗菌、升高白细胞、保肝、抑制血小板聚集和抗血栓形成, 对心血管、胃肠平滑肌和急性肾功能衰竭等也发挥一系列药理作用。含有挥发油、姜黄素类、有机酸、树脂和淀粉等^[1-4]。并且作为一种抗肿瘤、抗病毒、抗炎的重要药材^[3], 临床用量和工业化生产用量十分巨大, 市场上已经出现了供不应求的状况, 仅靠传统的生产方式远远不能满足人们的需求^[4]。

随着我国传统道地药材 GAP 的广泛深入实施, 生产、加工、制药、销售对植物药材品质要求更加严格, 遗传纯合的高产、优质新品种是保证质量稳定的重要物质基础。但是温郁金主要以根茎繁殖, 易感染病毒, 导致种群退化, 病毒化严重, 影响产量和品质, 难以得到安全、有效、稳定、可控的温莖术药材^[5]。近年来温郁金生产用种, 大部分都是已经退化的根茎, 再加上温莖术的生育期长, 用种量大, 已经影响到种植户的积极性 and 总

产量。张慧英和吕平分别研究了广西莖术和印尼莖术的快速繁殖技术^[6,7], 但是温郁金组织快繁的研究尚未见报道。因此, 该试验研究利用组织培养技术提纯复壮温郁金资源, 快速繁殖良种苗木, 为今后我国传统道地药材 GAP 的深入实施奠定深厚的基础。

1 材料和方法

1.1 材料

温郁金根茎采自浙江省温州市瑞安陶山镇温郁金实验基地, 经成都中医药大学李敏老师鉴定。

1.2 方法

1.2.1 无菌外植体的获得 洗净温郁金根茎, 将根茎上大约 0.5 cm 的芽切下, 清水下冲洗 2 h, 然后无菌水冲洗 4 次, 于 75% 酒精中消毒 2 min, 无菌水冲洗 4 次, 每次 2 min, 升汞或次氯酸钠消毒, 再用无菌水冲洗 5 次, 每次 2 min, 无菌滤纸吸干水分后, 接种到培养基中。

1.2.2 丛生芽的诱导与增殖 将获得的温郁金小芽, 接种于附加不同激素配比的培养基中, 筛选出适于丛生芽诱导与增殖的培养基。

1.2.3 愈伤组织的诱导、继代与分化 选取较幼嫩的温郁金试管苗的不同部位接入不同激素配比的愈伤组织诱导培养基中进行愈伤组织的诱导。将诱导出的愈伤组织于愈伤组织继代培养基上每 2~3 周继代 1 次。选取继代了 2~3 次生长旺盛, 表面有细颗粒状结构, 颜色鲜黄的愈伤组织转入愈伤组织分化培养集中进行愈伤组织的分化培养。

1.2.4 芽的伸长与生根培养 将在愈伤组织分化培养基中生长健壮的再生芽及在芽增殖培养基中生长了约 1 个月的丛生芽进行生根的诱导。

1.2.5 培养条件 培养温度(23±2)℃, 光照 11 h/d 光

第一作者简介: 王晓慧(1981-), 女, 吉林长春人, 博士, 主要从事温郁金生物技术研究工作。E-mail: nongdaxh@yahoo.com.cn.

通讯作者: 李校堃。

基金项目: 浙江省重大科技攻关资助项目(No. 2005C13019); 温州市科技计划资助项目(S2005B001); 瑞安市重大科技资助项目(20052005)。

收稿日期: 2008-04-23

强 2 000 lx, 0.7%琼脂, pH 5.8, 蔗糖浓度为 3%。

1.2.6 试验数据的处理 试验中的各个数据均为 3 次重复的平均值, 用 Spss 软件进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 不同消毒剂对外植体消毒效果的影响

温郁金为根茎营养繁殖类药用植物, 很难将附着其上的微生物彻底消除, 为了找到有效的灭菌方法, 用不同种类消毒剂对外植体消毒效果进行了试验。

表 1 不同消毒方法的比较

消毒方式	消毒时间/min	接种数	污染率/%	褐化率/%
0.1%升汞	8	30	25c	
	10	30	10d	
	15	30	10d	10
	20	30	8d	20
10%次氯酸钠	10	30	100a	
	15	30	85b	
	20	30	70b	10
10%次氯酸钠+0.1%升汞	8	30	6d	
	10	30	0e	
	15	30	0e	15

由表 1 可知, 10%次氯酸钠+0.1%升汞消毒 10 min 的消毒效果较好, 污染率最小, 而且没有褐化, 随着消毒时间的延长, 褐化率也明显增加, 次氯酸钠的消毒效果明显不如升汞, 而次氯酸钠和升汞一起用的效果最好。

2.2 莖术组织培养不同基础培养基的比较

表 2 不同培养基对根芽生长的影响

培养基种类	接种数	平均芽长/cm	1 周后/cm	3 周后/cm	1 个月后/cm	污染率/%
MS	30	0.5	1.5a	4.0a	7.0a	16b
B ₅	30	0.5	1.0b	3.0b	5.0b	15b
N ₆	30	0.5	1.0b	3.0b	5.0b	30a

由表 2 可知, 莖术的外植体在 MS 的培养基中生长较快, 而且污染率不高。在 B₅ 和 N₆ 培养基中, 莖术的外植体生长较慢, 虽然在 B₅ 培养中, 莖术外植体的污染率略低, 但是生长速度明显减慢。

2.3 激素对丛生芽诱导与增殖的影响

细胞分裂素和生长素是芽诱导与增殖过程中最关键的因子, 试验研究了细胞分裂素和生长素不同种类和浓度对温郁金丛生芽诱导与增殖的影响。

表 3 不同激素种类和浓度对丛生芽诱导与增殖的影响

激素的种类及浓度/mg·L ⁻¹	接种数	产生芽时间/d	增殖倍数	芽生长状况
MS	30	18	0.7c	芽弱小
MS+6-BA 1.0	30	16	0.9c	芽弱小
MS+6-BA 1.5	30	15	1.0c	芽弱小
MS+6-BA 2.0	30	14	1.3bc	生长缓慢
MS+6-BA 3.0	30	9	3.0b	芽健壮 生长良好
MS+6-BA 3.0+IAA 0.5	30	10	2.8b	芽健壮 生长一般
MS+6-BA 3.0+IAA 1.0	30	9	3.2a	芽健壮 生长良好

由表 3 可知, MS+6-BA 3.0 mg/L+IAA 1.0 mg/L

产生丛生芽的时间最短, 增殖的倍数最高, 效果最好, 其次为 MS+6-BA 3.0 mg/L。6-BA 1.0 mg/L 和 6-BA 2.0 mg/L 产生芽的时间较长, 增殖的倍数也较低, 6-BA 3.0 mg/L+IAA 0.5 mg/L 对丛生芽的诱导与增殖效果略低于 MS+6-BA 3.0 mg/L+IAA 1.0 mg/L 和 MS+6-BA 3 mg/L, 但是都好于 MS 培养基不加激素的效果。

2.4 外植体部位对愈伤组织诱导和继代的影响

由于温郁金的生育期比较长, 愈伤组织较难诱导, 愈伤组织的生长时间也较一般植物要长, 试验使用温郁金的不同部位做外植体诱导愈伤组织, 结果发现只是从温郁金试管苗茎的基部 1 cm 左右的位置和根部能产生愈伤组织, 但是根产生愈伤组织的速度较慢, 不易存活, 继代后变白, 几乎停止生长, 叶片及温郁金的其他部位均不能诱导出愈伤组织。

表 4 外植体部位对愈伤组织诱导和继代的影响

诱导部位	接种数	产生愈伤组织时间/d	诱导率/%	愈伤组织生长状况
叶	30	—	—	
茎基部 1 cm 茎尖生长点	30	32	95	良好
根尖	30	35	50	继代后变白 停止生长
茎上部生长点	30	—	—	
根茎组织块	30	—	—	

2.5 影响莖术外植体愈伤组织诱导和继代的因素

表 5 不同激素种类和浓度对愈伤组织诱导的影响

激素种类及浓度/mg·L ⁻¹	接种数	产生愈伤组织时间/d	诱导率/%
2,4-D 1.0+KT 4.0	30	30	55c
2,4-D 1.0+KT 5.0	30	25	78a
2,4-D 1.0+KT 6.0	30	26	69b
2,4-D 1.0+6-BA 1.0	30	—	—
2,4-D 1.0+6-BA 1.5	30	35	52c
2,4-D 1.0+6-BA 2.0	30	33	60bc

由表 5 可知, 不同激素种类和浓度诱导温郁金产生愈伤组织的时间和诱导率都不同。2,4-D 2.0 mg/L+KT 5.0 mg/L 有利于愈伤组织的诱导, 诱导出愈伤组织的时间较短, 为 25 d 诱导率较高。其他的激素种类和浓度配比诱导出愈伤组织的时间较长, 诱导率较低, 这和沈国林等^[8]的研究结果相似。由于愈伤组织在高浓度的 2,4-D+KT 的培养基中诱导产生的愈伤组织在继代培养基中生长旺盛, 而且易于分化, 所以在继代培养中应该降低 KT 的浓度, 经试验发现 2,4-D 1.0 mg/L+KT 0.5 mg/L 有利于愈伤组织的继代培养。

2.6 KT 和 NAA 对愈伤组织分化的影响

由于 KT 能诱导愈伤组织的形成并能促进愈伤组织的分化, 所以从愈伤组织诱导的结果选择 MS+KT 5.0 mol/L 作为基本培养基, 筛选最佳的 NAA 培养基。

激素为 KT 5.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L 时(见表 6), 温郁金愈伤组织的分化率较高, 而且产生再生芽的数

目较多, 再生芽的状态也较好, 当 NAA 的浓度小于 0.3 mg/L 时, 莖术的诱导率及长势都很弱 NAA 的浓度大于0.3 mg/L 时, 诱导率及长势也有所下降。然后将温莖术转到 MS+IAA 1.0 m g/L 中进行莖术的生根培养。莖术试管苗在生根培养基中生长 1 个月便可以

表 6 不同浓度 NAA 对愈伤组织分化的影响

	NAA	诱导率/ %	再生芽数目	再生芽生长状态
KT 5.0 mg/ L	0.1	52c	3	芽生长较弱
	0.2	63b	4	不易成苗
	0.3	75a	5	芽生长良好
	0.4	68b	4	芽生长较弱

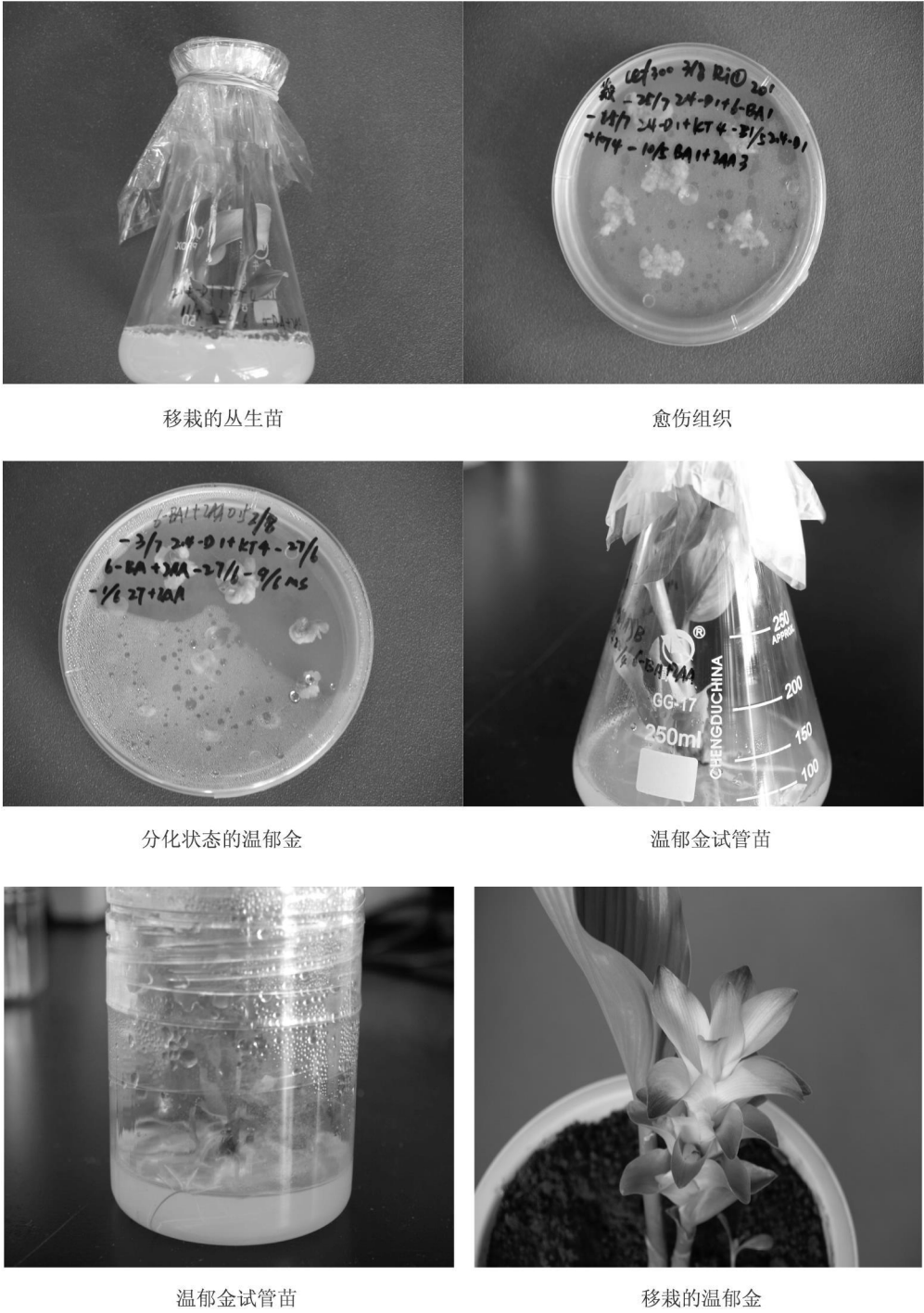


图 1 温郁金组织培养各阶段

3 结论及讨论

药用植物愈伤组织诱导受很多因素的影响,其作用程度和大小因植物种类不同而有差异。一般情况下,外植体、培养基、植物生长物质种类及其配比等是影响药用植物愈伤组织的主要因素^[9-10]。该试验表明植物生长物质的种类和配比是影响植物愈伤组织的主要因素,以温郁金的根茎为外植体,接种在以MS为基本培养基,附加6-BA 3.0 mg/L适于丛生芽的诱导与增殖;MS+2,4-D 2.0 mg/L+KT 5.0 mg/L适于愈伤组织的诱导;附加2,4-D 1.0 mg/L+KT 0.5 mg/L适于愈伤组织的继代培养;MS+KT 5.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L适于愈伤组织的分化。

不同培养基和消毒的方法及时间对温郁金外植体的生长也有一定的影响。不同的培养基中莖术的外植体均能生长。MS培养基中,温郁金外植体的生长速度较快,效果较好,与石乐娟等^[11]的研究结果一致。

温郁金为根茎营养繁殖类药材,在土壤中其根茎的微生物附着较多,所以消毒较困难,该试验在充分查阅相关文献^[12-13]的基础上,设计了不同的消毒剂种类和消毒方法,结果发现75%酒精+10%次氯酸钠+0.1%升汞消毒10 min的效果最好,这与前人的研究结果一致^[14]。

由于温郁金的药用价值高,具有治疗现代医学中的各种疑难杂症,如癌症、糖尿病等,所以今后应对温郁金愈伤组织诱导及继代培养、愈伤组织防褐化等进行深入的研究,并对愈伤组织的化学成分进行分析,以期提供一条利用组织培养方法高效获得温郁金资源的途径。

参考文献

- [1] Cao H, Yohei S, Hirotohi F, et al. Molecular analysis of medicinally-used Chinese and Japanese *Curcuma* based on 18S rRNA gene and tmK gene sequences[J]. Biol. Pharm. Bull. 2004, 24(12): 1389-1394.
- [2] Huang M T, Ma W, Patricia Y, et al. Inhibitory effects of topical ap-

- plication of low doses of curcumin on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor promotion and oxidized DNA based in mouse epidermis[J]. Carcinogenesis. 1997, 18(1): 83-88.
- [3] Xiao X H, Zhong G Y, Shu G M, et al. Numerical taxonomy of medicinal plants of *Curcuma* in China[J]. China Journal of Chinese Materia Medica. 2004, 29(1): 15-24.
- [4] Megumi N, Ayako S, Shigeaki O, et al. Turmeric and curcumin modulate the conjugation of 1-Naphthol in Caco-2 cells[J]. Biol. Pharm. Bull., 2006, 29(7): 1476-1479.
- [5] He H, Liu T N. Tissue culture and plantlet regeneration of *Amomum villosum* [J]. Plant physiology communications, 2005, 41(1): 57.
- [6] Zhang H Y, Tang X H, Wang J. Tissue culture of *Curcuma Kwang-siensis* [J]. Agriculture and Technology, 2006, 26(5): 62-65.
- [7] Lv P, Wei L J, Pang X H, et al. Primary study on rapid propagation of *Curcuma xanthorrhiza* [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials. 2007, 30(4): 383-385.
- [8] Shen G L, Shao A J, Huang L Q, et al. Studies on callus culture of *Akebia trifoliata* [J]. China Journal of Chinese Materia Medica 2007, 32(10): 899-901.
- [9] Gu X R, Pan J J. Formation of in vitro culture system for *Cinnamomum Japonicum Sieb* [J]. Journal of southwest agricultural university, 2005, 27(6): 825-828.
- [10] Li C B, Fang H J, Wang G L. Studies on plantlet regeneration and propagation of *Curcuma zedoaria* [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs 2000, 31(11): 853-856.
- [11] Shi L J, Zhang F, Zhang S L, et al. Effects of plant growth regulations on the Rhizomes multiplication and differentiation in *Cymbidium goeringii* with verge Line pattern leaves [J]. Acta Horticulturae Sinica 2006, 33(4): 887-890.
- [12] Peng S B, Wang D X. Tissue culture and rapid propagation of *Atriplex canescens* [J]. Journal of zhejiang forestry college 2007, 24(3): 377-381.
- [13] Chen X H, Gao J. Research on the callus culture induction and the secondary culture from cotyledon of *Cuminum cyminum* L. [J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2007, 44(3): 344-348.
- [14] Yang S G, Lv H. Studies on Tissue Culture of *Erigeron breviscapus* [J]. Seed 2006, 25(5): 24-26.

Callus Tissue Culture and Rapid Propagation of *Curcuma aromatica* Salisb

WANG Xiao-hui^{1,2}, YANG En-xiu², PANG Shi-feng², TANG Xiao-chuang², JIANG Cheng-xi^{1,2}, LI Xiao-kun^{1,2}

(1. Pharmacy School, Wenzhou Medical College, Wenzhou Zhejiang 325035, China; 2. Ministry of Education, Engineer Research Center of Bioreactor and Pharmaceutical Development, Jilin Agriculture University, Changchun, Jilin 130118, China)

Abstract: To purify and rejuvenate *Curcuma aromatica* Salisb resource, reproduce *Curcuma aromatica* Salisb rapidly, and satisfy the demand of market, we studied the induction, secondary culture and differentiation of callus tissue and explant culture of *Curcuma aromatica* Salisb. With the different part of *Curcuma aromatica* Salisb, different hormone, and analyse with Spss software. Results showed: MS medium with 3.0 mg/L 6-BA and 1.0 mg/L IAA was suitable for the induction and proliferation of multiple shoots. MS medium with 2.0 mg/L 2,4-D and 5.0 mg/L KT was suitable for the induction of calli. MS medium with 1.0 mg/L 2,4-D and 0.5 mg/L KT was suitable for the induction of calli. MS medium with 5.0 mg/L KT and 0.3 mg/L NAA was suitable for the differentiation of calli. The best suitable medium for take root was MS + IAA 1.0 mg/L. Thus, we can purify and rejuvenate *Curcuma aromatica* Salisb resource with the tissue culture, reproduce *Curcuma aromatica* Salisb rapidly.

Key words: *Curcuma aromatica* Salisb; Multiple shoots; Tissue culture; Rapid propagation