

广东道地中药何首乌的组织培养

姚 焱, 汪 珍 春, 王 小 兰, 张 平, 田 长 恩

(广州大学 植物抗逆基因功能研究广州市重点实验室, 广州大学 生命科学院, 广州 510006)

摘 要: 以广东德庆何首乌为试材, 研究叶片的愈伤组织诱导分化及茎尖的增殖快繁技术。结果表明: 以 MS 为基本培养基, 2,4-D 是诱导愈伤组织的必需激素, 1~2 mg/L 有利于叶片愈伤组织诱导; 分化培养基 BA 1~2 mg/L+NAA 0.5~1 mg/L 浓度组合分化能力低, 未分化成芽; 培养基 BA 2 mg/L+NAA 0.5 mg/L 对茎尖不定芽的诱导效果较好; 生根培养基 1/2 MS, 生根率 100%。

关键词: 何首乌; 道地药材; 组织培养; 快繁

中图分类号: S 567.23⁺9.035(265) 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2010)07-0175-03

何首乌 (*Polygonum multiflorum* Thunb.) 为蓼科 (Polygonaceae) 多年生落叶草本植物, 其体内含有蒽醌类、二苯乙烯苷类、卵磷脂等多种有效成分^[1], 是我国重要的滋补肝肾中药, 也是广东省重点发展的药材之一^[2]。目前, 为了便于何首乌工业化提取及生产快繁, 已进行了许多组织培养方面的研究^[3-5]。但是我国何首乌资源分布广泛, 遗传背景复杂, 以往的研究结果由于材料间的遗传背景差异而缺乏普遍适用性; 另外, 前人对材料选择比较随机, 许多是野生采集, 离体培养前普遍缺乏对何首乌材料品质方面的筛选和鉴定, 因此降低了研究材料和结果的进一步利用价值。

我国中医界历来视广东德庆何首乌为道地药材。

第一作者简介: 姚焱 (1972), 女, 河南开封人, 博士, 副教授, 现从事植物遗传育种和生物技术研究工作。E-mail: yaoyanm@163.com。

通讯作者: 田长恩 (1964), 男, 湖北宣恩人, 博士, 教授, 现从事分子遗传学研究。

基金项目: 广州大学科研创新团队资助项目。

收稿日期: 2010-01-08

经过不同研究者对各产地何首乌的成分质量的鉴定分析, 广东德庆产何首乌中的二苯乙烯苷类、蒽醌类成分均居首位^[6,8], 证明它是优质的何首乌中药资源, 也是进行何首乌遗传育种的重要材料。目前, 还没有针对广东德庆何首乌进行组织培养研究的报道。因此, 现选用经过品质鉴定的德庆何首乌优质种源^[8], 进行组织培养快繁方面研究, 为今后有目的的生产及何首乌遗传育种奠定技术基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

何首乌 (*Polygonum multiflorum* Thunb.), 引自广东德庆县何首乌生产基地。

1.2 叶片愈伤组织诱导

采集植株上幼嫩叶片, 经蒸馏水冲洗干净后, 70% 酒精消毒 30 s, 0.1% 升汞溶液消毒 10 min, 无菌水漂洗 3~4 次, 最后将叶片接种在培养基上。以 MS 为基本培养基, 设置 2,4-D (0.0、0.5、1、2 mg/L) 与 BA (0.0、0.5、1、2 mg/L) 的浓度组合, 共 16 处理, 每处理 3 次重复, 每重复接种 8 块叶片。黑暗培养, 温度 (25±1) °C。

The Study of Optimization Conditions about Fermentation Medium Shallow of *Morchella*

WANG Guang-yao¹, DONG Li-hua², ZHANG Hong³

(1. Jilin Agricultural Science and Technology College, Jilin, Jilin 132101; 2. Manjiang Agriculture Center Fusong, Jilin 134500; 3. Xinguan Agricultural Technology Extension Station, Fuyu, Jilin 131200)

Abstract: The optimization conditions about fermentation medium shallow of *Morchella* was studied by the single factor and the orthogonal tests. The best medium was determined according to *Morchella* mycelium biomass. The results showed that the best formula of liquid fermentation medium as following: 3.0% maltose, 4.0% yeast extract, 0.1% MgSO₄, 0.15% KH₂PO₄.

Key words: *morchella*; mycelial biomass; liquid fermentation

1.3 愈伤组织分化

叶片在愈伤组织诱导培养基培养 1 月后, 将愈伤组织块转移至分化培养基 BA 1 mg/L+NAA 0.1 mg/L, BA 2 mg/L+NAA 0.5 mg/L, BA 2 mg/L+NAA 1 mg/L 上。培养温度(25±1)℃, 光照 12 h/d, 光照度 1 500~2 000 lx。

1.4 茎尖不定芽诱导培养

采集茎尖和有节茎段 1.5 cm 左右, 经蒸馏水冲洗干净后, 70%酒精消毒 30 s, 0.1%升汞溶液消毒 10 min, 无菌水漂洗 3~4 次接种在培养基上。以 MS 为基本培养基, 设置 BA 1 mg/L、BA 1 mg/L+NAA 0.1 mg/L、BA 1 mg/L+NAA 0.5 mg/L、BA 2 mg/L、BA 2 mg/L+NAA 0.1 mg/L、BA 2 mg/L+NAA 0.5 mg/L、BA 3 mg/L+NAA 0.5 mg/L 7 种浓度处理, 每处理 3 次重复, 每重复接种 3 个外植体, 诱导不定芽。培养温度(25±1)℃, 光照 12 h/d, 光照度 1 500~2 000 lx。

1.5 生根

丛芽生长至 2~3 cm 左右后, 转移至生根培养基 1/2 MS、1/2 MS+NAA 0.1 mg/L 上生根壮苗。

2 结果与分析

2.1 德庆何首乌叶片愈伤组织诱导

何首乌叶片接种至培养基 10 d 左右, 叶缘处出现白色愈伤, 叶片中部零星有颗粒状愈伤(见图 1)。培养 1 月左右, 叶片转变为疏松愈伤组织块, 某些激素组合呈现一定程度褐变现象。

表 1 表明, 2,4-D 是德庆何首乌叶片诱导愈伤的必需激素, 无 2,4-D 的处理叶片不产生愈伤组织。随着 2,4-D 浓度的提高, 出愈率提高, 白色愈伤生长旺盛, 但随着培养时间延长, 浓度较高处理的愈伤褐变情况加重; BA 的添加对德庆何首乌叶片愈伤诱导的作用不明显, 在与 2,4-D 组合中, 随 BA 浓度的提高, 出愈情况有降低的趋势。根据愈伤组织的诱导及生长状况, 选择 2,4-D 浓度 1~2 mg/L 为较好的叶片愈伤组织诱导激素浓度。为减轻培养时间对褐变的影响, 愈伤诱导 1 个月后转入分化培养基中。

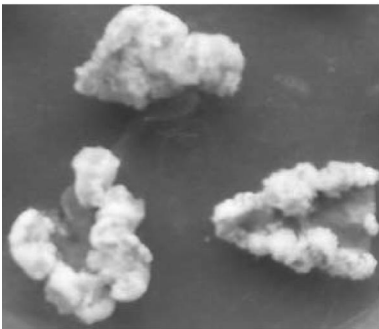


图 1 白色愈伤组织诱导

表 1 德庆何首乌叶片愈伤组织诱导

处理	2,4-D/ mg · L ⁻¹	BA/ mg · L ⁻¹	愈伤率/ %	褐变率/ %
1	0	0	0	0
2	0	0.5	0	0
3	0	1.0	0	0
4	0	2.0	0	0
5	0.5	0	67	0
6	0.5	0.5	83	0
7	0.5	1.0	67	0
8	0.5	2.0	67	0
9	1.0	0	89	20
10	1.0	0.5	83	0
11	1.0	1.0	50	0
12	1.0	2.0	50	0
13	2.0	0	100	20
14	2.0	0.5	50	10
15	2.0	1.0	50	0
16	2.0	2.0	25	0

2.2 德庆何首乌愈伤组织分化

叶片愈伤组织块转入分化培养基一周左右, 白色疏松的愈伤组织逐渐转变为绿色、结构致密有突起的组织块, 愈伤褐变的部分逐渐被新生绿色愈伤包围(见图 2)。但在选择的 3 种分化培养基上, 绿色组织块未分化出芽, 少量分化出现根毛。

2.3 德庆何首乌茎尖不定芽诱导

何首乌茎尖接入不定芽诱导培养基后, 1 周左右出单芽, 后陆续诱导出不定芽(见图 3)。培养 6 周后统计, 见表 2。

表 2 德庆何首乌茎尖不定芽诱导

处理	BA / mg · L ⁻¹	NAA / mg · L ⁻¹	接种数 / 个	出芽数 / 个	增值率 / %	芽平均高度/ cm
1	1.0	0	9	9	100	2.5
2	1.0	0.1	9	13	144	2.0
3	1.0	0.5	9	10	111	2.0
4	2.0	0	9	10	111	3.0
5	2.0	0.1	9	21	233	3.0
6	2.0	0.5	9	19	211	3.0
7	3.0	0.5	9	13	144	2.5

在 7 组浓度处理中, BA 2 mg/L+NAA 0.1~0.5 mg/L 组合对不定芽的诱导效果较好。在培养 1~1.5 月, 不定芽可以转入生根培养基诱导生根。

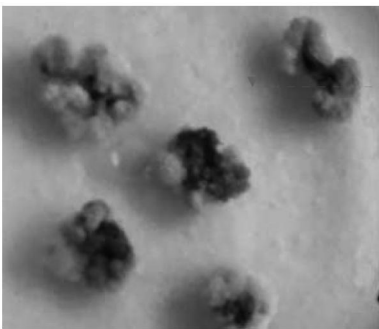


图 2 绿色愈伤组织分化



图3 不定芽丛



图4 再生植株

2.4 德庆何首乌不定芽生根

不定芽在 1/2 MS 生根培养基的生根情况均良好, 生根率 100%。移植获得再生植株(见图 4)。

3 讨论

比较前人研究, 不同来源的何首乌材料, 其组织培养结果有差异^[34]。这可能受到基因型的影响。依据资源分类研究, 各地采集的何首乌野生材料与栽培种相比, 野生种的遗传多样性要明显高于栽培种^[9], 这证明了不同来源的何首乌遗传背景确实存在差异; 在栽培种中, 广东德庆种源和广西靖西种源亲缘关系接近, 而且其二苯乙炔苷及蒽醌类的含量处于高水平, 不仅预示着德庆何首乌可以作为优良的生产种源, 也可以成为杂交、多倍体育种及种质创建的优良亲本加以利用。因此, 加强广东德庆何首乌优质种源的利用及育种方面研究是今后研究的方向。

参考文献

[1] 朱铁英. 何首乌化学成分研究进展[J]. 时珍国医国药, 2006(2): 274-275.

- [2] 广东重点发展 20 多种道地药材. www.99sj.com/News/81318.htm.
 - [3] 杜勤, 符红, 詹若挺, 等. 何首乌组织培养的研究[J]. 中药材, 1998, 21(3): 109-110.
 - [4] 邱奉同. 何首乌愈伤组织诱导和植株再生[J]. 植物生理通讯, 2000, 36(4): 335-336.
 - [5] 陈菊, 陈国惠. 6-BA 与 NAA 浓度对比对何首乌不定芽增殖的影响[J]. 中国农学通报, 2006, 22(11): 173-175.
 - [6] 傅军, 严寒静, 梁从庆, 等. 不同采集地何首乌的质量评价[J]. 广东药学院学报, 2006, 22(3): 253-254.
 - [7] 严寒静, 傅军, 梁从庆, 等. 不同采集地何首乌中蒽醌类成分的含量测定[J]. 中成药, 2007, 29(7): 1023-1026.
 - [8] 焦旭雯, 张相年, 赵翔, 等. 不同倍性何首乌中二苯乙炔苷和蒽醌类的含量比较[J]. 中药材, 2007, 30(12): 1487-1489.
 - [9] 严寒静, 房志坚, 余世孝. 不同种源何首乌的 ITS 序列分析及其亲缘关系研究[J]. 西北植物学报, 2008, 28(5): 922-927.
- (致谢: 感谢广州军区总医院赵树进主任提供何首乌种源及华南理工大学硕士研究生胡裕清给予的大量帮助。)

Tissue Culture of *Polygonum multiflorum* Thunb. Originated from Guangdong Deqing

YAO Yan, WANG Zhen-chun, WANG Xiao-lan, ZHANG Ping, TIAN Chang-en

(Guangzhou Key Laboratory for Functional Study on Plant Stress-Resistant Genes College of Life Sciences, Guangzhou University, Guangzhou, Guangdong 510006)

Abstract: This study was to set up the methods for tissue culture and stem rapid propagation *in vitro* of *Polygonum multiflorum* Thunb. The results showed that 2, 4-D was the necessary hormone in MS medium in order to induce callus from leaf, and the suitable concentration of 2, 4-D was 1.0 ~ 2.0 mg/L. The MS medium containing 1 ~ 2 mg/L BA and 0.5 ~ 1 mg/L NAA can not effectively give rise to callus from leaf, but the MS medium containing 2 mg/L BA and 0.5 mg/L NAA can significantly promote the stem rapid propagation *in vitro*. The root inducing medium was 1/2 MS, and the rooting rate was 100%.

Key words: *Polygonum multiflorum* Thunb.; genuine medicine material; tissue culture; rapid propagation