

# 西伯利亚远志组织培养与植株再生研究

任建伟, 魏常燕, 王进茂

(河北农业大学 林学院, 河北 保定 071000)

**摘 要:**以西伯利亚远志带腋芽的茎段为外植体, 探讨不同激素处理 6-BA、IBA、NAA 组合对西伯利亚远志试管苗增殖及生根的影响, 建立一套西伯利亚远志离体培养技术体系。结果表明: 适合西伯利亚远志增殖培养基为 MS+6-BA 0.5 mg/L+IBA 0.1 mg/L, 生根培养基为 1/2MS+IBA 1.0 mg/L, 在此体系中增殖系数达 3.15, 生根率 100%, 移栽成活率可达 100%。

**关键词:** 西伯利亚远志; 组织培养; 快速繁殖

**中图分类号:** S 567.23<sup>+</sup>9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2011)12-0106-04

远志科远志属植物在我国有 42 种 8 变种, 分布于东北、华北、西北、华中等地, 资源较丰富<sup>[1]</sup>。《中国药典》收载远志的 2 种基源植物分别为远志 (*Polygala tenuifolia* Willd.) (别名: 细叶远志) 和西伯利亚远志 (*Polygala sibirica* L.) (别名: 卵叶远志), 常以干燥根入药, 民间以全草或根入药<sup>[2]</sup>。远志具有抗衰老、抗诱变、抗抑郁、降血压血脂、抑制酒精吸收、抗癌、戒烟等功效<sup>[3]</sup>。西伯利亚远志为多年生草本植物, 根木质, 茎丛生, 直立, 单叶互生。多生于山坡、草地及灌丛、林缘<sup>[4]</sup>, 多处于野生状态。由于野生资源生长缓慢, 产量极低; 长期掠夺性采掘, 导致野生资源破坏严重; 而栽培品种供应有限, 商品品质明显下降, 直接影响临床疗效。因此, 市场上日益表现出优质药源匮乏, 供不应求的形势<sup>[5]</sup>。随着细胞生物技术在药用植物中的广泛应用, 可利用药用植物组织培养进行大规模的药用植物的快速繁殖, 这无疑是一条解决中草药短缺的有效途径<sup>[6]</sup>。为解决种苗品质复壮问题, 促进药材生产, 并保护野生种质资源, 试验以西伯利亚远志带腋芽的茎段为外植体, 探讨不同植物激素对试管苗增殖的影响, 以期建立一套西伯利亚远志离体培养技术体系, 从而达到对西伯利亚远志进行快速繁殖、种质资源保存和改良利用及规模化生产的目的, 为大批量生产优质西伯利亚远志种苗提供一定的参考价值, 并为进一步的研究提供经验。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

**第一作者简介:** 任建伟(1984), 女, 河北张家口人, 在读硕士, 研究方向为经济林与园林植物育种。E-mail: renjianwei2011@163.com。

**责任作者:** 王进茂(1969), 男, 河北深州人, 教授, 现主要从事林木组织培养与生物技术等方面的教学与研究工作。E-mail: kwjxm@hebau.edu.cn。

**收稿日期:** 2011-03-30

试验所用材料由石家庄市锦杨药业科技有限公司提供, 经河北农业大学生命科学学院植物学教研室冯天杰教授鉴定为西伯利亚远志 (*Polygala sibirica* L.)。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 材料处理** 选取生长健壮的西伯利亚远志带腋芽的茎段, 流水冲洗表面尘埃后, 切成 3~4 cm 的小段, 继续冲洗 10 min, 于超净工作台上用 75% 的乙醇表面消毒 30 s, 再用无菌水冲洗 3~5 次, 20% 的 84 消毒液进行不同时间的消毒处理(表 1), 用无菌水冲洗 4~5 次后, 接种于启动培养基上, 3 d 后观察材料生长状况及消毒处理情况。

**1.2.2 启动培养** 将经过消毒处理的材料接种于启动培养基 MS+6-BA 1.5 mg/L+KT 0.1 mg/L+IBA 0.1 mg/L, 每瓶接入 1 个外植体, 30 d 后观察材料生长状况。

**1.2.3 增殖培养** 以 MS 为基本培养基, 添加不同浓度的 6-BA 和 IBA、NAA 组成 16 种培养基(表 2)。将经过启动培养的茎尖接种到上述培养基中, 每个处理接种 5 瓶, 每瓶接入 4 个茎尖, 30 d 后统计增殖芽个数、增殖系数, 观察材料生长状况。

**1.2.4 生根培养** 切取高 1.5~2 cm 的西伯利亚远志试管苗茎尖作为试材, 以 1/2MS 为基本培养基, 添加不同浓度的生长素(表 3), 确定其对西伯利亚远志试管苗生根的影响。每个处理接种 5 瓶, 每瓶接入 4 个茎尖进行生根培养, 30 d 后统计生根情况, 观察材料生长状况。

**1.2.5 组培培养条件** 试验中, 琼脂含量均为 0.64%, pH 5.8~6.0。培养室温度 23~27℃, 光照度 1 400~1 600 lx, 光照周期 15 h/9 h。增殖培养基中蔗糖含量为 3.0%, 生根培养基为 2.0%。

## 2 结果与分析

### 2.1 材料处理

无菌外植体是组织培养体系建立的基础。试验采用不同药剂、不同处理时间对外植体进行消毒, 结果见

表 1。通过观察发现, 污染率、褐化率随消毒时间的变化而变化, 随着处理时间的延长, 污染率和褐化率分别有不同程度的降低和升高。当用 84 消毒液处理 20 min 时, 成活率最高, 污染率最低为 12. 5%, 但是褐化率偏高为 25. 0%。继续延长消毒时间, 则出现材料大部分褐化致死的现象。因此, 试验以 75%乙醇浸泡 30 s, 20%的 84 消毒液处理 20 min 作为消毒处理的最适处理。

表 1 不同消毒处理时间 对西伯利亚远志外植体的影响					
无性系	75%乙醇	20%84 消毒液	接种个数	污染率	褐化率
	/s	/min	/个	/%	/%
西伯利亚远志	30	10	8	50. 0	12. 5
	30	15	8	37. 5	12. 5
	30	20	8	12. 5	25. 0

2.2 启动培养

外植体在 MS+6-BA 1. 5 mg/L+KT 0. 1 mg/L+IBA 0. 1 mg/L 培养基培养 30 d 后观察发现, 分化良好, 平均增殖系数可达 4. 00~5. 00 倍, 但 76%的试管苗均出现不同程度的玻璃化现象, 且个别植株玻璃化

严重。后将玻璃化茎尖接于 MS+6-BA 0. 3 mg/L+IBA 0. 1 mg/L 培养基上培养, 20 d 后观察, 发现约有 92%的玻璃化苗得到改善。

2.3 增殖培养

将上述试管苗中生长状况基本一致的茎尖接种于表 2 所示培养基中, 7 d 后开始有芽点分化, 15 d 后伴有愈伤组织形成, 30 d 时观察增殖情况并将相关数据进行统计(表 2)。在培养过程中观察发现, 在外植体基部有愈伤组织形成, 少数有根生成。且随着 6-BA 浓度增加, 愈伤组织生成量逐渐增加, 生根数量逐渐减少。比较添加 IBA 与添加 NAA 的培养基后发现, 不同培养基中芽的增殖系数无明显差异, 但在添加 NAA 培养基中的芽要明显长一些。无论是在添加 IBA 还是 NAA 的培养基中, 随着 6-BA 浓度增加, 增殖系数均逐渐增高, 但试管苗的高生长逐渐受到抑制, 且出现玻璃化及茎尖干死现象。从表 2 可看出, 外植体增殖系数和芽长在不同的培养基间存在明显差异。综合考虑, 以 MS+6-BA 0. 5 mg/L+IBA 0. 1 mg/L 为宜, 增殖系数达 3. 15, 苗高 3. 48 cm, 且分化出的芽翠绿粗壮。

表 2 MS 培养基中添加不同浓度的激素组合对西伯利亚远志丛生芽增殖的影响									
培养基编号	基本培养基	激素浓度/mg·L <sup>-1</sup>			接种芽数/个	增殖不定芽总数/个	平均增殖系数/倍	株高/cm	增殖芽生长状况
		6-BA	IBA	NAA					
1	MS	0. 1	—	0. 1	20	54	2. 70	5. 65	生长健壮 有落叶现象
2	MS	0. 1	—	0. 2	20	45	2. 25	4. 50	生长健壮
3	MS	0. 1	0. 1	—	20	33	1. 65	3. 38	生长健壮
4	MS	0. 1	0. 2	—	20	31	1. 55	3. 55	生长健壮
5	MS	0. 3	—	0. 1	20	50	2. 50	4. 31	生长健壮 但个别芽有玻璃化现象
6	MS	0. 3	—	0. 2	20	59	2. 95	4. 30	翠绿、粗壮
7	MS	0. 3	0. 1	—	20	41	2. 05	3. 08	翠绿粗壮, 但有干死现象
8	MS	0. 3	0. 2	—	20	38	1. 90	2. 85	翠绿粗壮 但个别芽有玻璃化现象
9	MS	0. 5	—	0. 1	20	55	2. 75	3. 70	翠绿、粗壮
10	MS	0. 5	—	0. 2	20	54	2. 70	3. 20	有轻微玻璃化现象
11	MS	0. 5	0. 1	—	20	63	3. 15	3. 48	分化出的芽翠绿粗壮
12	MS	0. 5	0. 2	—	20	53	2. 65	2. 45	分化出的芽翠绿粗壮, 但个别芽尖端出现干死现象
13	MS	1. 0	—	0. 1	20	48	2. 40	2. 90	有玻璃化现象
14	MS	1. 0	—	0. 2	20	56	2. 80	3. 30	玻璃化及茎尖干死现象严重
15	MS	1. 0	0. 1	—	20	53	2. 65	2. 83	长势较弱
16	MS	1. 0	0. 2	—	20	63	3. 15	2. 98	分化出的芽细弱

注: 增殖系数为腋芽萌生数和基部丛生芽数之和与接种外植体数之比。

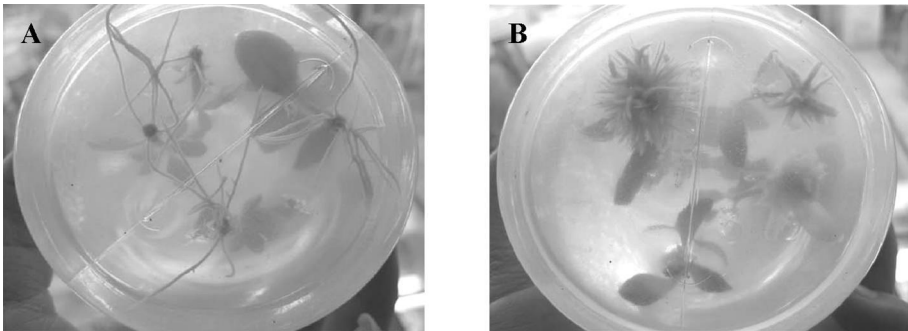


图 1 西伯利亚远志在添加不同生长素的培养基中的生根情况  
注: (A)添加 IBA 的培养基中的生根情况; (B)添加 NAA 的培养基中的生根情况

2.4 生根培养

将西伯利亚远志无根试管苗转入生根培养基中,第5天首先在激素浓度较大的培养基中出现生根现象,同时伴有愈伤组织形成,随后陆续在浓度较小的培养基中出现。30 d时观察生根情况并将相关数据进行统计(表3)。结果表明,西伯利亚远志在上述生根培养基中,生根率、根生长状况均有较大差异。在添加IBA的培养基中,生根率均在90%以上,最高可达100%,而添加NAA的最高仅为65%。同时将生长在上述培养基中的根比较后发现,添加IBA的培养基中根较长,最长可达1.74 cm;而添加NAA中的根较粗壮(图1)。添加IBA的培养基中各浓度之间生根率差异不大,根生长状况也较相近;但添加NAA的培养基中各浓度之间差异很大,生根率出现在25%~65%之间,根长在

0.33~0.82 cm 之间,根生长状况也明显不同(表3)。试管苗在生根培养基中,茎段基部及所形成的根均有不同程度的愈伤化现象,在含有NAA的培养基中尤为明显,且随着激素浓度增加,愈伤化现象急剧加重。另外,生长素的种类对平均生根条数也有显著影响。添加NAA的培养基中平均生根条数在4.20~6.15条,而添加IBA的培养基中也在3.75~4.75条之间。不含激素的1/2MS培养基也可诱导西伯利亚远志无根试管苗生根,但生根率仅为50%,生根条数为2.30条。结合生根率、生根条数以及根和苗的生长情况,选择1/2MS+IBA 1.0 mg/L为最佳生根培养基。

2.5 开花结实现象

试验过程中发现试管苗培养30 d后有开花结实现象出现(图2)。

培养基编号 No.	基本培养基	激素浓度/mg·L <sup>-1</sup>		接种苗数/株	生根株数/株	生根率/%	平均根条数/条	根长/cm	根生长状况
		NAA	IBA						
17	1/2MS			20	10	50	2.30	0.72	短、细较健壮
18	1/2MS		0.1	20	19	95	4.00	1.69	长、细较健壮
19	1/2MS		0.3	20	18	90	3.95	1.62	长、细较健壮
20	1/2MS		0.5	20	19	95	3.75	1.64	长、细较健壮
21	1/2MS		1.0	20	20	100	4.75	1.74	长、细较健壮
22	1/2MS	0.1		20	13	65	5.90	0.82	较长、粗壮
23	1/2MS	0.3		20	12	60	6.15	0.82	较长、粗壮
24	1/2MS	0.5		20	8	40	4.50	0.63	较短、弱
25	1/2MS	1.0		20	5	25	4.20	0.33	较短、弱

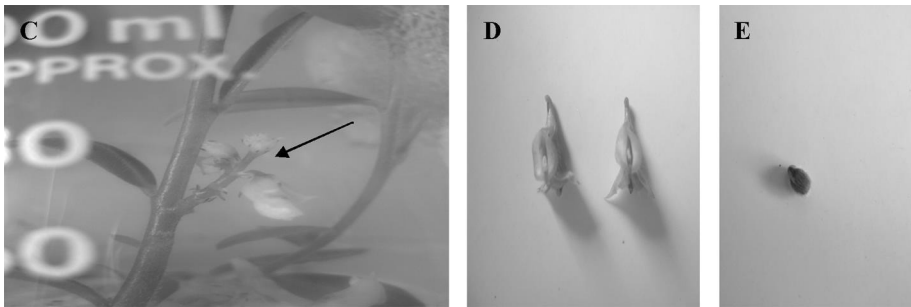


图2 西伯利亚远志试管苗的开花结实现象  
注:(C)试管苗开花现象;(D)试管苗的花;(E)试管苗的种子。

2.6 移栽

生根培养20 d后,将长有新根和2~3片叶的小苗在培养瓶置室温下练苗2~3 d,然后揭开封口膜,自然光下练苗2~3 d,后用清水将基部培养基洗净,栽种到壤土和砂土等体积混匀的育苗钵中,每2~3 d浇水1次。以移栽苗长出2片以上新叶为成活标准,30 d后统计成活率达100%。移栽后生长情况见图3。



图3 西伯利亚远志移栽后生长情况

3 结论与讨论

3.1 启动与增殖培养

由于外植体材料有限,在试验中参考了前人已确定的同科同属的远志培养基(略作修改),并未对西伯利亚远志启动培养基进行系统研究。试验过程中发现外植体平均增殖系数可达4.00~5.00倍,但出现了玻

璃化现象,严重影响了再生体系的建立。这与胡侃等<sup>[7]</sup>对远志试管苗的研究不同,可能是由于2种植物基因型差异所致。因此适宜西伯利亚远志的启动培养基有待继续研究。激素是影响植物组织培养成功的关键因子,尤其在组织培养的增殖阶段起着决定性的作用。该试验研究了16种添加不同浓度6-BA和IBA、

NAA 的增殖培养基, 从中筛选出了 MS+6-BA 0.5 mg/L+IBA 0.1 mg/L 为西伯利亚远志的最佳增殖培养基。在增殖培养过程中发现, 随着细胞分裂素浓度增加, 增殖系数也随之增加, 但试管苗株高逐渐降低, 增殖芽长势较弱, 逐渐出现了玻璃化及茎尖干死现象, 这在黄冬华等<sup>[8]</sup>对矮生石香竹、任东岁等<sup>[9]</sup>对毛刺槐的研究中也有相似报道。组织培养中试管苗的玻璃化现象往往导致无根试管苗不能诱导生根, 产生玻璃化的原因是多种多样的<sup>[9]</sup>, 为了减轻玻璃化对西伯利亚远志再生的影响, 试验过程中主要采取了降低细胞分裂素浓度的措施, 使试管苗的玻璃化程度得到极大改善。向增旭等<sup>[10]</sup>在忍冬组织培养体系的建立的研究中也有过报道。另外黄冬华等在对矮生石香竹的组织培养和快速繁殖中还发现采用透气性的封口膜包扎瓶口, 可明显减少玻璃化发生的比率<sup>[8]</sup>, 该措施在降低西伯利亚远志玻璃化方面是否有效还有待进一步验证。

### 3.2 生根培养与移栽

根的形成是组织培养过程中的关键环节, 其直接影响到试管苗移栽成活率。该试验以 1/2MS 为基本培养基, 通过考察不同生长素浓度对西伯利亚远志的影响, 发现 IBA、NAA 均可诱导试管苗生根, 但以 1/2 MS+IBA 1.0 mg/L 为最佳生根培养基, 生根率及试管苗移栽成活率均为 100%。生根率与根长在添加 NAA 的培养基中随激素浓度增大反而逐渐减小, 这与胡侃等<sup>[7]</sup>对远志试管苗的研究相一致。当根原基形成后, 含有生长素 NAA 的培养基对根的生长有明显的影响, 根明显愈伤化, 且粗而短, 易脱落, 从而影响移栽成活率。李云等<sup>[11]</sup>所做的四倍体刺槐生根试验也得出相似结论。组织培养是获得名贵中药材毛状根的一种方式, 如对丹参、三七、人参等药材的不定根的诱导研究<sup>[12-13]</sup>。试验中发现在添加 NAA 的生根培养基, 西伯利亚远志的根呈现短、粗、丛生的状态。鉴于此, 能否利用组织培养的方式直接进行西伯利亚远志根的诱导生产, 以缩短药用部位的培养周期。同时能否利

用其它部位(如叶片等)直接诱导大量生长迅速的不定根, 以扩大药用部位的培养方式均有待继续探究。

### 3.3 开花结实现象

自田野菟丝子进行试管中开花取得成功以来<sup>[14]</sup>, 关于试管开花植物的报道已有很多。因此该文认为可利用组织培养的方式对西伯利亚远志进行花芽诱导, 建立一套花芽诱导的培养体系, 并对其进行生理发育过程方面的系统研究。能否利用组织培养的方式诱导产生种子用于大田生产, 或者将由此得来的种子继续进行继代培养, 以达到快速繁殖的目的, 也有待进一步研究。

### 参考文献

- [1] 张培轩, 段瑞, 黄鹏. 中国远志属药用植物资源及地理分布[J]. 基层中药志, 2002, 16(6): 42-43.
- [2] 中国药典[S]. 一部, 2005.
- [3] 马菁菁, 刘斌, 罗跃娥. 远志化学成分和药理活性的研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2009, 11(12): 161-163.
- [4] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编(上册)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1975: 418.
- [5] 李世全. 远志市场前景远大[J]. 全国药材行情, 2006, 14: 1.
- [6] 叶南, 陈元胜. 药用植物组织培养在中药领域的应用研究[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(24): 7502, 7510.
- [7] 胡侃, 郝建平. 外源激素对远志试管苗增殖和生根的影响[J]. 山西医药杂志, 2008, 37(2): 189-190.
- [8] 黄冬华, 周群, 陶秀花, 等. 矮生石香竹的组织培养和快速繁殖[J]. 中国农学通报, 2007, 23(9): 103-106.
- [9] 任东岁, 段新玲, 张卫芳, 等. 毛刺槐试管无性系的建立[J]. 塔里木大学学报, 2000, 12(1): 5-8, 12.
- [10] 向增旭, 高山林. 忍冬组织培养体系的建立和优化[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(24): 2662-2663.
- [11] 李云, 田砚亭, 钱永强, 等. NAA 和 IBA 对四倍体刺槐试管苗生根影响及不定根发育过程解剖观察[J]. 林业科学, 2004, 40(5): 75-80.
- [12] 陈巍, 郭肖红, 肖培根, 等. 丹参不定根离体培养的研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(17): 1409.
- [13] 高先富, 徐朝晖, 刘佳建, 等. 三七不定根的离体诱导与培养[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(18): 1485.
- [14] Loo S W. Cultivation of excised stem tips of dodder in vitro[J]. American Journal of Botany, 1946, 33: 295-300.

## Research on the Tissue Culture and Plant Regenetation of *Polygala sibirica* L.

REN Jian-wei, WEI Chang-yan, WANG Jin-mao

(College of Forestry, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071000)

**Abstract:** Stems with axillaries bud of *Polygala sibirica* L. were used as explants, and placed on MS culture medium with different hormone of 6-BA, IBA, NAA combination and different concentrations, and established a new technical system of plantlet regeneration and rapid propagation. The results showed that the optimum multiplication culture medium was MS+6-BA 0.5 mg/L+IBA 0.1 mg/L; the rooting culture medium was 1/2MS+IBA 1.0 mg/L. In this system, the highest propagation coefficient was 3.15, the rooting rate was 100%, and the survived plantlets rate of transplant was 100%.

**Key words:** *Polygala sibirica* L.; tissue culture; rapid propagation