

岭南道地药材青天葵的组织培养与植株再生

张 晓 丽, 梁 凌 玲, 詹 若 挺, 何 瑞

(广州中医药大学 中药资源科学与工程研究中心, 岭南中药资源教育部重点实验室, 广东 广州 510006)

摘 要:以青天葵新鲜球茎为试材,对离体条件下青天葵的愈伤组织诱导及其植株再生进行研究。结果表明:0.1%升汞溶液处理青天葵球茎 10 min、玻璃培养皿有利于青天葵愈伤组织的诱导;青天葵走茎及愈伤组织在 MS+1.0 mg/L 6-BA 培养基中培养可得到大量丛生芽及愈伤组织,多次继代培养可得到完整植株;将青天葵走茎接种于含有 0.1%活性炭的 MS 培养基中可获得大量组培球茎。

关键词:青天葵;球茎;组织培养;再生植株

中图分类号:S 567.23⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1009(2012)19-0140-03

青天葵来源于兰科芋兰属多年生宿根草本植物毛唇芋兰 [*Nervilia fordii* (Hance) Schltr.] 的地下球茎或全草。有清肺止咳、清热解毒、消结散瘀等功效,主治小儿肺炎、咽喉肿痛、疮疡肿毒、跌打损伤等^[1-2]。青天葵是我国珍稀濒危植物,主要以球茎进行繁殖,繁殖系数极低,加之多年来灭绝式的挖掘,导致野生青天葵资源日益枯竭。而国内外市场的需求量却逐年加大,青天葵已远远满足不了市场的需求。因此,组织培养与人工种植成为保护野生青天葵资源和解决供需矛盾的有效途径。建立该植物扩繁体系可为其药材野生品种转家种,进行人工栽培提供技术基础。组织培养主要是为达到药材高产的目的服务,能最大程度的保持原有的遗传特性,在种质资源的离体保存上具有重要意义;且无菌培养可以为相关基因工程试验研究长期稳定地提供较少外源污染的试验材料;同时该体系的建立还可能形成成熟技术提供青天葵药材,为突破其资源贫乏濒危的瓶颈打下基础。该试验对青天葵组培技术进行了探索和研究,以期组织培养和人工种植途径实现青天葵资源的可持续利用提供依据,也为青天葵细胞工程和基因工程研究提供材料支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试毛唇芋兰购自广西凭祥,栽培于广州中医药大学药山荫棚,选取其球茎青天葵作为外植体。

第一作者简介:张晓丽(1987-),女,在读硕士,研究方向为中药资源的可持续利用研究和开发。E-mail:gzxyxiaoli_2010@163.com.

责任作者:何瑞(1972-),女,博士,研究员,研究方向为中药资源保护与可持续利用。E-mail:vipruihe@yahoo.cn.

基金项目:教育部博士点基金联合资助项目(200805720004)。

收稿日期:2012-05-17

1.2 试验方法

1.2.1 不同灭菌时间、培养皿材质对外植体诱导率的影响 取新鲜球茎,洗净泥土,用洗洁精水浸泡 30 min,然后自来水冲洗 30~60 min,球茎置于无菌小烧杯中,加入 75%乙醇浸泡 30 s,弃去乙醇,于超净工作台中加入 0.1%升汞灭菌,灭菌时间分别为 8、10、12 min,灭菌期间不断摇晃小烧杯,然后弃去升汞废液,灭菌纯水清洗 6 次,灭菌纸吸干表面水分。将灭菌球茎切分成 0.5 cm×0.5 cm 左右的小块,分别接种于铺有 MS 培养基的玻璃培养皿、塑料培养皿上,每处理接种外植体 9~10 个。温度(25±1)℃、光照 16 h/d,光照强度 1 500~2 000 lx,培养 30 d 后,统计诱导率、污染率和存活率。诱导率=(产生愈伤组织的总数/接种的外植体总数)×100%,污染率=(污染外植体总数/接种的外植体总数)×100%,存活率=(存活外植体总数/接种的外植体总数)×100%。

1.2.2 不同配方培养基对愈伤组织生长的影响 青天葵球茎常规消毒后(消毒程序同 1.2.1)接种到含有不同激素组合及不同活性炭含量的固体培养基中,设置 10 个组别,每处理接种外植体 9~10 个。培养观察不同激素对其诱导率的作用。激素组合见表 1。

表 1 不同激素组合的固体培养基

培养基 编号	培养基 类型	6-BA /mg·L ⁻¹	NAA /mg·L ⁻¹	2,4-D /mg·L ⁻¹	活性炭 /%	蔗糖浓度 /%	琼脂浓度 /%
MS	MS	—	—	—	—	1.0	0.5
M①	MS	0.3	—	1.0	—	1.0	0.5
M②	MS	—	2.0	—	—	2.0	0.7
M③	MS	1.0	—	—	—	2.0	0.7
M④	MS	1.0	0.5	—	—	1.0	0.7
M⑤	MS	1.0	0.5	—	0.1	1.0	0.7
M⑥	MS	2.0	0.5	—	—	1.0	0.5
M⑦	1/2MS	—	—	—	0.1	1.0	0.5
M⑧	1/2MS	2.0	2.0	—	—	1.0	0.7
M⑨	KC	—	—	—	0.1	2.0	0.7

2 结果与分析

2.1 不同灭菌时间、培养皿材质对外植体诱导率的影响

由图 1 可知,用 10 g/L 升汞溶液灭菌 8 min 后,各组污染情况严重,外植体不容易生长;灭菌 10 min 处理有利于外植体的诱导率和存活率的提高;灭菌 12 min 后,短期内污染率不高,但是外植体受到灭菌剂的破坏,诱导率低,基本停止生长。该试验还考察了玻璃和塑料 2 种材质对外植体的影响,综合比较各组诱导率、污染率及存活率,发现升汞处理 10 min、玻璃培养皿有利于青天葵球茎的诱导。

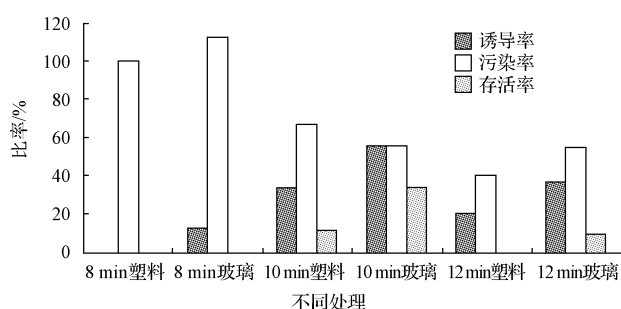


图 1 不同灭菌时间、培养皿材质对外植体诱导率的影响

2.2 不同配方培养基对青天葵愈伤组织生长的影响

由图 2 可知,经过多次继代培养,青天葵愈伤组织在不同配方培养基中的培养情况有所差异。为保留有限组培材料,试验仅从外观对愈伤组织影响进行描述和评价。其中,在 M③(MS+1.0 mg/L 6-BA)培养基中培养可得到大量丛生芽及愈伤组织,多次继代培养可获得完整植株。将青天葵走茎接种于含有 0.1%活性炭的培养基中可获得大量组培球茎。

表 2 不同配方培养基对青天葵愈伤组织生长的影响

培养基配方	重复数/瓶	愈伤培养情况
MS	6	黄褐色疏松愈伤、细长走茎
M③	20	植株、白色细长走茎、丛生芽、绿色愈伤组织
M①	6	绿色紧实愈伤、黄白色疏松愈伤组织
M④	9	丛生芽、绿色走茎、黄白色疏松愈伤组织
M⑤	3	大量绿色细长走茎、白色球茎
M⑥	4	黄白色紧实愈伤、白色走茎
M⑦	4	大量白色球茎、白色长走茎
M⑧	31	丛生芽、绿色粗壮走茎、白色愈伤组织
M⑨	4	大量细小球茎

由图 2 可知,经过多次试验培养得到青天葵组培苗,其基本生长模式为:球茎外植体—白色走茎—绿色走茎—组培球茎—组培苗。但该过程历时久,组培苗生长力较弱,尚不具备练苗下田和批量生产的条件。

3 讨论与结论

国内不少学者对青天葵组织培养植株再生体系进行了广泛地探讨,并建立了多种类型的培养体系和方法,为青天葵体细胞培养、功能基因组学研究、基因工程和现代青天葵育种研究的发展作出了巨大的贡献。

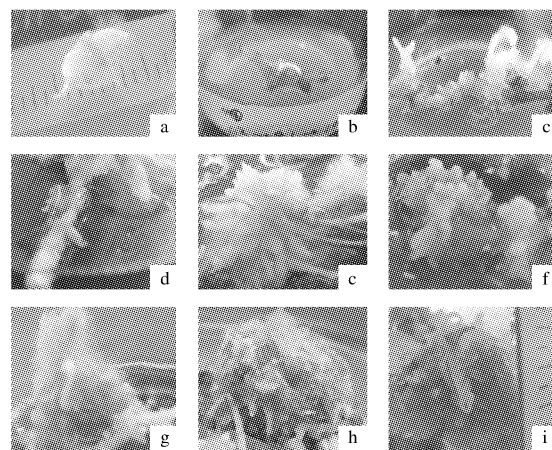


图 2 青天葵组培苗生长过程记录

注:a. 外植体诱导走茎;b. c. 白色走茎;d. 绿色走茎;e. f. 白色球茎;g. h. 芽分化;i. 组培苗。

灭菌剂需有良好的灭菌效果,不会对外植体造成损伤或损伤较小,且容易用无菌水冲净或能自行分解,不会在外植体上残留而影响其生长。不同的灭菌剂对外植体的消毒作用也不同。袁源^[3]考察了不同灭菌剂对青天葵污染组培走茎的灭菌效果,认为 5%次氯酸钠溶液对组培材料的灭菌效果好,伤害少,但是由于该试验以青天葵新鲜球茎为外植体,需要灭菌效果更强的灭菌剂,因此选取 0.1%升汞溶液为灭菌剂,考察不同时间的灭菌效果。升汞对材料表面灭菌效果好,能使细菌蛋白质变性,且杀灭细菌作用优于真菌。有学者指出^[4-5],升汞和酒精组合是较理想的杀菌方式。灭菌时间的控制是影响灭菌效果另一重要因素,时间过短,杀菌不完全,不能有效的杀死外植体表面的微生物;时间过长,对外植体有损伤,有时甚至杀死外植体,不利于愈伤组织的诱导。青天葵球茎为地下器官,容易附带细菌,且球茎表面多被有几层淡棕色膜质鳞片,给表面消毒带来一定的难度,此外兰科植物自身多带有内生菌,因此,青天葵球茎的消毒需要穿透力和灭菌效果强的消毒剂。前期试验发现,先以 75%酒精浸泡球茎 30 s,0.1%升汞溶液浸泡 10 min 可以收到较好的灭菌效果,且后期外植体诱导率较高,是灭菌处理的理想方法。

由于前期研究过程中发现青天葵球茎诱导率不高,生长速度慢,为了得到更加有利的培养条件,对培养皿材质进行了比较考察,结果发现玻璃培养皿有利于青天葵的组织培养。其原因可能为分装培养基时,培养基的热度导致一次性塑料培养皿释放出某些化学物质,对外植体的生长产生了影响。

植物细胞脱分化是一个复杂的生理生化过程,植物激素发挥着较大的作用,随着分子生物学的发展,已经证明植物激素是通过与植物细胞内的受体蛋白结合而起作用,即植物激素必须与靶细胞中的受体结合,才能

调节植物的生长发育^[6]。6-BA 是第一个人工合成的细胞分裂素,主要作用是促进细胞分裂和生物体内物质的积累,促进侧芽发生,诱导愈伤组织的生长。其具有高效、稳定、廉价和易于使用等特点,因而被广泛用于植物组织培养研究^[7]。经过多次继代培养,发现青天葵走茎及愈伤组织在 MS+1.0 mg/L 6-BA 培养基中培养可得到大量丛生芽及愈伤组织,多次继代培养可得到完整植株。

在植物组织培养中活性炭主要用于预防褐变,提高初代培养成活率;促进芽增殖和苗生长;创造黑暗环境,促进生根等^[8]。将青天葵走茎接种于含有 0.1% 活性炭的培养基中可获得大量组培球茎,验证了活性炭促进芽增生和生根的作用。

试验经过多次试验培养得到青天葵组培苗,其基本生长模式为:球茎外植体—白色走茎—绿色走茎—组培球茎—组培苗。但该过程历时久,且组培苗植株较弱,不具备练苗下田和批量生产的条件,仍需进一步优化青

天葵组培条件。

参考文献

- [1] 广东省食品药品监督管理局. 广东省中药材标准(第一册)[S]. 广州:广东科技出版社,2004:122.
- [2] 陈蔚文,徐鸿华. 岭南道地药材研究[M]. 广州:广东科技出版社,2007:326-351.
- [3] 袁源. 青天葵扩繁体系的建立和优化[D]. 广州:广州中医药大学,2010.
- [4] 阎志佩. 濒危品种软籽石榴的组织培养和快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2004(3):331.
- [5] 曾斌,李疆. 新疆皮亚曼石榴微繁殖技术研究[J]. 新疆农业大学学报,2003,26(2):34-39.
- [6] 陈延惠,陈海燕. 不同植物生长调节物质配比及有机添加物对泰山红石榴外植体生长分化的影响[J]. 南京农业大学学报,2006,40(2):152-155.
- [7] 刘颖,魏景芳,李冬杰. 甘草愈伤组织培养中激素优化组合的研究[J]. 中草药,2006,37(6):931-933.
- [8] 王红梅. 活性炭在植物组织培养中的应用[J]. 上海农业科技,2011(4):19-20.

Research on Tissue Culture and Plant Regeneration of Lingnan Genuine Medicinal Materials *Nervilia fordii*

ZHANG Xiao-li, LIANG Ling-ling, ZHAN Ruo-ting, HE Rui

(Research Center of Chinese Herbal Resource Science and Engineering, Key Laboratory of Chinese Medicinal Resource from Lingnan, Ministry of Education, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510006)

Abstract: Taking fresh corm of *Nervilia fordii* (Hance) Schltr. as material, the technique of callus induction and plantlet regeneration were studied. The results showed that *Nervilia fordii* corm treated by 0.1% HgCl_2 solution for 10 min, glass culture dish were in favor of the induction and regeneration of callus. High frequency multiple shoot-bud formation from callus induced by *Nervilia fordii* corm inducing culture on a MS-medium supplemented with 1.0 mg/L 6-BA. After several times of successive transfers of culture, regenerated plant could be obtained. The optimum medium for the induction of corm was a MS-medium contains 0.1% activated charcoal.

Key words: *Nervilia fordii*; corm; tissue culture; regeneration plant

提高尿素利用率的“三法”

方法一:施尿素后应立即灌水,此法可使尿素随水深贮于土壤下层,以后随着水分上移,不断分解成氨态氮为根系所利用。

方法二:深施,在没有灌溉条件的情况下,深施可显著提高尿素利用率,即结合整地做底肥,或条施、穴施。用作追肥时,施后严密覆土,以减缓氨化和硝化作用,减少有效氮的损失。深施以 10~12 cm 为宜。

方法三:适量施用,应根据不同作物目标产量和土壤肥力计算适当用量,同时考虑氮、磷、钾三要素的平衡,用量过多,易造成浪费和环境污染;用量过少,又达不到相应的增产目的。