

北苍术组织培养与快繁技术研究

张炜坤, 赵 恢, 张小芳, 王 冰, 乔亚科, 李桂兰
(河北科技师范学院农学与生物科技学院, 河北 昌黎 066600)

Study on Tissue Culture and Rapid Propagation Techniques of *Atractylodes chinensis* (DC.) Koidz.

ZHANG Weikun, ZHAO Hui, ZHANG Xiaofang, WANG Bing, QIAO Yake, LI Guilun

摘 要:为缓解北苍术种苗短缺以及保护种质资源,本试验采用组培快繁技术建立了北苍术快速繁殖技术体系。以北苍术幼嫩带芽茎段为外植体,研究消毒方法及激素类型对北苍术组培苗快繁影响。结果表明:使用 75%酒精消毒 30 s,0.1%氯化汞加吐温 20 消毒 15 min,消毒效果最好;不定芽增殖最适培养基为 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.25 mg/L;最适宜的伸长培养基是 MS+GA₃ 0.8 mg/L+IBA 0.1 mg/L+NAA 0.1 mg/L,组培苗伸长高度、长势均为最好;MS 培养基即可作为北苍术茎段组培苗生根培养。

关键词: 北苍术; 茎段; 组织培养; 消毒方法; 激素配比

DOI 编码: 10.16590/j.cnki.1001-4705.2018.12.136

中图分类号: S 567.21+1 文献标志码: A

文章编号: 1001-4705(2018)12-0136-04

北苍术 (*Atractylodes chinensis* (DC.) Koidz.) 属于菊科苍术属,为多年生、宿根、草本植物,根状茎入药。其性温,味辛、苦,归脾、胃、肝经;能祛风散寒,燥湿健脾,明目;用于腹胀泄泻、水肿,风湿痹痛,风寒感冒,雀目夜盲等症^[1]。在我国北方、东北、华北及河南、陕西、宁夏、甘肃、山东等地区有野生资源分布。北苍术是重要中药材,具有多种药理活性如抗菌作用、免疫调节活性、抗肿瘤及抗骨质疏松作用、保肝作用、降血糖作用、抗心律失常作用等。经过进一步开发利用在新药研究开发方面有着很大的潜力^[2-5]。

目前市场上北苍术需求主要来自野生资源,人工驯化栽培刚刚起步,人工栽培现状不容乐观,栽培的滞后性和野生资源逐渐枯竭致使北苍术的价格居高不下,从而导致供不应求^[6-7]。利用组织培养技术可以缓解这种资源短缺的现状,一来可以在短时间内快速繁殖出大量试管苗,二来可以保存好苍术珍贵的种质资源^[8-9]。

目前,国内外的研究主要集中在北苍术遗传学和药理学方面,对北苍术组培的研究较少,缺乏对北苍术组织培养技术系统性的研究,这为北苍术的组织培养研究提供了研究空间和研究价值^[10]。因此,对北苍术组织培养技术系统性研究具有重要科研价值和现实意义。因此开发建立北苍术组织培养繁育体系,快速生产大量种苗以满足人工栽培的需要以及保护野生北苍术资源具有十分重要的意义^[8-9,11-13]。

苍术是很具有开发潜力的植物,但国内有关茅苍术的组培研究比较多,对北苍术组织培养技术研究的报道较少^[10],本试验利用北苍术带芽茎段作外植体,探究影响组培苗再生的因素,为北苍术产业的优质化、标准化、规模化生产提供基础依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

北苍术带芽幼嫩茎段(本试验材料为秦皇岛市同盛医药有限公司提供,由河北科技师范学院王文颇教授鉴定,于 2017 年 5 月采于河北省秦皇岛市青龙县北苍术种植基地)。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体表面灭菌优化试验

取田间生长的 2 年生北苍术春季新萌发枝条,剪掉叶片,剪成带 1~2 个芽茎段,用洗涤灵涮洗外植体表面,流动水冲洗 20 min。经外植体放置在超净工作台中进行消毒,消毒方法共设 3 个处理(见表 1)。培养基以 MS 为基本培养基,内含 6-BA 和 NAA,pH 值调至 5.8~6.0,培养温度(23±2)℃,光照强度 1 500~2 200 lx,光暗时数分别为 12 h。15 d 之后调查外植体的污染率及外植体的芽诱导率。

收稿日期:2018-06-24

基金项目:河北省自然科学基金项目(C 2016407100);河北省研究生创新资助项目(0167-1270)。

作者简介:张炜坤(1993—),女,硕士研究生,研究方向:植物生物技术;E-mail:573243641@qq.com。

通讯作者:李桂兰(1963—),女,河北省肃宁县人;博士,教授,主要从事植物组织培养及植物基因工程研究;E-mail:lg163@126.com。

污染率(%)=(污染的外植个数/接种的总外植个数)×100%;

死亡率(%)=(死亡茎段数/接种的总外植体数)×100%;

诱导率(%)=(诱导出不定芽外植数/接种的总外植数)×100%。

表1 外植体表面灭菌试验设计

处理编号	灭菌方法
1	75%酒精消毒 30 s, 5%次氯酸钠消毒 20 min
2	75%酒精消毒 1 min, 0.1%氯化汞消毒 10 min
3	75%酒精消毒 30 s, 0.1%氯化汞+吐温 20 消毒 15 min

1.2.2 不定芽增殖培养

在 MS 里添加不同浓度 6-BA(1, 1.5, 2, 2.5, 3 mg/L)与 NAA 0.25 mg/L 配比组合,共 5 个处理,对照处理不添加激素。灭菌前 pH 值调至 5.8~6.0。诱导培养 2 周后统计外植体不定芽诱导率,培养 30 d 后统计增殖系数。诱导率见 1.2.1。

增殖系数(%)=(总不定芽数/接种的总外植数)×100%。

1.2.3 北苍术茎段不定芽伸长培养

在 MS 培养基中添加不同浓度的 IBA、NAA、GA₃ 等植物生长调节物质(见表 3)。8 周后观察不定芽伸长状况,调查各处理的不定芽伸长状况,对比不同植物激素对组培苗茎伸长的影响。

伸长率(%)=(伸长外植体外植数/接种的总外植数)×100%;

伸长高度(%)=(外植体伸长高度之和/外植个数)×100%。

1.2.4 北苍术组培苗生根培养

将不定芽剪成单株转入生根培养基中。试验设计以 MS 为基本培养基,添加不同浓度的 NAA(0, 0.2, 0.5, 0.8 mg/L),完全随机设计,共计 4 个处理。培养 3 周后调查不定芽生长状况。

生根率(%)=(生根的组培苗数/接种的总组培苗数)×100%。

1.2.5 北苍术组培苗炼苗移栽

当北苍术组培苗 4~6 条根,根长 3~5 cm 时,进行炼苗,3 d 后取出组培苗,洗净附着在根上的培养基,准备移栽。移栽基质为蛭石:草炭土比例为 1:1,草炭土、蛭石在使用前高温灭菌。移栽后组培苗用塑料薄膜覆盖保湿,每天观察、喷水、适时揭膜通风,待长出新叶后去掉地膜。

2 结果与分析

2.1 不同灭菌方法对北苍术带芽茎段的影响

较高浓度次氯酸钠碱性太强,在进行外植体表面消毒对外植体的伤害较大,死亡率最高(达 55.00%),外植体呈黑褐色,严重影响不定芽的再生,芽诱导率仅为 21.67%;低浓度氯化汞对于外植体的伤害较小,处理 2 污染率最高(为 48.33%),但死亡率最低(为 23.33%),在处理 3 中,氯化汞的消毒时间延长且加入表面活性剂吐温后,污染率最低(为 16.67%),同时芽诱导率最高(为 53.33%)。最佳表面消毒方法为 75%酒精消毒 30 s,0.1%氯化汞+吐温 20 消毒 15 min。

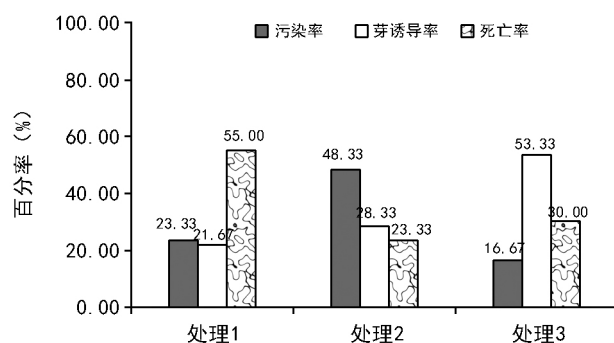


图1 不同灭菌处理的效果比较

2.2 不同浓度 6-BA 与 NAA 配比对不定芽增殖的影响

6-BA 与 NAA 不同浓度配比组合均促进了不定芽的增殖及生长。外植体在不定芽增殖培养基上培养 2 周后基部有愈伤组织形成,3 周后开始出现不定芽。6-BA 与 NAA 配比对不定芽的形成有影响,当 NAA 浓度为 0.25 mg/L 时,随着 6-BA 浓度的升高(1~3 mg/L),不定芽诱导率、增殖系数都表现为先升高后降低的趋势,在 2.0 mg/L 时(处理 3)达到最高,随后下降。6-BA 浓度对不定芽的质量也有影响,当 6-BA 浓度过高,达到 3 mg/L 时不定芽的叶片卷曲,出现玻璃化苗和畸形苗现象。在未添加任何激素的 MS 培养基中,未能诱导不定芽增殖。综合不定芽的诱导数量及质量,本试验范围内以 6-BA 2 mg/L 与 NAA 0.25 mg/L 配合适宜北苍术茎段不定芽增殖。

2.3 不同培养基对北苍术茎段不定芽伸长的影响

在北苍术伸长试验中,添加 GA₃ 并辅以 NAA 和 IBA(见表 3)。试验结果表明,6 个处理均能不同程度诱导北苍术不定芽伸长,并且随着 GA₃ 浓度的增加不定芽也随之增高,在 0.8 mg/L 时伸长高度及伸长率均显著高于其他处理。当培养基中同时添加 GA₃ 与 NAA 和 IBA 时显著提高了不定芽伸长率及伸长高度,以处理 3 效果最佳,不定芽伸长率达到 92.86%。

表明添加 NAA 和 IBA 有助于促进 GA₃ 诱导伸长。综上所述,在 GA₃ 0.8 mg/L+NAA 0.1 mg/L+IBA 0.1 mg/L 处理中,芽伸长效果最好。

表 2 不同激素组合对不定芽增殖诱导的影响

处理编号	6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)	不定芽诱导率 (%)	不定芽增殖系数
1	1.0	0.25	93.33 a	1.65 ab
2	1.5	0.25	97.22 a	2.04 ab
3	2.0	0.25	94.44 a	2.21 a
4	2.5	0.25	80.13 a	1.27 b
5	3.0	0.25	80.71 a	1.17 b
ck	0.0	0.0	0.00 b	0.00 c

注:不同小写字母表示差异显著(α=0.05)。下同。



图 2 不定芽诱导及增殖情况

2.4 不同浓度 NAA 对北苍术组培苗生根的影响

逐渐增加 NAA 浓度,生根率呈现为逐渐降低的趋势。不添加 NAA 的 MS 培养基生根率较高,最高达到 93.61%,且基部未形成愈伤组织(图 4)。试验中发现,添加 NAA 后不定芽基部有愈伤组织出现(图 4)。在生根阶段,愈伤组织的形成影响营养物质的输导,不利于不定芽生根后续的移栽。因此,不添加 NAA 的 MS 培养基即可作北苍术茎段组培苗生根培养。

3 讨论与结论

3.1 讨论

3.1.1 灭菌方法

外植体消毒是组培成功与否的关键因素之一。北苍术体表多毛,采自自然环境中的枝条带菌较多不易消除,容易造成污染。消毒剂使用浓度和时间是重要参数,直接影响组培的污染率和对外植体的伤害程度。次氯酸钠对环境、人畜的毒性极小。氯化汞则对环境和人畜毒性较强但氯化汞

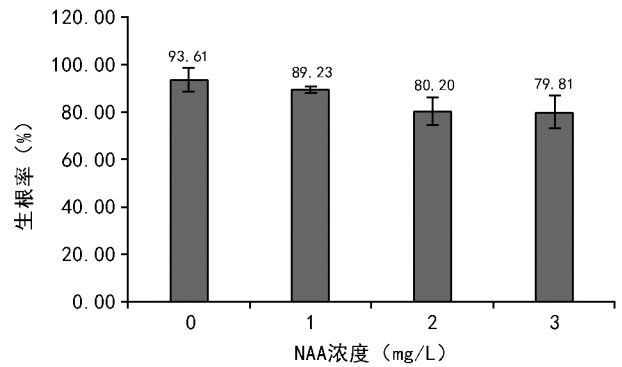
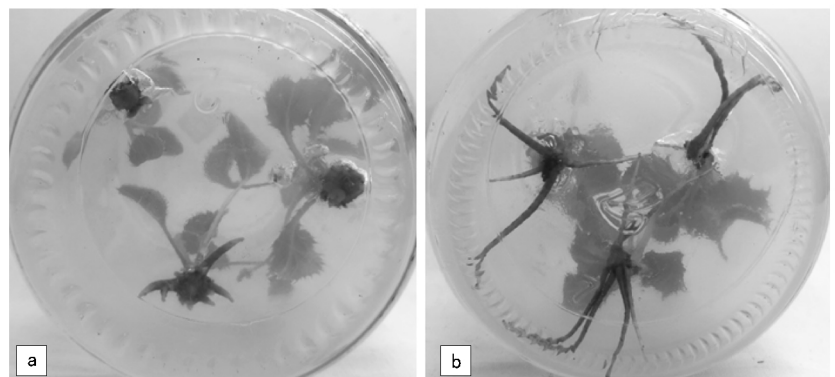


图 3 不同浓度 NAA 对北苍术组培苗生根的影响

表 3 不同种类激素组合对北苍术不定芽伸长的影响

处理编号	GA ₃ (mg/L)	NAA (mg/L)	IBA (mg/L)	伸长高度 (mm)	伸长率 (%)
1	0.2	0.1	0.1	5.94 b	59.82 bc
2	0.5	0.1	0.1	5.58 bc	81.25 ab
3	0.8	0.1	0.1	8.62 a	92.86 a
4	0.2	0	0	4.08 c	31.25 c
5	0.5	0	0	4.94 bc	37.50 c
6	0.8	0	0	5.71 b	58.93 bc
ck	0	0	0	0.00 d	0.00 d

的消毒效果较为有效,是常用的外植体消毒剂。袁媛等^[12]采用 0.1%氯化汞浸泡 10 min 对苍术种子进行消毒;巢建国等^[11]采用 75%酒精消毒 30 s 加 0.1 氯化汞浸泡 15 min 对茅苍术种子进行消毒,种子有种皮进行保护,消毒剂对种子的伤害较小。朱玉球等^[14]采用 75%酒精消 10 s 加 0.1%氯化汞消毒 10 min 对白术根茎进行消毒,效果较好。本研究结果表明,采用 75%酒精消毒 30 s 之后用 0.1%氯化汞加吐温 20 消毒 15 min 灭菌效果最好,污染率低、外植体死亡率低、不定芽诱导率高;添加吐温后增加了氯化汞对外植体的浸润及附着,提高灭菌效果。本试验研究显示高浓度次氯酸钠的强碱性对北苍术带芽茎段影响较大,但后续试验中会继续探索更加适宜北苍术的消毒浓度及消毒时间。



注:a 为添加 NAA 后基部出现愈伤组织,b 为不添加 NAA 的处理。

图 4 组培苗生根状况

3.1.2 丛生芽增殖培养

细胞分裂素是不定芽诱导的主要因素^[15-16],其中多采用 6-BA 进行不定芽诱导。在一定范围内北苍术不定芽的诱导率随着细胞分裂素浓度的增高而提高,但浓度过高的细胞分裂素不利于苗生长,易出现玻璃化、畸形、苗弱等现象。薛翔楠^[17]研究的适宜茅苍术茎段组培苗增殖的培养基为 MS+6-BA 1 mg/L+NAA 0.5 mg/L,黄波^[18]在茅苍术增殖培养基中添加 6-BA 2 mg/L、NAA 0.6 mg/L 增殖效果最好;左静静等^[19]认为 1/2 MS+6-BA 2 mg/L+KT 1 mg/L+NAA 0.5 mg/L 是最适北苍术组培苗增殖培养基。本试验结果表明,不定芽增殖阶段的培养基中 6-BA 浓度 2 mg/L、NAA 浓度为 0.25 mg/L 时效果最好,并且组培苗生长状况良好。

3.1.3 不定芽伸长培养

一年生北苍术种子实生苗叶基生,没有地上茎,越冬后的第 2 年生苗才会长出地上茎。在组培中再生的不定芽叶丛生,茎亦不伸长,影响成苗率。本试验在培养基中单独添加 GA₃ 可以诱导北苍术组培苗地上茎伸长,同时加入 IBA 和 NAA 的效果显著好于单独添加 GA₃,这与洋桔梗伸长的研究结果^[20-22]相似,说明 GA₃ 和 IBA、NAA 有协同作用。

3.1.4 不定芽生根培养

组培苗生根培养在整个组织培养过程中是关键的一个步骤,如果没有根系则无法进行移栽后应用。本试验研究发现,在添加生长素 NAA 后,组培苗基部有愈伤组织出现,不添加生长素的 MS 培养基适合北苍术组培苗生根的培养基配方。任建伟等^[23]在试验中发现添加较高浓度生长素时,组培苗基部有愈伤组织出现,与本研究相似。植物组织培养中在生根阶段如果发生愈伤组织的形成会影响营养物质的输导,不利于组培苗后续的移栽成活。李文等^[13]在以南苍术组培苗生根培养时,培养时间为 30 d 统计,最适宜的生根培养基为 1/2 MS+NAA 0.5 mg/L。左静静等^[19]在研究北苍术组培苗生根培养时,培养时间为 45 d,认为 1/2 MS+NAA 0.5 mg/L 为最适宜北苍术组培苗生根的培

养基,与本试验结果不同。原因可能是由于调查时间不同造成本试验的结果与其他学者的结果有差异。

3.2 结论

本试验以北苍术带芽茎段作为外植体进行离体快繁,成功诱导出不定芽并且移栽成活。将带芽茎段采用 75%酒精消毒 30 s 后,再用 0.1%氯化汞、吐温 20 消毒 15 min 对外植体进行表面消毒,此方法消毒后的芽诱导率较高,且污染率低。最佳不定芽诱导培养基为 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.25 mg/L,由此获得的不定芽增殖系数最高,长势最好;最适宜组培苗伸长的培养基为 MS+GA₃ 0.8 mg/L+IBA 0.1 mg/L+NAA 0.1 mg/L,组培苗生长健壮。北苍术组培苗生根较容易在不添加 NAA 的 MS 培养基即可生根培养,且根的生长状态较好。移栽基质蛭石:草炭土比例为 1:1 时,移栽成活率在 90%以上。

参考文献:

- [1]高学敏,钟麟生主编.临床中药学[M].河北科学技术出版社,2004.
- [2]谢友良,李卓明,黄鸣清,等.GC 法测定苍术药材中苍术素及苍术酮[J].中草药,2008(4):614-615.
- [3]樊敏,方成武.苍术药材质量研究概况与探讨[J].中国中医药科技,2007(2):143-144.
- [4]王金华,薛宝云,梁爱华,等.叶祖光.苍术有效成分 β-桉叶醇对小鼠小肠推进功能的影响[J].中国药学杂志,2002(4):28-30.
- [5]殷俊芳,黄宝康,吴锦忠.苍术属药用植物的药理作用研究进展[J].药学实践杂志,2008(4):252-254,315.
- [6]魏继新.浅谈北苍术的生产与发展[J].农民致富之友,2013(18):21.
- [7]李云霞,李沈明,商春丽.承德发展苍术种植的可行性分析[J].中草药,2013,44(9):1 215-1 218.
- [8]石云平,黄宁珍,付传明,等.罗田苍术增殖培养基的优化[J].安徽农业科学,2010(36):20 635-20 636.
- [9]李西腾,吴沿友.茅苍术的组织培养和快速繁殖[J].广西热带农业,2006(2):33-34.
- [10]左静静,刘少翔,闫贵云,等.北苍术组织培养与快速繁殖方法[P].山西:CN 105104211 A,2015-12-02.

参考文献著录规则及示例(论文集)

论文集著录格式:[序号]主要责任者.文献题目[C]//论文集主要责任者.论文题名:出版地:出版者,出版年:页码.

- [1]钟文发.非线性规则应用[C]//赵玮.运筹学的理论与应用:中国运筹学会第五届大会论文集.西安:西安电子科技大学出版社,1996:487-490.
- [2]辛希孟.信息技术与信息服务国际研讨会论文集:A 集[C].北京:中国社会科学出版社,1994.
- [3]张筑生.微分半动力系统的不变集[D].北京:北京大学数学系数学研究所,1983.