

中药王不留行的组织培养技术初探

贵爱玲¹, 蔡小宁¹, 任源浩¹, 汪晓婷²

(1. 南京晓庄学院 生命科学系, 江苏 南京 210017; 2. 南京大学 生命科学学院, 江苏 南京 210093)

摘要:选取王不留行饱满种子培养无菌苗, 用无菌苗的茎和叶作为外植体, 分别接种 MS 基本培养基外加激素 NAA 和 6-BA 诱导愈伤组织和不定芽, 使用 1/2MS 培养基, 附加 IBA 或 NAA 进行不定芽的生根实验, 最后炼苗和移栽。实验结果表明王不留行的最优组织培养方案: 种子用 0.1% 升汞消毒 8min, 无菌湿脱脂棉催芽, 茎和叶作为外植体, 使用 MS + 0.1mg/L NAA + 0.1mg/L 6-BA 诱导愈伤组织和不定芽, 1/2MS + 0.15mg/L NAA 诱导植株生根。

关键词:王不留行; 组织培养

中图分类号:S567 **文献标识码:**B **文章编号:**1009-7902(2006)06-0053-04

0 前言

王不留行是一种常用中药, 具有活血通经, 消肿止痛, 催生下乳的功能。主治月经不调, 乳汁缺乏, 难产, 痈肿疔毒等症, 是临床催乳通经良药。与其他中药配合还可以治疗急性腰扭伤, 关节炎、面部皮肤过敏等。《中华人民共和国药典》^[1]载: 本品为石竹科植物麦蓝菜 *Vacaria Segetalis* (Neck) Carcke 的干燥成熟种子。它广泛分布于我国的东北、华北、华东、西北及西南各地。主产于河北、山东、辽宁、黑龙江等地, 以河北省产量最大。在陕西省低山、麦田内或农田附近生长, 王不留行喜光, 耐旱, 耐寒, 对土壤要求不严, 为常见的杂草, 常用种子繁殖, 但生长很慢, 生物量较小。经过检索, 对王不留行的研究主要是关于其药效中的有效成分和中药配伍方面的研究, 尚没有关于王不留行组织培养的文献报道。本文主要进行王不留行的组织培养, 探索快速获得再生苗的技术途径, 为今后进一步进行悬浮细胞培养, 提取有效成分提供好的途径。

1 实验材料

王不留行种子, 由南京市妇幼保健院药房提供。

2 实验方法与步骤

2.1 种子发芽

2.1.1 种子灭菌方法的筛选

种子用自来水洗净, 在超净台上用 70% 酒精浸泡 30s, 用 10% 双氧水和 0.1% 升汞分别进行种子消毒实验, 时间分别为 2min, 4min, 6min, 8min, 10min, 无菌水反复冲洗 5 次。将种子接种到 1/2MS 培养基中。每处理接种 5 瓶, 每瓶接种 10 粒, 每处理重复三次。在培养室进行培养。每天观察种子萌发情况。培养室温度 25℃。

2.1.2 种子发芽方法的筛选

用 1/2MS 基本培养基和无菌湿脱脂棉分别进行发芽实验^[2]。每个处理分别作 100 粒种子, 每天观察, 5d 记录一次实验结果。

2.2 愈伤组织的诱导

取无菌苗进行愈伤组织诱导实验, 在超净工作台上分别将茎切成 4mm 长小段, 因为叶比较小, 只能将每片叶切成两块(无菌苗取出切块时动作要快, 因为茎很细, 很容易干燥并死亡)。分别转入下列培养基^[2]中: M1 (MS + 0.05mg/L NAA), M2 (MS + 0.1mg/L NAA), M3 (MS + 0.15mg/L NAA), M4 (MS + 0.2mg/L NAA), 每瓶接 6 块茎或叶, 每个处

收稿日期: 2006-04-24

修改日期:

基金项目: 南京晓庄学院科技处重点项目资助 (No. 4041004)

作者简介: 贵爱玲 (1970—), 南京晓庄学院生命科学系副教授, 南京林业大学在读博士, 研究方向: 植物病原微生物与分子遗传学。

理接 6 瓶,每处理重复三次. 每天观察,(本文所有 MS 培养基均加入 3% 蔗糖和 0. 7% 琼脂,pH5. 8, 培养室温度 25 + 2℃, 每天连续 12 小时散射光照下培养.)20d 后统计实验结果.

2.3 不定芽的诱导

当愈伤组织生长到 47d 左右, 部分愈伤组织开始长出不定芽^[3], 茎诱导的愈伤组织和叶诱导的愈伤组织长出不定芽的频率没有差异. 70d 左右时不定芽生长很好, 繁殖率达到 600% 以上.

2.4 不定芽的生根

取生长良好的不定芽, 分别使用 1/2MS 培养基, 附加 IBA 或 NAA 进行不定芽的生根实验^{[4],[5]}, M9 (1/2MS + 0. 1mg/LIBA), M10 (1/2MS + 0. 3mg/LIBA), M11 (1/2MS + 0. 5mg/LIBA), M12 (1/2MS + 0. 7mg/LIBA), M13 (1/2MS + 0. 05mg/LNAA), M14 (1/2MS + 0. 1mg/LNAA), M15 (1/2MS + 0. 15mg/L NAA), M16 (1/2MS +

0. 2mg/L NAA), 每瓶接 5 株苗, 每个处理接 3 瓶, 每处理重复三次. 每天观察, 20d 后统计实验结果.

2.5 炼苗

逐步打开培养瓶, 3d 后全打开, 在培养基中先加入少量自来水保湿, 1d 后, 取出再生苗植株, 清洗根部培养基, 注意清洗时动作要轻柔, 避免损伤根毛.

2.6 移栽

取松软的泥炭土装花盆, 随机选取 30 株移栽花盆, 移栽时将清洗干净的 30 株健壮植株移栽到花盆中, 7d 之内注意保湿, 可用透明保鲜膜覆盖花盆, 以后每天打开一部分, 7d 后全部揭开花盆.

3 实验结果与分析

3.1 种子灭菌方法和发芽方法的筛选结果

用 10% 双氧水和 0. 1% 升汞灭菌, 将种子接种到 1/2MS 基本培养基, 10 天后, 实验结果见表 1.

表 1 种子灭菌方法的筛选结果

	2min	4min	6min	8min	10min
10% 双氧水消毒	100% 染菌	100% 染菌	83% 染菌	81% 染菌	71% 染菌
0. 1% 升汞	85% 染菌	73% 染菌	23% 染菌	100% 不染菌	100% 不染菌

根据实验结果, 表 1 显示种子消毒时使用 0. 1% 升汞消毒效果好于 10% 双氧水, 为了避免升汞对种子的毒害, 8 分钟最为合适.

筛选种子发芽方法时, 用 1/2MS 培养基和无菌湿脱脂棉分别进行发芽试验, 接种后共观察 20d, 实验结果见表 2.

表 2 种子发芽方法的筛选结果

	5d	10d	15d	20d
1/2MS 培养基	100% 不发芽	100% 不发芽	100% 不发芽	100% 不发芽
无菌湿脱脂棉	87. 7% 发芽	96% 发芽	96% 发芽	96% 发芽

表 2 结果显示种子发芽时采用无菌湿脱脂棉催芽比 1/2MS 培养基好, 可能因为种子种皮较厚, 培养基中水分较少, 一直没有发芽. 可能种子发芽的关键是水分要充足.

3.2 愈伤组织的诱导

用无菌苗诱导愈伤组织时, 在 MS 培养基中添加不同浓度的 NAA, 20d 后观察的实验结果见表 3.

因为单独使用 NAA 愈伤组织生长不理想, 选择愈伤组织生长最好的 NAA 浓度, 附加 6-BA 进一步诱导愈伤组织, M5 (MS + 0. 1mg/L NAA + 0. 05mg/L 6-BA), M6 (MS + 0. 1mg/L NAA + 0. 1mg/L 6-BA), M7 (MS + 0. 1mg/L NAA + 0. 15mg/L 6-BA), M8 (MS + 0. 1mg/L NAA + 0. 2mg/L 6-BA), 每瓶接 6 块茎或叶, 每个处理接 6 瓶, 每处理重复三次. 每天观察, 20d 后统计实验结果. 实验结果见表 4.

表 3 和表 4 结果显示, 使用 MS + 0. 1mg/L BA + 0. 1mg/L NAA 诱导愈伤组织效果最佳.

3.3 不定芽的诱导

当愈伤组织生长到 47d 左右时, 上面可以直接长出不定芽, M3、M4 虽然比 M2 出现愈伤组织少, 但 M3、M4 中的愈伤组织长不定芽的时间比 M2 早, 所以繁殖率低些. 继续培养观察不定芽生长情况, 79d 左右不定芽生长很好 (见图 1), 每块愈伤组织

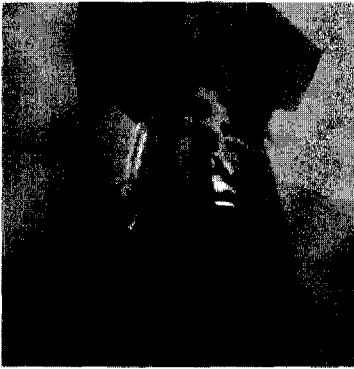


图 1 王不留行的不定芽 (75d 龄苗)

平均长不定芽 6 个以上,繁殖率达到 600% 以上. 经过观察,茎诱导的愈伤组织和叶诱导的愈伤组织长出不定芽的频率没有差异.

3.4 不定芽的生根

分别使用 1/2MS 培养基,附加不同浓度的 IBA 或 NAA 进行生根实验,20d 后的实验结果见表 5.

表 3 不同 NAA 浓度诱导愈伤组织的结果

	NAA (mg/L)	接种数量 (块)	接种 平均数	出现愈伤 组织数量(块)	出现愈伤 组织平均数(块)	出愈率	备注
M1	0.05	38	38	16 ± 2	17 ± 1	44.7%	
		39		17 ± 2			
		37		18 ± 1			
M2	0.1	37	37	28 ± 1	28 ± 1	75.7%	
		37		28 ± 2			
		37		27 ± 1			
M3	0.15	37	37	23 ± 2	24 ± 2	64.9%	基的两端长出愈伤组织的时间比叶边缘出现愈伤组织早.
		37		24 ± 2			
		37		24 ± 1			
M4	0.2	36	36	19 ± 2	19 ± 2	52.8%	
		36		21 ± 1			
		36		18 ± 2			

表 4 不同 6-BA 浓度诱导愈伤组织的结果

	6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)	接种数量 (块)	接种平均数 (块)	出现愈伤 组织数量(块)	出现愈伤 组织平均数(块)	出愈率
M5	0.05	0.1	36	36.3	25 ± 2	25 ± 2	68.9%
			36		25 ± 2		
			37		25 ± 1		
M6	0.1	0.1	36	36	35 ± 2	35 ± 1	97.2%
			36		34 ± 1		
			36		35 ± 2		
M7	0.15	0.1	36	36	31 ± 1	31 ± 1	86.1%
			36		30 ± 1		
			36		31 ± 2		
M8	0.2	0.1	36	37	27 ± 2	27 ± 2	73%
			38		27 ± 1		
			37		27 ± 2		

表 5 不定芽的生根结果

	IBA (mg/L)	接种数量 (株)	接种平均数 (株)	生根数 (株)	生根平均数 (株)	生根率
M9	0.1	15	15	0	0	0
		15		0		
		15		0		
M10	0.3	15	15	0	0	0
		15		0		
		15		0		
M11	0.5	15	15.3	3	3.3	21.6%
		15		3		
		16		4		
M12	0.7	15	15	4	4	26.7%
		15		4		
		15		4		
M13	NAA(mg/L) 0.05	15	15.3	6	5.7	37.3%
		16		5		
		15		6		
M14	0.1	15	15	10	10	66.7%
		15		9		
		15		11		
M15	0.15	15	15.3	15	14.3	93.5%
		16		14		
		15		14		
M16	0.2	15	15	11	9.7	64.7%
		15		9		
		15		9		

表5的实验结果表明不定芽生根时使用1/2MS + 0.15mg/L NAA 诱导植株生根最理想。

3.5 炼苗和移栽

30株经过炼苗后移栽28株成活(见图2),且长势良好,移栽时前3d注意保湿,移栽成活率达到90.3%。



图2 移栽15d后成活的幼苗

4 结论

经过实验,我们发现王不留行的组织培养过程中,在诱导愈伤组织和不定芽时,如果NAA浓度高于0.1mg/L,外植体长出的愈伤组织很快就长出不

定芽,这样就使愈伤组织增殖少,得到的不定芽数量就少些,所以我们提出王不留行的最优组织培养方案是:种子用0.1%升汞消毒8min,无菌湿脱脂棉催芽,MS + 0.1mg/LNAA + 0.1mg/L6-BA 诱导愈伤组织和不定芽,繁殖率达600%以上,1/2MS + 0.15mg/LNAA 诱导植株生根,经过炼苗后移栽,移栽时前3天注意保湿。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会, 中华人民共和国药典, 1995年版第一部[M]. 广州: 广东科技出版社, 1995, 50.
- [2] 黄莺, 范燕萍等. 石竹愈伤组织诱导及植株再生[J]. 华南农业大学学报(自然科学版), 2003, 24(1): 50.
- [3] 张春晓, 陈雪梅, 蒋湘宁. 宽叶石竹的组培与快繁[J]. 植物生理学通讯, 2004, 40(2): 198.
- [4] 唐蓉, 沈宁东. 香石竹试管苗瓶内生根试验[J]. 青海大学学报(自然科学版), 2000, 18(5): 10.
- [5] 欧阳志勤. 金铁锁的离体培养和快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2002, 38(4): 361.

(责任编辑: 叶 玲)

The Tissue Culture Procedure in the Chinese Traditional Medicine of *Vacaria Segetalis* (Neck) Carcke

BEN Ai-ling, CAI Xiao-ning, REN Yuan-hao, WANG Xiao-ting

(1. Department of Life Science, Nanjing Xiaozhuang University, Nanjing 210017, Jiangsu;

2. College of Life Science, Nanjing University, Nanjing 210093, Jiangsu)

Abstract: An experiment was conducted, which germinated sterile plantlet by the seeds, induced callus and adventitious shoots in MS media supplemented with 6-BA and NAA but induced roots in 1/2 MS media supplemented with IBA and NAA, and finally transplanted plantlet in *Vacaria Segetalis* (Neck) Carcke. The result showed that the fine tissue culture procedure was that 0.1% $HgCl_2$ was 8 min, the bud was germinated above the wet absorbent cotton under sterile condition, callus and adventitious shoots were produced on the stem and leaf piece in the MS media supplemented with 0.1mg/L NAA + 0.1mg/L 6-BA, and the new propagule was easy to root in the 1/2 MS media supplemented with 0.15mg/L NAA.

Key words: *Vacaria Segetalis* (Neck) Carcke; tissue culture