

Study on Cutting Propagation of *Tripterygium wilfordii*

REN Jiang-jian¹, YU Xu-ping¹, XIN Bo-yang², WANG Zhi-an¹

(1. Zhejiang Research Institute of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310023, China; 2. Zhejiang Deende Pharmaceutical CO. LTD, Xinchang 312560, China)

Abstracts The experiment of cutting propagation of *Tripterygium wilfordii* Hook. f. was carried out. It showed a better result when stems were instantly planted after being moistened or soaked by 500 ~ 1000 ppm IBA or NAA. A remarkably higher survival rate was achieved while plasticfilm and shade were accompanied. September and October or rainy June are prime moments for operation. It's recommendable to choose those newly corking twigs for cuttage.

Key words *Tripterygium wilfordii* Hook. f. ; Cuttage; Growth regulator

土贝母组织培养及植株再生

李翠芹^{1,2}, 王喆之²

(1. 西安交通大学医学院, 陕西西安 710061; 2. 陕西师范大学生命科学学院, 陕西西安 710062)

摘要 用土贝母茎段和叶片作外植体培养, 可获得大量的试管苗。茎段愈伤组织诱导的最佳培养基为 MS + 2,4-D 2.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L + BA 1.0 mg/L (单位下同); 叶片愈伤组织诱导的最佳培养基配方为 MS + 2,4-D 0.5 + NAA 2.0。叶片接入 MS + BA 3.0 + NAA 1.0 培养基可直接产生不定芽; 愈伤组织用 MS + BA 2.0 + IAA 1.0 培养基也可产生不定芽。MS + BA 2.0 + IAA 0.1 适于腋芽发育、增殖。壮苗生根培养基为 1/2 MS + IBA 1.0。诱导愈伤组织和不定芽, 选用 pH 6.0, 琼脂 0.8% ~ 1.0%; 诱导生根选用 pH 5.8, 琼脂 0.6% ~ 0.7%。经炼苗后, 组培苗移栽成活率达 90%。

关键词 土贝母; 组织培养; 快速繁殖

中图分类号: R282.2 **文献标识码**: B **文章编号**: 1001-4454(2006)03-0209-03

葫芦科土贝母 *Bolbostemma paniculatum* (Maxim) Franquet 鳞茎供药用, 主治乳腺炎、疮疖痈肿、淋巴结核、骨结核, 外敷可消肿止血。土贝母皂苷 (tubeimoside) 是从土贝母的鳞茎中提取分离的一类三萜皂苷, 用于治疗各种皮肤疣, 药理研究显示具有抗病毒作用^[1]。其中土贝母皂甲 (tubeimoside I) 对神经胶质细胞瘤、胰腺癌、宫颈癌和尖锐湿疣均有疗效, 是当今公认的较好的抗肿瘤和抗病毒活性成分之一^[2-4]。本文报道土贝母组织培养方法, 以建立相应的植株再生系统。

1 材料与方法

土贝母采自本校园内栽培的植株, 经陕西师范大学生命科学学院植物分类学教研室田宪华教授鉴定为 *Bolbostemma paniculatum* (Maxim) Franquet。以幼嫩茎段和叶片为外植体, 以 MS 为基本培养基, 附加各种植物生长物质。

取茎段和叶片, 洗洁剂清洗干净, 流水冲洗约 2 h, 0.1% HgCl₂ 常规灭菌 10 min, 无菌水冲洗 4 ~ 5 次, 无菌滤纸吸干。

1.1 愈伤组织诱导培养基筛选 将茎切成约 0.5 cm 长的切段, 叶片切成 0.5 × 0.5 cm² 的小块, 接种在附加不同植物生长物质的 MS 培养基上培养。每处理接种 50 瓶, 每瓶接种外植体 1 块。培养基中加蔗糖 3%, 琼脂 0.7%, pH 5.8 ~ 6.0, 培养室温度 25 ± 2℃, 光照 14 h/d, 光照强度 2000 ~ 3000 Lx (下同)。5 d 后观察统计。

1.2 不定芽分化培养基筛选 将叶片诱导得到的愈伤组织块切成约 1.0 cm² 见方的小块转接入各种分化培养基, 10 天后统计芽的分化情况。

1.3 生根培养基筛选 待丛生芽长到 2 ~ 3 cm 时, 切下粗壮芽条, 转接到生根培养基。15 天后统计生根情况。

1.4 试管苗驯化与移栽 试管苗生根后, 自然光下驯化 2 d, 打开器皿盖, 练苗 3 ~ 5 d 后, 用清水洗去根部培养基, 并剔除异常苗, 植于盛有蛭石的营养钵, 集中放置在塑料大棚内。待小苗生长健壮后, 定植于大田。

2 结果

作者简介: 李翠芹 (1970-), 女, 讲师, 在读博士

2.1 愈伤组织的产生及形态 愈伤组织诱导见表1。所有愈伤组织,分为两类:第一类为乳白色或黄色,疏松易碎,生长速度快;第二类为翠绿色或绿色,紧密坚实,生长速度缓慢。从表1中可见,茎段愈伤组织产生时间早于叶片;茎段在供试培养基的组合中都能诱导产生愈伤组织,而叶片在单独使用BA、ZT、NAA以及2,4-D、NAA与BA的组合中不能诱导产生愈伤组织,BA与ZT使叶片黄化,玻璃化;单独使用2,4-D、NAA或者二者的组合虽能诱导茎段产生愈伤组织,但10 d以后就分化毛状根,而且二者

同时使用时毛状根生长非常旺盛;茎段在2,4-D以及2,4-D与NAA的组合中诱导的愈伤组织在15 d以后也有毛状根产生。以上所产生的愈伤组织都为第一类愈伤组织。BA与NAA的组合既能诱导茎段又能诱导叶片产生愈伤组织,并且两类愈伤组织都有。12种培养基中,以幼茎段为外植体、MS+2,4-D 2.0+NAA 0.5+BA 1.0为培养基,以叶片为外植体、MS+2,4-D 0.5+NAA 2.0为培养基,愈伤组织的诱导率及生长速度均较理想,诱导率达100%,适宜于土贝母愈伤组织诱导。

表1 土贝母愈伤组织诱导与植物生长素

植物生长物质(mg/L)				时间(d)		茎段		叶片	
2,4-D	NAA	BA	ZT	茎段	叶片	成愈数	诱导率/%	成愈数	诱导率/%
2.0				7	12	45	90	50	100
2.0	0.5			7	15	45	90	25	50
2.0	0.5	1.0		6	-	50	100	-	-
	2.0			7	-	46	93	-	-
0.5	2.0			7	12	47	94	50	100
0.5	2.0	1.0		6	-	50	100	-	-
	1.0	5.0		6	12	50	100	50	100
	2.0	5.0		6	12	50	100	50	100
	0.8	1.0		7	14	50	100	40	80
	0.4	1.0		7	14	50	100	41	81
		3.0		8	-	50	100	-	-
			3.0	10	-	50	100	-	-

2.2 不定芽愈伤组织诱导及继代培养 将第一类乳白色疏松易碎状愈伤组织转入MS+BA 2.0+IAA 1.0的培养基上继代培养,培养过程中,愈伤组织形态发生了一些新的变化。第一次继代培养过程中,原乳白色愈伤组织逐渐变绿,在绿色愈伤组织上又长出新的浅绿色较致密的愈伤组织团块。这种愈伤组织经进一步继代培养约30天后产生不定芽。新的可产生不定芽的愈伤组织在转移到MS+2,4-D 2.0+NAA 0.5+BA 1.0的培养基上进一步继代培养又可产生疏松状的愈伤组织,二者可以互相转化。将土贝母茎段、叶片接入MS+BA(1.0~3.0)+NAA(0.2~1.0)的培养基上都能长出两类愈伤组织,继代培养后,未见有芽点分化。而将NAA换为IAA后,则不仅能诱导愈伤组织发生,而且在MS+BA 2.0+IAA 1.0的培养基上能诱导其分化出小芽点,并长大为无根苗。

2.3 器官分化和植株再生 为找出最佳培养基和最适培养条件,采用正式试验法设计了用于不同培养目的的培养基成分。经多次筛选后的培养基组成见表2。土贝母在筛选后的各种培养基上均可生长,将叶片接入MS+BA 3.0+NAA 1.0的培养基上

表2 培养基成分及土贝母生长状况

用途	基本培养基	植物生长物质(mg/L)					生长状况
		BA	ZT	NAA	IAA	IBA	
芽诱导							
叶片	MS	3.0		1.0			不定芽少,健壮
愈伤组织	MS	2.0			1.0		不定芽多,健壮
嫩芽	MS	3.0					腋芽多,健壮
芽繁殖	MS	2.0			0.1		芽生长较快,数目多
	MS	2.0					芽生长快,数目多
	MS		2.0				芽生长快,数目少
	MS		2.0		0.1		芽生长较快,数目少
根诱导	MS						根数目少,生长较慢
	1/2MS						根数目多,生长快
	1/2MS					1.0	根数目多,生长较快

15 d左右由叶片不经愈伤组织直接产生不定芽。由叶片诱导的愈伤组织在MS+BA 2.0+IAA 1.0的培养基上10 d左右开始出现不定芽,嫩芽只加细胞分裂素就可以形成芽丛。由叶片直接产生或经愈伤组织产生的不定芽的芽段在MS+BA 2.0+IAA 0.1的培养基上反复扦插,促进腋芽发育,可加快试管苗的繁殖。将腋芽和不定芽切下转入1/2MS+IBA 1.0的培养基上,15 d后,50%芽的基部生根而成苗。

2.4 pH值和琼脂浓度的诱导效应 以叶片为外植体研究了pH值和琼脂浓度对土贝母培养结果的影响,结果(见表3、4)表明:培养基的pH值和琼脂浓度不合适,叶片黄化、玻璃化。诱导愈伤组织及不定芽,选用pH 6.0,琼脂0.8%~1.0%;诱导生根选用pH 5.8,琼脂0.6%~0.7%。

表3 pH值与诱导结果

pH值	愈伤组织诱导	不定芽诱导	根诱导
5.6	叶片黄化、玻璃化	不产生不定芽	不生根
5.8	叶片黄化、玻璃化	不产生不定芽	生根
6.0	产生愈伤组织	产生不定芽	生根慢、根数少

表4 琼脂浓度与诱导结果

琼脂浓度 (%)	愈伤组织诱导	不定芽诱导	根诱导
0.6	叶片黄化、玻璃化	不产生不定芽	生根
0.7	叶片黄化、玻璃化	不产生不定芽	生根
0.8	产生愈伤组织	产生不定芽	生根慢、根数少
0.9	产生愈伤组织	产生不定芽	不生根
1.0	产生愈伤组织	产生不定芽	不生根

2.5 生长素对土贝母试管苗生根的影响 土贝母试管苗接种在含有不同浓度2,4-D的培养基中,经一周左右的培养,可见其基部切口处产生大量乳白色疏松的愈伤组织,未见不定根发生。只有浓度较低(0.2 mg/L)时,才有少量的试管苗可以生根,但均较对照低。表现出2,4-D对不定根的生长具有明显的抑制作用。

在含有IBA或IAA的培养基中,试管苗接种10 d后,可见基部稍有膨大,进而直接产生不定根,且生根率、生根条数及根长均比对照高,表现出IBA和IAA对试管苗不定根的发生及发育具有促进作用。将试管苗接种在含有NAA的培养基中,10 d后试管苗基部先形成愈伤组织,进而由愈伤组织分化出不定根,但不定根与茎连接疏松,移栽时易于脱落。

2.6 试管苗移栽 应用常规练苗法,土贝母组试管苗的移栽成活率为90%。

3 讨论

土贝母茎段和叶片外植体的愈伤组织诱导存在较明显的差异。以幼茎段在MS+2,4-D 2.0+NAA 0.5+BA 1.0的培养基上和以叶片在MS+2,4-D 0.5+NAA 2.0的培养基上适宜愈伤组织的诱导。不定芽的分化能力除与愈伤组织块的质量有关外,也与培养基的植物生长物质种类和浓度有关,选用MS+BA 2.0+IAA 1.0,不仅分化率高,且芽条粗壮。而适合于芽条发根的1/2 MS培养基附加IBA 1.0,生根情况较理想。

舒适坤等^[5]用土贝母嫩芽、茎段、叶片作外植体,在MS+BA 0.2+NAA 1.0+卅烷醇0.2的培养基上,通过愈伤组织分化出再生植株。笔者用叶片作外植体,在MS+BA 3.0+NAA 1.0上培养,可直接形成小芽。另外,用外植体嫩芽可直接诱导形成芽丛,有利于保持其遗传稳定性。

参 考 文 献

- [1] 胥戈. 土贝母化学成分及药理研究概论. 时珍国药研究, 1992, 3(4): 183.
- [2] Lijian Yu, Rundi Ma, Tingxi Yu. Induction of morphological and functional differentiation of human promyelocytic leukemia cells (HL-60) by Tubeimoside I. *Planta Medica*, 1996, 62: 119.
- [3] 李笑弓, 南勋义. 中药土贝母对人肾细胞癌影响的实验研究. 中华泌尿外科杂志, 1997, 18(8): 503.
- [4] 李兴华, 王朋, 付章才, 等. 土贝母皂甙A对实验动物免疫功能的影响. 中国药房, 1998, 9(1): 13.
- [5] 舒适坤, 舒迎澜. 土贝母的组织培养. 植物生理学通讯, 1986, (1): 42.

(2005-05-08 收稿)

Tissue Culture and Plant Regeneration of *Bolbostemma paniculatum*

LI Cui-qin^{1,2}, WANG Zhe-zhi²

(1. School of Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China; 2. College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

Abstract The tissue culture and plant regeneration of *Bolbostemma paniculatum* were studied and a large number of regenerated plantlets were obtained. The optimal compounding of medium that induced calli from stems and leaves were the MS medium supplemented with 2,4-D 2.0 mg/L, NAA 0.5 mg/L and BA 1.0 mg/L and the MS medium with 2,4-D 0.5 mg/L and NAA 2.0 mg/L, respectively. Numerous shoots could formed directly when leaf explants were cultured on the MS medium with BA 3.0 mg/L and NAA 1.0 mg/L and calli were cultured on the MS medium with BA 2.0 mg/L and IAA 1.0 mg/L. The MS medium supplemented with BA 2.0 mg/L, IAA 0.1 mg/L was optimal for shoots growth. For the root growth was 1/2MS medium with 1.0 mg/L IBA. At pH 6.0 and 0.8%-1.0% agar was optimal for callus and shoot formation, while pH 5.8 and 0.6%-0.7% agar was optimal for root formation. The tube seedling can be successfully transplanted.

Key words *Bolbostemma paniculatum*; Tissue culture; Rapid propagation