

祁术的组织培养及快速繁殖技术研究

胡长玉, 叶玉娟, 郝祥霞, 胡 跃

(黄山学院 生命与环境科学学院, 安徽 黄山 245041)

摘 要:为研究祁术的组织培养及快速繁殖技术,选用祁术的叶片和下胚轴为外植体材料,接种于附加植物生长调节剂NAA,6-BA及其组合的MS固体培养基上。结果表明:下胚轴为外植体明显好于叶片,对于愈伤组织形成,叶片采用MS+NAA(0.5mg/L)+6-BA(2mg/L);下胚轴MS+NAA(0.5mg/L)+6-BA(2mg/L);MS+NAA(0.5mg/L)+6-BA(1mg/L)为宜。对于叶片丛生芽愈伤组织培养基用MS+NAA(0.2mg/L)+6-BA(2.8mg/L),下胚轴丛生芽愈伤组织培养基用MS+NAA(0.01mg/L)+6-BA(0.1mg/L);MS+NAA(0.05mg/L)+6-BA(0.1mg/L)为宜,诱导生根以1/2MS+NAA0.3mg/L最佳,生根率达95%以上。

关键词:祁门白术;组织培养;植株再生

中图分类号:S567.23 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-447X(2006)05-0057-04

白术(*Atractylodes macrphala* Koidz)为双子叶植物菊科(Composita)苍术属植物白术的干燥根茎,^{[1]284-294}祁术是白术的一种,多野生,为多年生宿根植物,因品种特别,产于祁门而得名。医学研究表明,祁术的作用除具有一般白术健胃、益胃、止泻、养神、安胎、消除疲劳等功效外,对黄疸病人、心脏病、胃溃疡及腹水病人的康复十分有效,是道地药材。^[2]本文通过以祁术叶片、下胚轴为外植体进行组织培养及快速繁殖的研究,^[3]为其建立最佳培养环境,筛选方案,实现它的可持续性发展。

1 材料和方法

1.1 材料

实验材料采用野生祁门白术植株种子(祁门县新安乡红旗岭),于2004年11月采收,经2004年12月准备,无菌培养发芽,以叶片和下胚轴为外植体。

1.2 材料处理(无菌苗的获得)

祁术的种子,在酒精灯上通过火焰除去种子上的微绒毛,去污粉洗净,用两层纱布包好,流水冲洗

3小时,在超净工作台上经75%酒精消毒30s后,用1%的HGCL₂消毒3-4min,用无菌水反复冲洗的5-8遍后,用无菌纱布吸干水分,接种在1/2MS+GA₃1mg/L上,发芽10-15天后,转接于1/2MS培养基培养10-15天,于超净工作台上,切下叶片0.1-1cm²左右、下胚轴长1cm左右,即可用于接种。接种实验于2005年1月30日开始进行。

1.3 培养条件。

1.3.1 培养基

(1)无菌苗种子培养基

1/2MS+GA₃1mg/L+15g/L+0.8%琼脂;1/2MS。

(2)愈伤组织诱导培养基:

叶片:①MS+6-BA(2mg/L)+NAA(0.5mg/L);②

MS+6-BA(1mg/L)+NAA(0.5mg/L);③MS+6-BA(0.5mg/L)+NAA(0.3mg/L);④MS+6-BA(0.5mg/L)+NAA(0.5mg/L);⑤MS+6-BA(0.1mg/L)+NAA(0.3mg/L);⑥MS+6-BA(2mg/L)。下胚轴:①MS+6-BA(2mg/L)+NAA(0.5mg/L);②MS+6-BA(0.5mg/L)+NAA(0.5mg/L);③MS+6-BA(0.1mg/L)+NAA(0.3mg/L);④MS+6-BA(1mg/L);⑤MS+6-BA(0mg/L)+NAA

(0mg/L)。



图1 无菌苗的培养

(3)丛生芽增殖培养基:

叶片: ①MS+6-BA (2mg/L)+NAA (0.2mg/L); ②MS+6-BA (2.4mg/L)+NAA (0.2 mg/L); ③MS+6-BA (2.8mg/L)+NAA (0.2 mg/L); ④MS+6-BA (3.2mg/L)+NAA (0.2 mg/L); ⑤MS+6-BA (3.6mg/L)+NAA (0.2 mg/L)。

下胚轴: ①MS+6-BA (0.1mg/L)+NAA (0.1mg/L); ②MS+6-BA (0.1mg/L)+NAA (0.01mg/L); ③MS+6-BA (0.1mg/L)+NAA (0.05mg/L); ④MS+6-BA (0.5mg/L)+NAA (0.05mg/L)。

(4)生根培养基:1/2MS+NAA0.5mg/L

以上各培养基蔗糖为 30g/L, 加 0.8%琼脂固化, pH在灭菌前为 6.0。

1.3.2 培养条件

培养温度为 25℃ 左右, 光照时间 14-16h/d, 光照强度为 1500-1800lx

1.4 培养方法

(1)愈伤组织诱导:将无菌培养的叶片正面向上置于诱导分化培养基上,每瓶接种 1-4 片,下胚轴按形态学方向向上插入诱导分化培养基上, 每瓶接种 3-6 个。

(2)丛生芽增殖生长:将已分化的丛生芽移入丛生芽增殖培养基中培养, 可形成密集小芽苗,30 天左右长大约 2-3cm。

(3)试管苗生根培养:将培养的小芽转至生根培养基中继续培养。

(4)炼苗移栽:试管苗长至 5-6cm 左右时,首先在自然光下封口炼苗 7-10 天, 然后掀去封口膜,移至装有珍珠岩、桉石、营养土(1:1:10)混合的塑料杯中培养,放在遮阴处,每天喷雾一次,要通风。10 天后移至室外,罩上防虫网,每天喷一次水,20 天后栽到室外就能自然生长,移栽成活率可达 95%以上。

1.5 实验测定

每 3d 观察统计一次外植体的生长状况,除去接种后污染的培养基并记录;测定愈伤组织出现的时间、愈伤组织、出芽、出芽率=出芽个/接种、不定芽增殖率和根生长状况。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织与芽的诱导分化

2.1.1 叶片的分化状况

叶片在接种 3 天后开始伸展,长大明显,随后逐渐出现拱起,颜色变淡失绿,20 天后在子叶切口边缘处开始出现白色点状的愈伤组织,28-30 天,部分在④MS+6-BA (0.5mg/L)+NAA (0.5mg/L);⑤MS+6-BA (0.1mg/L)+NAA (0.3mg/L)中的材料,愈伤组织表面出现白色隆起,生出白色的不定根,不定根表面有白色绒毛覆盖,此后,愈伤组织增大不明显,不定根分化逐渐增多,没有芽丛出现。其他愈伤组织 30-45 天后,可形成小颗粒状愈伤组织,形成 5-8 个芽丛,与文献[4]中结果相近。



图2 下胚轴的培养



图3 叶片的培养

2.1.2 下胚轴的分化状况

下胚轴接种 6-7 天后,形态学下端切口处开始膨大,10-15 天后膨大明显,而形态学上端变化不明显(见图 3),随后白色逐渐变成灰褐色再到绿色,2 周后,表面出现绿白色腐状物;3-4 周后,可观察到丛生丝状体的出现;约 5-7 周后,每个外植体上可形成 5-8 个株芽。(如图 4,5)

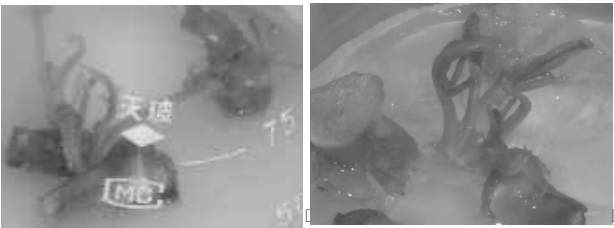


图 4,5 外植体上可形成 5-8 个株芽

2.1.3 不同外植体愈伤组织和芽分化的比较

用叶片和下胚轴都能诱导愈伤组织并分化出芽,但不同的外植体形成愈伤组织和芽分化所需时

间、分化速度、芽的数量都存在差异(见表1)。由表1可知,以下胚轴为外植体,出现愈伤组织时间短、形成愈伤组织数多、诱导率高、且分化芽数也多,因此祁白术的组织培养最佳外植体是下胚轴。

表 1 祁白术不同外植体的愈伤组织与芽分化的比较 *

外植体	接种数	出现愈伤组织时间(d)	外植体形成愈伤组织数	诱导率	分化的芽数
叶片	63	20	23	36.5(%)	115
下胚轴	63	15	56	88.88(%)	365

*:选取培养基{MS+6-BA(2mg/L)+NAA(0.5mg/L)}的外植体培养 45d 后统计

2.1.4 生长调节剂浓度不同的培养基对愈伤组织形成和芽分化的影响

叶片和下胚轴在所配制的培养基上均能诱导出现愈伤组织和分化出芽,结果见(表2,表3);其中叶片以MS+NAA(0.5mg/L)+6-BA(2mg/L);下胚轴以MS+NAA(0.5mg/L)+6-BA(2mg/L);MS+NAA(0.5mg/L)+6-BA(1mg/L)为宜。

表 2 生长调节剂浓度不同的培养基对祁白术叶片愈伤组织形成和分化的影响

培养基编号	激素组合 NAA + 6-BA (mg/L)	接种数	出芽的外植体数	出芽率 %
①	0.5 2	36	12	33.33
②	0.5 1	36	8	22.22
③	0.3 0.5	36	有不定根出现	0
④	0.5 0.5	36	有不定根出现	0
⑤	0.3 0.1	36	有不定根出现	5.56
⑥	0 2	36	0	0

表 3 生长调节剂浓度不同的培养基对祁白术下胚轴愈伤组织形成和分化的影响

培养基编号	激素组合 NAA + 6-BA (mg/L)	接种数	出芽的外植体数	出芽率 %
①	0.5 2.0	30	28	93.33
②	0.5 1.0	30	27	90.00
③	0.5 0.5	30	24	80.00
④	0.3 0.5	30	26	86.67
⑤	0.3 0.1	30	2	6.67
⑥	0 2.0	30	8	26.67

2.2 丛生芽生长

将已分化的丛生芽移入 1.3.1(3)中丛生芽培养基中培养,结果(表4,5)与文献[5]结果接近;叶片丛生芽愈伤组织培养基用MS+NAA(0.2mg/L)+6-BA(2.8mg/L),下胚轴丛生芽愈伤组织培养基用MS+NAA(0.01mg/L)+6-BA(0.1mg/L);MS+NAA(0.05mg/L)+6-BA(0.1mg/L)为宜。

2.3 生根诱导及壮苗移栽

2.3.1 生根诱导

表 4 生长调节剂不同浓度的培养基对祁白术叶片丛生芽生长的影响

培养基	愈伤组织块数	成苗率(%)	生长状况
① MS+6-BA2+NAA0.2	28	70	++
② MS+6-BA2.4+NAA0.2	30	75	++
③ MS+6-BA2.8+NAA0.2	34	85	+++
④ MS+6-BA3.2+NAA0.2	33	82.5	+++
⑤ MS+6-BA3.6+NAA0.2	28	70	++

表 5 生长调节剂不同浓度的培养基对祁白术下胚轴丛生芽生长的影响

培养基	愈伤组织块数	成苗率	生长状况
① MS+6-BA0.1+NAA0.1	33	82.5	++
② MS+6-BA0.1+NAA0.01	34	85	+++
③ MS+6-BA0.1+NAA0.05	36	90	+++
④ MS+6-BA0.5+NAA0.05	36	90	++

注: +、++、+++ 分别表示生长较弱、较强、强。

将高 2—3cm 的苗转入生根培养基中,培养基用 1/2MS+NAA0.5mg/L,10 天后开始发根,20 天后,每株可长出 4—8 条须根的发达根系,生根率达 95% 以上。

2.3.2 壮苗移栽

移栽前,首先在自然光下封口炼苗 7—10 天,然后取出,洗去培养基,栽至装有珍珠岩、蛭石、营养土(1:1:10)混合的塑料袋中,注意遮荫,保湿,通风。移栽后的苗能正常生长,移栽成活率可达 95% 以上。

3 结果与讨论

试验结果表明:用祁术的下胚轴和叶片作为外植体均能诱导出愈伤组织,但叶片出现愈伤组织后不易分化出芽,而下胚轴在愈伤组织的形成及分化方面时间都较早、速度快、诱导率高、形成芽数多,作为外植体进行快速繁殖宜用祁术的下胚轴。用下胚轴诱导时,无论正置或倒置在培养基上,形成的愈伤组织总是在形态学下端。因此,在实践中可考虑将下胚轴平放于培养基上,这样可能会有利于形态学上、下端均产生愈伤组织;另外祁术下胚轴培养诱导出现的极性与内源生长素的极性现象相似,[6]而且外源生长素浓度过高会导致丛生芽出现玻璃化(如叶片MS+6-BA3.6+NAA0.2,成苗率下降),这里内源与外源生长激素之间的作用有什么关系,有待于进一步研究。通过试验研究表明,最佳愈伤组织诱导培养基用MS+6-BA(0.5—2mg/L)+NAA0.5mg/L+蔗糖30g/L+琼脂0.8%,丛生芽生长培养基为MS+6-BA1.5mg/L+蔗糖30g/L+琼脂0.8%。培养的最佳条件为25摄氏度左右,光照强度为1500—1800lx,时间为14—16h/d,对比实验显示,一年生组育苗的生长明显比



图6 一年生组胚芽与两年生种子苗

(野生祁白术一般需4-5年才能收获)。

致谢：在实验设计和实验操作中得到生物系房江育博士、马雪龙老师指导和参与,在此致谢!

参考文献:

- [1]张伯叟.中医内科学(第三版)[M].上海:上海科技出版社,1987.
- [2]张慧冲,胡长玉,胡晓倩.祁白术结实率及发芽率的研究[J].黄山学院学报,2004.(6)
- [3]沈惠娟.本本植物组织培养技术[M].北京:中国农业科技出版社,1992.10-20.
- [4]高贵珍,张兴桃,刘小阳,庞伟.三角紫叶酢浆草的组织培养及快速繁殖[J].植物资源与环境学报,2004.21(1):62-63.
- [5]柳福智,董娟娥等.不同生长调节物质对丹参愈伤组织的诱导效应[J].中国农学通报,2005,21(11):202-204.
- [6]潘瑞帜等.植物生理学(第五版)[M].北京:高等教育出版社,2005.
- [7]马雪龙,胡长玉,房江育.野生中药祁术人工栽培基质的筛选[J].中国农学通报,2005,21(11):241-243.

Study on *Atractylodes macrocephala* Koidz By Tissue Culture and Rapid Propagation

Hu Changyu, Ye Yujuan, Hao Xiangxia, Hu Yue

Abstract:For the study on the rapid propagation of *Atractylodes macrocephala* Koidz,the aseptic inferior embryo spindles and leaves were used as explants cultured in solid medium MS supplemented with NAA,6-BA or combinations of plant growth regulators with different concentrations .The results showed that Better results could be obtained by the inferior Embryo spindle; the optimum combination was MS+NAA(0.5mg/L)+6-BA(2mg/L) for the leaves, MS+NAA(0.5mg/L)+6-BA(2mg/L) for the inferior embryo spindle; for bud increasing, the leaf is MS+NAA(0.2mg/L)+6-BA(2.8mg/L),and the inferior embryo spindle is MS+NAA(0.01mg/L)+6-BA(0.1mg/L);for the increasing of root, we should use 1/2 MS+NAA(0.5mg/L) ,and the effect can reach more than 95%.

Key words:*Atractylodes macrocephala* Koidz;tissue culture;