

知母组织培养的初步研究

洪森荣, 尹明华*

(上饶师范学院 生命科学学院, 江西 上饶 334001)

摘要:目的 以知母种子为试验材料, 对知母的组织培养进行了初步研究, 以期建立知母的再生体系。方法 采用植物组织培养和单因子试验的方法对知母无菌体系的建立、分蘖芽的增殖、分蘖愈伤组织的诱导和再分化以及再生苗的移栽进行研究。结果 知母种子最佳的消毒方式是 75% 酒精处理 30 s 后用 0.1% HgCl₂ 处理 15 min; 知母分蘖芽增殖的最佳培养基是 MS+ KT 1 mg/L+ NAA 0.5 mg/L; 知母分蘖愈伤组织诱导的最佳培养基是 MS+ KT 2 mg/L+ NAA 0.5 mg/L; 知母愈伤组织再分化的最佳培养基是 MS+ KT 2 mg/L+ NAA 0.1 mg/L; 知母愈伤组织再生芽最佳的生根培养基是 1/2MS+ NAA 0.5 mg/L; 知母试管苗最佳的移栽基质是腐殖土。结论 本实验建立了知母的再生体系, 为知母试管苗的工厂化生产奠定了技术基础。

关键词: 知母; 组织培养; 分蘖; 愈伤组织; 再生

中图分类号: R282.6

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)11-1886-04

Preliminary study on *Anemarrhena asphodeloides* tissue culture

HONG Senrong, YIN Minghua

(College of Life Sciences, Shangrao Normal University, Shangrao 334001, China)

Abstract: **Objective** The tissue culture of *Anemarrhena asphodeloides* was preliminarily studied to establish *A. asphodeloides* regeneration system. **Methods** The establishment of *A. asphodeloides* sterile system, tiller bud proliferation, tiller callus induction and its re-differentiation as well as transplanting of regenerated plantlets were studied by plant tissue culture and single factor test method. **Results** The best disinfection way of *A. asphodeloides* seeds was firstly dealt with 75% ethanol for 30 s and then dealt with 0.1% HgCl₂ for 15 min; The best medium of bud proliferation for *A. asphodeloides* tillers was MS+ KT 1 mg/L+ NAA 0.5 mg/L; The best medium of *A. asphodeloides* tiller callus induction was MS+ KT 2 mg/L+ NAA 0.5 mg/L; The best medium of *A. asphodeloides* tillers callus redifferentiation was MS+ KT 2 mg/L+ NAA 0.1 mg/L; The best rooting medium of *A. asphodeloides* callus regeneration buds was 1/2 MS+ NAA 0.5 mg/L; The best transplanting substrate of *A. asphodeloides* plantlets was humus soil. **Conclusion** The regeneration system of *A. asphodeloides* is established, which provides a technological basis for factory production of *A. asphodeloides* plantlets.

Key words: *Anemarrhena asphodeloides* Bunge; tissue culture; tillers; callus; regeneration

知母 *Anemarrhena asphodeloides* Bunge 为百合科知母属(单种属)多年生宿根植物, 广布温带地区, 多为野生^[1]。知母为常用中药, 以干燥根茎入药。知母性味苦、甘、寒, 归肺、胃、肾经^[2]。主要功能为清热泻火, 生津润燥, 用于外感热病、高热烦渴、肺热咳嗽、骨蒸潮热、内热消渴、肠燥便秘^[3]。知母的化学成分主要为甾体皂苷、双苯吡酮类、木脂素类、多糖类等, 活性成分主要是甾体皂苷和芒果苷^[4]。知母皂苷能抑制血小板聚集, 改善大鼠脑缺

血再灌注损伤^[4]。芒果苷是知母清热作用的主要有效成分, 同时具有抗炎、抗病毒、抗氧化、利尿、预防肥胖等作用^[5]。目前关于知母的研究, 主要集中在知母的化学成分^[4]、药理作用^[6-7]、生殖生物学^[8]、资源调查^[9]和栽培管理^[10-11]等方面, 而关于知母组织培养的研究, 国内研究极少, 郭晋华等^[12]对知母胚轴试管苗的诱导进行了研究; 李宝平等^[13]利用知母叶片诱导出了愈伤组织, 并分化出大量再生植株; 梁玉玲等^[14]研究了知母悬浮培养条件下的体细胞胚

①收稿日期: 2010-02-18

基金项目: 上饶师范学院 2010-2011 年度院级科技项目

作者简介: 洪森荣, 男, 硕士, 讲师, 研究方向为植物生物技术。E-mail: hongsenrong@163.com

* 通讯作者 尹明华, 女, 硕士, 研究方向为生物技术。E-mail: yinminghua@163.com

胎发生,并对体胚发育过程进行了观察。但有关知母再生体系的研究缺乏系统报道。本研究在建立知母种子萌发无菌苗的基础上,探讨植物生长调节剂等因素对知母植株分蘖增殖及其愈伤组织诱导和再生的影响,为其试管苗的工厂化生产提供理论依据和技术基础。

1 材料与方法

1.1 材料:知母种子由浙江省景宁县梧桐乡药材专业合作社提供,由上饶农业科学研究所何长水研究员鉴定。

1.2 知母种子的预处理:挑选无病虫害、健壮饱满的知母种子用饱和洗衣粉浸泡 20 min 左右,取出后再用自来水反复冲洗数次,备用。

1.3 知母种子的消毒:将预处理过的外植体用 4 种不同的消毒方式进行灭菌。第 I 方式:75% 酒精消毒 30 s;第 II 方式:75% 酒精消毒 30 s 后用 0.1% HgCl₂ 消毒 10 min;第 III 方式:75% 酒精消毒 30 s 后用 0.1% HgCl₂ 消毒 15 min;第 IV 方式:75% 酒精消毒 30 s 后用 0.1% HgCl₂ 消毒 20 min。灭菌过程中轻轻搅拌种子使灭菌更加彻底,每次灭菌后均用无菌水冲洗 3~4 次,再用灭菌滤纸片将种子的水分吸干,最后将种子接种到装有 1/2 MS 的固体培养基上,每天观察并记录知母种子的污染和萌发情况。第 30 天时统计知母种子的污染率和萌发率。

污染率= (污染的种子数/接种的总种子数) × 100%

萌发率= 萌发的种子数/接种的总种子数 × 100%

1.4 知母分蘖的芽增殖:从知母无菌苗上切离带芽分蘖(1.5~2 cm)接种至增殖培养基上。增殖培养基成分如下:MS; MS+ KT 1 mg/L+ NAA 0.1 mg/L; MS+ KT 1 mg/L+ NAA 0.5 mg/L; MS+ KT 1 mg/L+ NAA 1 mg/L。所用培养基中蔗糖量均为 30 g/L,冷凝脂(购于北京振泰园艺设施公司)质量浓度均为 7.5 g/L, pH 5.8~6.0。光照时间:12 h/d;光照强度:1 000~2 000 lx;温度(25±1)℃。每天观察并记录知母分蘖的芽增殖情况,第 30 天时统计试管苗的新生芽数、根数、根长和株高。

1.5 知母分蘖愈伤组织的诱导:将知母带芽分蘖(0.5~1.5 cm)从增殖培养基上切下来,接种于愈伤组织诱导培养基上。愈伤组织诱导培养基成分如下:MS; MS+ KT 2 mg/L+ NAA 0.1 mg/L; MS+ KT 2 mg/L+ NAA 0.5 mg/L; MS+ KT 2 mg/L+ NAA 1 mg/L。所用培养基中蔗糖质量浓度均为 30 g/L,冷凝脂质量浓度均为 7.5 g/L, pH 5.8~6.0。黑暗培养;温度:(25±1)℃。每天观察并记

录知母分蘖愈伤组织的诱导情况,第 30 天时统计知母分蘖的出愈率。

出愈率= 出愈的分蘖数/接种的总分蘖数 × 100%

1.6 知母分蘖愈伤组织的再分化:将知母愈伤组织在最佳诱导培养基上继代 2 次,然后接种于愈伤组织分化培养基上。愈伤组织分化培养基成分如下:MS; MS+ KT 2 mg/L+ NAA 0.1 mg/L; MS+ KT 2 mg/L+ NAA 0.5 mg/L; MS+ KT 2 mg/L+ NAA 1 mg/L。所用培养基中蔗糖质量浓度均为 30 g/L,冷凝脂质量浓度均为 7.5 g/L, pH 5.8~6.0。光照时间:12 h/d;光照强度:1 000~2 000 lx;温度(25±1)℃。每天观察并记录知母分蘖愈伤组织的再分化情况,第 30 天时统计知母愈伤组织的出芽率。

出芽率= 出芽的愈伤组织块数/接种的总愈伤组织块数 × 100%

1.7 知母分蘖愈伤组织再生芽的生根:将知母愈伤组织的再生芽从分化培养基上切离下来,接种于生根培养基上。生根培养基成分如下:1/2MS; 1/2MS+ NAA 0.1 mg/L; 1/2MS+ NAA 0.5 mg/L; 1/2MS+ NAA 1.0 mg/L; 1/2MS+ NAA 1.5 mg/L。所用培养基中蔗糖质量浓度均为 30 g/L,冷凝脂量均为 7.5 g/L, pH 5.8~6.0。光照时间:12 h/d;光照强度:1 000~2 000 lx;温度(25±1)℃。每天观察并记录知母分蘖愈伤组织再生芽的生根情况,第 30 天时统计知母愈伤组织再生芽的生根情况。

生根率= 生根的再生芽数/接种的总再生芽数 × 100%

1.8 知母再生苗的移栽:知母再生苗生根培养 30 d 后,在自然光下闭瓶炼苗 3 d,再打开瓶口锻炼 3 d 后,洗去附着的培养基,即可移栽于培养钵的基质中。移栽基质设 2 个处理:沙土、腐殖土。每日浇灌 MS 的基本培养液,移栽 30 d 后统计知母再生苗的成活率。

成活率= 成活的再生苗数/移栽的总再生苗数 × 100%

1.9 统计方法:以上实验均重复 3 次,所有数据表示为 $\bar{x} \pm s$ 。实验数据用 SPSS10.0 软件 One Way ANOVA 分析后,再进行 LSD 法或 t 检验。

2 结果

2.1 知母种子消毒方式的筛选:由表 1 可知,知母种子经单一消毒剂消毒后,污染率较高;而经复合消毒剂处理后污染率显著降低,且污染率随 HgCl₂ 处理时间的延长而逐渐下降,其中 HgCl₂ 处理 15 min 和 20 min 的污染率最低,两者的污染率相互比较没有显著性差异。所以建立知母种子无菌体系较好的

消毒方式为 75% 酒精处理 30 s 后再用 0. 1% HgCl₂ 处理 15~ 20 min。但从萌发率来看, HgCl₂ 处理时间延长将导致知母种子萌发率下降, 其中 HgCl₂ 处理 10 min 和 15 min 后种子的萌发率没有显著差异, 但 HgCl₂ 处理 20 min 后种子的萌发率与处理 10 min 和 15 min 比较则显著下降。因此, 综合污染率和萌发率的实验结果, 知母种子的最佳消毒方式为 75% 酒精处理 30 s 后再用 0. 1% HgCl₂ 处理 15 min, 用这种消毒方式处理知母种子 30 d 可获得知母的无菌苗。

2.2 知母分蘖的芽增殖: 从表 2 可知, 直接从种子无菌苗切取其分蘖接种到培养基上可以直接获得知母的再生苗, 而且长芽生根可以在 30 d 完成, 所以这可视作知母快速繁殖的手段之一。对照组没有激素, 只长芽

表 1 不同消毒方式对知母种子的消毒效果

Table 1 Disinfection of different sterilization methods on *A. asphodeloides* seeds

处理类别	污染率/ %	萌发率/ %
I (CK)	85.4±5.6aA	89.6±6.4aA
II	68.5±8.9bB	79.3±9.6bA
III	32.6±11.4cC	75.4±10.6bA
IV	29.4±7.9cC	63.5±8.7cB

表 2 植物生长调节剂对知母分蘖芽增殖的影响

Table 2 Effect of plant growth regulators on bud proliferation of *A. asphodeloides* tillers

培养基	新生芽数/ 个	株高/ cm	根数/ 个	根长/ cm
MS(CK)	0.8±0.3cC	1.6±0.9cC	0dC	0cC
MS+ KT 1 mg·L ⁻¹ + NAA 0.1 mg·L ⁻¹	2.3±0.6bB	5.6±1.2bB	3.4±1.3bB	6.2±2.3bB
MS+ KT 1 mg·L ⁻¹ + NAA 0.5 mg·L ⁻¹	4.5±0.5aA	11.4±2.4aA	5.2±2.1aA	10.2±1.9aA
MS+ KT 1 mg·L ⁻¹ + NAA 1 mg·L ⁻¹	2.8±0.4bB	6.2±2.2bB	2.5±1.6cB	7.2±1.6bB

表 3 植物生长调节剂对知母分蘖愈伤组织诱导的影响

Table 3 Effect of plant growth regulators on callus induction of *A. asphodeloides* tillers

培养基	出愈率/ %
MS(CK)	0±0dD
MS+ KT 2 mg·L ⁻¹ + NAA 0.1 mg·L ⁻¹	72.1±13.6bB
MS+ KT 2 mg·L ⁻¹ + NAA 0.5 mg·L ⁻¹	100±0aA
MS+ KT 2 mg·L ⁻¹ + NAA 1 mg·L ⁻¹	53.2±17.8cC

2.4 知母分蘖愈伤组织的再分化: 从表 4 可知, 把知母分蘖诱导的愈伤组织接种到培养基上可以获得知母的再生芽。对照组没有激素, 知母分蘖诱导的愈伤组织无法再生新的芽。而添加了植物激素, 则可促进知母分蘖愈伤组织的再分化。在 KT 浓度一定(2 mg/L)的情况下, NAA 浓度增大, 则出芽率显著下降。因此, 知母分蘖愈伤组织脱分化的最佳培养基为 MS+ KT 2 mg/L+ NAA 0.1 mg/L。在该培养基上, 知母分蘖诱导的愈伤组织可在 5~ 6 d 诱导出浅绿色的芽, 随后再生芽增多, 8~ 9 d 绿色的

不生根, 而且长芽时间很晚, 大约需要 20~ 30 d。而添加了植物激素, 均可促进知母分蘖的长芽和生根。在 KT 浓度一定(1 mg/L)的情况下, 适当提高 NAA 浓度, 可提高新生芽数、株高以及根长和根数, 但 NAA 浓度如过大, 则会抑制知母分蘖的生长。因此, 知母分蘖芽增殖的最佳培养基为 MS+ KT 1 mg/L+ NAA 0.5 mg/L。在该培养基上, 知母分蘖可在 3~ 5 d 长芽, 7~ 8 d 生根, 30 d 时可长成一个健壮的小植株。

2.3 知母分蘖愈伤组织的诱导: 从表 3 可知, 直接从种子无菌苗取其分蘖接种到培养基上可以获得知母分蘖的愈伤组织。对照组没有激素, 知母分蘖无法诱导出愈伤组织。而添加了植物激素, 则可促进知母分蘖愈伤组织的诱导。在 KT 浓度一定(2 mg/L)的情况下, 适当提高 NAA 浓度, 可提高出愈率, 但 NAA 浓度如过大, 则会抑制知母分蘖愈伤组织的诱导。因此, 知母分蘖愈伤组织诱导的最佳培养基为 MS+ KT 2 mg/L+ NAA 0.5 mg/L。在该培养基上, 知母分蘖可在 7~ 8 d 诱导出愈伤组织, 10~ 12 d 绿色愈伤组织开始增殖, 颜色也由浅绿色变成黄白色, 30 d 时如不进行继代, 则可长满整个三角瓶。

芽开始生根, 30 d 时如不把芽切离, 则再生的芽和根可长满整个三角瓶, 再生的完整植株如转移到新的培养基(MS+ KT 2 mg/L+ NAA 0.1 mg/L+ PP₃₃₃ 0.5 mg/L) 进行壮苗, 也可移栽成活, 所以这也可视为知母快速繁殖的手段之一。

表 4 植物生长调节剂对知母分蘖愈伤组织再分化的影响

Table 4 Effect of plant growth regulators on callus redifferentiation of *A. asphodeloides* tillers

培养基	出芽率/ %
MS(CK)	0±0dD
MS+ KT 2 mg·L ⁻¹ + NAA 0.1 mg·L ⁻¹	100±0aA
MS+ KT 2 mg·L ⁻¹ + NAA 0.5 mg·L ⁻¹	84.3±11.7bB
MS+ KT 2 mg·L ⁻¹ + NAA 1 mg·L ⁻¹	56.3±12.3cC

2.5 知母分蘖愈伤组织再生芽的生根: 从表 5 可知, 把知母分蘖愈伤组织再生的芽接种到培养基上可以获得知母的再生苗。对照组没有激素, 知母分蘖愈伤组织再生芽无法生根。而添加了 NAA, 则可促进知母分蘖愈伤组织再生芽的生根。在培养基为

1/2MS 的条件下, NAA 浓度增大, 则可促进再生芽生根, 但 NAA 浓度过大, 则又会抑制根的生长。因此, 知母分蘖愈伤组织再生芽生根的最佳培养基为 1/2MS+ NAA 0.5 mg/L。在该培养基上, 知母分蘖愈伤组织再生芽可在 3~4 d 再生出白色的根, 随后根逐渐增多, 新生芽也增多, 30 d 时则可长成一个完整的植株。

表 5 植物生长调节剂对知母分蘖愈伤组织再生芽生根的影响

Table 5 Effect of plant growth regulators on rooting of shoots regenerated from *A. asphodeloides* tillers calli

培养基	出愈率/ %
1/2MS(CK)	0±0dD
1/2MS+ NAA 0.1 mg·L ⁻¹	76.3±15.2bB
1/2MS+ NAA 0.5 mg·L ⁻¹	100±0aA
1/2MS+ NAA 1.0 mg·L ⁻¹	84.3±11.7bB
1/2MS+ NAA 1.5 mg·L ⁻¹	56.3±12.3cC

2.6 知母再生苗的移栽: 当知母再生苗高达 5 cm 左右, 根长为 2~3 cm 时^[13], 便将其移栽到沙土或腐殖土中。再生苗在腐殖土上的成活率[(95.3±6.1)%]与沙土上的成活率[(84.5±12.1)%]比较具有显著性差异。因此, 知母再生苗的最佳移栽基质为腐殖土。

3 讨论

种子是建立植物无菌体系的良好外植体, 但如何控制种子的污染是关系到组培实验的关键^[15]。本实验表明, 升汞灭菌时间延长虽可降低污染率, 但同时也导致了知母种子的萌发率下降, 这与多花黑麦种子灭菌^[16]的实验结果一致。本研究结果还表明, 培养基中添加 1 mg/L KT 和 0.5 mg/L NAA 可以显著提高知母分蘖芽和根的萌发, 过高或过低的 NAA 浓度均会抑制知母分蘖的生长发育, 这与前人的研究结果一致^[17]。之前的研究表明, 知母叶片和下胚轴在含有 2, 4-D 的 MS 培养基上均可诱导愈伤组织并能高频再生植株, 但较低浓度的 KT 和 NAA 或 IBA 组合则可促进叶片愈伤组织再生芽生根^[13-14]。而在本实验中, 利用知母分蘖也能诱导愈伤组织, 在 2 mg/L KT 的条件下, 适当提高 NAA 浓度, 可显著提高出愈率。愈伤组织诱导初期为浅绿色(胚性愈伤组织)后转为黄白色(非胚性愈伤组织), 多为半透明疏松的圆形或卵圆形细胞。分蘖愈伤组织在 2 mg/L KT 和 0.1 mg/L NAA 的 MS 培养基上可高频出芽, 且随着培养时间延长而逐渐生

根。在 1/2MS 培养基中添加 0.5 mg/L NAA 也可诱导分蘖愈伤组织再生芽转接后大量生根。分蘖再生植株移栽于腐殖土中成活率均可达到 95% 以上, 这与人报道结果一致^[13]。因此, 从这方面讲, 用分蘖诱导出的愈伤组织优于叶片和下胚轴诱导的愈伤组织, 因为分蘖诱导的愈伤组织可以脱分化直接再生出完整的植株应用于生产达到快速繁殖的目的。目前, 国内外对于知母再生体系的建立仅见通过叶片和下胚轴诱导愈伤组织的途径^[13-14], 而成功地从知母分蘖诱导愈伤组织并使其再生完整植株的研究鲜有报道。本实验结果为知母优良品系培育、快繁推广以及最终走向产业化生产提供了科学依据和技术支持。

参考文献:

[1] 宋芸, 乔永刚, 吕慧敏. 药用植物知母染色体核型分析[J]. 中国农学通讯, 2009, 25(10): 104-106

[2] 中国药典[S]. 一部. 2005

[3] 党小平, 毛春芹, 陆兔林, 等. HPLC 法测定生知母和盐知母中芒果苷和菝葜皂苷元[J]. 中草药, 2009, 40(2): 236-238

[4] 原源, 陈万生, 孙连娜, 等. 不同产地知母中皂苷类成分的测定[J]. 中草药, 2006, 37(10): 1574-1576

[5] 易博, 孙赫, 原源, 等. RP-HPLC 法测定知母黄柏药材中新芒果苷、芒果苷和盐酸小檗碱[J]. 中草药, 2007, 38(6): 856-858

[6] 王靖, 葛盛芳, 陈琦, 等. 知母多糖降血糖活性研究[J]. 中草药, 1996, 27(10): 605-606

[7] 王树桐, 曹克强, 胡同乐, 等. 知母提取物对马铃薯免疫病菌的抑制作用及防病效果[J]. 植物病理学报, 2006, 36(3): 267-272

[8] 李师翁. 知母雌雄配子体发生及胼胝质动态的研究[J]. 云南植物研究, 1998, 20(1): 71-75

[9] 周峰, 陈万生, 乔传卓. 中药知母商品及资源调查[J]. 时珍国医国药, 2000, 11(7): 672

[10] 刁诗冬, 徐杰, 徐同印. 知母高产栽培技术[J]. 中草药, 1999, 30(12): 944-945

[11] 张宏伟, 李惠卓, 王文全, 等. 知母 N、P、K 配方施肥效应的研究[J]. 河北农业大学学报, 2007, 30(2): 38-41

[12] 郭晋华, 王莉. 知母胚轴试管苗的诱导[J]. 植物生理学通讯, 1985, 3: 31

[13] 李宝平, 王佐芝, 刘维忠, 等. 知母的组织培养和快速繁殖[J]. 山西师大学报: 自然科学版, 1993, 7(3): 41-43

[14] 梁玉玲, 管延英, 韩继刚, 等. 知母悬浮培养下的体细胞胚胎发生(简报)[J]. 农业生物技术学报, 1999, 7(1): 28

[15] 周俊辉, 周厚高, 刘花全. 植物组织培养中的内生细菌污染问题[J]. 广西植物, 2003, 23(1): 41-47

[16] 刘占彬, 袁庆华. 多花黑麦草种子外植体组织培养灭菌方法研究[J]. 草地学报, 2009, 17(4): 474-479

[17] Wang G Y, Volker R, Li C J, et al. Involvement of auxin and CKs in boron deficiency induced changes in apical dominance of pea plants[J]. J Plant Physiol, 2006, 163: 591-600