

藏药马尿泡离体快繁技术研究

徐文华¹, 陈桂琛^{1*}, 周国英^{1,2}, 孙 菁¹, 卢学峰^{1*}

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810001; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要:目的 通过对马尿泡组织培养技术的研究, 为马尿泡的快速繁殖提供技术支撑。方法 以马尿泡野生植株上的休眠芽为外植体, 将它们接种到一系列含有不同激素的培养基中。结果 外植体野生芽不易进入正常萌发生长阶段, 一旦进入正常阶段, 能迅速进入生长状态, 诱导野生芽分化的最适培养基是 MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 1.0 mg/L, 且侧芽要比主芽分化得快, 增殖率明显高于主芽的增殖率。25 d 转接 1 次, 增殖倍数在 5 倍以上。最适生根培养基是 1/2 MS + IBA 0.5 mg/L, 诱导生根率达 96%。无菌苗幼叶诱导愈伤组织最适培养基是 MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.5 mg/L + 2,4-D 1.0 mg/L, 诱导率达 100%。结论 一方面建立了稳定高效的马尿泡再生体系, 另一方面通过组织培养达到了其种质资源的保存。

关键词: 马尿泡; 休眠芽; 离体快繁; 愈伤组织

中图分类号: R282.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)02-0297-04

Rapid propagation in a Tibetan medicine —— *Przewalskia tangutica*

XU Wen-hua¹, CHEN Gui-chen¹, ZHOU Guo-ying^{1,2}, SUN Jing¹, LU Xue-feng¹

(1. Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China;

2. Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract : Objective To provide scientific basis for rapid propagation of *Przewalskia tangutica* by means of preliminary study of the tissue culture technique. **Methods** Using the dormant wild buds from *P. tangutica* as explants to inoculate the buds on a series of media, which contained various hormone concentration. **Results** It was difficult for the dormant wild bud to get into germinating and growing periods. Conversely, it would rapidly develop. MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 1.0 mg/L was the optimum medium for inducing differentiation of the dormant wild bud, and the lateral bud was more appropriate for differentiation than the apical bud, and the rate of proliferation of the lateral bud was higher than that of the apical bud. The multiple of the proliferation was above five times if it was transferred every twenty five days. 1/2 MS + IBA 0.5 mg/L was the optimum medium for root induction, and the rate of the root induction was highly up to 96%. MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.5 mg/L + 2,4-D 1.0 mg/L was the optimum medium for inducing callus using the young leaves of sterile seedling. **Conclusion** A stable potential regeneration system is established and the idioplasm resources would be preserved by means of the tissue culture technique.

Key words : *Przewalskia tangutica* Maxim.; dormant buds; *in vitro* rapid propagation; callus

马尿泡 *Przewalskia tangutica* Maxim. 属茄科 (Solanaceae) 马尿泡属 (*Przewalskia* Maxim.) 多年生草本植物, 为我国特有属^[1], 属珍稀濒危物种。主要分布于西藏、青海、四川、甘肃南部等海拔 3 400 ~ 4 900 m 的高山砾石地及较干旱的草原、路旁^[2,3]。马尿泡是藏医常用药, 是血栓形成性疾病的有效抑制

剂^[4], 在藏药经典《晶珠本草》中早有记载。其根、种子及全草均可做药用, 味苦、性寒, 有毒。根含莨菪碱、东莨菪碱、山莨菪碱, 具有镇惊、消肿止痛、解痉、治毒疮等药效^[1~3]。有关马尿泡的研究, 早期的工作主要集中于其分布及分类等方面^[5,6], 对其化学成分方面的研究亦有一些报道^[7~9]。由于马尿泡在自然

* 收稿日期: 2008-05-05

基金项目: 国家科技攻关计划中西部专项(2001BA901A47); 中国科学院“西部之光”人才培养计划 2007 年项目“青海珍稀濒危药材羌活的原产地引种驯化研究”和中国科学院“西部之光”人才培养计划 2008 年项目“珍稀藏药桃儿七的离体快繁与种苗繁育关键技术研究”。

作者简介: 徐文华(1974—), 女, 青海乐都县人, 助理研究员, 硕士, 从事植物细胞组织培养和青藏高原特有药用植物资源培育方面的研究。 Tel: (0971) 6159630 13897221729 E-mail: whxu02@163.com

*通讯作者: 陈桂琛 Tel: (0971) 6143900 E-mail: gcchen@nwpib.ac.cn

界的数量有限,且传统的获取方式又以采集和消耗大量的野生资源为代价,造成马尿泡资源的短缺。另外由于马尿泡种子具有坚韧且厚的种皮,在自然状态下很难自然萌发、生长。因此,本实验通过组织培养方法对其进行研究,一方面有利于其种质资源的保存,另一方面可为马尿泡的人工快速繁殖体系的建立提供理论依据和技术路线。

1 材料和方法

1.1 实验材料:2005 年 9 月从青海省果洛州(海拔约 3 900 m)采挖野生马尿泡植株带回实验室,取植株上马尿泡芽为实验材料。

1.2 无菌培养体系的建立:从野生马尿泡植物上切取马尿泡芽,用软毛刷洗去表面泥土,自来水流水冲洗 5 h 后,在超净工作台上用 0.2% HgCl_2 溶液消毒 5~8 min,其间不断摇动消毒容器,无菌水冲洗 4~5 遍后,用消毒滤纸吸干表面水分,备用。

将灭菌后的材料接种到 MS 无激素固体培养基上,在(25 ±1) 条件下暗培养。2~3 d 后及时转移到成分相同的新培养基上继续培养,获得有效数量的实验材料后进行下一步的实验。

1.3 培养条件

1.3.1 培养基:以 MS 为基本培养基,附加不同的激素,蔗糖 30 g/L,琼脂粉 6.0 g/L, pH 5.8。

1.3.2 培养条件:温度为(25 ±1),光源为日光灯,光照强度为 1 500~2 000 lx,光照时间为 12 h/d。

2 结果与分析

2.1 无菌材料的获得:在植物组织培养过程中,外植体材料的表面灭菌消毒是极其关键的一步,不同部位材料消毒的时间是有所不同的。从表 1 结果可以看出,将马尿泡芽在 0.2% HgCl_2 溶液中消毒 5 min 是最佳的,没有芽的污染和褐化死亡,成活率达 100%。而消毒 4 min,芽都受细菌和霉菌的污染,消毒 6 或 8 min,芽几乎全部褐化死亡。

表 1 不同消毒时间对芽的成活率影响

Table 1 Effect of different sterile duration on bud's survival rates

外植体数	消毒时间/min	成活率/%	污染率/%	死亡率/%
20	4	0	100	100
20	5	100	0	0
20	6	6.5	0	93.5
20	8	0	0	100

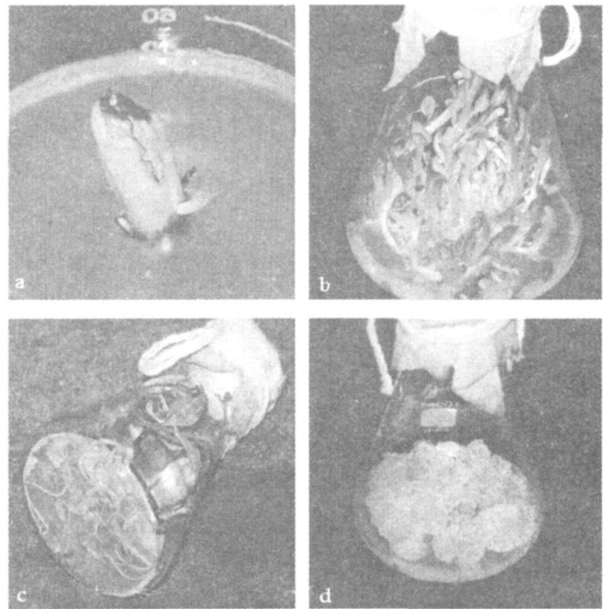
2.2 不同培养基上芽分化的比较:将获得的有效数量的芽转移到编号为 F1、F2 和 F3 分化增殖培养基上,实验结果(表 2)表明,在 F3 培养基上芽的生长和分化率最好,芽的分化率达 100%,而在 F1 和 F2

培养基上芽生长缓慢,几乎不易分化,难以进入正常生长阶段。F1 培养基中的芽培养 2 个周期后,逐渐褐化至坏死。F2 培养基中的芽大部分褐化坏死,少部分芽周围的侧芽有生长现象,但无明显分化迹象。F3 培养基中的芽生长都较好,主芽上的侧芽逐渐分化出 3~5 个小芽(图 1-a)。而且,主芽外围的芽鞘包得太紧,不利于芽的正常生长,所以应适当剥取主芽外围的芽鞘,以便芽能快速进入正常生长阶段。

表 2 不同激素组合培养基上主芽的分化率

Table 2 Differentiation rates of apical buds on media added with different phytohormones

编号	6-BA/ (mg · L ⁻¹)	NAA/ (mg · L ⁻¹)	外植体数	芽的分化 率/%	死亡率 /%
F1	1.0	0.2	8	0	100
F2	2.0	0.5	8	13.5	50
F3	2.0	1.0	7	100	0



a-主芽分化出 2~3 个侧芽 b-侧芽分化出丛生芽
c-生根分化 d-生长旺盛的愈伤组织
a-2 → 3 lateral buds devived from apical buds b-cluster buds
differentiation from lateral buds c-root differentiation
d-calluses of growing vigorously

图 1 马尿泡组织培养系列图

Fig 1 *P. tangutica* tissue culture

培养基 F3 中有些芽生长较好,主芽上的侧芽有明显分化迹象,将 F3 中主芽上形成的侧芽切割后转接到 F3 培养基中,侧芽分化率极高,平均每个芽每代可增殖 30 个芽以上,相比较而言,主芽的分化率没有侧芽的高。将 F3 中侧芽切取,再分别接种到 F1、F2、F3 中,统计结果见表 3。

从主芽上切取侧芽进行培养,侧芽生长较主芽生长良好,生长迅速,易进入正常分化生长阶段(图

表 3 不同激素组合培养基上侧芽的分化率

Table 3 Differentiation rates of lateral buds on media added with different phytohormones

编号	外植体数	死亡数	分化率/ %	平均每个外植体分化芽数
F1	10	1	100	11.5
F2	8	0	100	3.3
F3	14	0	100	30

1-b), 而且侧芽在 F1、F2、F3 培养基上分化率都为 100 %, 明显高于主芽的增殖率。但从增殖的平均芽数来看, F3 中芽的增殖倍数是 F1 的 2.6 倍, F2 的 9.1 倍, F3 激素组合最佳, 也可以看出, 在马尿泡芽分化的过程中, 6-BA 和 NAA 都起了重要的作用。所以, 可以选定马尿泡野生芽的最适分化培养基为

表 4 IBA 对试管苗生根的影响

Table 4 Effect of IBA on rooting of tube-plantlets

编号	IBA/ (mg · L ⁻¹)	外植体个数	起始生根时间	7 d 时生根率/ %	28 d 时生根率/ %	平均根数	平均根长/ cm
G1	0	26	第 15 天	0	8	3.0	1.0
G2	0.5	33	第 7 天	15	96	5.5	5.0
G3	1.0	29	第 11 天	0	52	5.3	4.3

后马尿泡单芽基部膨大, 膨大部位表面有颗粒状的小突起, 发白, 为根原基突起。在 0.5 mg/L IBA 作用下, 起始生根时间最早, 7 d 时部分芽有 0.1 ~ 0.2 cm 的根长出, 生根率为 15 %。而在 0、1.0 mg/L IBA 作用下, 起始生根时间都较 0.5 mg/L 的迟, 且 1 周时的生根率都为 0。从 4 周后的生根率、平均每个苗长根数及平均根长综合考虑, 可以选定培养基 G2 为马尿泡诱导生根最适培养条件, 其 IBA 条件下, 生根率达 96 %, 虽然在 G2 和 G3 培养条件下,

表 5 不同激素组合培养基上幼叶愈伤组织诱导

Table 5 Callus inducing of young leaf on media added with different phytohormones

编号	激素/(mg ·L ⁻¹)			接种的外植体数	10 d 时形成愈伤组织的 外植体数	10 d 时诱导率/ %	3 周时诱导率/ %
	2,4-D	NAA	6-BA				
1.0	0.5	0.5	16	8	50	100	
2.0	0.2	0.2	23	11	47.8	95.65	

1 周后有颗粒状的愈伤组织在外植体的切口处或表面形成, 颜色浅乳白色, 且观察到叶基和叶柄上形成愈伤组织要比叶尖上形成愈伤组织提前 5 d 左右。从 10 d 时愈伤组织的诱导率来看, 诱导率分别为 50 % 和 47.8 %, 培养基好于 培养基, 但差异不明显。3 周后, 2 种培养基上愈伤组织的诱导率分别为 100 % 和 95.65 %, 颜色浅乳白色, 呈疏松小颗粒状(图 1-d), 质地较硬, 这种愈伤组织有利于芽的分化。因此, 可以得出, 马尿泡愈伤组织的诱导对所加激素的要求不是很严格, 附加有激素 2,4-D, 都容易诱导出愈伤组织, 而且愈伤组织的诱导率都很高。而 6-BA 和 NAA 对愈伤组织的诱导作用不是

MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 1.0 mg/L, 最佳培养材料为主芽周围的侧芽。

2.3 再生苗的生根培养: 生根预试验表明, 在马尿泡生根培养中加入激素 NAA, 易促进愈伤组织的形成, 起始生根时间较迟, 形成根细小, 数量少, 一般只有 1 ~ 2 条。加入 6-BA 对发根有明显的抑制作用。因此本实验在诱导生根时, 只加不同质量浓度的 IBA 做对比。

将增殖形成的高约 3.5 ~ 8.0 cm 的苗, 接种到 1/2 MS 的固体培养基上进行诱根培养, 附加 IBA, 结果见表 4。

IBA 有助于马尿泡无菌苗生根(图 1-c)。1 周

平均长根数和平均根长没有太大区别, 但 G3 培养基中的生根率却只有约 50 %, 明显不及 G2 的生根率高。因此, 通过马尿泡生根培养试验可以看出, 激素 IBA 有利于苗的生根, 但控制其剂量是最重要的。

2.4 愈伤组织的诱导和继代培养: 将野生芽增殖形成的幼苗的幼叶切成 0.5 cm × 0.5 cm 大小的块, 接种于编号为 和 两种培养基上进行愈伤组织的诱导, 实验结果见表 5。

很明显, 但对促进愈伤组织的生长是很明显的。愈伤组织可在 培养基上连续继代培养, 生长良好, 增殖也快; 而在 培养基上生长缓慢, 逐渐有褐化发生, 因此进一步证实, 加入 NAA 对促进愈伤组织的快速生长是有利的。

3 结论

3.1 对我国特有单属单种、且仅分布于青藏高原的马尿泡的离体快繁技术进行了探讨, 获得了马尿泡愈伤组织诱导、生长的最佳条件, 并分析了影响马尿泡不定芽分化的主要因素, 不同生长素对马尿泡愈伤组织诱导和不定芽分化的效果不同。

3.2 降低无机盐的浓度有利于马尿泡无菌苗的生

根。选择适宜的生长素 (IBA) 种类,且控制其剂量,是进一步提高生根质量的关键。光照条件下马尿泡的生根效果较好。

3.3 马尿泡野生植株上的休眠芽可以作为离体培养的良好外植体。主芽周围基部的侧芽是适宜诱导分化的最适外植体;无菌苗的幼叶、叶基和叶柄是适宜愈伤组织诱导的最适外植体。马尿泡芽的最适分化培养基是:MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L。最适生根培养基是:1/2 MS+IBA 0.5 mg/L+蔗糖 3%。愈伤组织诱导培养基:MS+2,4-D 1.0~2.0 mg/L+NAA 0.2~0.5 mg/L+6-BA 0.2~0.5 mg/L。

参考文献:

- [1] 中国科学院西北高原生物研究所. 藏药志 [M]. 西宁:青海人民出版社,1991.
- [2] 刘尚武. 青海植物志 [M]. 西宁:青海人民出版社,1996.
- [3] 黄玉清,杨琳琳. 药用植物资源研究成果集萃 [J]. 植物杂志,1993,20(2):8-10.
- [4] 王荷生,张德铨. 中国种子植物特有科属的分布型 [J]. 地理学报,1994,49(5):403-417.
- [5] 倪志诚,李晖. 青藏高原及毗邻地区种子植物特有属中的重要经济植物 [J]. 西藏科技,1995,3:47-53,40.
- [6] 郝日明. 试论中国种子植物特有属的分布区类型 [J]. 植物分类学报,1997,35(6):500-510.
- [7] 王环,潘莉,张晓峰. HPLC 法测定天仙子和马尿泡中 3 中托烷类生物碱的含量 [J]. 西北药学杂志,2002,17(1):9-10.
- [8] 沈进. 两种药用植物化学成分及多肽二硫键形成方法的研究 [D]. 成都:中国科学院成都生物研究所,2004.
- [9] 胡尚连. 植物生物技术 [M]. 成都:西南交通大学出版社,2004.

桔梗种子的成熟生理动态研究

刘自刚*

(商洛学院 生物医药工程系,陕西 商洛 726000)

摘要:目的 揭示桔梗种子成熟过程的生理动态变化,为桔梗良种的生产提供理论依据。方法 采用统一挂牌分期取样,测定不同成熟度种子的千粒质量、发芽率、电导率、POD 活性和 MDA 的量。结果 桔梗开花后 55 d 千粒质量达到最大为 1.214 g,但此时种子发芽率仅为 53.0%,开花后 55~61 d 千粒质量开始逐渐下降,但发芽率却迅速上升,61 d 时达到最大为 93.3%,此时种子细胞膜结构完整性高,POD 活性也最高,种子性能达到最佳状态。结论 开花后 61 d,桔梗种子可完全成熟,种子成熟过程中存在生理后熟现象,后熟期约为 6 d。

关键词:桔梗;种子;成熟生理

中图分类号:R282.2

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)02-0300-04

桔梗 *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC. 属于桔梗科桔梗属,多年生双子叶草本,是一种药、食、赏兼用植物^[1]。近年来,桔梗抗衰老、抑癌、杀虫杀菌和气味掩蔽剂等功效相继被发现,使社会对桔梗原材料的需求迅速增加,单靠野生桔梗资源已不能满足需求。在此情况下,各地开展了桔梗野生种驯化和桔梗规模化栽培技术的研究,但制约桔梗生产发展的一个重要因素是其种源短缺问题,目前,桔梗种子生产处于半原始的传统生产状态,种子往往是药材生产的副产品^[1],或者从野生桔梗中直接采集获得,所得的种子质量普遍较差,其千粒质量平均仅 0.83 g,田间出苗率仅为 1%左右,严重影响了桔梗生产的发展^[2]。本实验针对桔梗生产中存在的上述问题,研究桔梗开花后种子成熟的动态,探讨桔梗开花后的天数与种子成熟度之间的关系,旨在

为桔梗的良种生产提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 材料:研究材料为陕西省商洛市境内 2 年生桔梗地方种居群,2005 年 3 月播种,2006 年 4 月移栽。试验地位于北纬 33.54',东经 109.53',地处秦岭南坡受东南季风影响,年平均降水量 725.5 mm,平均海拔 722 m,砂壤土。最热为 7 月,平均气温 24℃,最冷为 1 月,平均 0.3℃,年平均气温 12.8℃。绝对无霜期为 180 d 左右。

1.2 方法

1.2.1 取样方法:于 2007 年 7 月 23 日,在多年生桔梗群体中选取当日开放花朵 1 000 朵,挂牌标记,从开花后第 25 天开始取果实,之后每隔 3 d 取样 1 次,直到 9 月 28 日为止,共取样 15 次,每次取果实 60 个并分为两份,1 份测定种子千粒质量、发芽率、

* 收稿日期:2008-04-29

基金项目:陕西省科学技术研究发展计划项目[2008K16-02(01)]。

作者简介:刘自刚(1975—),男,汉,甘肃天水人,讲师,硕士,从事中草药种质资源及育种研究工作。

Tel:13991463731 E-mail:lzgzgworking@163.com