

林荫银莲花组织培养研究

张忠池¹, 耿明建¹, 杨特武^{1,2*}, 刘伟¹, 王俊¹, 辛龙¹, 刘保财¹, 朱端卫¹

(1. 华中农业大学微量元素中心 植物营养与生态环境研究室, 湖北 武汉 430070;

2. 华中农业大学植物科学技术学院, 湖北 武汉 430070)

摘要:目的 研究林荫银莲花 *Anemone flaccida* 组织培养技术, 为保护与合理利用这一珍稀中药资源提供新的方法和技术途径。方法 筛选适合组织培养的最佳外植体, 并研究不同植物生长调节物质对林荫银莲花愈伤组织诱导和芽分化的影响。结果 在 MS 培养基中添加 2.0 mg/L 6-BA 和 1.0 mg/L NAA, 在温度 17℃ 条件下培养有利于愈伤组织诱导和芽的分化; 生长健壮的芽为最佳外植体, 其愈伤组织诱导率可达 85.7%, 且易分化形成不定芽和拟球茎; 在 1/2MS+0.2 mg/L NAA 培养基上, 5℃ 条件下培养, 再生拟球茎和不定芽生根良好。结论 本研究为林荫银莲花种苗繁殖提供了有效途径, 为其人工扩大栽培奠定了良好基础。

关键词: 林荫银莲花; 组织培养; 拟球茎

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)07-1168-05

Studies on tissue culture of *Anemone flaccida*

ZHANG Zhong-chi¹, GENG Ming-jian¹, YANG Te-wu^{1,2}, LIU Wei¹, WANG Jun¹,

XIN Long¹, LIU Bao-cai¹, ZHU Duan-wei¹

(1. Laboratory of Plant Nutrition and Ecological Environment Research, Microelement Research Center, Wuhan 430070, China; 2. College of Plant Sciences and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: **Objective** In order to rationally protect and utilize the rare medicinal plant resources, plant tissue culture on *Anemone flaccida* was studied. **Methods** The optimal explant was screened and effects of different plant growth regulators on callus induction and bud differentiation were tested. **Results** The combination of 2.0 mg/L 6-BA and 1.0 mg/L NAA added in the basic MS medium was propitious to callus induction and bud differentiation. The rate of callus induction attained 85.7%, and the adventitious bud or corm-like structure was easy to differentiate when healthy bud germinating from rhizome was chosen as explant. Rooting of the regenerated adventitious bud or corm-like structure (CLS) was induced well on the 1/2MS+0.2 mg/L NAA medium under 5℃. **Conclusion** An effective approach for the seedling propagation has been provided, which could promote artificial planting of *A. flaccida* greatly.

Key words: *Anemone flaccida* Fr. Schmidt; tissue culture; corm-like structure (CLS)

林荫银莲花 *Anemone flaccida* Fr. Schmidt 属毛茛科银莲花属植物, 为高山药用植物, 其干燥根茎俗名地乌, 具祛风湿、助筋骨、消肿止痛等功效^[1], 对动脉粥样硬化也有一定的防治作用^[2]。最近研究又发现, 地乌提取物具有良好的抗炎免疫功能, 可通过诱导炎症细胞的凋亡而抑制炎症反应^[3], 且对淋巴细胞增殖有显著的抑制作用^[4], 并具有高效低毒特点。邴飞虹等^[3,4]以地乌为原料研制出用于治疗类风湿性关节炎的国家五类新药——地乌风湿安胶囊, 极具开发前景。但是, 由于林荫银莲花在自然条

件下生长、繁殖缓慢, 极大地制约其药用成分的开发利用。因此, 建立林荫银莲花种苗人工繁殖技术体系并进行人工栽培是实现林荫银莲花这一珍稀中药材可持续性利用的根本途径。近年来, 有许多珍稀药用植物的繁殖采取了组织培养繁殖种苗的方法, 并成功应用于大规模生产^[5~8], 但目前仍未见有关林荫银莲花组织培养的报道。本研究探索林荫银莲花的组织培养繁殖技术, 改良林荫银莲花的生长繁殖方法, 为其规模化种植提供大量优质种苗, 实现自然资源的可持续利用及促进本药材的产业化开发。

* 收稿日期: 2009-11-17

基金项目: 广东省教育部产学研结合项目(2006D90204009)

作者简介: 张忠池(1984—), 男, 湖北孝感人, 硕士研究生。Tel: (027) 87287184 E-mail: zczsteve@webmail.hzau.edu.cn

* 通讯作者 杨特武 Tel: (027) 87287184 E-mail: yangtewu@mail.hzau.edu.cn

1 材料和方法

1.1 试验材料: 供试材料采自湖北省长阳土家族自治县麻池村铜鼓包山(36°17.67' N, 110°48.81' E, 海拔 1 728 m), 经由湖北中医学院中药鉴定学教研室陈科力教授鉴定。使用前, 将林荫银莲花根状茎用 50 mg/L GA₃ 和 10 mg/L 6-BA 浸泡 24 h, 低温保存解除其休眠; 然后用自来水冲洗, 洗洁精浸泡 30 min, 将表面污泥清洗干净, 再用自来水冲洗 30 min, 去除根茎表面的分支和须根。解除休眠后萌发的根状茎, 可提供叶片、叶柄、根和芽为组织培养的外植体材料。

1.2 培养基: 本课题组的前期研究发现, 林荫银莲花外植体在组织培养中愈伤组织诱导和器官分化可同步完成, 故本研究中采用的诱导和分化培养基相同。以 MS 基本培养基添加不同种类和浓度的植物生长调节剂, 对愈伤组织诱导和分化进行调控。依据植物生长调节剂的种类和浓度, 设置 A、B、C、D、E、F、G 共 7 个处理(表 1)对外植体愈伤组织诱导培养; 依据不同浓度的 6-BA 和 NAA 配比, 设置 R1~R10 共 10 个处理(表 1)对外植体进行不同器官再生分化途径进行调控。以 1/2MS 基本培养基, 设置不同植物生长调节剂(0.2 mg/L NAA、0.5 mg/L NAA、0.5 mg/L IBA)和温度(5、18 °C)处理进行组培苗生根培养。

1.3 接种及培养: 分别以带有部分老组织的萌发芽(老组织长度不超过 1 cm)、新展开叶、未展幼叶、叶柄、根为材料, 用 1.5% 多菌灵浸泡 2 h, 自来水冲洗干净, 在超净工作台上用 75% 乙醇消毒 30 s, 无菌水冲洗后, 转入经过灭菌的三角瓶中, 滴入 2 滴聚山梨酯-20, 再加入适量 0.2% HgCl₂ 进行消毒。其中, 芽消毒时间 9 min, 其他组织消毒 5 min。无菌水冲洗 6 次后, 外植体在无菌滤纸上吸干表面水分并进行切割。然后, 将外植体接种至添加有 300 mg/L 的头孢噻肟钠的不同处理的培养基上, 在温度 17 °C、光照强度 3 000 lux、光照周期为 12 h/d 的条件下培养, 每 25 d 继代 1 次。将分化好的再生苗转入生根培养基, 分别于 5、18 °C 的黑暗条件下进行生根培养。

试验结果中诱导率均以未污染的有效外植体进行计算, 即诱导率= (诱导产生愈伤组织的外植体数+ 直接分化产生器官的外植体数)/有效外植体数×100%。

2 结果与分析

2.1 适宜外植体筛选: 分别采用带部分老组织的

表 1 林荫银莲花外植体诱导培养基的植物生长调节物质配比

Table 1 Ratio of plant growth regulators in explant induction medium of *A. flaccida*

处理	植物生长调节物质配比/(mg·L ⁻¹)			
	6-BA	ZT	IBA	NAA
A	0.0	0.0	0.0	0.0
B	2.0	0.0	1.0	0.0
C	2.0	0.0	0.0	1.0
D	0.0	2.0	1.0	0.0
E	0.0	2.0	0.0	1.0
F	1.0	1.0	1.0	0.0
G	1.0	1.0	0.0	1.0
R1	0.0	—	—	0.0
R2	1.0	—	—	0.0
R3	2.0	—	—	0.0
R4	1.0	—	—	0.2
R5	2.0	—	—	0.2
R6	1.0	—	—	0.5
R7	2.0	—	—	0.5
R8	1.0	—	—	1.0
R9	2.0	—	—	1.0
R10	3.0	—	—	1.0

芽、叶柄、未展开幼叶、展开叶片、展开叶切块(0.5 cm×0.5 cm)和根作为外植体, 接种于 MS+2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA 培养基上培养。由表 2 可知, 不同外植体诱导、分化差异明显, 以芽体(W-1-6)为外植体最佳, 诱导率达 85.7%, 其次是未展开叶片(W-1-3), 诱导率为 16.7%, 二者均可在诱导产生愈伤组织后直接分化出不定芽(图 1-3~6)或拟球茎(图 1-8~9), 且这些不定芽和拟球茎能不断进行增殖。W-1-2 为不切块的展开叶片, 虽在培养初期膨大、卷曲, 且少数可分化产生嫩绿色芽, 但随后出现黄化、死亡现象。以展开叶片的切块为外植体(W-1-1), 在培养 30 d 左右全部黄化、死亡。叶柄(W-1-4)接种到培养基上很快(15 d)就开始膨大、伸长, 有时会在叶柄基部产生少量愈伤组织(图 1-7), 但愈伤组织继续增殖困难。以新生的无菌根为外植体(W-1-5), 经培养也能诱导产生愈伤组织, 且愈伤组织分化率高、生长旺盛, 但愈伤组织诱导率很低, 仅为 5.0%。因此, 林荫银莲花组织培养最佳外植体为带部分老组织的芽, 诱导率最高, 增殖最快, 且能直接诱导产生不定芽和拟球茎。

2.2 不同植物生长调节物质组合对林荫银莲花愈伤组织诱导及芽再生的影响: 以 1/2 芽作为外植体, 一般在培养 28 d 左右产生愈伤组织, 40 d 左右开始分化出芽。在处理 A 中由于培养基中没有添加任何植物生长调节剂, 培养外植体均无愈伤组织产生, 也无器官直接发生; 处理 C 为 6-BA 2.0 mg/L+

NAA 1.0 mg/L 的植物生长调节剂组合, 愈伤组织和芽诱导率最高达 80.0%, 且外植体的生长比较旺盛, 分化系数高; 处理 B 为 6-BA 2.0 mg/L + IBA 1.0 mg/L 的植物生长调节剂组合, 愈伤组织和芽的诱导率为 40.0%, 说明生长素类物质中 NAA 的效果比 IBA 好。在 D 和 E 处理中, 分别以 ZT 2.0 mg/L 与两种生长素类物质组合进行处理, 诱导率均低于 B 和 C 处理(表 3), 说明细胞分裂素类物质中 6-BA 诱导愈伤的效果比 ZT 好。在处理 F 和 G 中, 以质量浓度各为 1.0 mg/L 的 6-BA 和 ZT 分别与两种生长素进行组合, 其诱导效果也不如 C 组合。因此, 在林荫银莲花组织培养中以添加 2.0 mg/L 6-BA 和 1.0 mg/L NAA 的植物生长调节剂组合为最佳。

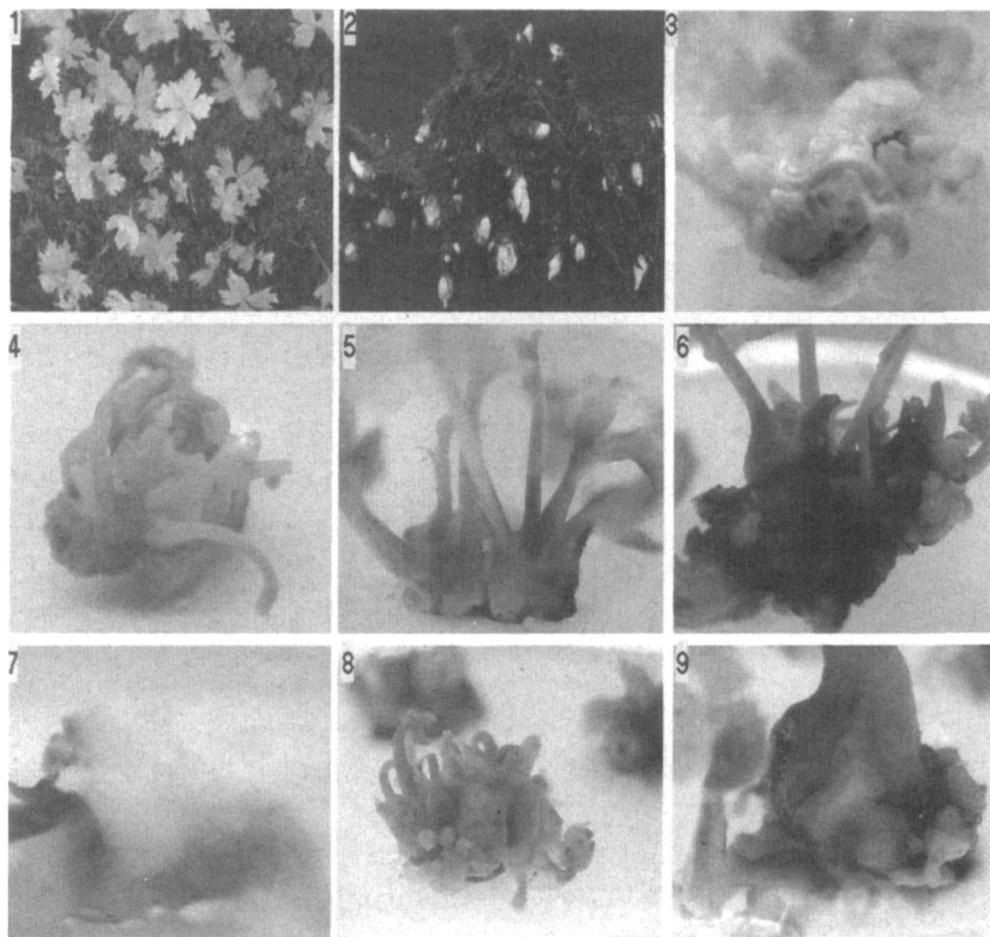
表 2 林荫银莲花不同外植体的诱导差异

Table 2 Induction differences among different explants of *A. flaccida*

处理 编号	外植体 类型	接种 总数	诱导率* /%	培养情况
W-1-1	展开叶切块	200	0.0	黄化、死亡
W-1-2	展开叶整体	40	10.0	叶边缘极度卷曲、膨大, 少数产生嫩绿色芽
W-1-3	未展开叶	30	16.7	叶边缘极度卷曲、膨大, 少数产生嫩绿色芽
W-1-4	叶柄	50	0.0	膨大、轻微愈伤化, 培养后期死亡
W-1-5	根	20	5.0	根膨大, 根尖产生少量愈伤组织
W-1-6	芽	30	85.7	颜色嫩绿、分化系数极高

*—产生愈伤组织和器官分化的外植体数占有效外植体数的百分比, 下同

*—Percentage of callus tissue induction and differentiation from explant, same as below



1-地上部 2-萌发的根茎 3-叶片诱导产生的不定芽 4-叶片诱导产生的不定芽 5-叶片诱导产生的不定芽 6-叶片诱导产生的不定芽 7-叶柄基部产生的愈伤组织 8-芽为外植体诱导产生的不定芽 9-芽为外植体诱导产生的拟球茎

1-shoots 2-germinating rhizome 3-adventitious buds induced from leaf 4-adventitious buds induced from leaf

5-adventitious buds induced from leaf 6-adventitious buds induced from leaf 7-callus induced at base of petiole

8-adventitious buds induced from bud explant 9-CLS induced from bud explant

图 1 林荫银莲花不同外植体及其在不同组培中产生的愈伤组织、不定芽及拟球茎

Fig 1 Callus, adventitious buds, and CLS induced from different explants of *A. flaccida* in different tissue culture

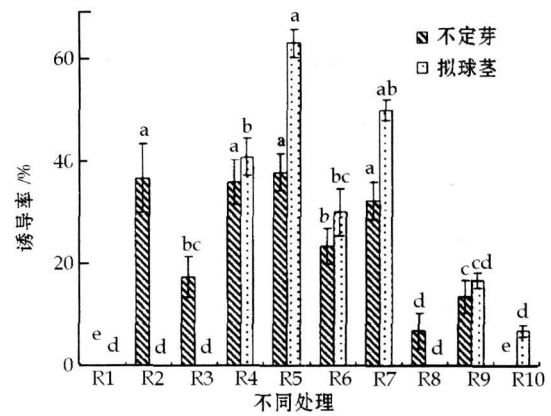
表 3 植物生长调节物质对林荫银莲花外植体诱导率的影响

Table 3 Effect of different plant growth regulators on explant induction rate of *A. flaccida*

处理	接种外植体数	诱导数	诱导率/%
A	30	0	0.0
B	30	12	40.0
C	35	28	80.0
D	36	3	8.3
E	32	4	12.5
F	36	9	25.0
G	30	20	66.7

2.3 不同质量浓度植物生长调节物质对比对芽再生途径的影响: 不定芽是指从叶、根、茎节间等通常不产生芽的部位生出的芽; 球茎为地下变态茎, 膨大呈球形, 茎内部实质, 顶端有肥大的顶芽, 因在本研究的器官分化中产生了一种类似球茎的诱导产物, 故称为拟球茎。图 2 为在不同质量浓度植物生长调节剂配比的培养基上不定芽和拟球茎的诱导率。在处理 R1 中, 由于培养基中未添加任何植物生长调节物质, 未产生不定芽或拟球茎; 在处理 R2 中, 培养基中单独添加 1.0 mg/L 的细胞分裂素类物质 6-BA, 只诱导产生不定芽, 没有拟球茎, 不定芽的诱导率为 $(36.7 \pm 6.7)\%$; 在处理 R3 中, 当 6-BA 增加到 2.0 mg/L 时, 不定芽的诱导率与 R2 差异不显著。R4 和 R5 处理是分别在 R2 和 R3 的基础上添加了 0.2 mg/L NAA, 其拟球茎的诱导率均有所提高, 其中 R4 拟球茎诱导率为 $(41.0 \pm 3.6)\%$, R5 拟球茎诱导率达 $(63.0 \pm 2.6)\%$, 且两者间差异显著, 但其不定芽诱导率与 R2 和 R3 差异不显著。当 NAA 提高到 0.5 mg/L 时, 即在处理 R6(6-BA 1 mg/L) 和 R7(6-BA 2 mg/L) 中, 不定芽和拟球茎的诱导率均低于 0.2 mg/L NAA 的相应组合(R4 和 R5), 其中 R6 拟球茎诱导率为 $(30.0 \pm 4.5)\%$, 处理 R7 中拟球茎诱导率为 $(50.0 \pm 2.0)\%$; 当 NAA 进一步提高到 1.0 mg/L 时, 即在处理 R8(6-BA 为 1.0 mg/L) 和 R9(6-BA 为 2.0 mg/L) 中, 不定芽和拟球茎的诱导率进一步下降, 其中在处理 R8 中没有拟球茎产生。在处理 R10 中, 植物生长调节剂配比为 1.0 mg/L NAA + 3.0 mg/L 6-BA, 则没有不定芽产生, 只有少数拟球茎产生。上述结果表明, 不同 NAA 和 6-BA 组合对林荫银莲花的器官分化再生具有不同的调控作用, 其中 0.2 mg/L NAA + 2.0 mg/L 6-BA 组合(R5)对不定芽和拟球茎的诱导率均较高。

2.4 植物生长调节物质及温度对林荫银莲花组培苗生根的影响: 林荫银莲花生长在海拔较高的地区, 在



差异检验为 LSD 法, 不同的小写字母(a, b, c)分别表示不定芽、拟球茎不同处理间诱导率差异达 0.05 的显著水平

Using LSD method to test difference levels, different letters (a, b, and c) represent significant difference ($P < 0.05$) among different treatments at the rate of adventitious bud or CLS

图 2 不同植物生长调节物质对比对林荫银莲花外植体再生途径的影响

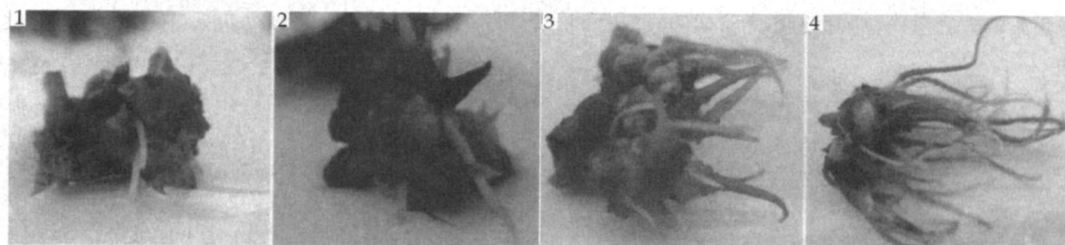
Fig 2 Effect of different ratios of plant growth regulators on morphogenesis of *A. flaccida*

自然条件下其休眠根茎需经较长时间的低温才能解除休眠, 萌发。本试验模拟自然低温条件, 研究了外源植物生长调节物质对拟球茎生根的促进作用。表 4 结果表明, 在 5 °C 暗培养 60 d 后观察, 即使不添加任何植物生长调节剂, 组培苗也可生根(图 3-1~2), 生根率为 60%, 平均生根数为 4.6 条/株; 在添加 0.2 mg/L NAA 培养基上, 生根率最高达 90%, 平均生根数为 16.2 条/株(图 3-4); 当 NAA 增加至 0.5 mg/L 时, 生根率(80%)和根数(10.0 条/株)略有下降; 而在添加 0.5 mg/L 的 IBA 培养基中, 拟球茎生根率虽然也有 80%, 但生根数明显低于其他处理(仅 3.0 条/株), 新生根却明显较为粗壮(图 3-3)。在 18 °C 的暗培养条件下, 拟球茎生根率和单芽生根数都降低, 并且, 在没有添加植物生长调节物质的处理中无新根分化。可见, 植物生长调节物质与温度对拟球茎生根具有协同效应。

表 4 植物生长调节物质和温度对林荫银莲花再生拟球茎生根的影响

Table 4 Effects of plant growth regulators and temperature on rooting of regenerated CLS of *A. flaccida*

NAA/ (mg · L ⁻¹)	IBA/ (mg · L ⁻¹)	5 °C		18 °C	
		生根率/%	生根数/ (条 · 株 ⁻¹)	生根率/%	生根数/ (条 · 株 ⁻¹)
0.0	0.0	60	4.6	0	0.0
0.2	0.0	90	16.2	30	3.2
0.5	0.0	80	10.0	10	2.5
0.0	0.5	80	3.0	0	0.0



1-不定芽诱导产生的根 2-拟球茎诱导产生的根 3-IBA 处理拟球茎产生的根 4-NAA 处理拟球茎产生的根
1-roots induced from adventitious buds 2-roots induced from CLS 3-roots induced from CLS by IBA treatment
4-roots induced from CLS by NAA treatment

图3 林荫银莲花组培再生不定芽和拟球茎诱导产生的根

Fig 3 Roots induced from regenerated adventitious buds or CLS of *A. flaccida* in tissue culture

3 讨论

本实验结果表明,添加 20 mg/L 6-BA 和 1.0 mg/L NAA 的 MS 培养基对林荫银莲花愈伤组织诱导效果较好,芽、叶片、叶柄和根均能诱导产生愈伤组织,但综合考虑愈伤组织诱导率及质量,以芽为外植体最佳,诱导率高,诱导产生的愈伤组织质地紧密,且分化系数高。植物生长调节物质 6-BA 和 NAA 的配比不同,诱导产生的不定芽和拟球茎的比例不一样,以添加 20 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA 组合的不定芽和拟球茎诱导率最高。林荫银莲花组培的不定芽再生苗和拟球茎在生产应用上存在明显不同的利用价值。不定芽在培养过程中由于基部连接在一起,在移栽时需要切割分离而产生伤口,因而会影响幼苗的移栽成活率。同时,由于林荫银莲花具有生长期短(自然条件下生长季节在3月中旬至5月上旬)的自然特性,导致不定芽在组培过程中易衰老死亡,从而影响其繁殖效率。而拟球茎再生后在培养后期渐渐脱离愈伤组织,并逐步进入休眠状态,这极利于制作人工种子,直接用于播种生产。通过调整植物生长调节剂配比建立外源调控器官再生分化途径的方法,在虎眼万年青研究中也得

到证实^[9];在马铃薯和魔芋^[10]等植物组织培养中也发现有类似的情况。因此,在本实验首次证明了组织培养繁殖林荫银莲花是可行的基础上,如何进一步提高拟球茎分化率,是建立更具实际应用价值的林荫银莲花组织培养快繁技术的关键。

参考文献:

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002
- [2] 韩钰, 钱京萍. 林荫银莲花对大鼠血清高密度脂蛋白的影响[J]. 宜昌医学专科学校学报, 1990, 18(1): 23-25
- [3] 邢飞虹, 张国斌, 邓成志, 等. 蜈蚣三七提取物对小鼠胶原性关节炎免疫作用机理的初步研究[J]. 中国免疫学杂志, 2008, 24(8): 716-718
- [4] 邢飞虹, 韩林涛, 张国斌, 等. 蜈蚣三七的化学成分及免疫抑制活性[J]. 中国药科大学学报, 2008, 39(6): 496-499
- [5] 马艳肖, 姬萍, 胡雅琴. 苦皮藤组织培养与植株再生[J]. 中草药, 2003, 34(10): 附4-附7
- [6] 刘长利, 崔俊茹. 萱草组织培养及植株再生的研究[J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(12): 2552-2553
- [7] 龙华, 胡雪峰, 黄衡宇. 獐牙菜的组织培养[J]. 中草药, 2009, 40(3): 462-466
- [8] 汪洋, 韩婷, 朱昱, 等. 番红花组织培养及快繁研究[J]. 中草药, 2009, 40(5): 807-809
- [9] 张光祥. 虎眼万年青不同形态发生途径激素调控的初步研究[J]. 四川师范大学学报(自然科学版), 1997, 20(5): 73-79
- [10] Hu J B, Liu Y J, Xie C H. Histological observations of morphogenesis in petiole derived callus of *Amorphophallus rivieri* Durieu in vitro [J]. Plant Cell Rep, 2005, 24: 642-648

天津中草药杂志社开通网上在线投稿系统

天津中草药杂志社编辑出版的4种期刊《中草药》、Chinese Herbal Medicines、《现代药物与临床》(原刊名《国外医药·植物药分册》)、《药物评价研究》(原刊名《中文科技资料目录·中草药》)为提高稿件处理效率,更好地为广大读者和作者服务,从2010年1月开始,中草药杂志社开通网上在线投稿系统。

1. 在线投稿请登陆天津中草药杂志社网站: <http://www.中草药杂志社.中国> 或 www.tipress.com 点击进入4刊网页,在页面左侧有“作者登录”链接,第一次登陆按操作说明注册后进行在线投稿;作者可通过点击“作者登录”进行稿件查询。

2. 原则上不再采用电子邮件、纸质投稿。

在此,对广大作者、读者和编委对本刊长期以来的支持表示深深的感谢!