

韦坤华,徐建平,蔡锦源,等. 外源激素对白花蛇舌草不同外植体体外培养的影响[J]. 江苏农业科学,2018,46(1):15-19.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.01.004

# 外源激素对白花蛇舌草不同外植体体外培养的影响

韦坤华<sup>1,2</sup>, 徐建平<sup>1,4</sup>, 蔡锦源<sup>3</sup>, 李林轩<sup>2</sup>, 缪剑华<sup>2</sup>, 高文远<sup>1,2</sup>

(1. 天津大学药物科学与技术学院, 天津 300072; 2. 广西药用植物园/广西药用资源保护与遗传改良重点实验室, 广西南宁 530023;  
3. 广西科技大学鹿山学院, 广西柳州 545616; 4. 包头医学院, 内蒙古包头 014060)

**摘要:**以带芽茎段、嫩叶与不带芽茎段为外植体,以 MS 培养基为基本培养基,采用正交设计研究不同外源激素组合(6-BA、IAA 和 KT)对白花蛇舌草体外培养的影响。结果发现,6-BA 对 3 种外植体的生长均具有显著影响,IAA 和 KT 对带芽茎段和嫩叶的生长具有显著影响,但对不带芽茎段的生长无显著影响,3 种外源激素对白花蛇舌草的 3 种不同部位来源材料的丛生芽增殖均无显著影响。综合考虑材料的生长与芽增殖情况,发现以白花蛇舌草带芽茎段进行丛生芽诱导的最适培养基为 MS+1.5 mg/L 6-BA+0.3 mg/L IAA+0.3 mg/L KT;以白花蛇舌草的幼嫩叶片进行丛生芽诱导的最适培养基为 MS+0.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L IAA+0.3 mg/L KT;白花蛇舌草不带腋芽茎段进行丛生芽诱导的最适培养基为 MS+2.5 mg/L 6-BA+0.3 mg/L IAA+0.3 mg/L KT。同时发现幼嫩叶片或不带芽嫩茎作为丛生芽诱导起始材料比带芽茎段更理想,成苗质量更好。

**关键词:**激素组合;白花蛇舌草;外植体;组织培养

**中图分类号:** S567.21<sup>+</sup>9.043 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)01-0015-04

白花蛇舌草(*Hedyotis diffusa* Willd.)为茜草科耳草属一年生草本植物。全草入药,味苦、甘,性寒。具有清热解毒、利湿之功效,用于治疗肺热咳嗽、毒蛇咬伤、咽喉肿痛等疾病<sup>[1]</sup>。白花蛇舌草广泛分布于亚热带地区,主产于我国福建、广东、江西、浙江、湖南等地,云南、贵州及四川南部亦有大量分布<sup>[2]</sup>。化学研究表明,白花蛇舌草中主要含有萜类、萜醌类、黄酮类、挥发油类、苯丙素和香豆素类、甾醇类、含酸化合物、多糖类化合物,其中萜类为白花蛇舌草的主要成分<sup>[3-4]</sup>。现代药理研究发现,白花蛇舌草具有抗氧化、抗肿瘤、增强免疫、神经保护等多种药理作用<sup>[5-10]</sup>,具有重要的开发应用价值。

近年来,由于使用量增加,白花蛇舌草资源不断枯竭,产量难以满足市场需求。且在人工栽培种植过程中发现白花蛇舌草极易混入伞房花耳草等伪品植株,造成药材品质下降。为了解决白花蛇舌草种源纯化问题,笔者在前人研究<sup>[11-12]</sup>的基础上,采用正交试验设计,优化白花蛇舌草组织培养快速繁殖体系。同时,在研究过程中,发现白花蛇舌草不同部位在离体条件下较为容易再生获得植株,因此,本研究也采用正交试验设计对白花蛇舌草不同外植体的植株再生及培养体系进行

筛选、优化,建立了不同外植体的快速繁殖培养体系,为其离体快繁技术的建立提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

材料采自广西壮族自治区药用植物园,为野生白花蛇舌草的种子,种子播种于 MS 基本培养基,发芽后获得无菌苗,再选取无菌苗的不同部位进行丛生芽诱导培养,最后对丛生芽进行生根培养。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 种子消毒** 取白花蛇舌草的成熟未开裂果实,依次用 2% (体积分数) 洗洁精水溶液浸泡 5 min,线状自来水冲洗 15~30 min,用 75% 的乙醇灭菌 15 s,无菌水冲洗 1 遍,再置于添加了 2~3 滴吐温-20 的 0.1% (体积分数) 氯化汞溶液中消毒 9 min,无菌水冲洗 3~5 次,每次浸洗 2 min,无菌滤纸吸干外植体表面的水分后,在无菌操作台上将果实拨开,将种子接种于 MS 空白培养基上培养促进种子萌发。培养条件为光照度 1 500~2 000 lx,光照时间 12 h/d,温度(26±2)℃。

**1.2.2 试验培养基设计** 试验采用正交试验进行,以 MS 为基本培养基,应用正交表 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>),对 6-BA、KT 和 IAA 等 3 个因素的 3 个水平设计正交试验培养基。正交试验的激素水平见表 1。

表 1 正交试验因素水平

水平	因素		
	A:6-BA(mg/L)	B:IAA(mg/L)	C:KT(mg/L)
1	0.5	0.1	0.1
2	1.5	0.3	0.3
3	2.5	0.5	0.5

**1.2.3 不同外植体的处理** 将种子萌发后的嫩芽接种到添加 0.5 mg/L 6-BA 的 MS 培养基上培养,培养条件为光照度

收稿日期:2016-08-18

基金项目:中组部西部之光访问学者项目(2015);广西科学研究与技术开发计划项目(桂科合 14125008-2-21、桂科重 14124002-1);广西博士后专项资金(2015 年);广西壮族自治区卫生厅中医药科技专项(编号:GZBZ14-14)。

作者简介:韦坤华(1980—),女,博士后,副研究员,从事药用植物组织培养方面的研究。E-mail:divinekh@163.com。

通信作者:缪剑华,博士,研究员,从事药用植物保育研究,E-mail:mjh1962@vip.163.com;高文远,教授,博士生导师,从事中药新药研发工作,E-mail:pharmgao@tju.edu.cn。

1 500 ~2 000 lx,光照时间 12 h/d,温度(26±2)℃。获得足够数量的丛生芽后,分别选取丛生芽的 3 个不同部位(带芽茎段、幼嫩叶片、不带芽茎段)作为外植体进行正交试验。

带芽茎段:切下 1 cm 的顶芽或带 1 个腋芽的茎段,插入到培养基上培养,插入深度 0.3 ~0.4 cm;幼嫩叶片:切取长约 0.5 cm、宽度基本一致的幼嫩叶片,在叶片上用解剖刀轻轻划 2 道伤口后,平铺到培养基表面培养;不带芽茎段的处理:选取幼嫩茎段,切取长度约 0.5 cm 的节间部分,平铺到培养基表面培养。

1.2.4 材料培养及数据统计 每个试验处理 4 瓶,每瓶接种 5 个外植体,培养条件为光照度 1 500 ~2 000 lx,光照时间 12 h/d,温度(26±2)℃,培养室中培养 30 d 后测定试管苗平均生长率和芽增殖系数。其中平均生长率=(30 d 后材料质量-接种时材料质量)/接种时材料质量;平均芽增殖系数=(30 d 后芽数-接种时材料数)/接种时材料数。

2 结果与分析

2.1 外源激素对白花蛇舌草带芽茎段培养的影响

前期研究发现白花蛇舌草的外植体在无菌组培条件下较容易获得丛生芽。为了明确不同激素组合对白花蛇舌草的带芽茎段增殖的影响,本研究将 1 cm 的顶芽或带 1 个腋芽的茎段,接种到正交试验培养基中,每天观察记录接种材料的变化。结果发现,培养 5 d 开始,接触培养基的切口部位开始膨大形成疏松愈伤组织,之后逐渐形成胚性愈伤,到 11 ~13 d 可明显观察到接触培养基的切口部位形成丛生芽团,并长出少量成型丛生芽(图 1)。但不接触培养基部分的腋芽或顶芽伸长,未见分化形成丛生芽。



图1 带芽茎段培养的白花蛇舌草丛生芽

对带芽茎段培养的正交试验结果见表 2 至表 4。平均生长率结果来看,白花蛇舌草带芽茎段培养 30 d 后,平均生长率在 4.7 ~7.6 倍之间。直观分析结果发现,3 种外源激素对带芽茎段培养的平均生长率影响顺序为 A(6-BA) > C(KT) > B(IAA),且 3 种激素均表现出低浓度促进生长,但浓度过高均抑制平均生长率的进一步增高。方差分析结果发现,3 种激素对白花蛇舌草带芽茎段的平均生长率均具有显著影响,*F* 值分别为 44.33、36.33 和 25.58。根据平均生长率的分析结果,确定带芽茎段增殖的最佳培养基外源激素配方为 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>,即 MS + 1.5 mg/L 6-BA + 0.3 mg/L IAA + 0.3 mg/L KT。

由芽的平均增殖系数结果可发现,白花蛇舌草带芽茎段培养的平均芽增殖系数均在 23 倍以上。直观分析结果发现,

表 2 白花蛇舌草茎段培养正交试验结果与直观分析

编号	6-BA	IAA	KT	空白	平均生长率	芽增殖系数
1	1	1	1	1	5.1	23.2
2	1	2	2	2	6.6	33.5
3	1	3	3	3	4.7	42.7
4	2	1	2	3	7.6	47.6
5	2	2	3	1	6.9	39.5
6	2	3	1	2	5.3	33.8
7	3	1	3	2	5.5	36.3
8	3	2	1	3	5.1	46.2
9	3	3	2	1	4.8	41.5

平均生长率直观分析

<i>k</i> <sub>1</sub>	5.47	6.07	5.17	5.60
<i>k</i> <sub>2</sub>	6.60	6.20	6.33	5.80
<i>k</i> <sub>3</sub>	5.13	4.93	5.70	5.80
<i>R</i>	1.47	1.27	1.17	0.20

芽增殖系数直观分析

<i>k</i> <sub>1</sub>	33.13	35.70	34.40	34.73
<i>k</i> <sub>2</sub>	40.30	39.73	40.87	34.53
<i>k</i> <sub>3</sub>	41.33	39.33	39.50	45.50
<i>R</i>	8.20	4.03	6.47	10.97

表 3 白花蛇舌草带芽茎段培养平均生长率方差分析

方差来源	离均差平方和	自由度	方差	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
A	3.55	2	1.77	44.33	0.10 > <i>P</i> > 0.05
B	2.91	2	1.45	36.33	0.10 > <i>P</i> > 0.05
C	2.05	2	1.02	25.58	0.10 > <i>P</i> > 0.05
误差	0.08	2	0.04	1.00	

表 4 白花蛇舌草带芽茎段培养芽增殖系数方差分析

方差来源	离均差平方和	自由度	方差	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
A	119.67	2	59.83	0.51	<i>P</i> > 0.1
B	29.63	2	14.81	0.13	<i>P</i> > 0.1
C	69.70	2	34.85	0.30	<i>P</i> > 0.1
误差	236.23	2	118.11	1.00	

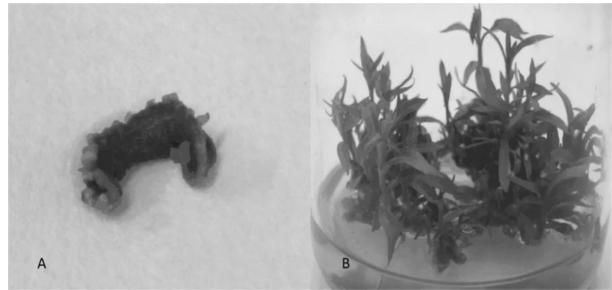
3 种外源激素对叶片培养芽增殖系数影响顺序为 A(6-BA) > C(KT) > B(IAA),其中 6-BA 浓度的提高有利于促进带芽茎段培养材料丛生芽的增殖,而适度增加 IAA 和 KT 浓度可促进丛生芽的增殖,但浓度过高具有抑制作用。方差分析结果表明,3 种激素均对带芽茎段培养材料均无显著影响,*P* 值均 >0.1。但不同培养基上的芽增殖系数差异较大,最低的芽增殖系数为 23.2 倍,而最高的芽增殖系数为 46.2 倍。根据平均芽增殖系数的分析结果,确定带芽茎段增殖的最佳培养基外源激素配方为 A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>,即 MS + 2.5 mg/L 6-BA + 0.3 mg/L IAA + 0.3 mg/L KT。

根据上述分析结果,3 种外源激素对带芽茎段培养材料的平均生长率具有显著影响,对芽增殖系数没有显著影响,较高浓度下,芽的增殖系数也较高。在试验过程中还发现,带芽茎段培养的材料中,接种的母芽很少分化形成丛生芽,仅为顶芽抽长或长出少量腋芽,而且培养材料容易出现叶片黄化、老化的现象。而接触培养基的切口部位长出的新的丛生芽由于生长空间限制,长势不一致,不利于实际生产利用。因此根据结果分析与材料的实际生长状况,确定嫩芽或腋芽增殖的最佳培养基外源激素配比为 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>,即 MS + 1.5 mg/L 6-BA +

0.3 mg/L IAA + 0.3 mg/L KT。

2.2 外源激素对白花蛇舌草叶片培养的影响

在进行带芽茎段培养的过程中,发现接触培养基的幼嫩叶片出现膨大,并形成丛生芽的现象。为了验证这一现象,并探讨不同外源激素组合对白花蛇舌草叶片培养的影响,本研究将白花蛇舌草的无菌幼嫩叶片外植体接入不同激素不同水平的 MS 培养基,观察记录其生长发育情况。结果发现白花蛇舌草叶片培养的成芽率为 100%,所有培养叶片均膨大形成疏松愈伤组织,再形成胚性愈伤,继而形成丛生芽簇。幼嫩叶片在培养基上培养 4~6 d 开始从切口部位出现不同程度的蜷曲膨胀,6 d 开始在膨大部位长出翠绿色成簇的不定芽点,10 d 时不定芽分化更为明显,高约 0.5 cm,呈翠绿色,且向无切口部位扩大,之后逐渐形成丛生芽簇(图 2)。



A. 叶片诱导形成愈伤组织 B. 愈伤组织分化获得的丛生芽

图2 叶片培养的白花蛇舌草丛生芽

30 d 后统计叶片外植体的平均生长率与芽增殖系数,结果见表 5 见表 7。根据平均生长率结果,白花蛇舌草叶片外植体培养 30 d 后,最低的平均生长率为 4.1 倍,最高的平均生长率为 8.1 倍。平均生长率的直观分析结果发现,3 种外源激素对叶片培养平均生长率的影响顺序为 B (IAA) > C (KT) > A (6-BA),其中 6-BA 浓度增加,抑制平均生长率的提高,IAA 浓度的增加可促进平均生长率的提高,而适度增加 KT 浓度可提高平均生长率,但浓度过高具有抑制作用。方差分析发现 3 种激素均对叶片的增殖具有影响,F 值分别为 10.11、43.00 和 21.44。根据平均生长率的分析结果,确定叶片增殖的最佳培养基外源激素配方为 A<sub>1</sub>B<sub>3</sub>C<sub>2</sub>,即 MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L IAA + 0.3 mg/L KT。

根据芽的平均增殖系数结果,白花蛇舌草叶片外植体培养的平均芽增殖系数均在 25 倍以上。直观分析结果发现,3 种外源激素对叶片培养芽增殖系数影响顺序为 A (6-BA) > C (KT) > B (IAA),其中 6-BA 和 IAA 浓度的提高有利于叶片培养材料丛生芽的增殖,而适度增加 KT 浓度可促进叶片培养材料丛生芽的增殖,但浓度过高具有抑制作用。方差分析发现,3 种激素均对叶片培养无显著影响,P 值均 > 0.1。但不同培养基上的芽增殖系数差异较大,最低的芽增殖系数为 25.3 倍,而最高的芽增殖系数为 54.5 倍。根据平均芽增殖系数的分析结果,确定叶片增殖的最佳培养基外源激素配方为 A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>2</sub>,即 MS + 2.5 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L IAA + 0.3 mg/L KT。

上述分析结果表明,3 种外源激素对叶片培养的平均生长率具有显著影响,对芽增殖系数没有显著影响,且芽的增殖系数随着激素浓度的增加而增加。但在本试验过程中发现,

表 5 白花蛇舌草叶片培养正交实验结果与直观分析

编号	6-BA	IAA	KT	空白	平均生长率	芽增殖系数
1	1	1	1	1	5.3	25.3
2	1	2	2	2	8.1	37.6
3	1	3	3	3	6.5	45.5
4	2	1	2	3	4.9	48.0
5	2	2	3	1	5.1	35.2
6	2	3	1	2	6.6	28.8
7	3	1	3	2	4.1	33.7
8	3	2	1	3	6.5	52.1
9	3	3	2	1	7.5	54.5

平均生长率直观分析				
k <sub>1</sub>	6.63	4.77	6.13	5.97
k <sub>2</sub>	5.53	6.57	6.83	6.27
k <sub>3</sub>	6.03	6.87	5.23	5.97
R	1.10	2.10	1.60	0.30

芽增殖系数直观分析				
k <sub>1</sub>	36.13	35.67	35.40	38.33
k <sub>2</sub>	37.33	41.63	46.70	33.37
k <sub>3</sub>	46.77	42.93	38.13	48.53
R	10.63	7.27	11.30	15.17

表 6 白花蛇舌草叶片培养平均生长率方差分析

方差来源	离均差平方和	自由度	方差	F 值	P 值
A	1.82	2	0.91	10.11	0.10 > P > 0.05
B	7.74	2	3.87	43.00	0.01 < P < 0.05
C	3.86	2	1.93	21.44	0.01 < P < 0.05
误差	0.18	2	0.09	1.00	

表 7 白花蛇舌草叶片培养芽增殖系数方差分析

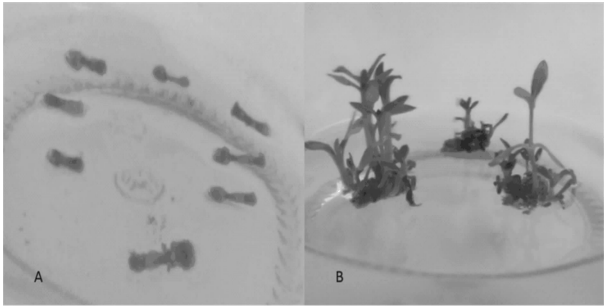
方差来源	离均差平方和	自由度	方差	F 值	P 值
A	203.50	2	101.75	0.57	P > 0.1
B	90.10	2	45.05	0.25	P > 0.1
C	208.55	2	104.27	0.58	P > 0.1
误差	358.74	2	179.37	1.00	

叶片培养材料的芽增殖系数增加到一定程度后,由于生长空间不足,容易造成丛生芽纤细、黄化等现象,培养时间稍微延长容易出现枯死,不利于种苗的工厂化生产。因此根据结果分析与材料的实际生长状况,确定叶片增殖的最佳培养基外源激素配比为 A<sub>1</sub>B<sub>3</sub>C<sub>2</sub>,即 MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L IAA + 0.3 mg/L KT。在此培养条件下,平均生长率约为 7.5 倍,芽增殖系数约为 40 倍,材料生长状况良好,丛生芽粗壮,色泽翠绿。

2.3 外源激素对白花蛇舌草茎段(不带腋芽)培养的影响

为了拓展外植体来源,为其他材料的组织培养,尤其是珍稀濒危物种的组织培养提供技术依据,本研究还考察了不同激素组合对白花蛇舌草节间不带芽茎段培养的影响。结果发现,白花蛇舌草不带芽的茎段培养成芽率为 100%,所有培养茎段均从两端切口处膨大形成疏松愈伤组织后形成胚性愈伤,继而形成丛生芽簇。根据试验记录,茎段在培养基上培养 3~4 d 开始从切口部位出现不同程度的膨大,10~12 d 观察到茎段两端长出大量丛生芽(图 3)。

30 d 后统计茎段外植体的平均生长率与芽增殖系数,结果见表 8 至表 10。根据平均生长率结果,白花蛇舌草茎段外



A. 茎段诱导形成愈伤 B. 愈伤分化获得的丛生芽

图3 不带芽茎段培养的白花蛇舌草丛生芽

表 8 白花蛇舌草不带芽茎段培养正交实验结果与直观分析

编号	6-BA	IAA	KT	空白	平均生长率	芽增殖系数
1	1	1	1	1	4.6	23.9
2	1	2	2	2	5.5	26.2
3	1	3	3	3	5.0	35.5
4	2	1	2	3	6.3	33.0
5	2	2	3	1	6.1	27.8
6	2	3	1	2	5.3	25.2
7	3	1	3	2	8.7	38.4
8	3	2	1	3	9.4	45.0
9	3	3	2	1	8.3	30.8

平均生长率直观分析				
$k_1$	5.03	6.53	6.43	6.33
$k_2$	5.90	7.00	6.70	6.50
$k_3$	8.80	6.20	6.60	6.90
$R$	3.77	0.80	0.27	0.57

芽增殖系数直观分析				
$k_1$	28.53	31.77	31.37	27.50
$k_2$	28.67	33.00	30.00	29.93
$k_3$	38.07	30.50	33.90	37.83
$R$	9.53	2.50	3.90	10.33

表 9 白花蛇舌草不带芽茎段培养平均生长率方差分析

方差来源	离均差平方和	自由度	方差	$F$ 值	$P$ 值
A	23.35	2	11.67	45.88	$0.10 > P > 0.05$
B	0.97	2	0.48	1.90	$P > 0.1$
C	0.11	2	0.05	0.21	$P > 0.1$
误差	0.51	2	0.25	1.00	

表 10 白花蛇舌草不带芽茎段培养芽增殖系数方差分析

方差来源	离均差平方和	自由度	方差	$F$ 值	$P$ 值
A	179.26	2	89.63	1.02	$P > 0.1$
B	9.38	2	4.69	0.05	$P > 0.1$
C	23.50	2	11.75	0.13	$P > 0.1$
误差	175.11	2	87.55	1.00	

植株培养 30 d 后,最低的平均生长率为 4.6 倍,最高的平均生长率为 9.4 倍。从平均生长率的直观分析结果发现,3 种外源激素对叶片培养芽增殖系数影响顺序为 A(6-BA) > B(IAA) > C(KT),其中 6-BA 浓度的提高可显著提高茎段培养材料的平均生长率,范围值  $R$  为 3.77,而 IAA 与 KT 浓度的提高对茎段培养平均生长率的影响不大,范围值  $R$  分别为 0.80 和 0.27。方差分析发现 6-BA 对茎段培养的平均生长率具有显著影响,而 IAA 和 KT 无显著影响。根据平均生长

率的分析结果,确定茎段增殖的最佳培养基外源激素配方为  $A_3B_2C_2$ ,即  $MS + 2.5 \text{ mg/L } 6-BA + 0.3 \text{ mg/L IAA} + 0.3 \text{ mg/L KT}$ 。

根据芽的平均增殖系数结果,发现白花蛇舌草茎段外植体培养的平均芽增殖系数均在 23.9 倍以上。直观分析发现,3 种外源激素对叶片培养芽增殖系数影响顺序为 A(6-BA) > C(KT) > B(IAA),其中 6-BA 浓度的提高可显著提高茎段培养材料的芽增殖系数,范围值  $R$  为 9.53;适度的 IAA 浓度可提高茎段材料的芽增殖系数,但浓度过高具有抑制作用;KT 浓度的增加对茎段培养材料的影响不具有规律性,试验中表现为较低与较高浓度均能提高培养材料的芽增殖系数。方差分析发现 3 种激素对叶片培养均无显著影响, $P$  值均  $> 0.1$ 。但不同培养基上的芽增殖系数差异较大,最低的芽增殖系数为 23.9 倍,而最高的芽增殖系数为 45.0 倍。根据平均芽增殖系数的分析结果,确定叶片增殖的最佳培养基外源激素配方为  $A_3B_2C_3$ ,即  $MS + 2.5 \text{ mg/L } 6-BA + 0.3 \text{ mg/L IAA} + 0.5 \text{ mg/L KT}$ 。

上述分析结果表明,6-BA 对茎段培养的平均生长率具有显著影响,对芽增殖系数没有显著影响,IAA 与 KT 对茎段培养的平均生长率和芽增殖系数均无显著影响,但较高浓度的激素组合获得较高的芽增殖系数。在试验过程中观察发现,茎段培养获得的丛生芽长势较为均一,色泽翠绿,植株健壮,是比较理想的工厂化生产材料。因此根据结果分析与材料的实际生长状况,确定茎段培养的最佳培养基外源激素配比为  $A_3B_2C_2$ ,即  $MS + 2.5 \text{ mg/L } 6-BA + 0.3 \text{ mg/L IAA} + 0.3 \text{ mg/L KT}$ 。在此培养条件下,平均生长率约为 9.0 倍,芽增殖系数约为 40 倍,材料生长状况良好,丛生芽粗壮,色泽翠绿。

3 讨论

在体外培养条件下,白花蛇舌草的芽、幼嫩叶片与不带芽茎段均适用于丛生芽的诱导培养,均可培养获得大量丛生芽,且成芽率均达 100%。但不同来源的外植体培养效果并不相同,几乎所有丛生芽均是通过接触培养基的切口部位萌动形成愈伤组织后再生形成丛生芽。嫩芽或带腋芽嫩茎培养的材料,不接触培养基部分往上延伸,但不分化形成丛生芽,顶部材料容易枯黄,而基部材料由于空间限制,丛生芽长势不均一,难以获得优质材料。以幼嫩叶片或不带芽嫩茎为外植体培养的材料,获得的丛生芽长势较为均一,颜色翠绿新鲜,成苗质量较好,但需要控制丛生芽增殖系数,以免增殖系数过高,获得的丛生芽缺少生存空间而出现黄化等现象。

不同的激素组合对白花蛇舌草外植体培养的影响不同,嫩芽或腋芽培养的最佳培养基激素配比为  $MS + 1.5 \text{ mg/L } 6-BA + 0.3 \text{ mg/L IAA} + 0.3 \text{ mg/L KT}$ ;以幼嫩叶片为外植体培养的最佳培养基激素配比为  $MS + 0.5 \text{ mg/L } 6-BA + 0.5 \text{ mg/L IAA} + 0.3 \text{ mg/L KT}$ ;以茎段为外植体培养的最佳培养基激素配比为  $MS + 2.5 \text{ mg/L } 6-BA + 0.3 \text{ mg/L IAA} + 0.3 \text{ mg/L KT}$ 。但综合考虑整体试验结果,3 种材料的最适 6-BA 浓度均不相同,表明对 3 种不同外植体培养产生的不同影响主要来源为 6-BA。

数据分析发现,白花蛇舌草不同外植体培养材料的平均

李红,李超,张敏. 金针菇菌株遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 江苏农业科学,2018,46(1):19-22.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.01.005

# 金针菇菌株遗传多样性的 RAPD 分析

李红,李超,张敏

(辽宁省农业科学院食用菌研究所,辽宁沈阳 110161)

**摘要:**采用 RAPD 分子标记技术对 35 株来源不同的金针菇菌株进行遗传多样性分析,从 22 条引物中筛选出 8 条多态性丰富、谱带清晰且重复性好的引物进行了 RAPD-PCR 扩增。结果表明:8 条引物共扩增出 68 条条带,其中多态性条带为 56 条,多态位点率为 82%,遗传相异系数变化范围为 0~0.71。在遗传相异系数为 0.60 时,可将 35 个金针菇菌株划为五大类群,为今后金针菇的分类鉴定及遗传育种亲本的选配提供了理论依据。

**关键词:**金针菇;RAPD;分子标记;遗传多样性;多态性;谱带;重复性;多态位点;分类鉴定

**中图分类号:** S646.1<sup>+</sup>50.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)01-0019-04

金针菇 [*Flammulina velutipes* (Fr.) Singer.] 隶属于真菌门担子菌亚门层菌纲无隔担子菌亚纲伞菌目口蘑科小火焰菌属,因形似金针菜而得名。金针菇是古今中外著名的食用菌之一,金针菇蛋白质含量高,氨基酸种类丰富,具有抗癌功能,经常食用具有预防高血压、治疗肝病和胃溃疡等功效。金针菇特别以富含赖氨酸而著称,可以活化神经细胞,促进智力发育,素有“增智菇”之美称,是当今市场上十分走俏的天然保健食品之一。随着金针菇产业的迅速发展,金针菇新品种选育已成为食用菌育种研究的重要内容之一,为此,开展金针菇菌株的遗传多样性分析及了解菌株间遗传差异就具有重要意义。

随机扩增多态性 DNA (randomly amplified polymorphic DNA, 简称 RAPD) 标记以基因组 DNA 为模板,以 1 个随机的

寡核苷酸序列(通常为 10 个碱基对)作引物,通过 PCR 扩增反应,产生不连续的 DNA 产物,用以检测 DNA 序列的多态性。它具有程序简单、DNA 用量少、随机引物没有严格的种属界限、不须要事先知道基因组的任何分子信息就能快速检测大量遗传多态性等优点。在食用菌领域常用于品种鉴定、遗传关系分析、分子遗传的构建及基因定位等研究。Khush 等用 RAPD 技术分析双孢蘑菇的野生和栽培品种,在 8 个异核体中识别出 7 个不同的基因型。说明 RAPD 标记在遗传研究中的通用性和对菌株指纹识别的有效性<sup>[1]</sup>。Zhang 等用 RAPD 标记对 15 个香菇菌株行分析,其中 13 个菌株的 DNA 指纹各异,2 个菌株谱带一致,说明 RAPD 标记可用于鉴别香菇菌种,并可用于香菇育种和菌种改良<sup>[2]</sup>。詹才新等以金针菇不同亲本菌株及其杂交种为材料进行 RAPD 分析后,认为 RAPD 技术可鉴别出真伪杂种<sup>[3]</sup>。Castle 等曾以 RFLP 为标记进行双孢蘑菇及大肥菇种内和种间多态性研究。王翠等应用 RAPD 技术对滇西北地区冬虫夏草、阔孢虫草和蛹虫草进行遗传分化研究,表明虫草群体中存在着显著的地区差异性<sup>[4]</sup>。本研究应用 RAPD-PCR 分子标记的方法对金针菇菌株遗传多样性进行分析,以期对金针菇资源遗传多样性及遗

收稿日期:2017-05-18

基金项目:辽宁省科学事业公益研究基金(编号:2015002012)。

作者简介:李红(1979—),女,辽宁开原人,硕士,助理研究员,从事食用菌菌种选育及栽培研究。E-mail:li79hong@163.com。

通信作者:李超,硕士,副研究员,从事食用菌育种及栽培技术研究。E-mail:lnnkylxy@163.com。

生长率与芽增殖系数之间并不存在线性关系,平均增长率高的试验组,芽增殖系数并不一定高,反之亦然。因此,在进行最佳培养条件确定时,需要综合材料的培养状况,选择适宜生产最优质培养材料的培养方案。

## 参考文献:

- [1] 国家中医药管理局中华本草编委会. 中华本草:第六卷[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999.
- [2] 范崇庆,李尧尧,金艳,等. 白花蛇舌草质量标准[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(17):98-101.
- [3] 纪宝玉,范崇庆,裴莉昕,等. 白花蛇舌草的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(19):235-240.
- [4] 陈永康. 白花蛇舌草的化学成分研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(17):290-293.
- [5] 于新,杜志坚,陈悦娇,等. 白花蛇舌草提取物抗氧化作用的研究[J]. 食品与发酵工业,2002,28(3):10-13.

- [6] 赵浩如,李瑞,林以宁,等. 白花蛇舌草不同提取工艺对抗肿瘤活性的影响[J]. 中国药科大学学报,2002,33(6):510-513.
- [7] 王宇翎,张艳,方明,等. 白花蛇舌草总黄酮的免疫调节作用[J]. 中国药理学通报,2005,21(4):444-447.
- [8] 孟玮,邱世翠,刘志强,等. 白花蛇舌草对小鼠淋巴细胞增殖和抗体产生的影响[J]. 中国中医药科技,2003,10(6):340.
- [9] Kim Y, Park E J, Kim J, et al. Neuroprotective constituents from *Hedyotis diffusa*[J]. Journal of Natural Products,2001,64(1):75-78.
- [10] 朱雪瑜. 白花蛇舌草中的神经保护成分[J]. 国外医药(植物药分册),2002,17(1):28-29.
- [11] 李国平,杨鹭生. 白花蛇舌草的组织培养和植株再生[J]. 植物生理学通讯,2002,38(2):150.
- [12] 巢建国,谈献和,张瑜,等. 白花蛇舌草组织培养研究[J]. 南京中医药大学学报(自然科学版),2005,21(6):369-370.