

刘颖,李冬杰,王沛沛,等. 怀牛膝组织培养和快速繁殖体系的优化[J]. 江苏农业科学,2016,44(7):83-86.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.07.023

怀牛膝组织培养和快速繁殖体系的优化

刘颖,李冬杰,王沛沛,朱昀,李朝炜,魏景芳

(河北科技大学生物科学与工程学院,河北石家庄 050000)

摘要:为优化怀牛膝(*Achyranthes bidentata* BL.)组织培养和快速繁殖体系,以怀牛膝茎段作为外植体,选择MS为基本培养基,研究不同激素配比对组培快繁的影响。结果表明,3种激素对于外植体芽诱导中影响顺序依次为6-BA > IBA > KT,最佳芽诱导优化培养基为MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L IBA + 0.2 mg/L KT。诱导丛生芽增殖的培养基以MS + 1.3 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L IBA + 0.2 mg/L KT为最优,增殖系数达6.03。优化生根培养以1/2 MS + 0.5 mg/L IBA效果最佳,生根率最高,达95.1%。组培苗移栽至炭灰:营养土:蛭石(体积比1:2:1)的基质中,成活率达到100%,且植株生长健壮。

关键词:怀牛膝;组织培养;快速繁殖;优化

中图分类号: Q945.5;S567.23⁺9.043 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)07-0083-04

怀牛膝(*Achyranthes bidentata* BL.)属苋科牛膝属多年生草本植物,高70~120 cm,生长于河南沁阳、武陟、修武、温县一带,为中国著名的“四大怀药”之一^[1]。其根呈圆柱形,直径5~10 mm,土黄色;茎有棱角或四方形,绿色,有的还带有紫色;叶片一般是椭圆形或是椭圆披针形,基部呈楔形或是宽楔形。怀牛膝因其根含皂苷元、齐墩果酸、蜕皮激素、牛膝多糖等有效成分,具有补肝肾、强筋骨、通血脉、降血压、镇痛、引药下行和泻通淋等功效^[2],所以越来越受到人们的青睐,具有广阔的开发利用前景。为了满足市场需求,须要对其进行大规模的培养栽培。近年来,对于牛膝的组织培养研究也有相关报道^[3-5],但对于外植体选择、激素配比及丛生芽分化上还存在一些问题^[6-7]。本研究选取怀牛膝茎段为外植体,建立并优化怀牛膝的组织培养及快繁体系,以期获得最佳的

组培条件,整体提高怀牛膝组培的效率,为其药用成分的长期工厂化生产奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料由河北科技大学植物组织培养实验室提供,以含有1~2个芽眼的怀牛膝2 cm幼嫩茎段为外植体。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体处理 选取怀牛膝2 cm带腋芽茎段,先用去离子水冲洗,再加入稀释的洗洁精清洗,之后置于超净工作台上。用75%乙醇浸泡30 s,无菌水冲洗3次,然后用0.1%氯化汞消毒3 min,最后用无菌水冲洗3次,用消毒滤纸吸干水分,在无菌条件下,把消毒后的茎段切成0.5 cm的小段待接种。

1.2.2 芽诱导培养基的优化 以MS为基本培养基(蔗糖3%、琼脂0.8%,pH值为5.7~5.8),添加不同浓度的6-BA、IBA、KT,采用L₉(3⁴)正交设计表(表1),以筛选出最佳的激素组合,确定最佳的诱导培养基。将消毒处理后的外植体置于诱导培养基上,每种培养基中接种3个,重复3次,置于培养室中,进行培养并定期观察不同外植体的诱导及分化情况,14 d后统计每个外植体诱导出的丛生芽数。

收稿日期:2015-11-18

基金项目:国家科技专项(编号:2011ZX08001-003);河北省科技支撑计划(编号:14237503D)。

作者简介:刘颖(1980—),女,河北新河人,硕士,讲师,研究方向为药用植物细胞工程。E-mail:llp327@163.com。

通信作者:魏景芳,博士,教授,研究方向为植物细胞工程。E-mail:Wjfang@126.com。

16.0分析软件进行聚类,构建了遗传相关聚类图谱,为辣椒抗病育种以及综合防治提供了重要的理论参考。ISSR标记技术以其多态性高、稳定性强、简便快捷等优势在未来必将在更多物种、更多领域中获得广泛的应用。

参考文献:

- [1]王永平,张绍刚,张婧,等. 我国辣椒产业发展现状及趋势[J]. 河北农业科学,2009,13(6):135-138.
- [2]毛亦卉,向拉蛟. 对我国辣椒产业发展对策思考[J]. 辣椒杂志,2007,5(3):1-4.
- [3]赵宁. 从干红辣椒中提取辣椒红素的研究[D]. 北京:北京化工大学,2004:1-2.

- [4]Kashi Y, King D, Soller M. Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation[J]. Trends in Genetics, 1997, 13(2): 74-78.
- [5]Godwin I D, Aitken E A B, Smith L W. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics[J]. Electrophoresis, 1997, 18(9): 1524-1528.
- [6]黄光文,陈觉梁,王伟成,等. 运用ISSR标记鉴别水稻品种的初步研究[J]. 杂交水稻, 2006, 21(3): 64-67.
- [7]张立荣,刘大群,徐大庆,等. 小麦ISSR分析初探[J]. 河北农业大学学报, 2004, 27(1): 10-13.
- [8]袁洪波,艾尼江,赵建军,等. 棉花黄萎病菌致病力分化与ISSR遗传变异分析[J]. 华北农学报, 2013, 28(5): 84-89.

表1 怀牛膝茎段外植体芽诱导试验 $L_9(3^4)$ 正交设计因素和水平

水平	激素浓度(mg/L)		
	A:6-BA	B:IBA	C:KT
1	0.5	0.5	0.1
2	1.0	1.0	0.2
3	1.5	1.5	0.3

1.2.3 丛生芽增殖培养基的优化 以MS为基本培养基(蔗糖3%、琼脂0.8%, pH值为5.7~5.8), 添加IBA 0.5 mg/L、KT 0.2 mg/L及3种不同浓度梯度的6-BA(表2), 以筛选出最佳的6-BA浓度, 确定最优的增殖培养基。切取1 cm长的单芽接种至3种增殖培养基上, 每种培养基接种30个, 置于培养室中进行增殖培养, 观察丛生芽增殖及生长情况, 25 d后统计丛生芽的增殖系数(增殖系数=丛生芽分化的个数/丛生芽分化的外植体数)。

表2 怀牛膝丛生芽增殖培养基

培养基	激素浓度(mg/L)		
	6-BA	IBA	KT
Z1	1.0	0.5	0.2
Z2	1.3	0.5	0.2
Z3	1.5	0.5	0.2

1.2.4 生根培养基的优化 切取生长较粗壮的丛生芽接种于1/2 MS培养基(蔗糖3%、琼脂0.8%, pH值5.7~5.8)上, 并添加不同浓度的激素(表3)进行生根诱导培养, 每种培养基接种约30个丛生芽。观察根的萌发及生长情况, 统计根长、生根数和生根率(生根率=生根的组培苗数/接种的组培苗数×100%)。

表3 诱导生根的培养基

培养基	激素浓度(mg/L)	
	NAA	IBA
G1	0.3	0
G2	0.5	0
G3	0	0.3
G4	0	0.5

1.2.5 培养条件 培养室的温度为(25±2)℃, 光照强度为2 000 lx, 光照时间为14 h/d。

1.2.6 练苗与移栽的优化 当生根苗长至5 cm时, 置于温室中揭去瓶盖练苗4 d。然后用镊子取出小植株, 流水洗净根部附着的培养基, 移栽至苗床上, 苗床基质采用4种处理, 分别为(1)草炭土;(2)营养土;(3)草炭土+营养土+蛭石(体积比1:2:1);(4)营养土+蛭石(体积比2:1)。将移栽苗置于相对湿度80%~90%、温度(25±2)℃的环境中遮阴培养。培养期间, 用1/2 MS的大量元素的营养液润湿基质, 观察怀牛膝苗的生长情况, 30 d后统计成活率, 并比较生长状态。

1.3 数据统计

利用SPSS 20.0软件统计分析数据。

2 结果与分析

2.1 外植体芽诱导的优化

将处理后的怀牛膝带芽茎段分别接种于不同激素浓度组

合的诱导培养基中, 在相同条件下进行离体培养, 比较不同激素浓度配比对外植体芽诱导的影响, 正交试验结果见表4, 方差分析结果见表5。

从表4可以看出, 试验中选取的3种激素, 即6-BA、IBA、KT对怀牛膝外植体的诱导均具有影响。通过极差分析得出, 3种激素对于丛生芽诱导的影响从强到弱依次为6-BA>IBA>KT, 3种激素最优水平的组合是A₂B₁C₂。方差分析结果表明, 3种影响因素的不同水平之间均存在极显著差异, 3种激素的不同浓度配比对外植体的诱导具有极显著的影响。

表4 怀牛膝外植体芽诱导正交试验结果

培养基号	因素				每个外植体平均丛生芽数(个)
	A:6-BA	B:IBA	C:KT	D(误差)	
1	1	1	1	1	1.88
2	1	2	2	2	2.13
3	1	3	3	3	1.75
4	2	1	2	3	3.25
5	2	2	3	1	2.75
6	2	3	1	2	2.38
7	3	1	3	2	3.08
8	3	2	1	3	2.50
9	3	3	2	1	2.68
k_1	1.92	2.74	2.25	2.44	
k_2	2.79	2.46	2.69	2.53	
k_3	2.75	2.27	2.53	2.50	
R	0.87	0.47	0.44	0.09	

表5 怀牛膝外植体芽诱导试验的方差分析

来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
A	4.720	2	2.360	2 308.826	0.000 **
B	0.755	2	0.378	369.424	0.000 **
C	1.128	2	0.564	551.874	0.000 **
D(误差)	10.230	2	3.614	2.380	0.121

注:“**”表示在0.01水平上差异显著。

在9种不同浓度的激素组合培养基中外植体芽的诱导和生长情况不同(表4、图1)。接种在4号培养基中的外植体出芽数最高, 平均达到3.25; 4号培养基中外植体芽的生长状态最好。培养7 d后, 9种培养基中的外植体均于切口处萌发侧芽, 使其出现了启动现象。但随着培养时间的延长, 不同培养基中的外植体芽生长情况出现了差异。5号、6号培养基中茎段基部愈伤组织生长旺盛, 丛生芽数量少, 而4号培养基中茎段的腋芽着生处膨大变绿, 在切口处形成少量的绿色愈伤组织; 并在茎节或茎尖端紧靠茎节上、下的部位分化出侧芽, 且生长旺盛; 14 d形成丛生芽。

结合正交试验分析结果及外植体芽诱导和生长情况, 4号培养基的激素浓度配比为1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L IBA+0.2 mg/L KT, 为怀牛膝外植体芽诱导的最佳激素配比方案。

2.2 丛生芽增殖的优化

正交试验结果表明, 影响怀牛膝丛生芽诱导分化的主要因素是6-BA, 试验设计了6-BA 3个不同浓度梯度的增殖培养基。将怀牛膝单芽接种至3种不同的增殖培养基中, 观察丛生芽的增殖及生长情况, 培养30 d后统计丛生芽的增殖

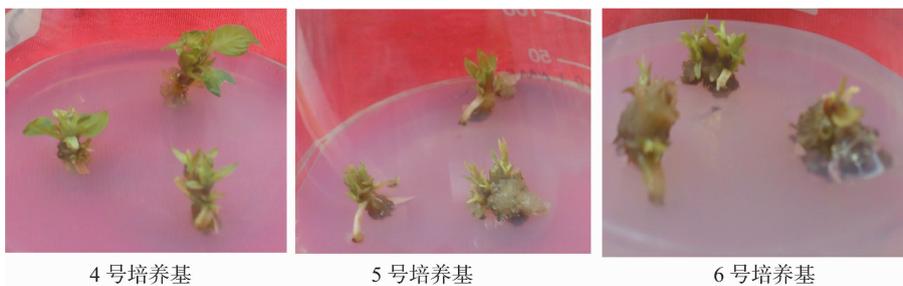


图1 培养 14 d 不同激素配比对怀牛膝外植体芽诱导的影响

系数及株高,比较不同 6-BA 浓度对丛生芽增殖的影响(表 6)。结果表明,在 Z2 培养基中,即添加 1.3 mg/L 6-BA 时,丛生芽的增殖系数最高,平均为 6.03,丛生芽生长最快,且植株总体生长状况最佳,整体表现均匀、壮实,植株株高达 4.12 cm(图 2)。培养基 6-BA 浓度增加 1.5 mg/L 或浓度减少至 1.0 mg/L,丛生芽增殖系数和株高均偏低,且 3 种不同浓度的 6-BA 诱导丛生芽增殖的效果差异显著。牛膝丛生芽增殖最适的 6-BA 浓度为 1.3 mg/L,最优的增殖培养基为 Z2,即 MS + 1.3 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L IBA + 0.2 mg/L KT。



图2 培养 30 d 丛生芽增殖情况

2.3 诱导生根的优化

选取生长健壮且长势一致、高 3~5 cm 的丛生芽接入 4 种不同生根培养基中进行生根诱导。7 d 可见根已长出,11 d 根长可达约 5 cm,根数最多达到 8 条,单芽长高变大,逐渐长成苗。从表 7 可以看出,在 1/2 MS 培养基中添加一定浓度的 NAA 或 IBA 都可以诱导怀牛膝丛生芽生根,但不同激素种类和浓度对生根诱导的影响不同(图 3)。多重比较分析结果显示,4 种不同生根培养基中丛生芽的根长、平均生根数、生根率均存在显著差异。整体来看,在添加 NAA 的 G1、G2 培养基中,怀牛膝丛生芽生根速度慢,根粗且短,生根率低;而在添加 IBA 的 G3、G4 培养基中,丛生芽生根速度较快,生根率较高。在 G4 培养基中生根效果最好,生根率最高,为 95.1%,并且生根速度快,根多而长,粗细适中。所以,怀牛膝丛生芽诱导生根的最佳培养基为 G4 培养基,即 1/2 MS + 0.5 mg/L IBA。

表 7 不同激素对怀牛膝丛生芽生根的影响

培养基	根长 (cm)	平均生根数 (条)	生根率 (%)
G1	0.53d	2.69d	43.1d
G2	0.87c	3.82c	55.7c
G3	3.26b	5.41b	80.4b
G4	5.19a	8.03a	95.1a

2.4 组培苗练苗移栽的优化

怀牛膝生根苗经过练苗 4 d 后移栽至 4 种基质中,比较

表 6 不同增殖培养基对丛生芽增殖的影响

培养基	增殖系数	株高 (cm)	生长情况
Z1	4.58c	3.65c	生长较快,植株粗细不均匀、瘦弱
Z2	6.03a	4.12a	生长快,植株均匀、壮实
Z3	5.22b	3.83b	生长较快,植株较均匀、壮实

注:同列数据后不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。表 7 同。

在不同的基质中组培苗的生长情况,结果(表 8)表明,怀牛膝的生根苗移栽至草炭灰:营养土:蛭石(体积比 1:2:1)的基质中成活率最高,达 100%,且 15 d 后幼苗长出新叶(图 4),植株壮实。

3 结论与讨论

植物生长调节物质对植物细胞的分裂、分化产生影响。一定浓度配比的细胞分裂素和生长素对丛生芽的诱导与增殖发挥着重要作用。不同激素浓度组合的正交试验及极差分析结果表明,3 种激素对于丛生芽诱导的影响从强到弱依次为 6-BA > IBA > KT,3 种激素最优水平的组合是 $A_2B_1C_2$ 。以此激素组合的培养基诱导怀牛膝外植体出芽数最多,平均值达 3.25,并且外植体芽生长健壮、长势好,综合正交试验结果和外植体芽的诱导分化,筛选出怀牛膝外植体芽诱导的最佳培养基为 MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L IBA + 0.2 mg/L KT。结果表明,细胞分裂素 6-BA 在丛生芽诱导中最为重要,它可以促进细胞分裂,使芽分化,促进萌发^[8],特别是与一定浓度的生长素协同作用时会加速细胞分裂,加快丛生芽分化生长的速度。增加 6-BA 浓度,外植体的出芽数会增加,但当 6-BA 浓度达到 1.5 mg/L 时,外植体的出芽数呈减少的趋势,外植体芽的诱导受到了抑制,本结论与刘坚等的研究结果^[9]一致,可能与试验材料自身生理特性及细胞分裂素和生长素的交互作用有关^[10]。在丛生芽增殖诱导中,设计 6-BA 的 3 个浓度梯度^[11],获得最佳的增殖培养基为 MS +

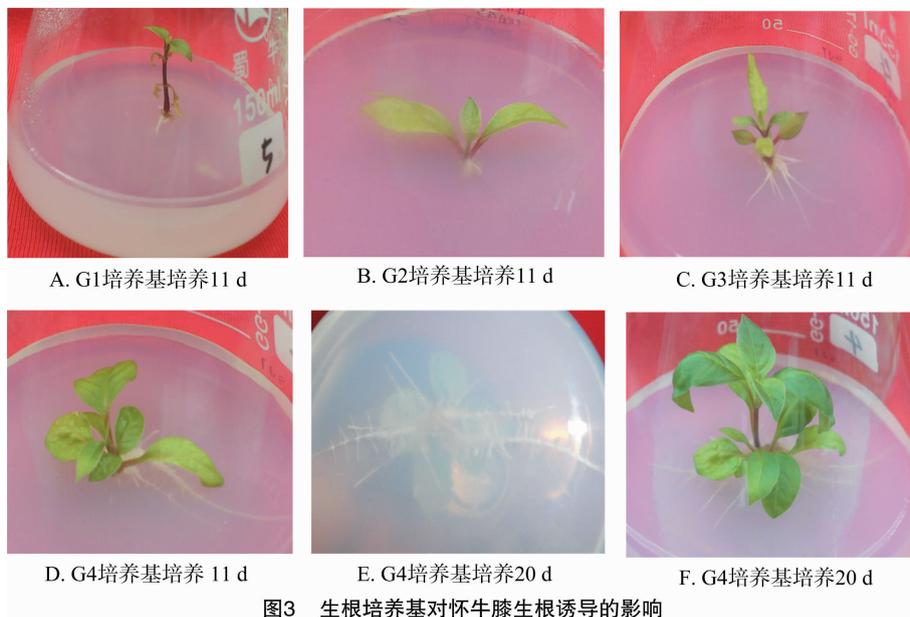


图3 生根培养基对怀牛膝生根诱导的影响

表8 不同基质对组培苗移栽的影响

基质种类	基质配比	移栽数 (个)	成活数 (个)	成活率 (%)
草炭灰		20	14	70
营养土		20	15	75
草炭灰 + 营养土 + 蛭石	1 : 2 : 1	20	20	100
营养土 + 蛭石	2 : 1	20	18	90



图4 怀牛膝组培苗移栽

1.3 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L IBA + 0.2 mg/L KT, 增殖系数最高达 6.03。

生根过程起始于茎内已分化潜伏的根原基, 研究表明, 生长素 IBA 和 NAA 对根的形成均发挥着重要作用。IBA 可以促进根原基的产生, 激活不定根^[12], 加快不定根生长的速度, 且形成的不定根细而长, 在根与茎之间连接紧密, 有利于组培苗大范围吸收营养及水分。而 NAA 作用机理主要是为根的形成提供能源和碳源。通过不同浓度 IBA、NAA 的对比试验发现, IBA 在生根速度、生根条数及生根率上均优于 NAA。生根培养以培养基 1/2 MS + 0.5 mg/L IBA 效果最佳, 生根率最高, 达 95.1%, 且每株组培苗平均生根数约为 8 条。

栽培基质是组培苗移栽成活的基础, 在保水性能好且通风透气的栽培基质中, 组培苗成活率较高^[13]。通过不同基质的配比试验得出练苗后置于草炭灰 : 营养土 : 蛭石 (体积比 1 : 2 : 1) 的基质中, 组培苗成活率可以达到 100%, 且植株生

长健壮。

本研究从外植体芽诱导、丛生芽增殖、丛生芽生根、组培苗练苗移栽 4 个阶段优化怀牛膝组织培养和快速繁殖体系, 整体提高组培效率, 为实现怀牛膝工厂化快速繁育奠定基础。

参考文献:

- [1] 董诚明, 张丽萍, 刘杰, 等. 怀牛膝组织培养的研究[J]. 河南中医, 2002, 22(4): 63-64.
- [2] 赵兴梅, 徐光忠, 李建利, 等. 川牛膝和怀牛膝的现代药理研究概况[J]. 华西药理学杂志, 2004, 19(3): 205-207.
- [3] Mareone M F, Jahaniaval F, Alice H, et al. Chemical characterization of *Achyranthes bidentata* seed[J]. Food Chemistry, 2003, 81(1): 7.
- [4] Sun H X. Adjuvant effect of *Achyranthes bidentata* saponins on specific antibody and cellular response to ovalbumin in mice[J]. Vaccine, 2006, 24(17): 3432-3439.
- [5] 张丽萍, 董诚明, 金盖宇. 怀牛膝组织培养及齐墩果酸定量分析的研究[J]. 河南中医学院学报, 2003, 18(4): 32-33.
- [6] 李明军, 李萍, 洪森荣, 等. 怀牛膝愈伤组织诱导及分化的研究[J]. 河南师范大学学报: 自然科学版, 2005, 33(4): 118-121.
- [7] 刘叶蔓, 谢果珍. 粗毛牛膝带腋芽茎段的植株再生研究[J]. 中国药房, 2011, 22(35): 3286-3287.
- [8] 刘中兵, 孟媛. 南天竹离体初代培养条件优化[J]. 北方园艺, 2015(5): 93-96.
- [9] 刘坚, 张挺, 陈德茜, 等. 川牛膝组织培养快繁技术研究[J]. 中药材, 2006, 29(5): 425-426.
- [10] 黎海利, 谭飞理, 刘锴栋, 等. 聚花过路黄的组织培养和快速繁殖[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(6): 51-53.
- [11] Kang B K, Lim C W, Chung K H, et al. Plant regeneration from cotyledon and hypocotyl tissues of Chinese cabbage[J]. Korean Journal of Horticultural Science & Technology, 2001, 19(3): 315-319.
- [12] 陈慧, 李顺福, 刘翔, 等. 不同浓度 IBA 和 NAA 对蓝莓组培苗瓶外扦插生根的影响[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(3): 15-17.
- [13] 陈宝玲, 陈尔, 王华新, 等. 不同基质配比对铁皮石斛试管苗移栽的影响[J]. 北方园艺, 2014(23): 57-61.