

## 巴戟天组织培养和快速繁殖研究

黄宁珍, 付传明, 赵志国, 唐凤鸾, 李 锋

(广西壮族自治区广西植物研究所, 广西 桂林 541006)  
(中国科学院)

**摘要:** 以巴戟天顶芽及嫩茎节段为外植体, 以 MS 为基本培养基, 通过不同的激素种类和浓度配比, 建立巴戟天组培快繁体系。结果表明, 外植体表面消毒以 70% 酒精预处理 60 s, 再用 0.1% HgCl<sub>2</sub> 浸泡 10 min, 效果较好, 茎节为外植体优于顶芽。培养基 MS+BA 1.0 mg/L+IBA 0.05 mg/L 利于诱导出芽, 可用于初代培养; MS+BA 1.0 mg/L+IBA 0.2 mg/L 利于形成丛生芽, 用于继代增殖, 繁殖系数 6.0/50 d; 1/2MS+IBA 0.4~0.8 mg/L 适宜诱导生根获得再生植株, 生根率 100%; 生根苗移栽于排水良好的火土或砂土中, 成活率 90%。

**关键词:** 巴戟天; 顶芽及嫩茎节段; 组织培养与快速繁殖

中图分类号: Q943.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2007)01-0127-05

## Tissue culture and rapid proliferation of *Morinda officinalis* How

HUANG Ning-Zhen, FU Chuan-Ming, ZHAO Zhi-Guo,  
TANG Feng-Luan, LI Feng

(Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuangzu Autonomous Region  
and the Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, China)

**Abstract:** The tissue culture and rapid proliferation techniques of *Morinda officinalis* How were studied by using apical buds and tender stems as explants. The explants were cultivated in different MS medium with different types and concentrations of plant hormones. The results showed that the most suitable procedure for sterilization was to soak explants into 0.1% HgCl<sub>2</sub> solution for 10 minutes after pretreatment with 70% alcohol for 60 seconds. The tender stems were superior to apical buds *in vitro* culture procedure. The medium MS+IBA 0.05 mg/L+BA 1.0 mg/L was effective to induce shooting and suitable for the first generation cultivation; MS+IBA 0.2 mg/L+BA 1.0 mg/L could effectively induce fasciculate buds and be suitable for subculture and proliferation, the propagation coefficient was 6.0 every 50 days; the most optimum rooting medium was 1/2MS+IBA 0.4~0.8 mg/L, and the rooting rate was 100%. The rooting seedlings were transplanted in sand or burnt soil with plant ash. The highest survival rate was 90%.

**Key words:** *Morinda officinalis* How; apical buds and tender stems; tissue culture and rapid proliferation

巴戟天(*Morinda officinalis* How)又名巴戟, 为茜草科多年生木质藤本植物, 肉质根入药, 根皮含蒽醌化合物、环烯醚萜甙、植物甾醇及多糖、低聚糖等药用成分。具有补肾壮阳、强筋骨、祛风湿等功效, 主治虚劳内伤、肾虚阳痿、月经不调、尿频遗尿、

宫寒不孕等症, 同槟榔、益智、砂仁一起, 被称为中国四大南药。后来研究发现, 巴戟天除了传统的治疗功效外, 还具有抗癌(付嘉等, 2005)、提高免疫力(陈忠等 2003; 徐超斗等, 2003)、抗抑郁(梁建辉等, 2002; 张中启等, 2000)、抗衰老(李斐菲等, 2005)、增

收稿日期: 2006-04-25 修回日期: 2006-08-16

基金项目: 广西科技攻关项目(桂科攻 0322024-3B) [Supported by Key Technologies Research and Development Program of Guangxi (0322024-3B)]

作者简介: 黄宁珍(1968-), 女, 广西大化县人, 副研究员, 从事药用植物生物技术研究, (E-mail) huangnz@gxib.cn.

强记忆力(谭宝璇等,2000)、补血及促进造血干细胞的增殖和分化(陈忠等,2002)等一系列新的功能,用途十分广泛,是我国目前出口创汇的主要中药品种之一。由于市场需求量大,近年来巴戟天的栽培规模不断扩大。因此,本研究以种质快速繁殖为目的,对巴戟天进行组培快繁研究,为巴戟天快速繁殖和工厂化育苗提供技术和方法。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料及外植体消毒

植物材料采自广西宁明县中越边境地区及广西药用植物园,引种于广西桂林植物园内。当新梢生长至30~50 cm时,选择晴好的天气,于9:00左右剪下新枝,除去叶子,用自来水清洗干净,然后在超净工作台上,剪成约3 cm长的带节的小段,用70%的酒精浸泡60 s,再用0.1% HgCl<sub>2</sub>处理10 min,以无菌水冲洗5次,用无菌吸水纸吸干表面水分,剪去带有残余HgCl<sub>2</sub>两端伤口,接种于诱导培养基上。

### 1.2 培养基

以MS为基本培养基,根据实验目的添加不同种类和浓度配比的6-BA(6-Benzyl-aminopurine)、IBA(Indol-3-butyric acid)、NAA(Naphthalene acetic acid)、BR(2,4-Epi brassinolide),并附加3.0%蔗糖和0.5%的琼脂,pH5.8。配制分装后,于温度121℃、压力1.1 kg/cm的条件下灭菌20 min。

### 1.3 培养条件

材料接种后,在平均照度2 000 lx的光照下培养,光照时间12 h/d;温度(28±3)℃。

### 1.4 培养过程及方法

将经表面消毒的外植体接入诱导培养基上,一般经过约10 d的培养,开始形成新芽;20 d左右新芽长成1~3 cm的健壮小芽。将新长出的小芽剪下,接入继代增殖培养基中,经40 d的培养,形成丛生芽,将丛生芽分割并剪成1 cm长的带节小段,再次接入继代增殖培养基中,每瓶接种外植体3~5个,继代的次数和量根据需要而定。当继代增殖的芽苗长到3 cm高、具4~6片叶时,将芽苗从基部分开,整枝接入生根培养基中,每瓶接种5~7枝。

### 1.5 生根苗的移栽

根据巴戟天的生长特性及对环境条件的要求,以火土或沙土为移栽基质。将生好根的试管小苗,移出培养室后,在室外炼苗3 d,洗净根系上的培养

基,移栽至装好基质的营养杯中,在荫蔽度70%塑料大棚中培养,40 d后统计成活率。

## 2 结 果

### 2.1 外植体的选择和消毒方法

用0.1% HgCl<sub>2</sub>处理10 min,顶芽和嫩茎节的死亡率相差不大,均为10%左右;但污染率和生长情况却大不相同。以顶芽为外植体,出芽率较高,生长也比较快,2周可长1~2 cm,但污染率比茎段高,成功率仅为22%,抽出的新芽也比较细弱,在继代增殖过程中易死亡,因此,选用顶芽作为外植体并不理想。以嫩茎节为外植体,消毒成功率为60%,腋芽的萌发率稍低,生长速度也比较慢,但诱导出的芽比较壮,在继代培养过程中,生长情况比顶芽好。因此,通常情况下以嫩茎节段为外植体比较理想。

### 2.2 外源激素对初代芽形成的影响

在培养基中添加合适的激素种类和浓度对初代芽的萌发和芽苗的质量非常重要。经多次试验发现,在培养基MS+BA 1.0 mg/L+IBA 0.05 mg/L中,出芽率较高,诱导出的新芽粗壮,生长速度也比较快。BA浓度对抽芽速度和出芽率的影响较大,在0~1.0 mg/L范围内,出芽率、出芽速度随着BA浓度的升高而升高,当BA浓度达到2.0 mg/L时,出芽率反而降低,同时芽苗弱化,生长速度缓慢。低浓度的IBA或NAA利于初代芽的形成和生长,最适浓度为0.05 mg/L;浓度过高,形成较多的愈伤组织,芽的生长则受到抑制。比较IBA和NAA在不同浓度下诱导芽的频率和芽的生长情况,结果表明,IBA更利于形成健壮的芽苗。

### 2.3 激素种类和浓度对继代繁殖的影响

2.3.1 BA浓度对继代增殖的影响 在巴戟天继代培养中,增殖率主要受BA浓度的影响,丛芽的数量随着BA浓度的升高而增多,而且较高的BA浓度可以使形成丛芽的时间提前5~10 d;比较不同BA浓度对增殖率的影响,结果表明,BA浓度为1.0 mg/L时,单个外植体的最高增殖率为8.0个/块,平均繁殖系数为6.0/50 d,芽苗健壮;BA升高至2.0 mg/L时,单个外植体的最高增殖率达10.0个/块,平均繁殖系数为6.5/50 d,芽苗下部叶片黄化。综合增殖率及芽苗的生长情况,我们认为,巴戟天继代增殖的BA浓度以1.0 mg/L为宜。

### 2.3.2 不同浓度的NAA和IBA对继代增殖的影响

继代培养基中, BA 浓度不变, NAA 或 IBA 浓度变化对增殖率影响很大(表 1)。其中, NAA 浓度的变化对巴戟天增殖率的影响较 IBA 大。NAA 浓度为 0.1~0.2 mg/L 时, 增殖率为 5.0; 随着 NAA 浓度的升高, 增殖率明显下降; 当 NAA 浓度升到 1.6 mg/L, 每块外植体只形成单一的芽, 芽苗的高度也受到一定的影响。IBA 浓度的改变对增殖率的影响不如 NAA 明显, 在 0.1~0.4 mg/L 之间, 增殖率为 6.0; 随着浓度的升高, 丛芽数量有所下降, 但下降的

幅度不大; 当 IBA 浓度升到 1.6 mg/L 时, 每块外植体也能萌发 4 个新芽; 高浓度的 IBA 与 NAA 一样, 在一定程度上抑制芽苗长高。比较 NAA 和 IBA 在最适浓度条件下材料的增殖率和植株的生长数据, 结果证明, IBA 比 NAA 更适合用于巴戟天继代增殖, 最适浓度 0.2 mg/L。

因此, 巴戟天继代增殖的最适培养基为 MS+BA 1.0 mg/L+IBA 0.2 mg/L, 在此培养基上, 形成丛生芽的频率较高, 芽苗生长速度快, 植株相对健

表 1 不同 NAA 或 IBA 浓度下的繁殖系数及生长状况

Table 1 Propagation coefficient and growth condition of buds under different concentrations of NAA or IBA

MS 培养基 Medium(mg/L)	培养时间 Culture time(d)	观测瓶数 Number of bottles	繁殖系数 Propagation coefficient	平均高度 Height (cm)	生长状况 Growth condition
BA1.0+NAA0.1	40	6	5.0	4.0	中等粗壮
BA1.0+NAA0.2	40	6	5.0	4.0	中等粗壮
BA1.0+NAA0.4	40	6	3.5	3.5	中等粗壮
BA1.0+NAA0.8	40	6	2.0	3.5	中等粗壮
BA1.0+NAA1.6	40	6	1.0	3.5	中等粗壮
BA1.0+IBA0.1	40	6	6.0	4.0	中等粗壮
BA1.0+IBA0.2	40	6	6.0	4.5	中等粗壮
BA1.0+IBA0.4	40	6	6.0	4.0	中等粗壮
BA1.0+IBA0.8	40	6	5.0	3.5	中等粗壮
BA1.0+IBA1.6	40	6	4.0	3.5	中等粗壮



图 1 继代培养

Fig. 1 Subculture and proliferation

壮(图 1), 繁殖系数达 6.0/50 d。

#### 2.4 外源生长素种类和浓度对再生苗生根的影响

不同浓度的 NAA、IBA、BR 对再生植株生根的影响见表 2。实验结果表明, IBA 和 BR 较 NAA 对诱导巴戟天再生植株生根更有效。其中 IBA、NAA 的最适浓度为 0.4~0.8 mg/L, BR 为 0.02 mg/L。在最适浓度下, IBA 和 BR 诱导的生根率达 100%; NAA 稍低, 为 76%。低于最适浓度, NAA 诱导的生根效果较差, 生根率偏低; IBA 和 BR 诱导形成根的效率虽然较高, 达 100%, 但根系较细。高于最适

浓度, 生根率下降, 生根部位从培养基表面的茎节部长出, 或者先在外植体与培养基表面的交接处形成愈伤组织, 再从愈伤组织上长出根, 而且在高生长素浓度下形成的根多为白色成团的气生根。

尽管 IBA 和 BR 在最适浓度下诱导的生根率相同, 但比较两者根的形态后发现, BR 诱导形成的根多为须根、较细, 重复效果不够稳定; 而由 IBA 诱导形成的根相对较粗, 根系主次分明, 多次重复效果稳定, 因此, IBA 诱导巴戟天的生根效果最好。比较 MS 和 1/2MS 对生根的影响发现, 1/2MS 更利于生根及小苗的生长。因此, 巴戟天的最佳生根培养基为 1/2MS+IBA 0.4~0.8 mg/L, 一般培养 45 d 后新根长成, 主根相对粗壮, 须根较多, 效果见图 2。

#### 2.5 再生苗的移栽

将长好根的试管苗开盖炼苗 2 d, 移栽于装有火土的营养杯或消过毒的沙床中, 移栽成活率 90%。由于前一种移栽方式更利于大田定植, 因此, 我们以火土为基质、营养杯移栽为主, 见图 3。

### 3 讨论

#### 3.1 外植体类型对消毒效果和组培苗质量的影响

根据我们的实验结果, 以嫩茎节为外植体消毒

效果最好,污染率较低,这可能与顶芽带有嫩叶等附属器官、难以彻底消毒有关。外植体的类型对继代增殖过程中苗的质量有一定的影响,顶芽为外植体,初代培养中萌发快、出芽率高,但由于污染率较高,因此,成功率偏低;而且,由顶芽萌发的新芽比较细弱,在继代培养中容易死亡。嫩茎节为外植体,萌发出的新芽较壮,活力高,比顶芽更利于继代增殖。

表 2 不同浓度 NAA 或 IBA 再生苗的生根率  
Table 2 Rooting rates under different concentrations of NAA, IBA or BR

培养基 Medium (mg/L)	培养 时间 Cul- ture time (d)	观测 瓶数 Num- ber of bottles	生根率 Roo- ting rate (%)	根的形态 Morphological character of roots
MS+NAA 0.2	40	10	20	细,正常根
MS+NAA 0.6	40	10	76	细,白色成团气生根
MS+NAA 0.8	40	10	50	细,白色成团气生根
MS+NAA 1.0	40	10	40	细,白色成团气生根
MS+NAA 1.6	40	10	30	细,白色成团气生根
MS+IBA 0.05	40	10	100	细,多,正常根
MS+IBA 0.1	40	10	100	细,多,正常根
MS+IBA 0.2	40	10	100	细,多,正常根
MS+IBA 0.4	40	10	100	多,略粗壮,正常根
MS+IBA 0.8	40	10	100	多,略粗壮,正常根
MS+IBA 1.2	40	10	60	部分植株长气生根
MS+IBA 1.6	40	10	20	少量植株长气生根
MS+BR 0.02	40	10	100	根须多,细长
MS+BR 0.05	40	10	100	根须多,细长
MS+BR 0.1	40	10	70	根须少,较短
MS+BR 0.2	40	10	80	根须少,短,不整齐
MS+BR 0.4	40	10	20	只有少数长根
MS+BR 0.8	40	10	0	不长根

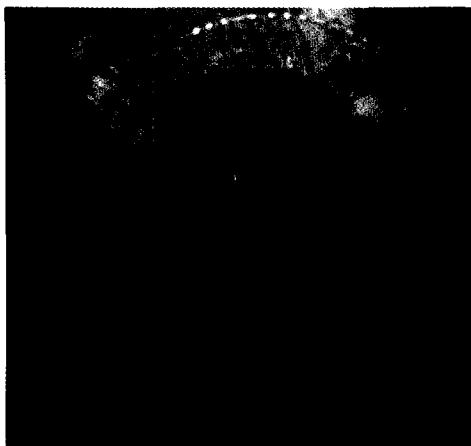


图 2 试管苗生根  
Fig. 2 Rooting plantlets in test-tube

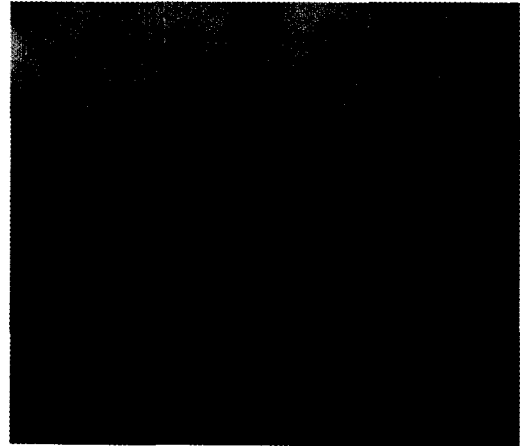


图 3 冬季移栽 100 d 的试管苗  
Fig. 3 Plantlet transplanted for 100 d in winter

### 3.2 外源细胞分裂素对增殖率和生长的影响

在继代增殖培养中,细胞分裂素是影响繁殖系数和组培苗质量的主要因素。赵玉辉等(2005)在对巨玫瑰葡萄试管苗扩繁增殖试验中发现,随着 BA 浓度的升高,增殖系数有增加的趋势,当 BA 浓度过高时,发出的新芽呈簇生状,难以分清具体芽数,且枝条拔节困难,伸长变慢。而王爱勤等(2002)在研究 BA 浓度对芦荟组培苗增殖和玻璃化的影响时也发现,随着 BA 浓度的增加,芦荟增殖系数增大,玻璃化苗的数量也随之增多。不同的植物品种,外源细胞分裂素对增殖率和芽苗生长的影响也有所不同,对于巴戟天而言,邓沛东等(1991)在早期的组织培养研究中,增殖培养所用的 BA 浓度为 0.7 mg/L,但增殖率不高。后期的实验中(贺红等,2000),BA 浓度用 1.0 mg/L,但未在继代增殖这一环节进行系统的研究和分析。在本实验中,在 0~2.0 mg/L 范围内,巴戟天的繁殖系数随 BA 浓度的升高而增高,但当超过 1.0 mg/L 时,增殖率虽然有所增加,芽苗也未见玻璃化,但出现下部叶片黄化,苗长高的速度变慢等症状。由此可见,高浓度的 BA 容易引起组培材料异常,影响组培苗的质量,甚至还可能导致某些性状变异(吴丽芳等,2001)。因此,组培快繁中一般采用达到扩繁目的的最低适合浓度。我们的结果表明,巴戟天继代增殖培养中,BA 的最适浓度为 1.0 mg/L。

### 3.3 外源生长素种类和浓度对生根的影响

比较 IBA、BR 和 NAA 诱导巴戟天的生根效果,结果表明,IBA 诱导的生根率最高,达 100%,根的质量也最好;BR 诱导的生根率与 IBA 相同,但根

系的质量稍差, NAA 诱导的生根率则较低, 仅为 76%。几种激素的最适浓度也相差较大, 其中, IBA 与 NAA 接近, 均为 0.4~0.8 mg/L; BR 则很低, 为 0.02~0.05 mg/L。贺红等(2000)在巴戟天的生根培养中, 添加 NAA 0.4 mg/L, 生根率 80%。而邓沛东(1991)则采用复合的生长素组合 (IAA 0.2 mg/L+NAA 0.4 mg/L), 生根率 84.6%。我们也曾尝试采用复合的生长素组合, 在培养基中添加不同浓度(0.2~0.8 mg/L)组合的 NAA 和 IBA, 进行类似的实验, 最高生根率仅为 60%。因此, 不论是 NAA, NAA 与 IAA 组合, 或 NAA 与 IBA 组合, 其生根效果均不如 IBA 或 BR 理想, 而 IBA 则更利于形成粗壮均匀的根系。

外源生长素促进根生长的最佳浓度约为 5~10 mol/L, 过高则起抑制作用(曹宗巽等, 1980)。不同的植物种类对外源生长素的最适反应浓度有所不同。外源生长素浓度与巴戟天生根率和根的形态密切相关, 在低浓度条件下, 生根率较低, 根为浅褐色, 较细, 生根的部位为插植于培养基中的茎基部; 随着浓度的升高, 生根率上升; 但当浓度过高时, 生根率反而下降, 生根的部位也随之改变, 主要从培养基与茎交接处上部的茎节处长出, 或者先在培养基表面形成愈伤, 再从愈伤上长出, 且多为白色绒毛状气生根, 有时交结成团。崔广荣等(2005)在研究生长素浓度对矮牵牛生根的影响时也有类似发现。由此可见, 生根率下降、生根部位的改变及根外部形态的畸形化与外源生长激素浓度过高有关。

### 参考文献:

- 吴丽芳, 杨春梅, 蒋亚莲, 等. 2001. 非洲紫罗兰组培快繁技术 [J]. 云南农业科技, 3: 19-20
- 赵玉辉, 郭印山. 2005. 巨玫瑰葡萄试管苗扩繁增殖试验 [J]. 中外葡萄与葡萄酒, 5: 42-43
- 曹宗巽, 吴相钰. 1980. 植物生理学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 277
- Chen Z(陈忠), Fang DN(方代南), Ji MH(纪明慧). 2003. Effect of *Morinda officinalis* How decoction on immune function in mice(南药巴戟天水提液对小鼠免疫功能的影响) [J]. *Bull Sci Tech*(科技通报), 19(3): 244-246
- Chen Z(陈忠), Xu T(涂涛), Fang DN(方代南). 2002. A preliminary report on the influence of *Morinda officinalis* decoction on hemopoietic function in mice(南药巴戟天水提液对小鼠造血功能的影响研究初报) [J]. *Chin J Trop Agric*(热带农业科学), 22(5): 21-22, 52
- Cui GR(崔广荣), Ye XY(叶选怡), Liu YC(刘跃成), et al. 2005. The types and concentrations of hormone influence the rate of shoot propagation and rooting of *Petunia hybrida*(激素种类及其浓度对矮牵牛试管苗增殖及生根率的影响) [J]. *J Wuhan Bot Res*(武汉植物学研究), 23(4): 389-392
- Deng PD(邓沛东), Xu HC(徐鸿材). 1991. Research on test-tube plantlet culture of *Morinda officinalis* How(巴戟天试管苗培养研究) [J]. *J Guangzhou Univ Trad Chin Med*(广州中医药大学学报), 8(2): 227-230
- Fu J(付嘉), Xiong B(熊彬). 2005. Study on anti-tumour application of Bajitian in tumour mice(巴戟天对荷瘤小鼠抗肿瘤作用研究) [J]. *Chin J Practical Chinese with Modern Medicine*(中华实用中西医杂志), 18(16): 729-730
- He H(贺红), Xiao SE(肖省娥), Xian JC(冼建春), et al. 2000. *In vitro* culture and plant regeneration of *Morinda officinalis* How(巴戟天离体培养及植株再生的研究) [J]. *J Guangzhou Univ Trad Chin Med*(广州中医学院学报), 17(4): 353-354
- Liang JH(梁建辉), Shu L(舒良), Luo SP(罗质璞), et al. 2002. Primitive study on antidepressant effect of the decoction of *Morinda officinalis*(巴戟天水提物治疗抑郁临床疗效初探) [J]. *China J Chin Mat Med*(中国中药杂志), 27(1): 75-78
- Li FF(李斐非), Wu YJ(吴拥军), Qu LB(屈凌波), et al. 2005. Study on anti-radical activity of Chinese medicine *Morinda officinalis* How(中药巴戟天抗自由基活性的研究) [J]. *Chin J Spectroscopy Lab*(光谱实验室), 22(3): 552-554
- Tan BX(谭宝璇), Su W(苏文), Chen JW(陈洁文), et al. 2000. Improvement effect of Bajishin on spatial learning and memory ability of rats(巴戟素对衰老大鼠空间学习记忆力改善作用) [J]. *New Chinese Medicine and Clinic Pharmacology*(中药新药与临床药理), 11(2): 95-97
- Wang AQ(王爱勤), He LF(何龙飞), Pei RM(裴润梅), et al. 2002. Study on the vitrification of *Aloe* varieties plantlet in tissue culture 组培条件对不同品种芦荟试管苗玻璃化的影响 [J]. *Chin Agric Sci Bull*(中国农学通报), 18(5): 46-49
- Xu CD(徐超斗), Zhang YX(张永祥), Yang M(杨明), et al. 2003. Immunopotentiating effect of *Morinda officinalis* oligosaccharides(巴戟天寡糖的促免疫活性作用) [J]. *Pharm J Chin PLA*(解放军药学报), 19(6): 466-468
- Zhang ZQ(张中启), Yuan L(袁莉), Zhao N(赵楠), et al. 2000. Antidepressant effect of the ethanolic extracts of the roots of *Morinda officinalis* in rats and mice(巴戟天醇提物的抗抑郁作用) [J]. *Chin Pharm J*(中国药学杂志), 35(11): 739-741