

南药巴戟天脱毒苗的培育与快繁体系的优化

陈子恩¹, 冯冲², 罗振华¹, 刘梦云¹, 丁平^{1*}

1. 广州中医药大学中药学院, 广东广州 510006; 2. 广州采芝林药业有限公司, 广东广州 510000

摘要: 巴戟天 (*Morinda officinalis* How) 为茜草科巴戟属植物, 其干燥根入药, 能够强健筋骨、滋补肾阳、祛风除湿, 是中国四大南药之一, 在我国主产区主要通过扦插繁殖, 品种选育过程中往往受到植物病毒的干扰, 造成植物生长受到抑制、产量及品质下降。因此, 以巴戟天的组织培养脱毒为目的, 对巴戟天进行组织培养脱毒研究, 从而提高巴戟天的产量及质量, 对保护巴戟天种质资源及巴戟天的工厂化育苗提供技术支撑, 具有重要的现实意义。利用巴戟天茎段为外植体, 建立高效、稳定的巴戟天组织快繁体系, 筛选出适宜的植株再生途径。以 1/2 MS 为基础培养基, 利用巴戟天茎段腋芽诱导丛生芽获得巴戟天的脱毒苗并成功驯化移栽, 通过 PCR 技术对巴戟天组培苗与移栽苗进行病毒检测。结果表明, 以巴戟天半木质化茎段作为外植体诱导形成腋芽最优, 最适培养基为 1/2 MS+6-BA 0.2 mg/L, 腋芽诱导率为 70%; 以巴戟天腋芽诱导丛生芽, 最适培养基为 1/2 MS+6-BA 0.2 mg/L, 丛生芽诱导率达到 86.36%, 生长状况良好; 适宜生根的培养基为 1/2 MS+IBA 0.5 mg/L, 生根率达 100%; 组培苗移栽于草炭土-珍珠岩 1:1 的基质中炼苗 8 d 成活率最高, 达到 93.3%; 经过反转录 PCR 检测巴戟天组培苗与移栽苗中黄瓜花叶病毒-巴戟天株 (*Cucumber mosaic virus isolate Morinda officinalis* How, CMVMO), 结果显示组培苗成功脱毒。本研究通过直接器官发生途径, 成功培育出巴戟天脱毒苗, 建立了巴戟天体外快繁再生体系, 不仅提高了巴戟天的产量和品质, 为南药巴戟天种苗的脱毒快繁及商业化生产育苗提供参考。

关键词: 巴戟天; 脱毒; 快繁; 直接器官发生; 病毒检测

中图分类号: R285 文献标识码: A

Cultivation of Detoxification Seedlings and Optimization of the Rapid Propagation System of Southern Medicine *Morinda officinalis* How

CHEN Zi'en¹, FENG Chong², LUO Zhenhua¹, LIU Mengyun¹, DING Ping^{1*}

1. School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510006, China;
2. Guangzhou Caizhilin Pharmaceutical Co., Ltd., Guangzhou, Guangdong 510000, China

Abstract: *Morinda officinalis* How is a plant of the Rubiaceae, whose dried roots are used as medicine. It can strengthen bones and muscles, nourish kidney-yang and remove wind and moisture. It is mainly distributed in Guangdong, Guangxi, Fujian and Hainan provinces. It is one of the four major southern medicines in China. In the main production areas of China, it is mainly propagated by cuttings. In the process of variety breeding, it is often disturbed by plant viruses. The viruses are transmitted and accumulated in plants through asexual propagation of plants, resulting in the inhibition of plant growth and the decline of yield and quality. Therefore, for the purpose of tissue culture detoxification of *M. officinalis*, the tissue culture detoxification research of *M. officinalis* was carried out. Thereby improving the yield and quality of *M. officinalis*, which is beneficial to the protection of *M. officinalis* species. It is of great practical significance to provide technical support for quality resources and the factory-based seedlings of *M. officinalis*. Using the stem segments as the explants, an efficient and stable *M. officinalis* tissue rapid propagation system was established, and suitable

收稿日期 2022-04-24; 修回日期 2022-08-07

基金项目 广东省农业科技创新及推广体系建设项目 (No. 2021KJ142); 国家重点研发计划项目 (No. 2017YFC1701102); 2021 年广东省级乡村振兴战略专项 (No. 2021KJ268)。

作者简介 陈子恩 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药资源与质量评价。*通信作者 (Corresponding author): 丁平 (DING Ping), E-mail: dingpinggz@126.com。

plant regeneration methods were screened out. Using 1/2MS as the basic medium, *M. officinalis* stem axillary buds were used to induce clustered buds to obtain the virus-free seedlings and successfully domesticated and transplanted, the virus detection of *M. officinalis* tissue culture seedlings and transplanted seedlings were carried out by PCR technology. The semi-lignified stem segments as the explants were suitable to induce axillary buds, the most suitable medium was 1/2MS+6-BA 0.2 mg/L, and the axillary bud induction rate was 70%. Taking the axillary buds to induce fascicled bud, the most suitable medium was 1/2MS+6-BA 0.2 mg/L, and the fascicled bud induction rate was 86.36%. The suitable medium for rooting was 1/2MS+IBA 0.5 mg/L, with a root rate of 100%. The tissue culture seedlings were transplanted in the 1 : 1 peat soil-perlite matrix for 8 days with the highest survival rate, reaching 93.3%. The reverse transcript PCR was used to determine the *Cucumber mosaic virus* isolate *M. officinalis* How (CMVMO) in the tissue cultured seedlings and transplanted seedlings, the plantlets of *M. officinalis* How detoxified was obtained. In this study, virus-free seedlings of *M. officinalis* were successfully cultivated through direct organogenesis, and an *in vitro* rapid propagation and regeneration system of *M. officinalis* was established, which would not only improve the yield and quality of *M. officinalis*, but also provide a reference for virus-free rapid propagation and commercial production and seedling raising of *M. officinalis*.

Keywords: *Morinda officinalis* How; detoxification; rapid propagation; direct organogenesis; virus detection

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.05.012

巴戟天 (*Morinda officinalis* How) 为茜草科巴戟天属植物, 多年生藤本, 其干燥根入药, 是我国的“四大南药”之一, 具有补肝肾、强筋骨的作用^[1]。其主产于广东、福建等地, 在我国主要通过扦插繁殖, 病毒通过植物的无性繁殖在植物体内传递及积累, 最终造成植物生长受到抑制、产量及品质下降^[2-3], 因此, 加强对巴戟天组织培养技术的研究具有十分重要的意义。本课题组在前期研究中对花叶病巴戟天进行病原鉴定, 确定该病原为黄瓜花叶病毒-巴戟天株 (*Cucumber mosaic virus* isolate *Morinda officinalis* How, CMVMO)^[4]。目前, 对于防治病毒病害没有特别有效的防治药物, 脱除病毒是提高植物产量和品质最有效的方法, 张晓丽等^[5]发现脱毒苗在生长过程中各方面指标如形态指标、生理特性均优于非脱毒苗, 且产量也会显著提高。常见的脱病毒方法包括低温脱毒、温热脱毒、利用组织培养技术脱毒、化学脱毒等^[6]。其中, 利用组织培养技术脱除植物病毒简便、易行, 目前使用该技术进行植物脱毒的有半夏 (*Pinellia ternata*)、大蒜 (*Allium sativum*)、姜 (*Zingiber officinale* Rosc.) 等^[7-9]。因此, 加强对巴戟天组织培养技术的研究具有十分重要的意义。

通过器官发生途径进行组织培养是药用植物组织培养的主要方式, 指一定条件下通过诱导外植体产生不定芽等器官, 经过扩繁、诱导生根、炼苗移栽等步骤发育成为完整植株。器官发生途径有 2 种, 根据组织培养过程中是否需要诱导愈伤组织, 又分为直接器官发生途径和间接器官发

生途径^[10]。目前巴戟天的组织培养技术主要通过间接器官发生途径, 即利用巴戟天外植体诱导出愈伤组织, 通过愈伤组织诱导不定芽从而获得巴戟天的组培苗, 这种组织培养方法存在许多问题, 例如培养时间比较长, 培养基配方繁多, 繁殖系数低, 增殖困难, 继代生长周期长, 缺少建立经济效率高、成本低的标准生产体系等。与其相比, 直接器官发生途径不需经过愈伤组织阶段, 周期更短, 且期间发生的变异少, 能很好地保留植株的遗传特异性, 特别适用于需要维持遗传稳定性的道地药材种苗的培育^[11-13]。利用直接器官发生途径建立巴戟天组织培养技术体系的研究迄今鲜有报道。故本研究选用组织培养技术以获得巴戟天的脱毒苗, 通过直接器官发生途径, 以巴戟天茎段材料直接诱导生芽, 建立巴戟天的组织培养技术体系的快速繁殖方法, 为巴戟天种苗的工厂化生产提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

巴戟天小叶黑蕊型植株与大叶型植株均收集自广东省德庆县, 移栽至华南植物园种质资源圃。经广州中医药大学丁平研究员鉴定为茜草科植物巴戟天的植株。

1.2 方法

1.2.1 外植体的消毒接种 取两年生的巴戟天样品, 将其茎分为 3 部分, 距离顶端 20 cm 以内为幼嫩茎段, 距离顶端 20~40 cm 处为半木质化茎段, 距离顶端超过 40 cm 的部位为完全木质化茎

段。切除叶片后置于超净工作台中,用 75%酒精棉片,擦拭其表面,将巴戟天茎段切成带有节位的长度约为 2~3 cm 的小段,为了筛选出巴戟天的最佳消毒部位和消毒方法,将其使用 0.1%氯化汞将巴戟天幼嫩、半木质化及木质化茎段分别消毒 5.5~8.0 min,无菌水漂洗 3 次。处理后,于无菌条件下接种至 1/2 MS 培养基上,于接种后第 2 天开始记录污染数。20 d 后统计污染率和成活率(污染率=污染苗数/接种苗数 \times 100%,成活率=成活苗数/接种苗数 \times 100%)。

1.2.2 腋芽的诱导分化 将消毒处理后的巴戟天茎段分为幼嫩部位、半木质部位、全木质化部位,分别接种于含不同浓度及组合植物生长调节剂的培养基中。培养 30 d 后观察结果,记录腋芽诱导率以及腋芽诱导状况,筛选出诱导腋芽的最适部位与最适培养基(腋芽诱导率=产生腋芽的外植体数/接入外植体总数 \times 100%)。

1.2.3 丛生芽的增殖培养 将培养 30 d,诱导出的腋芽从茎段上切下,接种于不同类型培养基中,接种 20 个外植体,培养 30 d 后观察结果。记录丛生芽诱导率以及丛生芽生长状况(丛生芽诱导率=产生丛生芽的腋芽数/接入腋芽总数 \times 100%)。

1.2.4 组培苗的生根与移栽 (1)生根培养。将培养 30 d,诱导出 1.5 cm 左右高的丛生芽苗转接到不同类型的生根培养基中,每瓶 3~4 个芽苗,共转接 4 瓶。在培养室中培养 30 d 后,统计其生根率和根系生长状况(生根率=生根的单苗数/接种单苗总数 \times 100%)。(2)炼苗与移栽。当组培苗根系长度大于 2 cm 后,将完成生根的组培苗连组培瓶移出培养室,保持温度 20~25 °C、相对湿度 60%左右,闭盖置于室温自然光条件下放置 3 d,然后打开瓶口,自然光下炼苗 5 d 或 8 d。将炼苗结束的巴戟天组培苗从组培瓶中移出,用清水洗净根部残留的培养基,将根部浸泡于稀释的多菌灵溶液中 5 min,再用流水冲洗 4 min。处理后移栽至 4 种不同栽培基质的育苗杯中,每 1~2 d 喷施 1 次水,30 d 后记录移栽存活率(移栽存活率=成活苗数/移栽总苗数 \times 100%)。

1.2.5 组培苗与移栽苗的病毒检测 以脱毒组培苗与移栽苗为试验组,田间感病巴戟天为阳性对照组,取各组幼嫩叶片各 0.1 g 提取总 RNA 后进行反转录,利用设计的 3 对特异引物进行 RT-PCR 检测。反应体系为 2 \times Pfu Master Mix 10 μ L,上游引物 1 μ L,下游引物 1 μ L, ddH₂O 6 μ L, cDNA

模板 2 μ L,PCR 反应程序为 94 °C 1 min 30 s,94 °C 20 s, 50~60 °C 20 s, 72 °C 60 s, 30 个循环,72 °C 5 min 得到最终样品。PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳进行观察。

1.3 数据处理

试验数据采用 SPSS 20.0 软件进行单因素方差分析(ANOVA)。

2 结果与分析

2.1 不同消毒处理对茎段消毒效果的影响

不同消毒处理对巴戟天茎段的污染率及成活率均有一定的影响。随氯化汞消毒时间的延长,幼嫩茎段的污染率及成活率成反比,而半木质和全木质茎段的污染率和成活率均逐渐下降(表 1)。对于巴戟天幼嫩茎段,消毒 8 min 的污染率最低,且成活率在 4 组中最高,达到 35.12%,因此消毒 8 min 为巴戟天幼嫩茎段消毒的优选方法。对于半木质茎段,消毒 5.5 min 的成活率最高,接种 21 个外植体成活 10 个,成活率达 47.62%,但是污染率偏高,达到 47.62%;0.1%氯化汞消毒 8 min 的污染率最低,只有 38.33%,但是成活率也最低,只有 30.00%,综合考虑污染率及成活率 2 个指标,最终选定 0.1%氯化汞溶液消毒 6 min 为巴戟天半木质化茎段消毒的优选方法。对于巴戟天的全木质化茎段,消毒 8 min 的污染率最低,消毒 5.5 min 的成活率最高,综合考虑污染率及成活率 2 个指标,最终选定 0.1%氯化汞溶液消毒 6 min 为巴戟天全木质化茎段消毒的优选方法。综上,虽然消毒时间组内之间没有显著差异,但比较 3 个部位巴戟天的消毒效果,半木质部位污染率较低,成活率较高,优选其为巴戟天组织培养的外植体部位。

2.2 不同部位茎段对腋芽诱导能力的影响

比较巴戟天不同部位茎段的平均腋芽诱导数及腋芽生长状况,结果如表 2 所示。巴戟天的半木质化茎段平均腋芽诱导数大,生长较快,平均腋芽诱导数为 1.90 个,一个生长点可见多个腋芽,与幼嫩部位及全木质化部位差异显著($P < 0.05$)。幼嫩部位的平均腋芽诱导数低于半木质化部位,高于木质化部位,半木质化部位的平均腋芽诱导数最低,每个生长点仅长一个腋芽。因此最终筛选巴戟天半木质化茎段可作为巴戟天组织培养的理想材料来源。

2.3 不同类型培养基对腋芽诱导能力的影响

比较半木质化巴戟天茎段在 3 种不同类型培

表 1 巴戟天茎段不同消毒处理的消毒效果

Tab. 1 Effect of different disinfection treatment on *M. officinalis* How stem segment disinfection

编号 No.	部位 Position	消毒时间 Disinfection time/min	接种数 Number of inoculation	污染率 Pollution rate/%	成活率 Survival rate/%
1	幼嫩茎段	5.5	20	84.68±1.221 ^{abc}	10.32±9.014 ^{kl}
2		6.0	17	88.89±9.624 ^{ab}	5.56±9.624 ^{kl}
3		7.0	15	73.33±11.54 ^{bcdef}	26.67±11.550 ^{efghij}
4		8.0	23	39.28±3.089 ^{hijkl}	35.12±9.165 ^{cdefghij}
5	半木质茎段	5.5	21	47.62±8.244 ^{defghijkl}	47.62±8.244 ^{abcdefgh}
6		6.0	23	44.05±11.34 ^{efghijkl}	48.21±9.941 ^{abcdefgh}
7		7.0	26	42.13±4.007 ^{ghijkl}	38.42±5.612 ^{abcdefghij}
8		8.0	13	38.33±12.58 ^{hijkl}	30.00±8.660 ^{efghij}
9	全木质茎段	5.5	26	61.58±5.621 ^{cdefgh}	50.00±5.560 ^{abcdefg}
10		6.0	22	58.93±3.094 ^{cdefghi}	49.94±7.230 ^{abcdefg}
11		7.0	19	58.72±13.75 ^{cdefghi}	42.06±8.364 ^{abcdefghi}
12		8.0	25	56.48±10.43 ^{defghij}	36.11±2.408 ^{abcdefghij}

注：同列数据后不同小写字母表示差异显著 (P<0.05)。

Note: The different lowercase letters in the same column indicate significant difference (P<0.05).

表 2 不同部位茎段腋芽诱导情况

Tab. 2 Induction of the axillary buds of *M. officinalis* How in different sites

部位 Position	外植体个数 Number of explants	平均腋芽诱导数 Average number of axillary buds induced	腋芽生长情况 Axillary bud growth
幼嫩茎段	30	1.37±0.56 ^{bc}	10~15 d 长出白色芽点，每个生长点长一个芽点，顶芽大多只有一个生长点
半木质化茎段	30	1.90±0.55 ^a	10~15 d 长出白色芽点，每个生长点长一个芽点，有时可见多个
全木质化茎段	30	1.17±0.38 ^{bc}	15~20 d 萌芽，每个生长点长一个腋芽，部分生长点不萌芽

注：同列数据后不同小写字母表示差异显著 (P<0.05)。

Note: The different lowercase letters in the same column indicate significant difference(P<0.05).

培养基中的腋芽诱导率及其生长状况，结果显示组间并没有明显差异(表 3，图 1)。以巴戟天半木质化茎段为外植体，接种于含有 6-BA 0.2 mg/L 的 1/2 MS 培养基中，茎段的节点处长出腋芽，腋芽生长状况良好(图 1A)，巴戟天半木质化茎段诱导腋芽在 MS 培养基中生长状况不佳，芽苗瘦弱(图 1B)，在含有 6-BA 0.2 mg/L 的 MS 培养基中诱导腋芽出现透明玻璃化现象(图 1C)。

2.4 不同类型培养基对丛生芽诱导能力的影响

以 1/2 MS 培养基为基础培养基，利用不同浓

表 3 不同培养基中巴戟天茎段腋芽的生长状况

Tab. 3 Growth of axillary buds of *M. officinalis* How in different media

培养基 Culture medium	植物生长调节剂 Plant growth regulator	腋芽诱导率 Rate of axillary buds induced/%	腋芽生长情况 Axillary bud growth
MS		56.67±23.09 ^a	芽苗瘦弱、生长状况不佳
	0.2 mg/L 6-BA	73.33±11.54 ^a	芽苗出现玻璃化现象
1/2 MS	0.2 mg/L 6-BA	70.00±10.00 ^a	芽苗生长状况良好

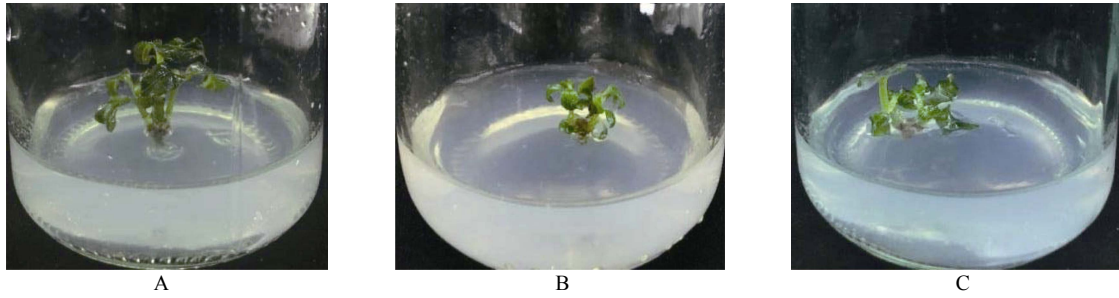
注：同列数据后不同小写字母表示差异显著 (P<0.05)。

Note: The different lowercase letters in the same column indicate significant difference (P<0.05).

度配比的 6-BA 与 NAA 筛选出适合诱导巴戟天茎段丛生芽的培养基。对巴戟天茎段丛生芽在不同类型培养基中生长状况进行统计，结果如表 4 和图 2 所示。6-BA 0.2 mg/L 的 1/2 MS 培养基丛生芽诱导率达到 83.33%，丛生芽生长状况良好，叶片呈现深绿色；当 6-BA 的浓度升高到 0.5 mg/L 时，丛生芽的诱导率反而下降到 46.67%，与另外 2 组有显著差异性，丛生芽生长缓慢，叶片蜷缩并且出现玻璃化现象；在 0.5 mg/L 6-BA 的基础上再添加 0.2 mg/L 的 NAA，丛生芽的诱导率有所上升，可达 73.33%，丛生芽的生长状况有所改善，但是部分丛生芽叶片玻璃化的现象仍然存在。

2.5 不同生根培养基对巴戟天生根的影响

分别以 1/2 N6、N6、1/2 MS 为基础培养基，添



A: 添加 0.2 mg/L 6-BA 的 1/2 MS 培养基; B: MS 空白培养基; C: 添加 0.2 mg/L 6-BA 的 MS 培养基。
A: 1/2 MS medium supplemented with 0.2 mg/L 6-BA; B: MS blank medium; C: MS medium supplemented with 0.2 mg/L 6-BA.

图 1 巴戟天半木质化茎段腋芽诱导生长情况

Fig. 1 Growth of semi lignification axillary buds of *M. officinalis* How

表 4 不同培养基巴戟天茎段丛生芽的生长状况

Tab. 4 Growth of fascicled buds of *M. officinalis* How in different media

培养基 Culture medium	植物生长调节剂 Plant growth regulator	丛生芽诱导率 Rate of fascicled buds induced/%	丛生芽生长情况 Fascicled buds growth
1/2 MS	0.2 mg/L 6-BA	83.33±5.77 ^{ab}	生长状况良好、呈深绿色
	0.5 mg/L 6-BA	46.67±20.81 ^c	出现玻璃化现象，叶片蜷缩，生长缓慢
	0.5 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA	73.33±5.77 ^{ab}	部分生长状况良好、部分出现玻璃化现象

注：同列数据后不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

Note: The different lowercase letters in the same column indicate significant difference ($P<0.05$).

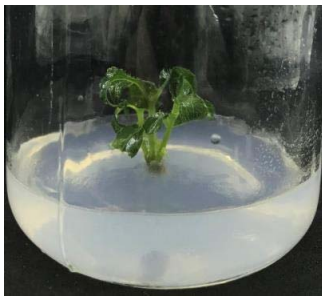


图 2 巴戟天腋芽诱导丛生芽生长状况

Fig. 2 Growth of fascicled buds of *M. officinalis* How

加不同浓度配比的 IBA，筛选出适合巴戟天芽苗生根的培养条件。统计巴戟天芽苗移入不同类型培养基的诱导生根率及生根情况，结果见表 5 和图 3。巴戟天芽苗在添加 0.5 mg/L IBA 的 1/2 N6 及添加 1.0 mg/L IBA 的 N6 培养基中，未出现生根现象，且巴戟天芽苗在 N6 培养基中生长状况较差，出现叶子掉落，萎黄的情况，说明 N6 培养基并不适合巴戟天芽苗生根；而在添加不同浓度 IBA 的 1/2 MS 培养基中均可生根，但在 IBA 浓度超过 1.0 mg/L 的 1/2 MS 培养基中出现气生根现象。

2.6 不同类型基质对组培苗炼苗移栽的影响

待巴戟天芽苗在瓶中长至 4~5 cm 后，从组培室移至室外炼苗 5 d 或 8 d 后移栽至含有不同类型

表 5 巴戟天芽苗的生根情况

Tab. 5 Sprout rooting situation of *M. officinalis* How

培养基 Culture medium	植物生长调节剂 Plant growth regulator	生根率 Rooting rate/%
1/2 N6	0.5 mg/L IBA	0 ^{de}
N6	1.0 mg/L IBA	0 ^{de}
1/2 MS	0.5 mg/L IBA	100 ^{abc}
	1.0 mg/L IBA	100 ^{abc}
	1.5 mg/L IBA	100 ^{abc}

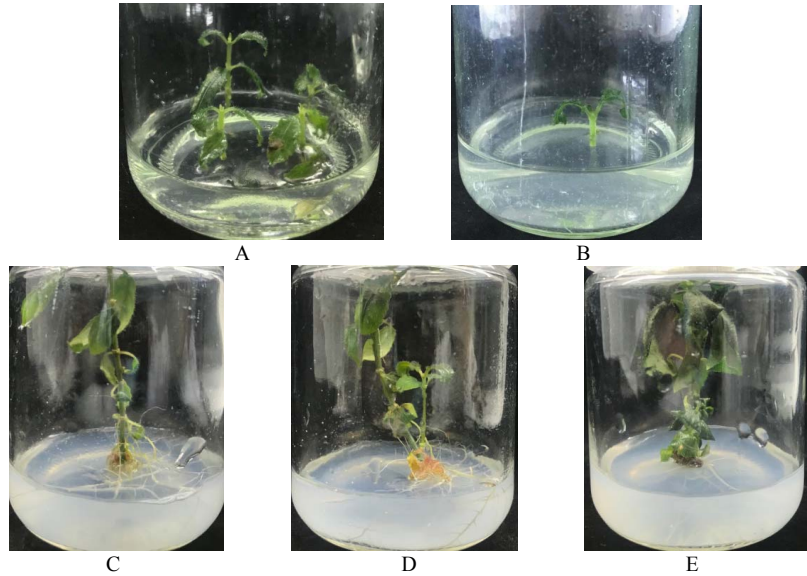
注：同列数据后不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

Note: The different lowercase letters in the same column indicate significant difference ($P<0.05$).

基质的育苗杯，统计移栽苗的存活率（表 6）。就炼苗时间而言，经过 8 d 炼苗时间的移栽苗存活率明显高于 5 d 组。几种基质中，当炼苗 5 d 时，草炭土与珍珠岩比例 1:1 的组培苗成活率最高，达到 88.90%；当炼苗时间为 8 d 时，草炭土比珍珠岩 1:1 和草炭土比蛭石 1:1 这 2 种基质的成活率最高，均为 93.33%。因此最佳基质为草炭土比珍珠岩 1:1 和草炭土比蛭石 1:1。

2.7 巴戟天组培苗与移栽苗脱毒效果评价

利用 RT-PCR 方法检测巴戟天脱毒苗与田间感病巴戟天的病毒情况，结果如图 4A 所示，根据黄瓜花叶病毒-巴戟天株 (*Cucumber mosaic virus*



A: 添加 0.5 mg/L IBA 的 1/2 N6 培养基; B: 添加 1.0 mg/L IBA 的 N6 培养基; C: 添加 0.5 mg/L IBA 的 1/2 MS 培养基; D: 添加 1.0 mg/L IBA 的 1/2 MS 培养基; E: 添加 1.5 mg/L IBA 的 1/2 MS 培养基。
 A: 1/2 N6 medium supplemented with 0.5 mg/L IBA; B: N6 medium supplemented with 1.0 mg/L IBA; C: 1/2 MS medium supplemented with 0.5 mg/L IBA; D: 1/2 MS medium supplemented with 1.0 mg/L IBA; E: 1/2 MS medium supplemented with 1.5 mg/L IBA.

图 3 不同培养基中巴戟天丛生芽的诱导生根状况

Fig. 3 Rooting of fascicled buds of *M. officinalis* How in different media

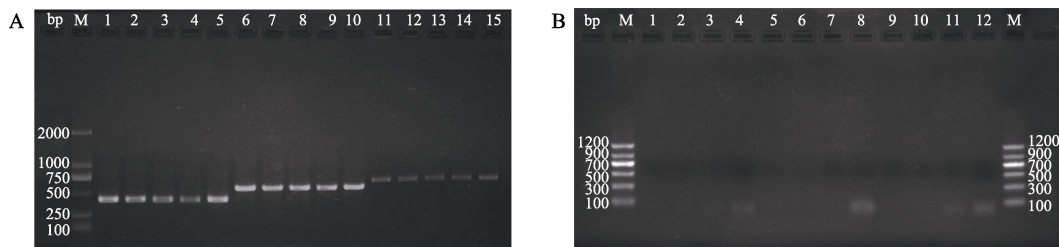
表 6 巴戟天不同基质炼苗移栽结果

Tab. 6 Transplanting results of *M. officinalis* How in different substrates

编号 No.	基质 Substrate	比例 Proportion	炼苗时间 Seedling time/d	数量 Quantity	移栽存活数 Survival number	移栽存活率 Survival rate/%
1	草炭土、珍珠岩	1 : 1	5	17	15	88.90±10.18 ^{acd}
			8	15	14	93.33±11.55 ^{abc}
2	草炭土、蛭石	1 : 1	5	15	7	46.67±11.55 ^{bf}
			8	15	14	93.33±11.55 ^{abc}
3	草炭土、蛭石、珍珠岩	1 : 1 : 1	5	18	13	72.21±9.624 ^{cde}
4	红土、蛭石	1 : 1	8	16	11	68.89±10.18 ^{de}

注：同列数据后不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: The different lowercase letters in the same column indicate significant difference ($P < 0.05$).



A: 田间感病巴戟天病毒检测结果; M: DNA marker D (100~2000 bp); 1~5: 第一对引物 CMVMO1 扩增产物; 6~10: 第二对引物 CMVMO2 扩增产物; 11~15: 第三对引物 CMVMO3 扩增产物。B: 巴戟天脱毒苗病毒检测结果; M: DNA marker C (100~1200 bp); 1、5、9: 小叶黑蕊型巴戟天组培苗; 2、6、10: 小叶黑蕊型巴戟天移栽苗; 3、7、11: 大叶型巴戟天组培苗; 4、8、12: 大叶型巴戟天移栽苗。

A: Detection results of virus in field susceptible *M. officinalis* How; M: DNA marker D (100~2000 bp); 1~5: CMVMO1 amplification of the first primers; 6~10: CMVMO2 amplification of the second primer; 11~15: CMVMO3 amplification of the third primer. B: Detection results of virus in detoxification seedlings of *M. officinalis* How; M: DNA marker C (100~1200 bp); 1, 5, 9: Tissue culture seedlings of *M. officinalis* How with small leaves and black stamens; 2, 6, 10: Transplanting seedlings of *M. officinalis* How with small leaves and black stamens; 3, 7, 11: Tissue culture seedlings of *M. officinalis* How with large leaves; 4, 8, 12: Transplanting seedlings of *M. officinalis* How with large leaves.

图 4 RT-PCR 病毒检测结果

Fig. 4 RT-PCR virus detection results

isolate *M. officinalis* How, CMVMO) 设计的 3 对引物均可对黄瓜花叶病毒-巴戟天株进行检测, 第二对引物 CMVMO2 的特异性最佳。与阳性对照相比, 巴戟天组培苗与移栽苗均未检测出特异性高亮度条带, 说明该组织培养体系所诱导的巴戟天脱毒苗可成功脱除 CMVMO 病毒 (图 4B)。

3 讨论

近年来关于巴戟天组织培养技术的报道有很多, 且选择的培养方式不尽相同。其中陈煌等^[14]以巴戟天茎尖或茎节段为试验材料, 成功建立了一套巴戟天优质种苗快速繁育应用的组培技术体系。林美珍等^[15]以巴戟天幼胚为外植体诱导愈伤组织, 再由愈伤组织分化成完整植株, 并诱导出多倍体巴戟天。巴戟天是广东的道地药材, 必须要保持巴戟天的品种特性, 因此本研究选用直接器官发生途径建立巴戟天组织培养体系, 本方法不经过愈伤组织阶段, 具有极强的遗传稳定性。

研究表明, 利用巴戟天不同部位茎段作外植体, 对其消毒效果也会有所不同。使用相同的消毒处理方法, 半木质化茎段的污染率较低, 成活率相对较高, 若巴戟天茎段太幼嫩会对氯化汞不耐受, 从而降低成活率, 而全木质化茎段污染的主要来源为真菌污染, 主要表现为培养基上生长白色的霉菌。巴戟天表面被有绒毛, 容易带有真菌及细菌且不易消除, 其中以全木质化茎段表面最为粗糙, 是其污染率较高的主要原因。另外, 选择不同部位茎段作为外植体, 其腋芽的发生情况也不相同, 茎段不同取材部位诱导腋芽能力由强到弱依次为半木质部位、幼嫩部位、全木质部位。以巴戟天茎段为材料诱导腋芽, 数量多, 基数大, 增殖快, 容易诱导成功, 能为巴戟天种苗的工厂化生产提供研究基础。该结果与黄宁珍等^[16]、陈伟等^[17]的结果一致。本研究以巴戟天茎段为材料诱导腋芽, 并进一步增殖, 其诱导最适培养基为添加 6-BA 0.2 mg/L 的 1/2 MS 培养基。巴戟天常规的外植体材料包括叶片及茎段等, 分化能力较差, 丛生芽诱导率较低。本研究以巴戟天半木质化茎段诱导出的腋芽为材料, 其分化能力较强, 为理想的巴戟天丛生芽诱导来源。以茎段诱导的腋芽为外植体, 接种于添加 6-BA 0.2 mg/L 的 1/2 MS 培养基上 (与诱导茎段腋芽的培养基相同), 丛生芽的诱导率达到 86.36%。巴戟天移

栽到疏松透气、偏酸性的土壤可提高其移栽成活率, 故选用偏酸性的材料作为培养基^[14]。草炭土中富含有机质, 质地松软, 呈微酸性, 但其缺乏保水性。珍珠岩和蛭石在农业育苗中均有改善土壤、增加土壤透气性、保水保湿等作用。但由于二者保水效果好, 过度添加反而导致基质中水分过多, 使植株死亡。农业上巴戟天种植通常使用红土^[18], 但红土黏性较大, 透气性差, 土质偏重, 不能和珍珠岩很好地混合, 易导致根系腐烂。因此, 在巴戟天组培苗移栽初期, 最好选择草炭土与珍珠岩或蛭石混合使用, 既保水又有透气性。

研究结果还表明, 选用 1/2 MS 培养基作为基础培养基, 其生根效果要比选用 N6 培养基的好, 这与肖祖飞等^[19]对樟树、张琨等^[20]对黄花菜、刘丹等^[21]对附子的研究结果一致, 且巴戟天芽苗在 N6 培养基中生长状况较差, 出现叶子掉落, 萎黄的情况, 推测为 N6 培养基中大量元素含量较低导致。此外, 本研究还通过 RT-PCR 的方法检测巴戟天脱毒苗中黄瓜花叶病毒-巴戟天株 (CMVMO), 结果发现巴戟天脱毒苗已彻底脱除病毒, 近年来, 组织培养技术已广泛应用于对中草药脱毒培养^[22]。因此, 本研究认为通过组织培养技术可以实现巴戟天的脱毒培养与快繁, 为巴戟天种苗的脱毒快繁与工厂化生产提供参考。

由于本研究主要针对农家品种巴戟天大叶型巴戟天与小叶黑蕊型巴戟天, 使得本研究结果不一定适用于其他品种巴戟天, 有一定的局限性。但利用本研究结果, 可为农家品种巴戟天的脱毒快繁技术在生产上的运用提供参考, 为巴戟天的种质资源保护、脱毒扩繁、品种改良等提供理论依据。

4 结论

本研究以巴戟天茎段为材料, 经 75%乙醇预处理后的茎段用 0.1%氯化汞溶液消毒 5.5 min 为巴戟天茎段消毒的优选方法; 以巴戟天半木质部位作为外植体接种的腋芽诱导能力最强; 巴戟天茎段诱导腋芽的最适培养基为添加 0.2 mg/L 6-BA 激素的 1/2 MS 培养基; 巴戟天茎段诱导丛生芽的最适培养基为添加 0.2 mg/L 6-BA 激素的 1/2 MS 培养基; 诱导巴戟天芽苗生根的最佳培养基为添加 0.5 mg/L IBA 激素的 1/2 MS 培养基; 巴戟天组培苗的最适移栽基质为草炭土: 珍珠岩 1:1 和草炭土: 蛭石 1:1 的基质。通过组织培养技术可以实现巴戟天的脱毒培养与快繁。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 84-85.
The National Pharmacopoeia Commission. Chinese pharmacopoeia[M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020: 84-85. (in Chinese)
- [2] 王德立, 甘炳春. 巴戟天插穗质量与扦插繁殖关键技术研究[J]. 海南师范大学学报(自然科学版), 2016, 29(2): 169-172.
WANG D L, GAN B C. Study on cutting quality and key techniques of cutting propagation of *Morinda officinalis*[J]. Journal of Hainan Normal University (Natural Science), 2016, 29(2): 169-172. (in Chinese)
- [3] 宫璐, 汪鹏, 谭瑞湘, 许翔翔, 廖保生, 黄志海. 南药巴戟天的全球产地规划[J]. 世界中医药, 2017, 12(5): 986-988.
GONG L, WANG P, TAN R X, XU X X, LIAO B S, HUANG Z H. The global production area of *Morinda officinalis*[J]. World Chinese Medicine, 2017, 12(5): 986-988. (in Chinese)
- [4] FENG C, SHAN T J, YANG L, CAI M M. First report of *Cucumber mosaic virus* infecting *Morinda officinalis* in China[J]. Journal of Plant Pathology, 2021, 103: 327.
- [5] 张晓丽, 李萍, 周彩云, 陈明霞, 赵喜亭, 李明军. 怀地黄脱毒种苗大田生长性状及产量品质[J]. 植物学报, 2017, 52(4): 474-479.
ZHANG X L, LI P, ZHOU C Y, CHEN M X, ZHAO X T, LI M J. Growth characters, yield and quality of virus-free *Rehmannia glutinosa* seedlings in the field[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2017, 52(4): 474-479. (in Chinese)
- [6] 颜克如, 毛碧增. 植物病毒脱毒技术进展与展望[J]. 分子植物育种, 2019, 17(23): 7861-7870.
YAN K R, MAO B Z. Progress and prospect of detoxification technology in plant[J]. Molecular Plant Breeding, 2019, 17(23): 7861-7870. (in Chinese)
- [7] 王宝霞, 齐永红, 肖雅尹, 崔丽艳, 王德富, 牛颜冰. 半夏茎尖脱毒培养及病毒检测[J]. 植物生理学报, 2018, 54(12): 1813-1819.
WANG B X, QI Y H, XIAO Y Y, CUI L Y, WANG D F, NIU Y B. Virus-free culture and virus detection of stem tip of *Pinellia ternata*[J]. Plant Physiology Journal, 2018, 54(12): 1813-1819. (in Chinese)
- [8] 董玉惠, 顾启玉, 苑磊, 王立霞, 孙秀东, 刘世琦. 大蒜气生鳞茎脱毒快繁[J]. 植物生理学报, 2019, 55(9): 1315-1324.
DONG Y H, GU Q Y, YUAN L, WANG L X, SUN X D, LIU S Q. Rapid propagation of virus-free garlic aerial bulbs[J]. Plant Physiology Journal, 2019, 55(9): 1315-1324. (in Chinese)
- [9] 吕金丽, 吕树鸣, 张冬莲, 罗凯, 吴迪, 李伟. ‘水城小黄姜’芽茎尖组培脱毒与快繁体系的建立[J]. 分子植物育种, 2021(10): 1-22.
LYU J L, LYU S M, ZHANG D L, LUO K, WU D, LI W. Establishment the system of detoxification and rapid propagation in ‘Shuicheng Small Yellow Ginger’[J]. Molecular Plant Breeding, 2021(10): 1-22. (in Chinese)
- [10] 郭佳祺, 单良, 杨世海. 药用植物再生体系建立的研究进展[J]. 中药材, 2016, 39(10): 2386-2391.
GUO J Q, SHAN L, YANG S H. Research progress on establishment of medicinal plant regeneration system[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2016, 39(10): 2386-2391. (in Chinese)
- [11] SARKAR T, RAVINDRA K N, DOSS S G, KUMAR P M P, TEWARY P. *In vitro* regeneration of mulberry plants from seedling explants of *Morus indica* cv. G4 through direct organogenesis[J]. Trees, 2022, 36(1): 113-125.
- [12] MURASEVA D S, NOVIKOVA T I. Efficient protocol for *in vitro* propagation from bulb scale explants of *Fritillaria ruthenica* Wikstr. (Liliaceae), a rare ornamental species[J]. Rendiconti Lincei-Scienze Fisiche e Naturali, 2018, 29(2): 491-497.
- [13] PAUL A, THAPA G, BASU A, MAZUMDAR P, KALITA M C, SAHOO L. Rapid plant regeneration, analysis of genetic fidelity and essential aromatic oil content of micro-propagated plants of *Patchouli, Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. - an industrially important aromatic plant[J]. Industrial Crops and Products, 2010, 32(3): 366-374.
- [14] 陈煌, 王园园, 邱晓婷, 阮少江, 叶祖云. 巴戟天良种组培繁育技术体系的建立[J]. 宁德师范学院学报(自然科学版), 2015, 27(4): 403-406.
CHEN H, WANG Y Y, QIU X T, RUAN S J, YE Z Y. Technology of tissue culture and seed breeding for *Morinda officinalis*[J]. Journal of Ningde Normal University (Natural Science), 2015, 27(4): 403-406. (in Chinese)
- [15] 林美珍, 巫庆珍, 郑松, 田惠桥. 巴戟天的组织培养和多倍体诱导[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(17): 2325-2328.
LIN M Z, WU Q Z, ZHENG S, TIAN H Q. Tissue culture and polyploidy induction of *Morinda officinalis*[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2011, 36(17): 2325-2328. (in Chinese)
- [16] 黄宁珍, 付传明, 赵志国, 唐凤鸾, 李锋. 巴戟天组织培养和快速繁殖研究[J]. 广西植物, 2007(1): 127-131.
HUANG N Z, FU C M, ZHAO Z G, TANG F L, LI F. Tissue culture and rapid proliferation of *Morinda officinalis* HOW[J]. Guihaia, 2007(1): 127-131. (in Chinese)
- [17] 陈伟, 徐立, 李志英, 李克烈. 巴戟天的组织培养及快速繁殖[J]. 热带农业科学, 2006(4): 8-9, 13.

- CHEN W, XU L, LI Z Y, LI K L. Tissue culture and rapid propagation of *Morinda officinalis* HOW[J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2006(4): 8-9, 13. (in Chinese)
- [18] 洗丽铎, 吴道铭, 隆曼迪, 曾曙才. 土壤养分、种植年限和种植方式对巴戟天寡糖含量的影响[J]. 华南农业大学学报, 2021, 42(3): 75-85.
- XIAN L H, WU D M, LONG M D, ZENG S C. Effects of soil nutrients, planting years and methods on oligosaccharide content of *Morinda officinalis*[J]. Journal of South China Agricultural University, 2021, 42(3): 75-85. (in Chinese)
- [19] 肖祖飞, 郑丽丽, 张北红, 王颜波, 李凤, 姜睿, 彭艺, 金志农. 樟树赣芳 1 号茎段组织培养研究[J]. 南昌工程学院学报, 2022, 41(1): 71-77.
- XIAO Z F, ZHENG L L, ZHANG B H, WANG Y B, LI F, JIANG R, PENG Y, JIN Z N. Study on tissue culture technology of stem segment of *Cinnamomum camphora* ‘Ganfeng 1’[J]. Journal of Nanchang Institute of Technology, 2022, 41(1): 71-77. (in Chinese)
- [20] 张琨, 周渊, 单晓菲, 韩志平. 黄花菜组织培养研究进展[J]. 北方园艺, 2020(2): 130-137.
- ZHANG K, ZHOU Y, SHAN X F, HAN Z P. Research progress on tissue culture of *Hemerocallis citrine*[J]. Northern Horticulture, 2020(2): 130-137. (in Chinese)
- [21] 刘丹, 刘霞, 余马, 侯大斌, 吕向阳. 附子茎段组培快繁体系的建立[J]. 分子植物育种, 2020, 18(15): 5081-5089.
- LIU D, LIU X, YU M, HOU D B, LYU X Y. Establishment of rapid propagation system for stem segment of *Aconitum camichaelii* by tissue culture[J]. Molecular Plant Breeding, 2020, 18(15): 5081-5089. (in Chinese)
- [22] 蔡时可, 李静宇, 梅瑜, 顾艳, 徐世强, 孙铭阳, 王继华. 中草药脱毒技术研究进展[J]. 广东农业科学, 2021, 48(12): 151-161.
- CAI S K, LI J Y, MEI Y, GU Y, XU S Q, SUN M Y, WANG J H. Research progress in detoxification technology of Chinese herbal medicine[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2021, 48(12): 151-161. (in Chinese)