

# 朝鲜白头翁的组织培养与快繁技术

廉玉姬, 赵小梅, 林光哲\*

(山东省临沂师范学院生命科学学院, 山东临沂 276005)

**摘要:** 以朝鲜白头翁的叶片、叶柄和花梗为材料, 研究了细胞分裂素 zeatin、kinetin、6-BA 和生长素 IAA 组合对诱导不定芽的影响; 以不定芽为材料研究了植物生长调节剂对不定芽的增殖和生根的影响; 研究了不同基质对比对组培苗移栽成活的影响。结果表明: 1) 叶柄和花梗接种在  $MS + 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  zeatin +  $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  IAA 培养基培养 6 周后不定芽再生率为 100%。2) 不定芽切成小块或单株带类似愈伤的组织块转到  $MS + 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  zeatin +  $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  IAA 或  $MS + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA +  $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  IAA 的培养基时不定芽的增殖与生长良好。3) 在增殖培养基中生长至 3 cm 以上的小植株转入到  $1/2 MS + 1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA 的生根培养基中培养 42 d 后, 生根率高达 93%, 平均根长 12.3 cm, 每株平均根数 11 条, 且可缩短生根时间。4) 组培苗移栽到东北山土和珍珠岩比例为 2 : 1 的混合基质时, 成活率高达 66.7%。

**关键词:** 朝鲜白头翁; 不定芽; 细胞分裂素; 生根; 移栽

**中图分类号:** S 567

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2010) 03-0491-08

## Studies on Tissue Culture and Rapid Propagation of *Pulsatilla koreana* Nakai

LIAN Yu-ji, ZHAO Xiao-mei, and LIN Guang-zhe\*

(College of Life Science, Linyi Normal University, Linyi, Shandong 276005, China)

**Abstract:** Leaf, petiole and pedicle explants of *Pulsatilla koreana* were cultured on MS medium supplemented with various concentrations of zeatin, kinetin or 6-BA combined with  $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  IAA. After 6 weeks of culture, effects of cytokinin on adventitious shoot formation from explants were investigated. The highest frequency of shoot formation was obtained when petiole and pedicle explants were cultured on  $MS + 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  zeatin +  $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  IAA. Regenerated shoot were cut as several cluster or single plant with callus like tissue, and then transferred on  $MS + 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  zeatin +  $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  IAA or  $MS + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA +  $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  IAA for shoot propagation and growth. When shoot reached more than 3 cm in length, they were transferred on to root induction medium. 93 percent of rooting ratio was observed in  $1/2 MS + 1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA, after 42 days of culture. The rooted plantlets were acclimatized on mixture of North east mountain soil and perlite (2 : 1).

**Key words:** *Pulsatilla koreana* Nakai; adventitious shoot; cytokinin; rooting; transplanting

朝鲜白头翁 (*Pulsatilla koreana* Nakai) 是毛茛科白头翁属多年生草本植物, 原产于中国, 主要分布于中国东北、韩国、日本等地。白头翁属植物含毛茛苷、白头翁素、原白头翁素、三萜皂苷等

收稿日期: 2009 - 12 - 07; 修回日期: 2010 - 03 - 01

基金项目: 山东省自然科学基金项目 (Y2008D17)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: linguangzhe@lytu.edu.cn)

成分 (Kim et al., 2004), 具有广泛的药理及生物活性。在农业上, 白头翁对小麦赤霉病菌和水稻白叶枯病菌等均表现出很好的抑制活性 (郑昌戈和吴恭廉, 1999)。近年来, 白头翁除作为中草药外, 还被人们作为观赏花卉 (赵渤和鲁新海, 2002), 研发前景广阔。

朝鲜白头翁主要依靠种子繁殖, 但种子成熟后, 若不及时播种, 很快就会丧失活力 (Sang et al., 1993); 目前, 朝鲜白头翁仍处于野生状态, 人工播种栽培量极少, 而且移栽困难, 成活率较低; 此外, 白头翁不仅具有药理作用和观赏价值, 而且可用于制造生物农药和除草剂, 国内外市场需求量大。利益驱使人们盲目挖掘, 乱挖乱采, 以及生存环境的破坏、盲目开发、开山凿石, 导致朝鲜白头翁资源日渐稀少, 濒临灭绝, 遗传资源面临枯竭, 已开始影响到中医临床用药及制药企业的生产。应用组织培养技术缓解这一状况成为迫切需要。

在朝鲜白头翁的组织培养方面, 相关工作者分别对其增殖 (Lee & Oh, 1993)、生根 (Yoon, 1996) 做了初步研究, 但其分化率低、生根差, 未建立较完善的组培快速繁殖和大规模人工栽培及其现代化生产体系, 而国内未有朝鲜白头翁组织培养的相关报道。

本研究中以朝鲜白头翁的叶片、叶柄和花梗为材料, 研究了 zeatin、kinetin、6-BA 对诱导不定芽影响; 以不定芽为材料研究了植物生长调节剂对不定芽的增殖、生根的影响; 研究了不同基质配比对组培苗移栽成活的影响。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

试验材料为野生朝鲜白头翁, 采自韩国江原道平昌郡横溪。2005 年 4 月和 9 月取材, 外植体为幼嫩的花梗、叶片和叶柄。4 月取材料时, 白头翁发芽、抽薹, 但未开花; 9 月的材料是春天采挖后在大棚内栽培的野生白头翁。不定芽诱导试验在韩国农业振兴厅高冷地农业研究所组织培养实验室里进行。

材料用流水冲洗 2~4 h, 然后加入几滴洗涤剂浸泡 10 min, 并用自来水冲洗至无泡沫为止, 用滤纸吸干水分。在超净工作台上用加 1 滴 Tween-20 的 1% 次氯酸钠浸泡 20 min, 中间摇动几次。再用灭菌水淋洗 5~6 次, 放在灭菌的不锈钢盘子里, 用灭菌滤纸吸干表面水分, 备用。

### 1.2 不定芽的诱导

将灭菌的花梗、叶柄切成长约 0.5 cm, 叶片切成约 0.5 cm × 0.5 cm 的小块, 分别接种到不定芽诱导培养基上。诱导培养基为: MS (Murashige & Skoog, 1962) 培养基分别添加不同浓度的玉米素 (zeatin)、激动素 (kinetin) 和 6-BA, 其浓度处理分别为 (0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0) mg · L<sup>-1</sup>, 3% 糖, 0.8% 琼脂, pH 5.8。每处理的 IAA 浓度均为 0.05 mg · L<sup>-1</sup>。叶片、叶柄和花梗用解剖刀片匀割划 2~3 刀 (不切断叶片), 分别接种于上述的诱导培养基, 于 (25 ± 1) °C、光培养 16 h · d<sup>-1</sup>, 光照强度 4 000 lx 下培养。每处理接种 10~15 个外植体, 定期观察, 6 周后统计结果。不定芽再生率 (%) = (再生不定芽外植体数/接种外植体数) × 100。试验重复 3 次。

### 1.3 不定芽的增殖

将不定芽均切成小块儿接入增殖培养基。增殖培养基 (1) MS + (0、0.2、0.5、1.0、1.5) mg · L<sup>-1</sup> zeatin + 0.05 mg · L<sup>-1</sup> IAA, (2) MS + (0、0.2、0.5、1.0、1.5) mg · L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.05 mg · L<sup>-1</sup> IAA。每个处理 10 株苗, 6 周后统计结果。增殖系数 = 诱导产生芽的总数/接种外植体的总数。试验重复 3 次。

## 1.4 生根与移栽

①将新诱导的不定芽直接转入到生根培养基;②将在增殖培养基中长至 3 cm 以上的白头翁小植株转入到生根诱导培养基。生根培养基为 MS 和 1/2 MS + (0、0.2、0.4、0.8、1.5、3.0) mg · L<sup>-1</sup> NAA。每瓶接种 8 ~ 10 个, 重复 3 次, 6 周后统计结果。生根率 (%) = 生根株数/接种株数 × 100。

选用东北山土和珍珠岩为基质, 进行高压灭菌, 按 1 : 0, 1 : 1, 2 : 1 和 3 : 2 配成 4 种基质。

取出已打开培养瓶口炼苗 1 ~ 2 d 的组培苗, 洗净根部的培养基, 放入添加 1.5 mg · L<sup>-1</sup> NAA 的无菌水中浸泡 10 ~ 20 min。选取生长健壮的苗移栽到装有基质的塑料花盆里, 适量浇不加糖的 1/4 MS 液体培养基, 覆盖保鲜膜, 上面再覆盖一层报纸, 放在组培室里培养, 24 h 后揭开报纸, 继续培养, 还苗后移入温室, 6 周后统计其成活率。成活率 (%) = 成活植株数/移栽株数 × 100。

数据采用 SAS 软件进行方差分析和多重比较分析 (Duncan's 法)。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同植物生长调节剂处理对朝鲜白头翁不同外植体诱导不定芽的影响

#### 2.1.1 zeatin 的影响

在添加 zeatin 的诱导培养基培养 2 周左右, 外植体叶柄和花梗两端膨大并出现绿色或浅绿色的愈伤组织, 4 周左右从愈伤组织分化出丛生不定芽; 外植体叶片发生褐变现象, 但不影响愈伤组织和不定芽的分化 (图 1, A、a、a-1)。不同浓度 zeatin 对不同组织部位的不定芽的诱导差异明显 (表 1), 花梗和叶柄的分化率很高, 叶片的分化率低, 不同浓度处理间多数差异不显著。

表 1 不同浓度 zeatin 处理对朝鲜白头翁不定芽诱导的影响  
Table 1 Effect of zeatin concentration on adventitious shoot formation from leaf, petiole and pedicle explants of *P. koreana* after 6 weeks of culture

生长调节剂/ (mg · L <sup>-1</sup> ) PGR		不定芽再生率/% Shoot regeneration frequency		
Zeatin	IAA	叶柄 Petiole	叶片 Leaf	花梗 Pedicle
0	0.05	0a	0a	0a
0.5	0.05	100.0 ± 0.0 b	79.0 ± 4.0b c	100.0 ± 0 b
1.0	0.05	100.0 ± 0.0 b	53.9 ± 13.4b c	100.0 ± 0 b
1.5	0.05	98.0 ± 1.5 b	56.9 ± 4.4b c	100.0 ± 0 b
2.0	0.05	100.0 ± 0.0 b	21.1 ± 1.6 c	100.0 ± 0 b
2.5	0.05	92.5 ± 8.5 b	38.1 ± 11.4 bc	95.0 ± 5.8 b
3.0	0.05	82.5 ± 9.1 b	53.9 ± 24.7 bc	97.5 ± 5.0 b

注: 表中数据为平均值 ± SD, 同一列中不同字母表示数据差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Note: Values represent the means ± SD, Means followed by different letters indicate significant difference at  $P < 0.05$ .

#### 2.1.2 kinetin 的影响

在添加 kinetin 的诱导培养基培养 2 周左右, 3 种外植体均发生褐变现象, 虽不影响愈伤组织和不定芽的分化, 但分化的丛生不定芽数及其生长明显不如 zeatin 的诱导效果 (图 1, B、b、b-1)。不同浓度 kinetin 对 3 种外植体不定芽的诱导影响差异明显 (表 2), 花梗和叶柄的分化率很高, 叶片的分化率较低。以叶柄为外植体, 以及以叶片为外植体各浓度处理间无显著差异; 以花梗为外植体时最适培养基为 MS + 0.5 mg · L<sup>-1</sup> kinetin + 0.05 mg · L<sup>-1</sup> IAA。

#### 2.1.3 6-BA 的影响

花梗、叶柄和叶片外植体接种在添加不同浓度的 6-BA 的诱导培养基时, 叶片、叶柄外植体逐渐褐化死亡, 不分化 (图 1, C、c)。

表 2 不同浓度 kinetin 处理对朝鲜白头翁不定芽诱导的影响  
Table 2 The effect of kinetin treatment on adventitious shoot formation from leaf, petiole and pedicle explants of *P. koreana* after 6 weeks of culture

生长调节剂/(mg · L <sup>-1</sup> ) PGR		不定芽再生率/% Shoot regeneration frequency		
Kinetin	IAA	叶柄 Petiole	叶片 Leaf	花梗 Pedicle
0	0.05	0 a	0 a	0 a
0.5	0.05	80.0 ± 14.1 b	29.3 ± 1.0 b	80.4 ± 4.4 e
1.0	0.05	65.2 ± 2.2 b	32.5 ± 5.5 b	61.0 ± 5.7 cd
1.5	0.05	77.3 ± 19.3 b	58.8 ± 1.8 b	57.9 ± 3.6 c
2.0	0.05	76.7 ± 9.4 b	68.0 ± 6.6 b	24.1 ± 5.3 b
2.5	0.05	66.6 ± 9.3 b	20.9 ± 5.9 b	50.0 ± 3.9 c
3.0	0.05	81.8 ± 6.9 b	27.5 ± 10.6 b	68.2 ± 4.3 de

注: 表中数据为平均值 ± SD, 同一栏中不同字母表示数据差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Note: Values represent the means ± SD, Means followed by different letters indicate significant difference at  $P < 0.05$ .

## 2.2 不同植物生长调节剂处理对朝鲜白头翁增殖的影响

如表 3 所示, 在添加 zeatin 的增殖培养基中, 随着 zeatin 浓度的升高, 增殖系数呈增加的趋势, 但 zeatin 浓度  $> 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 增殖系数虽较高, 但不定芽生长不正常, 有些玻璃化; zeatin 浓度为  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 不仅增殖系数比较高, 而且叶片大, 叶色深绿, 不定芽成簇生长长势较好。因此, 以 zeatin 为细胞分裂素诱导增殖时, 最适增殖培养基为  $\text{MS} + 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ zeatin} + 0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ IAA}$ 。

表 3 Zeatin 对朝鲜白头翁增殖的影响  
Table 3 The effect of different concentrations of zeatin on shoot propagation in *P. koreana*

植物生长调节剂/(mg · L <sup>-1</sup> ) PGR		外植体数	增殖系数	苗高/cm
Zeatin	IAA	Number of explants	Breeding ratio	Average length of shoot
0	0.05	30	0.4	6.0 ~ 7.0
0.2	0.05	30	>4	5.0 ~ 6.0
0.5	0.05	30	>7	4.5 ~ 5.0
1.0	0.05	30	>8	4.0
1.5	0.05	30	>20	3.0

如表 4 所示, 在添加 6-BA 的增殖培养基中, 6-BA 浓度为  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 不仅增殖系数比较高, 而且叶片大, 叶色深绿, 不定芽成簇生长, 长势较好 (图 1, D)。因此, 以 6-BA 为细胞分裂素进行增殖培养时,  $\text{MS} + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 6-BA} + 0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ IAA}$  为最适培养基。

表 4 6-BA 对朝鲜白头翁增殖的影响  
Table 4 The effect of different concentrations of 6-BA on shoot propagation in *P. koreana*

植物生长调节剂/(mg · L <sup>-1</sup> ) PGR		外植体数	增殖系数	苗高/cm
6-BA	IAA	Number of explants	Breeding ratio	Average length of shoot
0	0.05	30	0.4	6.0 ~ 7.0
0.2	0.05	30	2.0	5.0 ~ 5.4
0.5	0.05	30	2.3	4.0 ~ 5.0
1.0	0.05	30	7.1	3.0 ~ 4.0
1.5	0.05	30	6.0	2.0

## 2.3 生根培养与移栽

### 2.3.1 培养基对生根的影响

新诱导的不定芽直接转入到生根培养基时, 20 d 后才出现根原基, 30 d 后能观察到生根现象,

但生根率很低，生根时间超过 2 个月，且绝大部分植物枯褐死亡。

将在增殖培养基中长至 3 cm 以上的小植株转入到添加不同浓度 NAA 的生根培养基中，10 d 左右开始出现根原基，6 周后其平均根长达 0.7 ~ 2.3 cm (图 1, G、H)。

生根率、平均生根数、平均根长在 1/2MS 培养基中明显好于在 MS 培养基中 (表 5)。因此，朝鲜白头翁生根适宜的基本培养基为 1/2MS 培养基。

表 5 不同浓度 NAA 对朝鲜白头翁生根的影响  
Table 5 Effects of NAA treatment on *P. koreana* rooting

处理 Treatment	NAA/ (mg · L <sup>-1</sup> )	生根率/% Rate of rooting	平均根长/cm Length of root	平均每株生根数 Average number of rooting
1/2MS	0	7.0 ± 0.1 a	0.6 ± 0.4 a	1.0 ± 1.0 a
	0.2	7.0 ± 0.1 a	1.0 ± 0.9 a	0.7 ± 0.6 a
	0.4	34.4 ± 0.1 b	1.0 ± 0.4 a	2.7 ± 0.6 a
	0.8	61.0 ± 0.1 c	1.0 ± 0.4 a	3.3 ± 1.5 a
	1.5	93.0 ± 0.1 d	2.3 ± 0.7 b	11.0 ± 4.0 a
	3.0	79.3 ± 0.0 d	1.1 ± 0.6 a	25.0 ± 6.2 b
MS	0	0 a	0 a	0 a
	0.2	0 a	0 a	0 a
	0.4	13.3 ± 0.1 ab	0.7 ± 0.3 a	1.5 ± 0.6 a
	0.8	17.4 ± 0.07 b	0.7 ± 0.3 a	1.9 ± 1.0 a
	1.5	33.3 ± 0.06 c	1.0 ± 0.2 a	4.3 ± 1.7 b
	3.0	25.2 ± 0.07 bc	0.7 ± 0.2 a	7.8 ± 2.2 b

注：表中数据为平均值 ± SD，同一列栏中不同字母表示数据差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Note: Values represent the means ± SD, Means followed by different letters indicate significant difference at  $P < 0.05$ .

### 2.3.2 不同浓度 NAA 对生根影响

将小植株接种到不添加或添加低浓度 NAA 的培养基时，不生根或生根率很低。1/2MS 培养基中，添加 NAA 浓度为 0.4 ~ 1.5 mg · L<sup>-1</sup> 时，有不定根形成，生根率、平均生根数、平均根长随 NAA 浓度的增加而呈提高的趋势 (表 5)，特别是浓度为 1.5 mg · L<sup>-1</sup> 时生根率高达 93%，平均根系长、平均生根数多、植物的生长良好 (图 1, E、G)；NAA 浓度为 3.0 mg · L<sup>-1</sup> 时，根粗壮，平均生根数最多，但根系短，植株矮，叶片数少，植物生长差 (图 1, F、H)。因此，白头翁生根最适培养基为 1/2 MS + 1.5 mg · L<sup>-1</sup> NAA。

### 2.3.3 不同基质对组培苗移栽的影响

如表 6 所示，东北山土和珍珠岩的混合比例为 2 : 1 时，植物的成活率最高，并且植物的生长好。

表 6 不同基质对比朝鲜白头翁组培苗成活的影响  
Table 6 *Ex vitro* growth of plantlets of *P. koreana* as influenced by culture soil after 6 weeks in culture

基质比例 (东北山土 : 珍珠岩) Ratio of substrate (Mountain soil : Perlite)	移栽/株数 Number of transplanted plantlet	成活率/% Survive ratio	株高/cm Plant height
1 : 0	15	26.7 a	4.1 ± 0.4 a
1 : 1	15	13.3 a	4.3 ± 0.4 a
2 : 1	15	66.7 c	7.4 ± 0.9 b
3 : 2	15	46.7 bc	5.4 ± 0.5 a

注：表中数据为平均值 ± SD，同一列栏中不同字母表示数据差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Note: Values represent the means ± SD, Means followed by different letters indicate significant difference at  $P < 0.05$ .



图1 朝鲜白头翁不定芽的诱导、生根与移栽

A、B、C: 叶柄外植体在不定芽诱导培养基上 (A:  $MS + 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  zeatin +  $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  IAA; B:  $MS + 3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  kinetin +  $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  IAA; C:  $MS + 3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA +  $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  IAA); a、b、c: 叶片外植体外植体在不定芽诱导培养基上 (a:  $MS + 1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  zeatin +  $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  IAA; b:  $MS + 1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  kinetin +  $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  IAA; c:  $MS + 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA +  $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  IAA); a-1、b-1: 花梗外植体在不定芽诱导培养基上 (a-1:  $MS + 1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  zeatin +  $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  IAA; b-1:  $MS + 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  kinetin +  $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  IAA); D: 被诱导的不定芽在增殖培养基中 ( $MS + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA +  $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ); E~H: 白头翁的组培苗 (E、G:  $1/2MS + 1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA; F、H:  $1/2MS + 3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA.); I: 成活的白头翁组培苗 (东北山土和珍珠岩 2 : 1 的混合基质)。

Fig. 1 Adventitious shoot formation and root formation from explants of *P. koreana*

A, B, C: Adventitious shoots were formed from explants of petiole on shoot induction medium, which contained  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  zeatin,  $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  kinetin and  $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA combined with  $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  IAA, respectively; a, b, c: Adventitious shoots were formed from explants of leaf on shoot induction medium, which contained  $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  zeatin,  $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  kinetin and  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA combined with  $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  IAA, respectively; a-1, b-1: Adventitious shoots were formed from explants pedicels on shoot induction medium, which contained  $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  zeatin,  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  kinetin combined with  $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  IAA, respectively; D: Multiple shoot propagation of *P. koreana*; E-H: Root Formation of *P. koreana* on 1/2 MS medium supplemented with different concentrations of NAA (E & G:  $1/2MS + 1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA; F & H:  $1/2MS + 3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA); I: The rooted plantlets were acclimatized on mixture of North east mountain soil and perlite (2 : 1).

### 3 讨论

研究表明,以朝鲜白头翁的叶柄、花梗和叶片为外植体,利用 zeatin 和 kinetin 均可诱导不定芽,其再生率为花梗>叶柄>叶片。这可能与不同外植体的分化程度有关。细胞分裂素对不定芽的诱导效果为 zeatin>kinetin>6-BA。6-BA 在初代不定芽诱导中没有效果,但对芽的增殖效果较好。用不同浓度 zeatin 诱导不定芽中发现,zeatin 0.5~3.0 mg·L<sup>-1</sup> 浓度内,3 种外植体的再生率呈随浓度的增加而减少的趋势,因此,zeatin 0~0.5 mg·L<sup>-1</sup> 浓度范围内诱导不定芽的试验有待进一步研究。

朝鲜白头翁的不定芽丛或单株不定芽接入不加任何生长调节剂的培养基时,初期的不定芽的生长较好,但不生根,逐渐老化、枯黄甚至褐变死亡。增殖时,把不定芽切成不定芽丛或单株基部带上部分类似愈伤的组织块接种在添加激素的培养基,其增殖与生长效果好。与张子学等(2004)进行凤阳白头翁的培养时的结果相似。这说明同属植物之间生长特性相似,白头翁的这种生长特性可能与白头翁的茎是根状茎有关(黄泰康等,1994)。其芽基部似愈伤的组织团类似于根状茎,可能是白头翁进行无性繁殖的器官,在组织培养的过程中,它有利于芽和根的分化与生长(张子学等,2004)。因此,进行朝鲜白头翁的组培快繁时,最好把不定芽切成不定芽丛或单株基部带上部分类似愈伤的组织块进行培养。

比较两种细胞分裂素对白头翁不定芽的增殖效果,zeatin 增殖效果更佳,更有利于芽、苗的分化与生长,生物效应更强,但在实际应用中,zeatin 的价格较高,会大大提高生产成本,而 6-BA 生物效应比较适中,效应比较稳定、价格相对低廉、易于使用,因此,实际应用中还是选用 MS + 1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.05 mg·L<sup>-1</sup> IAA 为增殖培养基较好。

朝鲜白头翁组培苗生根难、缓慢,并且对生长素浓度要求高。一般在添加高浓度 NAA 的培养基上直接转入诱导的新生不定芽时,经过 20 d 的培养才出现根原基,生根时间超过 2 个月,生根率很低,并且绝大部分植物枯褐死亡。这与 Yoon 等(2006)试验结果相似。这可能是新生不定芽长时间生长在添加高浓度生长素的培养基时,高浓度生长素抑制不定芽的生长和生根。本研究把诱导的不定芽先转入到增殖培养基中,当小植株长至 3 cm 以上时再转入到生根培养基诱导生根,发现此方法不仅可提高生根率,而且可缩短生根时间。

生根试验中发现,在增殖培养基上长至 3 cm 以上的小植株在 1/2MS 添加 NAA 的培养基中的生根率比添加同样浓度 NAA 的 MS 培养基中好。这可能是培养基中 N 元素的含量减少提高了生根率。Maene 和 Debergh(1985)报告离体培养植物生根时,培养基中的盐类浓度减少会促进植物的生根;Bucio 等(2005)在 *Arabidopsis* 根系发育研究中提出,减少培养基中的 N 元素或增加磷元素均可促进根系发育与生长。因此,朝鲜白头翁生根诱导培养最佳 N 浓度和 P 浓度的范围尚待进一步研究。

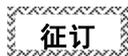
1/2MS 培养基中添加不同浓度 NAA 时,其生根率呈随 NAA 浓度增加而提高的趋势,当超过 1.5 mg·L<sup>-1</sup> NAA 生根效果虽好,但地上部分的生长差。这可能是根部的分化与生长抑制了地上部分的分化与生长。

朝鲜白头翁的移栽试验中发现不同基质比例影响组培苗的成活率。在基质全部为东北山土时,移栽成活率最低,可能是其保水能力、透气性很差的原因;东北山土和珍珠岩按适当比例混合时,其吸水、保水性和透气性良好,这可能有助于根系的发育和生长,移栽成活率较高。

### References

- Bucio J L, Cruz-Ramirez A, Perez-Torres A, Ranirez-Pimentel J G, Sanchez-Calderon L, Herrera-Esrella L. 2005. Root Architecture // Turnbull, C G N. Plant architecture and its manipulation (Annual plant reviews). Boca Raton: CRC Press: 200.
- Huang Tai-kang, You Qi-dong, Shi Mei-yao. 1994. Hand book of the composition and pharmacology of common Chinese drug. Beijing: China

- Medical Science and Technolgy Press: 743. (in Chinese)
- 黄泰康, 尤啓冬, 史美瑶. 1994. 常用中药成分与药理手册. 北京: 中国药科技出版社: 743.
- Kim Yong, Bang Seong-cheo, Lee Ji-hyun, Ahn Byung-zun. 2004. *Pulsatilla* Saponin D: The antitumor principle from *Pulsatilla koreana*. Arch Pharm Res, 27 (9): 915 - 918.
- Lee Man-shang, Oh Ki-hong. 1993. Histological studies on *in vitro* propagation of *Pulsatilla koreana* Nakai. Kor J Med Crop Sci, 1: 137 - 157.
- Maene L, Debergh P. 1985. Liquid medium addition to established tissue cultures to improve elongation and rooting *in vitro*. Plant Cell Tis Organ Cult, 5: 23 - 33.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol Plant, 15: 473 - 497.
- Sang Cae-kyu, Kim En-hee, Kim Hong-yoel. 1993. Germination and life span of *Pulsatilla cenea* var. *koreana* seeds. J Kor Soc Hort Sci, 34 (3): 207 - 212.
- Yoon Eui-soo. 1996. Effect of polyvinylpyrrolidone on callus growth and plant regeneration of *Pulsatilla koreana* Nakai. Kor J Plant Tiss Cult, 23 (6): 349 - 354.
- Yoon Eui-soo, Kwon Hye-kyoung, Cho Yi-yun. 2006. Effects of plant growth regulation on adventitious root formation of *Pulsatilla koreana* Nakai. Kor J Medicinal Crop Sci, 14 (4): 225 - 228.
- Zhang Zi-xue, Ding Wei-qun, Tang Yong, Shi Wei-jing, Ye Wen-cai. 2004. Study on tissue of pasque flower. China Journal of Chinese materia medica, 29 (3): 215 - 218. (in Chinese)
- 张子学, 丁为群, 唐 勇, 时维静, 叶文才. 2004. 白头翁组织培养研究. 中国中药杂志, 29 (3): 215 - 218.
- Zhao Bo, Lu Xin-hai. 2002. Medicinal flower cultivation and utilization. Beijing: China Agricultural press: 311. (in Chinese)
- 赵 渤, 鲁新海. 2002. 药用花卉栽培和利用. 北京: 中国农业出版社: 311.
- Zheng Chang-ge, Wu Gong-lian. 1999. A study on synthesis and bactericidal bioactivity of pseudoprotonemonein. Journal of University of Science and Technology of China, 29 (2): 168 - 174. (in Chinese)
- 郑昌戈, 吴恭廉. 1999. 拟原白头翁素的合成与杀菌活性研究. 中国科学技术大学学报, 29 (2): 168 - 174.



## 欢迎订阅《园艺学报》

《园艺学报》是中国园艺学会主办的学术期刊, 创刊于 1962 年, 刊载有关果树、蔬菜、观赏植物、茶及药用植物等方面的学术论文、研究简报、专题文献综述、问题与讨论、新技术新品种以及园艺研究动态与信息, 适合园艺科研人员、大专院校师生及农业技术推广部门专业技术人员阅读参考。

《园艺学报》是中文核心期刊, 被中国科学引文数据库 Chinese Science Citation Database 等多家重要数据库收录。《园艺学报》2005 年荣获第三届国家期刊奖, 2008 年获中国科技信息所“中国精品科技期刊”称号及武汉大学中国科学评价研究中心“中国权威学术期刊”称号。2008 年《园艺学报》总被引频次 4 591 次, 影响因子 1.075。

《园艺学报》为月刊, 每月 25 日出版。2010 年每期定价 40.00 元, 全年 480.00 元。国内外公开发行, 全国各地邮局办理订阅, 国内邮发代号 82 - 471, 国外发行由中国国际图书贸易总公司承办, 代号 M448。漏订者可直接寄款至本编辑部订购。

编辑部地址: 北京市海淀区中关村南大街 12 号 中国农业科学院蔬菜花卉研究所《园艺学报》编辑部;

邮政编码: 100081; 电 话: (010) 82109523。

E-mail: yuanyixuebao@126.com。网址: <http://www.ahs.ac.cn>。