

药用植物华泽兰组织培养和快速繁殖

梁钻姬, 潘超美*, 赖珍珍, 郑芳昊, 夏静, 刘欣

广州中医药大学中药学院, 广州510006

摘要: 通过比较不同的外植体、植物生长调节剂种类和浓度配比、生根培养基类型以及生根苗的移栽基质, 建立华泽兰组织培养快速繁殖体系。结果表明, 外植体表面消毒以75%酒精预处理10 s, 再用0.1% HgCl₂浸泡10 min, 以嫩茎节为外植体诱导效果最好。培养基MS+6-BA 1.00 mg·L⁻¹+IBA 0.05 mg·L⁻¹利于形成丛生芽, 用于继代增殖, 30 d的增殖系数为9.43; 1/2MS+IBA 0.05~0.10 mg·L⁻¹适宜诱导生根获得再生植株, 生根率100%; 生根苗适宜移栽于田园土中, 成活率93.3%。

关键词: 华泽兰; 组织培养; 快速繁殖

Tissue Culture and Rapid Propagation of Medicinal Plant *Eupatorium chinense* L.

LIANG Zuan-Ji, PAN Chao-Mei*, LAI Zhen-Zhen, ZHENG Fang-Hao, XIA Jing, LIU Xin

College of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

Abstract: The techniques of tissue culture and rapid propagation of *Eupatorium chinense* L. were studied by comparing with different explants, types and concentrations of plant growth regulators, types of rooting medium and transplanting medium. The results showed that the most suitable procedure for sterilization was to soak explants into 0.1% HgCl₂ solution for 10 min after pretreatment with 75% alcohol for 10 s. The tender stems were the best explants. MS+6-BA 1.00 mg·L⁻¹+IBA 0.05 mg·L⁻¹ could effectively induce fasciculate buds and be suitable for subculture and proliferation, the propagation coefficient was 9.43 every 30 days; the most optimum rooting medium was 1/2MS+IBA 0.05–0.10 mg·L⁻¹, and the rooting rate was 100%. The rooting seedlings were effectively transplanted in glebe soil. The highest survival rate was 93.3%.

Key words: *Eupatorium chinense*; tissue culture; rapid propagation

华泽兰(*Eupatorium chinense* L.)又名多须公、六月雪、斑骨相思, 系菊科泽兰属多年生草本植物, 分布于我国东南部及西南部。以根入药, 名为广东土牛膝, 具清热解毒、凉血利咽的功效。广东多家知名医药企业生产的东梅止咳颗粒、喉疾灵胶囊和片剂, 以及珠江三角洲地区针对多种喉痛病开发研制的各类医院制剂, 均以广东土牛膝作为主药原料, 临床应用已有半世纪历史, 素有喉科要药之称(梅全喜和吴惠妃2005)。本课题组研究中了解到, 一直以来, 广东土牛膝药材全部来源于野生资源, 过度采挖已导致资源蕴藏量剧减, 野生居群已不多见; 不少生产企业和医院由于原料短缺要从越南等邻近国家进口, 甚至因原料短缺而停产。因此, 通过人工种植广东土牛膝药材既可解决当前燃眉之急, 又能使野生资源得到可持续利用。由于华泽兰自然条件下种子繁育能力低, 自我更新能力弱, 人工栽培的研究未见有报道。本实验对华泽兰进行离体培养考察, 旨在为华泽兰野生转家种以及规范化、产业化种植的种苗繁

育生产积累提供科学的依据。

材料与方法

1 材料及外植体消毒

供试材料采自广州中医药大学大学城校区药王山, 经鉴定为华泽兰(*Eupatorium chinense* L.)。选择春季晴朗天气, 于清晨剪下幼嫩枝条8~10 cm, 除去叶子, 将其顶芽和带节茎段两个部位分开; 同时从4℃冰箱里取出去年秋末采收的华泽兰种子, 以上3种外植体进行同样消毒处理。先用0.3%家用洗洁精浸泡5 min, 再用自来水冲洗2 h。然后在超净工作台上, 用浓度为75%酒精处理10 s, 用无菌水冲洗3次; 再用0.1% HgCl₂溶液进行灭菌10 min, 无菌水冲洗4~5次, 无菌滤纸吸干表面水分,

收稿 2011-09-07 修定 2011-10-21

资助 广东省重点科技专项(2004B60302001)和湛江市农业局科技专项。

* 通讯作者(E-mail: pancm@gzhtcm.edu.cn; Tel: 020-39358249)。

剪去带有残余 HgCl_2 的两端伤口,剪成2 cm长的带节小段接种于诱导培养基($\text{MS}+6\text{-BA } 0.50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{IBA } 0.02 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)。

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的6-BA (6-苄基腺嘌呤)、IBA (吲哚丁酸)和NAA (萘乙酸),其中诱导生根实验还设计 B_5 和 N_6 培养基。附加2.0%蔗糖和0.65%的琼脂, pH 5.8~6.0,配制分装后,于温度 $121\text{ }^\circ\text{C}$ 、压力 $1.1 \text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ 的条件下灭菌16 min。

3 培养条件

材料接种后,在光照强度 $40\sim 60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的光照下培养,光照时间 $10 \text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$;温度 $(25\pm 2)\text{ }^\circ\text{C}$ 。

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10 d的培养,开始形成新芽;30 d新芽长成3~4 cm的健壮小芽。将新芽接种到基本培养基中,经50 d的培养,取健壮、无菌的试管苗,剪成1.5 cm的带节小段,接种到诱导丛生芽培养基中,用正交设计表 $L_{16}(4^5)$ 考察6-BA和IBA两种植物生长调节剂及4个浓度水平(表1);当单个丛生芽长到1~2 cm高、具2~4片小叶时,将其从基部分开,并将无菌小芽接入各种生根培养基上,以培养出完整的小植株。每种处理接种10瓶,每瓶接种3个,重复3次,定期观察记录,30 d后统计得率。

表1 诱导丛生芽的 $L_{16}(4^5)$ 正交试验表

Table 1 Orthogonal experiment of inducing cluster shoots

水平	因素	
	6-BA/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	IBA/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
1	0.50	0.02
2	1.00	0.05
3	1.50	0.08
4	2.00	0.10

5 生根苗的炼苗与移栽

取培养30~50 d,根系发达,植株高为10~15 cm的华泽兰试管苗,预先室内进行开盖炼苗3 d,洗净根部附着的培养基,放入0.1%多菌灵溶液中浸泡消毒15 min,用适量的清水培养数天后,移栽到预先消毒处理过的基质中,基质用营养杯分装,每杯栽种1株,浇水淋透,适当保湿遮荫。15 d喷施1次

营养液,进行常规管理。30 d后统计植株的成活数、成活率以及生长状况。

实验结果

1 外植体的选择与无菌苗的获得

试验中采自秋末的华泽兰成熟种子,形态微小且种皮薄,表面灭菌操作困难,容易导致污染,污染率达60%,新萌发出的小苗生长缓慢,细弱甚至不长,存活率仅有8% (表2)。以顶芽和嫩茎节为外植体,都能诱导出新芽;其中以顶芽为外植体,污染率稍高于嫩茎节,且抽出新芽较弱,生长较为缓慢;以嫩茎节为外植体(图1-A),存活率可达60% (表2),叶腋处诱导出的新芽较壮,生长迅速,在继代培养过程中,长势优于顶芽。因此,通常以嫩茎节为外植体较为理想。

表2 华泽兰不同外植体培养效果的比较

Table 2 Comparison of culture effect of different explants of

Eupatorium chinense

外植体类型	污染率/%	存活率/%	芽高/cm
顶芽	40	55	2.8
嫩茎节	35	60	3.3
种子	60	8	0.7

2 丛生芽的诱导增殖

$L_{16}(4^5)$ 正交试验结果可知,6-BA和IBA配比的培养基均可诱导出华泽兰的丛生芽。单个带节茎段叶腋处大多数可诱导出4~9个丛生芽,数目最多可达16个,少数直接长成单个小植株。从增殖系数的角度看(表3),可以认为华泽兰丛生芽诱导的培养基以6号为最佳组合,即 $\text{MS}+6\text{-BA } 1.00 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{IBA } 0.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组合,平均增殖系数可达9.43。 R 值极差分析表明,6-BA对丛生芽的诱导影响作用大于IBA;当6-BA在 $0.50\sim 1.50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内,出芽率较高,诱导出的丛生芽色绿健康,生长速度较快,其中6、8和9号的增殖系数达到8以上;当6-BA量达 $2.00 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,茎节基部出现愈伤组织,生长速度可能受到抑制,丛芽数有所下降,芽苗弱化,部分出现玻璃化。因此,华泽兰的丛生芽增殖的最佳培养基为 $\text{MS}+6\text{-BA } 1.00 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{IBA } 0.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,效果见图1-B。



图1 药用植物华泽兰组织培养和快速繁殖

Fig.1 Tissue culture and rapid propagation of medicinal plant *Eupatorium chinense*

A: 茎节外植体30 d后的生长情况; B: 增殖培养30 d后的生长情况; C: 生根培养30 d后的生长情况; D: 移栽90 d后的组培苗。

3 生根基本培养基的选择

将健壮的单个丛生芽小植株转入含 $0.10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA的4种不同基本培养基中(分别为MS、1/2MS、 B_5 、 N_6)，结果见表4。MS和1/2MS培养基中的华泽兰幼苗生长整齐，叶色淡绿到亮绿色，茎的基部分化出须根系，生根率达100%。其中MS组的植株生长速度较快，叶片数多，植株粗壮，茎粗最大可达 1.36 mm 。而减半的1/2MS培养基更有利于对华泽兰的生长，与MS组比，叶面积、苗高都有显著性差异，植株生长最快，植株最高可达 9 cm ，基部根系生长发达。在 B_5 和 N_6 两组培养基中的植株生长速度稍缓慢，植株偏小，叶片出现淡黄绿色，茎节稀疏，生根率有所下降，基部根系不够发达；其中 N_6 培养基中植株更为瘦弱，叶片细小，生根率偏低。因此，在华泽兰组织培养中以1/2MS为基本培养基为最佳，出苗快，生根率好。

4 植物生长调节剂的种类和浓度对再生芽生根的影响

将每个华泽兰丛生芽接种到含IBA或NAA的生根培养基1~2周后，都能促进单芽基部生根，4周后可形成须根系，植株可达 $3\sim 10 \text{ cm}$ 高。表5结果可知，IBA在浓度 $0.05\sim 0.20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ，NAA在浓度 $0.10\sim 0.20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 下，诱导的生根率达100%；低浓度的NAA诱导的生根率偏低。NAA在浓度 $0.10\sim 0.20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 诱导的发根数目较多，但易促进愈伤组织的形成，根系基部膨大，发白，因此起始发根时间较迟，形成的根系较细长。由IBA诱导形成的根系直接从茎节基部长出，长而粗壮，植株生长健康。其中IBA在浓度 $0.05\sim 0.10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 下，植株生长良好，茎干粗壮，根多而长，但IBA在 $0.20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下少数根部开始出现发白的愈伤组织。综合考虑，可以选择培养基1/2MS+IBA $0.05\sim 0.10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 为华泽

表3 不同植物生长调节剂组合对华泽兰丛生芽增殖的影响

Table 3 Effects of different plant growth regulators on fasciculate buds propagation of *Eupatorium chinense*

编号	6-BA浓度/mg·L ⁻¹	IBA浓度/mg·L ⁻¹	增殖系数
1	0.50	0.02	6.47
2	0.50	0.05	7.07
3	0.50	0.08	7.23
4	0.50	0.10	5.97
5	1.00	0.02	7.13
6	1.00	0.05	9.43
7	1.00	0.08	7.03
8	1.00	0.10	8.03
9	1.50	0.02	9.10
10	1.50	0.05	6.73
11	1.50	0.08	6.50
12	1.50	0.10	6.23
13	2.00	0.02	5.07
14	2.00	0.05	4.47
15	2.00	0.08	4.50
16	2.00	0.10	5.13
\bar{X}_1	6.685	6.942	
\bar{X}_2	7.905	6.925	
\bar{X}_3	7.140	6.315	
\bar{X}_4	4.792	6.340	
R	3.113	0.627	

\bar{X}_n 表示在某个因素时的同一剂量水平的平均值($n=1, 2, 3, 4$); R表示极差。

表4 不同基本培养基对华泽兰组培苗生长的影响

Table 4 Effects of different basic medium on the growth of *Eupatorium chinense* in vitro

培养基	茎粗/mm	叶面积/cm ²	苗高/cm	茎节数	生根率/%
MS	1.00	0.75	5.6	5.07	100
1/2MS	0.96	1.00*	7.4**	5.60	100
B ₅	0.97	0.78	4.6*	3.87*	97
N ₆	0.86*	0.61	4.3**	3.93*	93

与MS组比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

表5 不同浓度IBA或NAA对根系分化的影响

Table 5 Effects of different NAA or IBA concentrations on differentiation of rooting

植物生长调节剂种类及浓度/mg·L ⁻¹	生根率/%	根长/cm	根数/条	根生长状况	
空白试验	-	53	2.50	2.35	发根少,短
IBA	0.01	95	7.00	2.73	发根少,略粗
	0.05	100	6.32	5.69	发根多,长,粗壮
	0.10	100	9.22	3.92	发根多,长,粗壮
	0.20	100	9.61	3.09	根长,略粗壮,基部少数出现愈伤组织
NAA	0.01	95	5.08	4.90	发根多,细长
	0.05	87	5.96	4.67	发根多,细长
	0.10	100	5.00	7.53	发根多,细长,基部少数出现愈伤组织
	0.20	100	6.27	6.00	发根多,细长,基部出现愈伤组织

兰生根最佳培养条件,效果见图1-C。

5 移栽基质的选择

从表6看出,组培苗移栽在田园土基质上的成活率可达93.3% (图1-D),新长出的叶大而绿,茎粗叶茂,植株健壮,根系发达粗壮,可能是土质透气、保湿性良好;河沙与田园土(1:1)的组培苗定植也快,长势良好,根较多但不粗,成活率仅有66.7%;河沙基质的植株成活率偏低,长出新叶小而偏黄绿色,植株长势较差,可能是河沙虽透气性良好,但保湿性偏差。

讨 论

外植体类型的选择对其植物组织培养体系的建立十分重要,不同取材时间、部位、植株年龄和生理状态等都会直接影响培养结果。本实验材料采自春季3~4月份从土里新长出来的嫩枝条,这时的枝条受雨水、粉尘等环境污染的时间相对减少,在组培工艺过程中通过严格操作可使污染率控制在一定范围内,可以获得无菌材料。同属植物紫茎泽兰组织培养试验选择茎尖和叶进行诱导愈伤组织,诱导难易程度与取材时间有关,4~5月份取材明显优于其他月份(李霞2005)。本实验选

表6 不同移栽基质对组培苗生长的影响

Table 6 Effects of different substrates on growth of plantlets

基质	移栽株数	成活株数	成活率/%
河沙	30	12	40.0
田园土	30	28	93.3
河沙:田园土(1:1)	30	20	66.7

择嫩枝条中的顶芽和茎节为外植体, 都能诱导出新芽, 其中以顶芽污染率稍高于嫩茎节, 且生长缓慢, 可能与顶芽带有嫩叶等附属器官有关, 一是难以彻底消毒, 二是消毒过程容易受到损伤。因此, 通常选择嫩茎节为外植体, 活力高, 叶腋处诱导出的新芽较壮。

在植物组织培养中, 内源激素与外源激素起着重要的调控作用, 植物生长调节剂的种类、水平以及相互组合的选择对组织的产生与分化十分重要。相关报道指出, 不同植物生长调节剂相互作用比单一某种生长调节剂更能促进丛生芽或不定芽的形成与增殖。野生木香继代增殖培养中单独使用6-BA, 丛生芽的增殖少而苗势弱, 而将6-BA和NAA配合使用, 增殖数增多, 生长势强(余晓丽2005)。用单因子6-BA诱导蒲公英外植体试验中, 不定芽的诱导率小于20%, 植株容易枯萎, 配合一定浓度NAA后诱导率达90%以上, 长势良好(孙怀娟和魏小弟2008)。预实验中曾使用单因子6-BA直接诱导丛生芽时, 发现芽长势偏细弱, 叶片容易黄化。因此, 华泽兰丛生芽的增殖诱导中设计6-BA与IBA两因子, 四个水平进行正交试验, 芽生长良好, 叶色偏绿。配合IBA使用的6-BA在0.50~1.00 mg·L⁻¹范围内, 华泽兰的增殖系数随浓度的升高而有所增高, 而高浓度的6-BA容易引起丛生芽出现玻璃化现象。由此可见, 高浓度的6-BA不利于华泽兰丛生芽的生长与分化, 以采用达到增殖系数较高的最低配合浓度为宜。

植物组织培养生根阶段, 减少培养基中营养成分和糖含量可刺激生根, 原因可能是在培养基中营养元素浓度较高, 试管苗产生依赖性而不易生根(王玉英和高新一2006)。试验中发现, 养分减半的1/2MS作为基本培养基生根率可达100%, 长势良好, 与MS组比, 叶面积、苗高都有显著性差异(表4)。在选择IBA和NAA两种生长素分别进行生根试验中, 结果(表5)表明, 两者对组培苗生根均有一定的促进作用, 但达到一定浓度时, 少数植株茎节基部出现愈伤组织化。同科药用植物白术生根试验中发现, IBA与NAA都能诱导生根, 以IBA较优, 但浓度过高易产生畸形根, 从而降低组培苗质量(珠玉球等2006)。其原因一方面可能是前期培养阶段所用的外源激素水平不同, 导致培养产物的内源激素在质和量上有所差异(龙华等2009), 另一方面可能是外源激素超过本身适应极限, 从而影响自身根的形成与生长。

本试验通过系统研究已建立起了一套完整的华泽兰组培快繁技术, 这对今后的工厂化育苗以及对有效成分在植株体内积累的形成调控和利用研究有重要意义, 也确保华泽兰资源的保持和可持续利用。

参考文献

- 李霞(2005). 紫茎泽兰组织培养及草甘膦对其幼苗影响的研究[硕士论文]. 山西: 山西农业大学, 17
- 龙华, 胡雪峰, 黄衡宇(2009). 獐牙菜的组织培养. 中草药, 40 (3): 462~466
- 梅全喜, 吴惠妃(2005). 广东土牛膝的药用历史及现代研究概况. 中医药学刊, 23 (11): 1995~1997
- 孙怀娟, 魏小弟(2008). 蒲公英的组织培养研究. 热带农业科学, 28 (3): 4~7
- 王玉英, 高新一(2006). 植物组织培养技术手册. 北京: 金盾出版社, 97
- 余晓丽(2005). 野生木香丛生芽诱导因素的研究. 江苏农业科学, (1): 76~77
- 珠玉球, 夏国华, 方慧刚, 付顺华, 何富基(2006). 白术组培快繁技术. 中药材, 29 (3): 212~213