

茅苍术规模化组培快繁体系的建立

宋刚, 徐银, 史俊, 谢正林

(江苏农林职业技术学院, 江苏 句容 212400)

摘要: 为建立道地药材茅苍术规模化组培快繁生产技术体系, 以茅苍术无菌苗为外植体, 研究了茅苍术丛生芽增殖系数、生根率、平均生根数、移栽成活率等指标。结果表明: 16种不同浓度激素组合(6-BA、NAA)增殖培养基最高增殖系数为15.0, 并与其他组合差异显著($P < 0.05$, 下同)。继代4~8代的茅苍术丛生芽增殖系数互相间差异不显著, 但显著高于前3代。培养基单独添加活性炭或NAA和同时添加活性炭和NAA相比对照都能显著促进生根, 且3个处理的平均生根数差异不显著。通过全面组合试验, 筛选出适合规模化生产茅苍术种苗的增殖培养基为: MS+1.0 mg/L 6-BA+0.15 mg/L NAA, 生根培养基为: 1/2MS+0.5%活性炭。茅苍术可连续进行多代继代扩繁, 增殖系数稳定。采用泥炭土: 蛭石: 珍珠岩=2:1:1的基质移栽成活率达95%。

关键词: 茅苍术; 丛生芽; 增殖系数; 快繁

中图分类号: Q949.783.5 文献标志码: A 文章编号: 1001-8581(2018)09-0063-05

Establishment of Large-scale Tissue Culture and Rapid Propagation System for *Atractylodes lancea*

SONG Gang, XU Yin, SHI Jun, XIE Zheng-lin

(Jiangsu Vocational College of Agriculture and Forestry, Jurong 212400, China)

Abstract: In order to establish a large-scale tissue culture and rapid propagation system for *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC., the author used the aseptic seedlings of *A. lancea* as explant materials, and studied the multiplication coefficient of tuft buds, rooting rate, average rooting number and transplanting survival rate of this medicinal plant. The results showed that the highest multiplication coefficient of tuft buds in 16 propagation culture media with different concentrations of combined hormones (6-BA, and NAA) was 15.0, which was significantly ($P < 0.05$, the same below) higher than that in the other hormone combination treatments. The multiplication coefficients of tuft buds in the 4~8 generations of subculture were not significantly different, but they were significantly higher than those in the 1~3 generations of subculture. The media supplemented with activated carbon (AC) or NAA or both two could significantly promote the rooting as compared with the control, while there was no significant difference in average root number among these three treatments. Through the complete combination tests, the screened propagation culture medium suitable for the large-scale production of *A. lancea* was MS+1.0 mg/L 6-BA+0.15 mg/L NAA, and the suitable rooting culture medium was 1/2MS+0.5% AC. *A. lancea* could be propagated through continuous generations of subculture, and its multiplication coefficient was stable. The survival rate of the transplanted seedlings reached 95% by using the substrate with peat soil, vermiculite and perlite (2:1:1, in volume).

Key words: *Atractylodes lancea*; Tuft bud; Multiplication coefficient; Rapid propagation

茅苍术 [*Atractylodes lancea* (Thunb.) DC.] 又名南苍术、茅术、京苍术, 是菊科苍术属多年生草本植物, 地下根状茎经炮制作苍术入药。茅苍术在中国分布广泛, 主产于江苏、浙江、山东、江西、广东、安徽、湖北、四川等地区^[1-2]。江苏茅山地区是茅苍术道地药材的中心产区, 品质优良的茅苍术根茎断面有黄白色或灰白色和棕红色油腺, 习称“朱砂点”^[3]。在传统用药中, 茅苍术挥发油部分是主要药用成分, 主要

包括 β -桉叶醇、茅术醇、苍术素、苍术酮等, 药理药性研究表明茅苍术具有胃肠促进、抗缺氧、抗血糖、抗菌、抑制癌细胞增殖等作用^[4]。体外细胞试验表明, 茅苍术还具有一定的抗HIV病毒的活性^[5]。除药用外, 茅苍术还可用作各种饮料的添加剂和加工工艺品香包^[6]。传统生产可以利用茅苍术种子和根茎进行繁殖, 但存在种子生命力较差、繁殖系数较低; 根茎繁殖时根茎需求量大、品质易退化等弊端。通过组培

收稿日期: 2018-04-11

基金项目: 江苏省高校自然科学基金项目(16KJB210017); 江苏农林职业技术学院科研课题(2016kj012)。

作者简介: 宋刚(1978—), 副教授, 从事植物组培与快繁技术、植物资源开发与利用研究。

快繁技术能在短期内获得大量优质无菌苗,满足生产种苗需求。还能与生物技术育种结合选育高产优质的新品种,开辟新的药用资源,并对缓解供需矛盾,保护野生茅苍术资源具有重要的意义。对茅苍术组培快繁技术的研究已有报道^[6-8],所用外植体包括根茎侧芽、胚根、胚轴、子叶、叶柄、叶片,通过直接诱导丛生芽和先诱导愈伤再分化成丛生芽再生途径实现再生。在配方研究方面,李文等^[9]采用正交设计筛选了南苍术最佳增殖和生根培养基配方及试管苗移栽基质配方。王红娟等^[10]通过均匀设计对茅苍术增殖和生根培养基进行了优化,并比较了不同移栽基质的效果。

前人研究中试验组合数偏少,研究目的偏向于再生体系建立,适合规模化工厂化生产的技术体系并未明确。本研究采用全面试验组合,旨在筛选适合生产用的高效增殖和生根培养基、同时对茅苍术组培苗多次继代,阐明其丛生芽增殖变化规律,为实现茅苍术种苗工厂化生产奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

茅苍术植株 2011 年 11 月采集自句容茅山,经江苏省中医院主任中药师宋金斌鉴定为野生茅苍术;将其移栽于江苏农林职业技术学院植物园。收集茅苍术种子,经无菌播种^[11]培养成无菌苗(图 1-A);选取叶色浓绿、植株粗壮的无菌苗作为试验材料。

1.2 试验方法

1.2.1 增殖培养 接种前于超净工作台上剪去茅苍术无菌苗叶片、根系,将胚轴形成的芽苗切割成单芽,接入不同芽增殖培养基,每瓶接 1 个单芽,每处理接 6 瓶,重复 3 次。培养 6 周后统计芽增殖系数。

1.2.2 生根培养 取株高达到 5 cm 以上,叶片挺拔、叶色浓绿的单株健壮的幼苗,接种至不同生根培养基,每瓶接 1 株,每处理接 6 瓶,重复 3 次。培养 3 周后调查统计生根率、平均生根数、根系长势情况。

1.2.3 驯化与移栽 挑选叶片数多于 8 片、不定根数多于 15、苗高超过 6 cm 的壮苗,拧松瓶盖先在温室放置 2 d,随后在温室自然光下锻炼 1 周,移栽前打开瓶盖,倒入少量水保持植株不萎缩。取出试管苗注意不要伤到根,洗净培养基后定植于 72 孔穴盘,2 周后调查其移栽成活率。

1.2.4 培养基与培养条件 按表 1 所示,设计了 16 种增殖培养基和 8 种生根培养基。所有培养基均分装在组培瓶中,于 122 °C 条件下灭菌 20 min。培养时培养室温度控制在 (25±2) °C,日光灯光照强度 2000~2500 lx,时间 12 h/d^[12-13]。

表 1 培养基配方设计

培养基配方	增殖培养基				生根培养基	
基本培养基	MS				1/2MS	
6-BA/(mg/L)	1.0	2.0	3.0	4.0	0	1.0
NAA/(mg/L)	0.05	0.10	0.15	0.20	0	0.15
活性炭/%	0				0	0.5
蔗糖/%	3				3	
琼脂/%	0.7				0.7	
pH 值	5.8~6.2				5.8~6.2	
培养基组合数	16				8	

1.2.5 数据统计与分析 按下列公式计算各指标:

$$\text{增殖系数} = \text{增殖丛生芽数} / \text{接种瓶数}$$

$$\text{生根率} = (\text{生根苗数} / \text{接种瓶数}) \times 100\%$$

$$\text{平均生根数} = \text{总生根数} / \text{接种瓶数}$$

$$\text{移栽成活率} = (\text{移栽成活苗数} / \text{移栽总苗数}) \times 100\%$$

利用 Excel 2007 和 SPSS 20.0 对统计的数据进行分析,多重比较采用 Duncan's 检验法。

2 结果与分析

2.1 不同植物生长调节剂对不定芽增殖的影响

单芽接入培养基中,约 1 周可见新芽出现,陆续长出新叶。随后有更多丛生芽产生,最后形成丛苗(图 1-B)。如表 2 所示,除了 6、8、12、13、14、15 号这 6 种培养基未能诱导增殖出丛生芽,其余 9 种培养基均能诱导分化形成数量不等的丛生芽,其中 3 号培养基丛生芽增殖系数达到 15,为所有培养基中最高,并与其他处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

添加 4.0 mg/L 6-BA 的培养基,虽然分别与 4 种不同浓度 NAA 搭配组合,但各组合都未有丛生芽分化形成,说明在培养基中过高浓度的 6-BA 会抑制茅苍术单芽分化形成丛生芽,相对较低浓度的 6-BA 与 NAA 组合能够诱导出丛生芽。而在形成丛生芽的培养基当中,添加了 1.0 mg/L 的和部分 2.0 mg/L 6-BA 的培养基有少量同时诱导产生了愈伤组织,这些愈伤组织呈绿色到棕色,位于丛生芽基部胚轴位置,随着丛生芽增多而增大。愈伤组织的产生并未明显影响到丛生芽的分化。

对各培养基中丛苗长势进行比较发现,1~4 号培养基中丛苗比较健壮,而其他培养基中丛苗长势偏弱,叶色偏浅,部分甚至发黄。

2.2 不同继代次数对丛苗增殖的影响

将 3 号培养基增殖的丛苗分成单芽(图 1-C)继代培养于相同培养基,每隔 4 周继代一次,连续继代 8 次。每代调查每瓶平均叶片数、平均苗高和增殖系数,并描述芽苗生长状况。结果如表 3 所示,8 代继代苗每瓶苗平均叶片数在 34~43 之间。平均苗高在

5.95~6.33 cm 之间,各代间差异不显著。增殖系数前 3 代与后 5 代差异显著 ($P<0.05$); 从第 4 代开始增殖系数趋于稳定,到第 6 代达最高值 12.33。在增殖苗长势方面,1~5 代苗的生长状况正常,叶形挺

拔、叶色浓绿、株型匀称规则; 从第 6 代起出现少部分苗长势偏弱,有叶萎缩卷曲、叶色偏淡转黄现象,但没有白化、玻璃化、黄化苗出现。

表 2 不同植物生长调节剂组合对茅苍术丛芽增殖的影响

培养基编号	6-BA/(mg/L)	NAA/(mg/L)	增殖系数	出愈瓶数	苗生长状况
1	1.0	0.05	7.33±0.89 b	1	苗壮
2	1.0	0.10	4.44±0.57 d	3	苗壮
3	1.0	0.15	15.00±1.42 a	4	苗壮
4	1.0	0.20	6.56±0.88 bc	5	苗壮
5	2.0	0.05	8.56±0.71 b	2	生长不良,发生褐化
6	2.0	0.10	0 f	0	/
7	2.0	0.15	3.56±0.23 d	0	苗娇弱
8	2.0	0.20	0 f	0	/
9	3.0	0.05	5.89±0.34 c	0	苗娇弱
10	3.0	0.10	1.78±0.19 e	0	苗娇弱
11	3.0	0.15	13.78±1.33 a	0	苗娇弱,叶片发黄
12	3.0	0.20	0 f	0	/
13	4.0	0.05	0 f	0	/
14	4.0	0.10	0 f	0	/
15	4.0	0.15	0 f	0	/
16	4.0	0.20	0 f	0	/

注: 不同小写字母表示差异达到 $P<0.05$ 的显著水平。下同。

表 3 不同继代次数对茅苍术丛苗增殖的影响

继代次数	平均叶片数	平均苗高/cm	增殖系数	丛苗生长状况
1	34	5.95±0.22 a	10.40±0.19 ab	叶挺拔、色绿、株形匀称
2	35	6.10±0.32 a	10.14±0.15 b	叶挺拔、色绿、株形匀称
3	35	6.04±0.45 a	8.88±0.22 c	叶挺拔、色绿、株形匀称
4	40	6.33±0.36 a	11.26±0.14 a	叶挺拔、色绿、株形匀称
5	43	6.31±0.28 a	11.25±0.21 a	叶挺拔、色绿、株形匀称
6	41	6.24±0.36 a	12.33±0.12 a	个别苗出现叶萎缩、色淡
7	41	6.30±0.42 a	11.66±0.13 a	个别苗出现叶萎缩、色淡
8	40	6.17±0.38 a	11.24±0.08 a	个别苗出现叶萎缩、色淡

2.3 不同培养基对生根的影响

取生长 8 周的一致单株壮苗(图 1-D),接入生根培养基培养 3 周后调查生根状况,结果如表 4、图 1-E 所示。根系长势采用“+++”(表示根长度长于 8 cm、数量达到 15 根以上)、“++”(根系长度长于 5 cm,数量 10 根以上)和“+”(根系长度短于 5 cm,数量较少)三等级表示。在 8 种生根培养基中,3、4、5、6 号培养基的生根率、平均生根数、根系长势都与其

余 4 种差异明显,显然不适合作为茅苍术工厂化生产的生根培养基。1 号对照与 2、7、8 号培养基比较,生根率都为 100%,但平均生根数显著减少,根系长势也偏弱。

2、7、8 号培养基分别添加活性炭、NAA 及活性炭+NAA,它们的平均生根数分别为 24.9、25.7 和 24.8,彼此差异不显著,根系长势也一致,都到达+++级别。

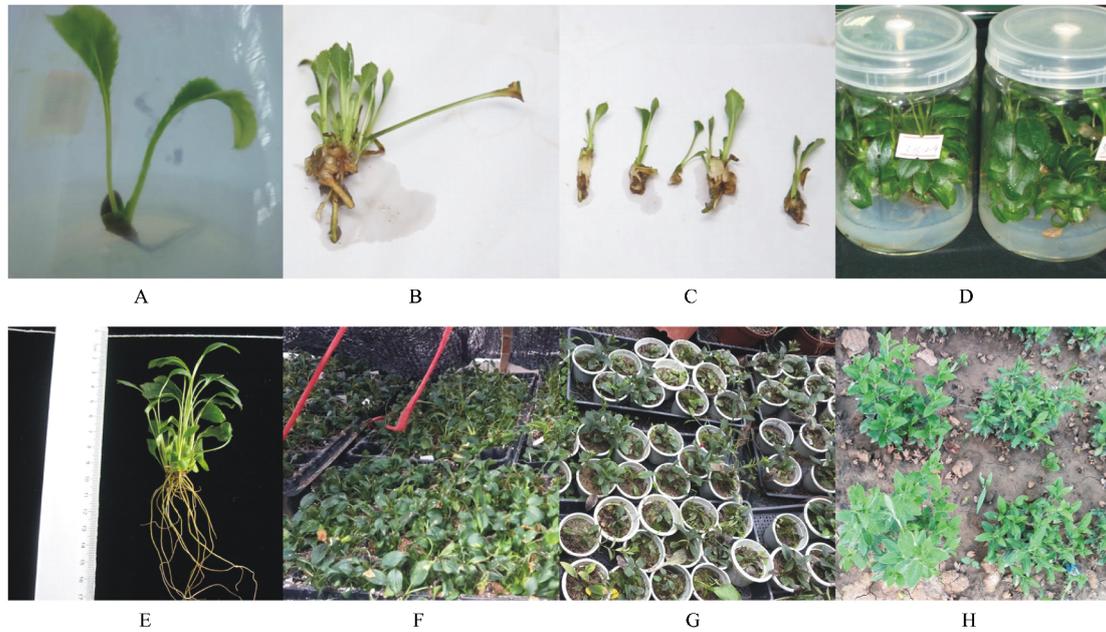
表 4 不同类型培养基对茅苍术生根的影响

培养基编号	培养基配方设计	生根率/%	平均生根数	根系长势
1	1/2MS (CK)	100	16.5±0.06 b	++
2	1/2MS +0.5%活性炭	100	24.9±0.23 a	+++
3	1/2 MS+6-BA 1.0 mg/L	50	2.0±0.02 c	+
4	1/2 MS+6-BA 1.0 mg/L+0.5%活性炭	70	2.3±0.03 c	+
5	1/2 MS+6-BA 1.0 mg/L +NAA 0.15 mg/L	80	2.4±0.08 c	+
6	1/2MS+6-BA 1.0 mg/L +NAA 0.15 mg/L+0.5%活性炭	70	1.6±0.01 c	+
7	1/2MS+NAA 0.15 mg/L	100	25.7±0.26 a	+++
8	1/2MS+NAA 0.15 mg/L +0.5%活性炭	100	24.8±0.19 a	+++

2.4 组培苗的移栽

茅苍术组培苗移栽基质采用泥炭土:蛭石:珍珠岩=2:1:1,高压蒸汽灭菌处理。移栽后穴盘置于温室,相对湿度保持80%以上,每周喷施0.1%多菌灵一

次,常规管理移栽苗。两周后以产生新叶植株为移栽成活判断标准(图1-F)。经调查成活率达95%,后续可移入盆栽(图1-G),一年后可地栽(图1-H)。



A. 无菌苗; B. 丛生芽; C. 单芽; D. 试管苗; E. 生根苗; F. 移栽苗; G. 盆栽苗; H. 地栽苗

图1 茅苍术高效快繁技术体系

3 讨论与结论

巢建国等^[7]研究发现茅苍术胚轴分化能力最强,每段能产生8~10个新芽。王红娟等^[10]研究茅苍术胚轴丛生芽增殖最佳培养基,平均增殖系数为(10.0±0.71)。植物生长调节剂是植物组织培养器官分化的关键因素,形成器官的类型由培养基中不同植物生长调节剂的相对质量浓度控制,而不是由这些物质的绝对质量浓度决定^[14]。本研究使用6-BA 1.0 mg/L、NAA 0.15 mg/L的植物生长调节剂组合,芽增殖系数达到最高15.0,高于前人的研究结果,这说明这2种植物生长调节剂的相对浓度比例较合适,对芽的增殖起到较好的促进作用。

利用此增殖培养基对茅苍术丛生芽进行继代培养,共继代到8代。试验结果显示,4代以后增殖系数显著增加,一直到第8代,并且继代苗高度和叶片数各代间差异不大,丛苗生长状况良好。通常在种苗快繁与保存时,无菌繁殖体系在培养基中激素的作用下,分生组织不断分化,能连续多代增殖。曹孜义等^[15]对葡萄离体培养48~80代后发现增殖倍数并未降低。苹果新梢外植体继代培养100余次,其器官再生能力没有显著变化^[16]。本试验结果与上述研究结果相似,表明在茅苍术工厂化快繁生产中能使用此培养

基多次继代,在组培苗生根前获得充足的中间繁殖体。

培养基中添加活性炭能为根的生长发育营造近似自然生长条件下的黑暗环境,吸附培养基中有毒副作用的物质,降低盐离子浓度,因而活性炭可以促进不定芽生根和生长。张素勤等^[17]研究发现1/2MS中添加0.2%~0.3%活性炭能明显促进非洲菊不定芽生根,缩短生根时间,增加根数和根长。在本试验中,1/2MS添加0.5%活性炭与未添加活性炭平均生根数比较差异显著,说明添加活性炭有利于茅苍术生根。此外,1/2MS添加0.15 mg/L NAA的生根效果与添加活性炭类似,但两者均添加的培养基中并没有表现出明显增加、乃至倍增的生根效果,原因有待进一步深入研究。我们认为,与在生根培养基中添加生长素相比,添加活性炭取材容易、操作简便、无激素积累,更适合在工厂化生产中推广使用。

本研究以茅苍术无菌苗为材料,分别从16种增殖培养基和8种生根培养基中筛选出适合工厂化大规模生产用培养基。丛生芽增殖培养基为:MS+1.0 mg/L 6-BA+0.15 mg/L NAA,可进行多次继代增殖。生根培养基为:1/2MS+0.5%活性炭。采用泥炭土:蛭石:珍珠岩=2:1:1的基质移栽成活率达95%。利

用该体系可进行茅苍术组培苗高效扩繁,为规模化生产提供技术支持。

参考文献:

- [1] 贺善安, 贺慧生, 吕晔, 等. 茅苍术资源的保护和利用[J]. 植物资源与环境学报, 1993(1): 1-6.
- [2] 徐晓兰, 王鸣, 夏冰, 等. 不同产地茅苍术的质量比较[C]. 南京: 全国药用植物学与植物学学术研讨会, 2004: 148-151.
- [3] 张惠芝. 茅苍术种子育苗关键技术研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2010.
- [4] 戴红君, 程金花, 虞德容, 等. 中药茅苍术研究进展[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(11): 26-28.
- [5] Kato T, Horie N, Matsuta T, et al. Anti-UV/HIV activity of Kampo medicines and constituent plant extracts [J]. *Vivo*, 2012, 26(6): 1007.
- [6] 巢建国, 谈献和, 张瑜, 等. 茅苍术快速繁殖[J]. 中药材, 2001, 24(7): 473-474.
- [7] 李西腾, 吴沿友. 茅苍术的组织培养和快速繁殖[J]. 农业研究与应用, 2006(2): 33-34.
- [8] 刘海萍, 巢建国. 药用植物茅苍术的组织培养[J]. 现代中药研究与实践, 2005, 19(5): 11-13.
- [9] 李文, 谢焯明, 罗翠平, 等. 正交设计优化南苍术快速繁殖培养基的研究[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(2): 663-666.
- [10] 王红娟, 杨岚, 向增旭. 药用植物茅苍术工厂化育苗关键技术研究[J]. 药物生物技术, 2014, 21(2): 152-155.
- [11] 宋刚, 沈菲, 王庆涛, 等. 茅苍术无菌培养体系的构建[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(11): 46-47.
- [12] 李莺, 王朝. 景天三七的组织培养和植株再生[J]. 西北农业学报, 2010, 19(12): 109-112.
- [13] 张莹, 陶佩琳, 高政平. 三七景天离体快繁技术研究[J]. 北方园艺, 2013(7): 134-136.
- [14] 崔澄. 植物激素与细胞分化及形态发生的关系[J]. 细胞生物学杂志, 1983, 5(2): 1-6.
- [15] 曹孜义, 刘国民. 实用植物组织培养技术教程[M]. 兰州: 甘肃科学技术出版社, 1996: 220-221.
- [16] 师校欣, 杜国强, 王晨, 等. 苹果离体新梢外植体继代培养次数对其再生的影响[J]. 园艺学报, 2007, 34(3): 561-564.
- [17] 张素勤, 邹志荣, 耿广东, 等. 活性炭对非洲菊组培苗的生根诱导和移栽基质的筛选[J]. 北方园艺, 2008(5): 207-208.

(责任编辑: 曾小军)