

灯盏花组织培养研究

杨生超¹ 吕红¹ 杨建文² 杨允辉³

(1. 云南农业大学/云南省中药材规范化种植(GAP)技术指导中心 昆明 650201;

2. 红河千山生物工程有限公司 云南泸西 652400; 3. 云南白药集团大理药业有限公司 大理 671000)

摘要:比较了灯盏花组织培养中不同外植体消毒方法和不同激素及其浓度对愈伤组织诱导与分化、继代增殖、生根的影响,并探索了试管苗假植炼苗方法。结果表明:MS+0.5~1.0 mg/L 2,4-D 培养基的灯盏花幼叶愈伤组织诱导效果最好;在 BA 浓度为 0~2.0 mg/L 范围内,浓度越高继代增殖倍数越大,而单株生长则是在 MS+BA 0.5 mg/L+NAA 1~2 mg/L 培养基上最佳;不同培养基上的组培苗均具有较高的生根率,而生根质量则以 MS+IBA 1.0 mg/L+NAA 2.0 mg/L 最好;对生根试管苗进行漂洗、消毒后假植铺有河沙的苗床上,其上建盖有塑料薄膜和遮荫网的小拱棚,并精心管理,其假植成活率高达 95% 以上。

关键词 灯盏花 组织培养 继代 生根

Studies on Tissue Culture of *Erigeron breviscapus*

Yang Shengchao¹, Lü Hong¹, Yang Jianwen², Yang Yunhui³

(1. Yunnan Agricultural University,

Instructor Center of Chinese Medicinal Materials Good Agriculture Practice, Kunming 650201;

2. Honghe Qianshan Bioengineering co., Ltd,

Honghe Prefecture Erigerontis Research Institute, Luxi 652400;

3. Dali Pharmaceutical Co., Ltd of Yunnan Baiyao Group Dali 671000)

Abstract: Different disinfecting methods of explant, effects of inducing and differentiation of callus, subcultures proliferation, and plantlets rooting under different hormones and their different concentration in *Erigeron breviscapus* tissue culture were compared, and explored temporality planted methods of its tube plantlets. The results showed: the best medium for explant induction is MS+0.5~1.0 mg/L 2,4-D; the higher concentration of BA ranging 0~2.0 mg/L; the better proliferation coefficient, but the best plantlet growth medium is MS+BA 0.5 mg/L+NAA 1~2 mg/L; there are high rooting ratio of the plantlets under different mediums, but the best medium for rooting quality is MS+IBA 1.0 mg/L+NAA 2.0 mg/L. After washed and disinfected, rooting tube plantlets were temporality planted seedbed with spreading sand, and that was covered the arched plastic with shading net, at last there were over 95% surviving ratio.

Key words *Erigeron breviscapus* Tissue culture Subculture Rooting

灯盏花(*Erigeron breviscapus* (Vant.) Hand.-Mazz.) 属菊科飞蓬属野生草本植物^[1],其药性味甘温,主要功能是散寒解表、祛风除湿、舒筋活血、消积止痛,对心脑血管类疾病所致的瘫痪及脑后遗症等有明显的疗效^[2],因其花似灯盏,根似细辛又名灯盏细辛。由于人们对该类药物需求的不断增长,野生资源在不断减少,通过采挖野生资源的方式已经不能满足社会需求的发展。为满足社会对灯盏花类药物的需求,人工种植的方式是解决这一问题的有效途径。有关灯盏花形态特征^[1]、光合特性^[3]、驯化种植^[2,4]、有效成分含量的变化^[5]、液体培养^[6]及病虫害^[7]等方面已有研究报道。在灯盏花组织培养方面,前人^[8]报道了用花序诱导愈伤组织及其继代和生根等方面的初步研究。本文在此基础上以植株幼叶作为外植体,就不同激素及其浓度对灯盏花愈伤组织诱导、继代增殖和生根等过程中的影响进行了进一步研究,以期建立较为系统的灯盏花组织培养体系。

收稿日期:2006-01-27。

基金项目:中药现代化产业(云南)基地建设项目(2002 ZY-3)。

作者简介:杨生超(1972-),男,副教授,硕士;主要从事药用植物资源的研究与利用。

1 材料与方法

1.1 材料

实验材料选用采自云南省泸西县野生生长的灯盏花,经人工播种育苗后种植于云南农业大学甘蔗研究所内。诱导愈伤组织的外植体选取生长旺盛的植株幼叶。继代增殖和生根培养的组培苗是经愈伤组织诱导和分化成苗后,在 MS + BA 0.5 mg/L 培养基上继代增殖二代后个体激素水平相对一致的组培苗。假植实验用的生根试管苗是经过生根苗。

1.2 方法

实验于 2003 年 3 ~ 10 月在云南农业大学甘蔗研究所内进行。

实验用 MS 培养基作为基本培养基。愈伤组织诱导采用暗培养,继代培养和生根培养部分采用培养室内的自然光,温度为 $(28 \pm 2)^\circ\text{C}$ 。

选取生长旺盛的灯盏花的幼嫩叶片,用自来水冲洗干净,投入 75% 酒精溶液中消毒 3 ~ 4 s 或 6 ~ 7 s 后用 0.1% HgCl_2 进行消毒 60 s 或 90 s,再用无菌水漂洗 3 ~ 4 次,最后接种到愈伤组织诱导培养基上诱导愈伤组织。愈伤组织诱导培养基为 MS + 2,4-D 0、0.5、1.0、2.0 mg/L 四个处理。继代和生根培养基均采用 MS 外加不同激素水平各 16 处理,处理设置情况分别见表 1、表 2。外植体接种后 20 ~ 30 d 诱导

出愈伤组织和分化出绿苗。选择苗情相近的组培苗接种,每个处理接种 30 瓶,每瓶接种 1 苗。培养过程中检出污染苗后,两部分实验均培养至 30 d 时随机取样 9 瓶进行观测。增殖倍数系指经继代培养后每瓶 1 cm 以上幼苗株数。株高指茎基部至叶尖的高度。生根时间指从接种到根系生长至 0.5 cm 左右的时所经历的天数。

2 结果与分析

2.1 外植体消毒及愈伤组织诱导与分化

在几种消毒液中,外植体污染率变化在 85% ~ 50% 之间,其中用 75% 的酒精处理 3 ~ 4 s 后,再在 0.1% 的升汞中浸泡 90 s 的效果最佳,污染率为 50%。

在愈伤组织诱导与分化培养中,凡添加有 2,4-D 的培养基均能诱导愈伤组织和分化绿苗,其中 MS + 2,4-D 0.5 mg/L 和 1.0 mg/L 两个处理效果最好。

2.2 继代增殖

由表 3 可知,BA 为 0.5 mg/L 水平时植株生长势最佳,BA 为 0、1.0 mg/L 水平的培养基在 NAA 浓度不超过 2.0 mg/L 时均生长良好,但较高浓度的 NAA 和较高浓度 BA 的培养基灯盏花均生长一般。叶色变化较为复杂,与两种激素及其不同浓度无明显的规律性。在继代培养基中灯盏花月增殖倍数达到极显著水平的差异,在 NAA 浓度低于 2.0 mg/L 时,添加 2.0 mg/L BA 的增殖倍数较不添加 BA 的,NAA 为 0 ~ 2.0 mg/L 的 4 组培养基的增殖倍数的 2 ~ 3 倍,其余条件下的增殖倍数居其间。不同培养基对于灯盏花株高的影响差异显著,其规律与增殖倍数的规律不同。0.5 ~ 1.0 mg/L 的 NAA 和低于 2.0 mg/L 的 BA 有利于植株长高,过高或过低浓度的 NAA 和较高浓度的 BA 则不利于长高。单株鲜重随激素及其浓度的不同,差异达到极显著水平。高浓度的 BA 的培养基和 BA 的浓度与 NAA 浓度差异较大均不利于植株干物质的积累。

表 1 继代培养基处理

处 理	激 素 B	激 素 A	NAA (mg/L)			
			0	0.5	1.0	2.0
BA (mg/L)	0		A ₁ B ₁	A ₁ B ₂	A ₁ B ₃	A ₁ B ₄
	0.5		A ₂ B ₁	A ₂ B ₂	A ₂ B ₃	A ₂ B ₄
	1.0		A ₃ B ₁	A ₃ B ₂	A ₃ B ₃	A ₃ B ₄
	2.0		A ₄ B ₁	A ₄ B ₂	A ₄ B ₃	A ₄ B ₄

表 2 生根培养基处理

处 理	激 素 E	激 素 A	NAA (mg/L)			
			0	0.5	1.0	2.0
IBA (mg/L)	0		C ₁ D ₁	C ₁ D ₂	C ₁ D ₃	C ₁ D ₄
	0.5		C ₂ D ₁	C ₂ D ₂	C ₂ D ₃	C ₂ D ₄
	1.0		C ₃ D ₁	C ₃ D ₂	C ₃ D ₃	C ₃ D ₄
	2.0		C ₄ D ₁	C ₄ D ₂	C ₄ D ₃	C ₄ D ₄

表 3 激素 BA 与 NAA 不同浓度对灯盏花继代增殖的影响

培养基 编号	生长势	叶色	增殖倍数	株高 (cm)	鲜重 (g/株)
A ₁ B ₁	+	绿	5.33 ± 1.22 DEF	9.70 ± 1.02 bcde	0.53 ± 0.20 BCDE
A ₁ B ₂	+	绿	4.11 ± 1.45 F	10.56 ± 1.01 abc	0.58 ± 0.18 ABCD
A ₁ B ₃	+	绿	4.67 ± 1.32 EF	10.02 ± 1.36 abcd	0.58 ± 0.16 ABCD
A ₁ B ₄	+	黄绿	4.67 ± 1.50 EF	9.31 ± 1.28 cdef	0.46 ± 0.10 DE
A ₂ B ₁	+	黄绿	8.11 ± 3.33 BCD	9.33 ± 1.22 cdef	0.49 ± 0.14 DE
A ₂ B ₂	+	黄绿	8.78 ± 3.67 BC	9.68 ± 1.66 bcde	0.59 ± 0.17 ABCD
A ₂ B ₃	+	绿	7.27 ± 1.64 CDE	11.28 ± 1.19 a	0.70 ± 0.11 AB
A ₂ B ₄	+	绿	7.11 ± 1.83 CDE	10.96 ± 10.96 ab	0.72 ± 0.20 A
A ₃ B ₁	+	绿	9.11 ± 2.80 BC	8.96 ± 1.27 def	0.60 ± 0.12 ABCD
A ₃ B ₂	+	绿	7.56 ± 1.81 BCD	9.84 ± 1.04 bcd	0.67 ± 0.09 ABC
A ₃ B ₃	+	绿	7.33 ± 1.58 BCDE	9.90 ± 1.84 bcd	0.62 ± 0.10 ABCD
A ₃ B ₄	+	黄绿	9.56 ± 2.24 BC	9.67 ± 1.35 bcde	0.53 ± 0.19 BCDE
A ₄ B ₁	+	绿	10.11 ± 1.83 AB	8.03 ± 1.61 f	0.40 ± 0.07 E
A ₄ B ₂	+	绿	9.89 ± 3.06 ABC	8.82 ± 1.87 def	0.46 ± 0.06 DE
A ₄ B ₃	+	绿	12.56 ± 3.28 A	8.43 ± 1.44 ef	0.50 ± 0.14 CDE
A ₄ B ₄	+	黄绿	8.11 ± 1.90 BCD	8.12 ± 1.30 f	0.47 ± 0.05 DE

注:表中大写字母表示 $P < 0.01$,小写字母表示 $P < 0.05$,下同。

2.3 生根

通过表4可知,灯盏花组培苗在添加有不同浓度的IBA和NAA培养基上的生根时间变化在接种后17~21 d。随IBA浓度增加,生根时间缩短,而NAA则差异不大。不同的培养基上灯盏花组培苗均具有很高的生根率,变化在93%~100%之间,在对照中也有较高的生根率。不同培养基的单株根数差异达到极显著水平,IBA对灯盏花生根效果较为明显,高浓度的IBA有利于提高单株根数,而NAA对单株根数的影响不大。根鲜重受激素的影响也较大,但规律不甚明显,

其中IBA为1.0 mg/L, NAA为2.0 mg/L时根重最高,IBA为2.0 mg/L,而NAA为0 mg/L时根重最低。

2.4 假植炼苗

生根试管苗放置于室温下炼苗2 d后,用清水漂洗干净,再用0.3%的多菌灵溶液浸泡5 min消毒。经消毒的组培苗假植到铺有2~3 cm厚的苗床上,在其上建小拱棚覆盖塑料薄膜和遮荫网。在移栽初期要注意保持墒面较高的湿度,10~15 d后可以揭开塑料薄膜和遮荫网,并适当追施肥料。经30 d的苗圃假植后即可成苗,并定植于大田。用这一方法假植炼苗,成活率可达95%以上。

3 讨论

灯盏花繁殖系数高,通过有性繁殖能解决在生产中的种苗需求问题,其组织培养体系的建立和完善可用于优良株系的扩繁等环节并为其其他方面的研究奠定基础。本实验用幼叶作为外植体诱导愈伤组织,建立组培体系,与用花序作为外植体^[6]一样,效果良好。外植体用75%的酒精处理3~4 s后,再在0.1%的升汞中浸泡90 s的效果最佳,污染率为50%。用添加有0.5~1.0 mg/L 2,4-D培养基的诱导愈伤效果最好。在灯盏花继代增殖中,一定浓度的BA是决定繁殖速度高低的关键因素,BA有利于提高繁殖倍数,而一定浓度的NAA则有利于植株生长。灯盏花生根培养较为容易,生根培养后的17~21 d所有的培养基均能正常生根,生根率也较高,变化在93%~100%之间。生根质量以IBA为1.0 mg/L而NAA为2.0 mg/L时单株根数和单株根鲜重最高。继代增殖的组培苗虽经过激素水平的调整,但生根质量的观察值重复性仍然较差,方差较大,其原因可能与组培苗群体特征有关。生根试管苗使用多菌灵消毒后假植在铺有河沙的苗床上,其上盖塑料小拱棚和遮荫网30 d后即可成苗定植到大田栽培。

参考文献

- 1 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴[M]. 北京:科学出版社,1975, IV卷:444.
- 2 李三无,何平,李从越. 四川攀西珍贵野生药用植物—灯盏细辛[J]. 亚热带植物通讯,1999,28(2):52~54.
- 3 苏文华,张光飞,王崇云等. 短葶飞蓬光合生理生态的初步研究[J]. 云南大学学报(自然科学版),2001,23(2):142~145.
- 4 俞宏渊,陈宗莲. 灯盏细辛的家化栽培[J]. 云南植物研究,2002,24(3):115~120.
- 5 苏文华,陆洁,张光飞等. 短葶飞蓬总黄酮含量的生态生物学分析[J]. 中草药,2001,32(12):1119~1121.
- 6 林春,刘鸿高,苏友波等. 灯盏花快速繁殖研究简报[J]. 云南农业大学学报,2003,18(3):323~326.
- 7 胡先奇,鲁菊芬,林丽飞等. 云南发现灯盏花根结线虫病[J]. 云南农业大学学报,2003,18(3):317~319,326.
- 8 杨耀文,钱子刚. 灯盏花组织培养初步研究[J]. 云南中医学院学报,2002,52(2):12~13.