

药用植物灯盏花的组织培养

黄衡宇¹, 李 鹏^{1,2*}, 党承林²

(1. 吉首大学生态研究所, 湖南 吉首 416000; 2. 云南大学生态学及地植物学研究所, 昆明 650091)

摘要: 以灯盏花花萼、花盘及叶柄为外植体, MS为基本培养基, 通过不同的激素种类和浓度配比, 建立灯盏花组培快繁体系。结果如下: 在所有实验方案中, 花萼的出愈率最高, 是理想的快速繁殖材料。较适宜的诱导愈伤组织的培养基为 MS+BA1.0 mg/L+IBA0.05 mg/L+蔗糖 3.0%, 诱导不定芽的培养基为 MS+BA2.0 mg/L+IAA1.0 mg/L+蔗糖 3.0% 或 MS+Kt3.0+IAA0.5 mg/L+蔗糖 3.0%, 而根的诱导则是在 1/2MS+NAA1.0mg/L+蔗糖 3.0% 的培养基上进行。同时对组织培养过程中灯盏花植株再生的方式进行了讨论。

关键词: 灯盏花; 愈伤组织; 不定芽; 生根; 组织培养

中图分类号: Q943.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2008)05-0685-05

Tissue culture of medical plant *Erigeron breviscapus*

HUANG Heng-Yu¹, LI Li^{1,2*}, DANG Cheng-Lin²

(1. Institute of Ecology, Jishou University, Jishou 416000, China; 2. Institute of Ecology and Geobotany, Yunnan University, Kunming 650091, China)

Abstract: The tissue culture and rapid proliferation techniques of *Erigeron breviscapus* were studied by using scape, floral disc and petiole as explants. The explants were cultivated in different MS media with different types and concentrations of plant hormones. The main results can be concluded as follows: the scape is the best material for the propagation among the three explants, scape, floral disc and petiole, as it has the highest inductivity, the best growth and it is easy to produce adventitious buds. The suitable phytohormone compositions to induce callus, adventitious buds and roots are MS+BA 1.0 mg/L+IBA 0.05 mg/L+sugar 3.0%, Ms+BA 2.0 mg/L+IAA 1.0 mg/L+sugar 3.0% or Ms+Kt 3.0 mg/L+IAA 0.5 mg/L+sugar 3.0%, and 1/2Ms+NAA 1.0 mg/L+sugar 3.0%, respectively. The mode of plant regeneration of *E. breviscapus* in tissue culture has also been investigated.

Key words: *Erigeron breviscapus*; callus; adventitious bud; rooting; tissue culture

灯盏花学名短葶飞蓬(*Erigeron breviscapus*), 为菊科飞蓬属(*Erigeron*)植物, 俗名为灯盏花、灯盏细辛、地顶草、地阳草等, 主要产于我国云南、湖南、广东、广西及四川等省区, 主要分布于海拔 1 200~3 500 m 的中山和亚高山的山坡、草地或林缘(林谿等, 1985)。

灯盏花为民间常用的中草药, 全草入药(陈馥馨, 1998)。由于灯盏花的黄酮类提取物(灯盏甲素

和灯盏乙素)对治疗闭塞性脑血管疾病所致瘫痪及脑出血后遗症有特效, 是目前治疗心血管疾病药物中疗效较好的一种(史树贵, 1998; 张凤斋等, 1999)。尽管我国已经对短葶飞蓬进行了大量的研究工作, 但这些工作大多集中在短葶飞蓬的化学成分分析、药理研究(张卫东等, 2000; 林雄等, 2005)和药剂工艺(佐承益等, 1991; 莫静义, 1991), 较少涉及繁殖生物学等基础研究(俞宏渊等, 2002; 苏文华等, 2001;

收稿日期: 2007-02-17 修回日期: 2007-06-29

基金项目: 国家自然科学基金(30360009)[Supported by the National Natural Science Foundation of China(30360009)]

作者简介: 黄衡宇(1970-), 男, 江苏无锡人, 博士, 副教授, 从事植物发育生物学研究。

* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: liliyjsu@126.com)

冯定霞等,2002;周利杰等,2005;李鹞,2007a,b)。而由于灯盏花独特的药用价值,工厂化生产至少已有 25 年以上的历史,破坏性采挖和其生境的丧失导致灯盏花野生居群数量锐减。因此,对灯盏花进行人工繁殖及栽培研究是解决保护和利用之间矛盾的一个关键。

1 材料和方法

1.1 材料

来自云南省昆明市禄劝县转龙(102°48' E, 25°54' N, 海拔 2 000 m),采集的野生植株(凭证标本:李鹞 179,存于吉首大学资源与环境科学学院生物系标本室;标本鉴定人:云南大学生命科学学院马绍宾教授),带土移栽于吉首大学生态研究所试验地,在其花期内(2005 年 6 月)选取生长健壮、无病虫害个体,剪取花萼、花盘及叶柄作为外植体。

1.2 方法

晴天取 3 种不同的外植体,按下列程序进行消毒:取材→自来水粗洗→5%洗衣粉水溶液漂洗 5 min→自来水冲洗 30 min→75%乙醇擦洗表面→0.1%升汞溶液中消毒 2 min→2%次氯酸钠中消毒 15 min→无菌水冲洗 4~6 次,然后在无菌工作台将外植体切成 0.5 至 1.0 cm 长的小段接种于诱导培养基上,将培养出来的愈伤组织切成小块,接种于增殖培养基上;最后将形成不定芽的块段移至生根培养基上,以培养出完整的小植株。以 7 d 为 1 周期。记录不同处理的生长状况。

1.3 培养基

基本培养基为 MS,附加不同浓度的 2,4-D(2,4-二氯苯氧乙酸)、BA(6-苄基腺嘌呤)、IBA(吲哚丁酸)、IAA(吲哚乙酸)、NAA(萘乙酸)、KT(激动素)和 Zt(玉米素),其浓度组合见下文。蔗糖 3%,卡拉胶 0.6%,用 0.1 mol/L NaOH 和 0.1 mol/L HCl 调节 pH 值为 5.8~6.0,在高压灭菌锅中(121 °C)灭菌 20 min。

2 观察结果

2.1 外植体的选择和愈伤组织的诱导

灯盏花的花萼、花盘和叶柄形成愈伤组织的能力不一样。多种植物激素组合的实验结果表明:诱导愈伤组织的外植体以花萼为最好,花盘次之,而叶

柄形成愈伤组织的能力最差,虽经改变多种激素组合来调节叶柄愈伤组织的出愈率,仍只有少数激素组合诱导出愈伤组织。

将灯盏花的花萼外植体接种在含有不同分裂素及其浓度的培养基上,45 d 后均能诱导出愈伤组织(图版 I:1),但愈伤组织的诱导率和生长量却有较大差异(表 1)。从表 1 中可以看出,适中浓度的 BA 对愈伤组织的诱导较为适宜。

研究中发现,仅用细胞分裂素诱导出来的愈伤组织,细胞团比较松散,较容易出现水浸状,几乎不会分化出芽。而在有分裂素(BA1.0 mg/L)存在的诱导培养基中加入适量的生长素 IBA(0.05 mg/L),外植体生长 45 d 后产生的愈伤组织不仅密度大而致密,且有绿色芽点产生(图版 I:2);培养 50 d 后已有明显的幼芽产生(图版 I:3),这十分有利于下一步的增殖培养。

不同培养基上的死亡数相差不大,说明培养基中激素浓度的差异对外植体死亡率的影响不大,死亡的材料可能是由于消毒过度或取材时操作不当造成的。

2.2 诱导不定芽

将诱导出来的愈伤组织及芽丛转到含有不同分裂素种类及浓度的培养基上培养,接种后置于 25 ± 1 °C 散射光下培养,30 d 后统计不定芽的诱导率(表 2)。从表 2 可以看出,不同种类及浓度的分裂素对灯盏花芽丛诱导情况影响较大。从分裂素(单因素)影响来看,BA2.0 mg/L 及 Kt3.0 mg/L 较为适宜(图版 I:4,5)。但仅加入分裂素芽丛的生长量并不十分理想,在分裂素种类及浓度选定的情况下,加入不同浓度的生长素(IAA),30 d 后再统计不定芽及不定根的诱导率。在 BA 浓度不变(2.0 mg/L)的情况下,随着 IAA 浓度的升高不定芽增殖分化较明显,但当 IAA 浓度高于 1.0 mg/L,不定芽诱导率下降,不定根分化率增大;同样,在用 Kt 代替 BA 的实验中发现,当 IAA 浓度高于 0.5 mg/L 时,不定芽诱导率下降,不定根分化率增大(表 3)。从表 3 可看出,对于灯盏花芽丛诱导的最佳激素组合为 BA2.0 mg/L, IAA1.0 mg/L 或 Kt3.0 mg/L, IAA0.5 mg/L,在这 2 种组合的培养基中,生长量和增殖率均大,而几乎不产生不定根,这十分有利于继代培养。此外,上述 2 种激素组合在继代培养中交替使用,对丛苗的增殖效果更好。

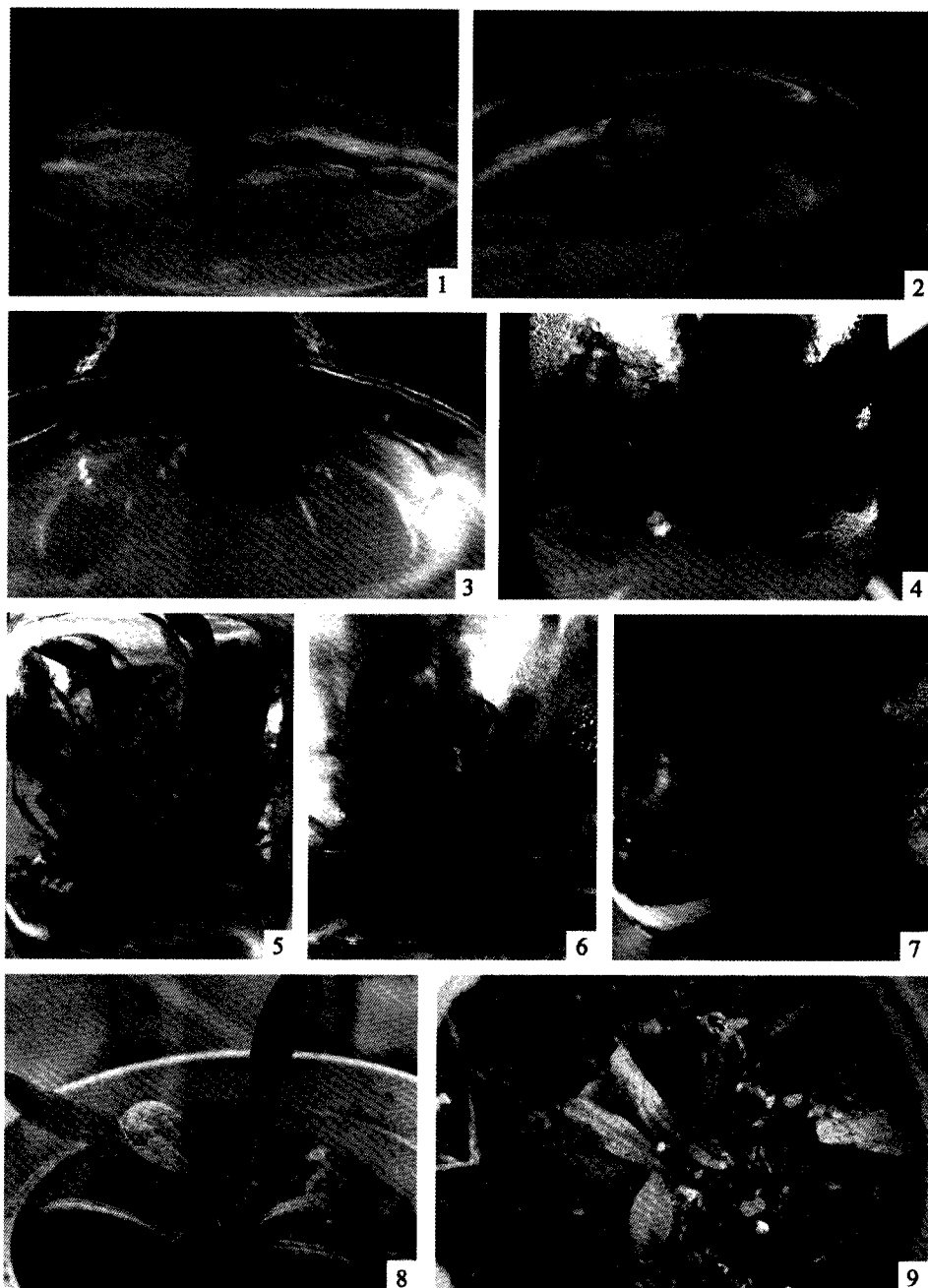
2.3 生根

将诱导发生的不定芽接种于不同 NAA 浓度的 1/2MS 培养基上,得到了较适宜的生根培养基配方:1/2MS+NAA1.0 mg/L(表 4)。生根苗生长情

况见图版 I :6,7。

2.4 试管苗移栽

当不定芽长够一定量时,将长至 3~4 cm 的丛芽切成单芽转至生根培养基中。25~30 d 后,苗壮



图版 I 1. 外植体诱导 30 d 后的生长情况; 2. 出现绿色芽点的愈伤组织; 3. 愈伤组织转入增殖培养基 10 d 后的情况; 4. 愈伤组织转入增殖培养基 25 d 后的情况; 5. 增殖苗的生长情况; 6,7. 生根苗的生长情况; 8,9. 过渡苗。

Plate I 1. The growth of induction after 30 days; 2. The callus showing green bud point; 3. The growth of callus transferred to proliferous culture medium for 10 days; 4. The growth of callus transferred to proliferous culture medium for 25 days; 5. The growth of proliferous sprouts; 6,7. The growth of rooting sprouts; 8,9. The transition sprouts.

根粗时,将瓶盖打开,置于自然光下 24 h,然后取出生根苗,小心洗净残余培养基后移栽到经 0.1% 甲醛消

毒的细河沙中,保温保湿培养 25 d(温度 20~25 °C,湿度 70%左右),再移入沙土中培养(图版I:8,9),待

小苗长出4~5片新叶便可移栽至大田。

3 讨论

诱导愈伤组织是植物组织培养中的一个关键。对于灯盏花来说,愈伤组织的诱导是其组培快繁的必

表1 不同细胞分裂素及浓度对灯盏花愈伤组织诱导的影响¹⁾

Table 1 Effect of different cytomins and their concentrations on the callus induction

细胞分裂素 Cytomin	浓度(mg/L) Concentration	培养数 Number	愈伤组织形数 Callus	出愈率(%) Inductivity	生长量 ²⁾ Growth amount
Zt	0.5	15	3	20.00	++
	1.0	20	7	35.00	++
	1.5	17	9	52.94	+++
	2.0	20	11	55.00	+
	3.0	15	4	26.67	+
BA	0.5	22	3	13.64	++
	1.0	19	15	78.95	+++
	1.5	14	9	64.29	+++
	2.0	16	10	62.50	++
	3.0	13	6	46.15	+
Kt	0.1	19	4	21.05	+
	0.5	15	2	13.33	+
	1.0	21	3	14.28	+
	1.5	12	2	16.67	+

¹⁾ 污染数除外,下表同;²⁾ +少量; ++ 绿色,质地紧密; +++ 大量,表面有白色霜状组织层。

¹⁾ Excluding the number of pollution, the same below; ²⁾ + A few; ++ Grassy and compact; +++ Mass, having white frosted layer.

表2 不同细胞分裂素及浓度对灯盏花芽丛诱导的影响
Table 2 Effect of different cytomins and their concentrations on the adventitious buds induction

细胞分裂素 Cytomin	浓度(mg/L) Concentration	培养数 Number	芽丛诱导率(%) Frequency of bud clump induction	生长量 ¹⁾ Growth amount
Zt	1.5	15	20.00	+
	2.0	15	40.00	+
	3.0	15	26.67	+
BA	1.5	15	60.00	+
	2.0	14	71.43	+
	3.0	13	46.15	+
Kt	1.5	15	26.67	+
	2.0	12	41.67	+
	3.0	10	60.00	+

¹⁾ +少量 A few.

要阶段。多数植物在通常的外植体培养中,使用较高浓度的生长素以诱导脱分化和促进愈伤组织生长(谭文澄等,1991)。本研究结果表明生长素的添加与否,并不影响灯盏花愈伤组织的形成,单独使用生

长素,对于诱导愈伤组织是有利的,但不利于下一步芽的分化;而仅用细胞分裂素诱导出来的愈伤组织,细胞团比较松散,较容易出现水浸状,几乎不会分化出芽。而在有适量细胞分裂素(BA1.0 mg/L)存在的诱导培养基中加入少量的生长素 IBA(0.05 mg/L),外植体生长45d后产生的愈伤组织不仅密度大而致密,且有绿色芽点产生;培养50d后已有明显的幼芽产生,这有利于下一步的增殖培养,这与其他一些草本植物的组培快繁极为相似(陈芳清等,1997)。研究表明,对于灯盏花的花萼外植体来说,适宜诱导愈伤组织的激素组合是 BA 1.0 mg/L + IBA 0.05 mg/L。

表3 不同细胞生长素浓度对灯盏花芽丛诱导的影响
Table 3 Effect of different concentrations of auxin on the adventitious buds induction

激素组合(mg/L) Phytohormone composition		培养数 Number	芽丛诱导率(%) Frequency of bud clump induction	不定根诱导率(%) Frequency of root induction
BA2.0	IAA 0.1	23	69.57	0.00
	IAA 0.5	22	81.82	9.09
	IAA 1.0	25	96.00	12.00
	IAA 1.5	19	78.95	31.58
Kt3.0	IAA 0.1	24	62.50	0.00
	IAA 0.5	23	95.65	8.70
	IAA 1.0	22	81.82	13.63
	IAA 1.5	23	78.26	21.74

表4 不同NAA浓度对根系分化的影响

Table 4 Effect of different phytohormone compositions on the differentiation of rooting

NAA浓度(mg/L) The concentration of NAA	培养数 Number	根系分化 Differentiation of rooting	出愈率(%) Inductivity	生长量 ¹⁾ Growth amount
0.1	20	9	45.00	+
0.5	19	12	63.16	++
1.0	19	18	94.74	+++
1.5	20	14	70.00	++
2.0	18	8	44.44	+

¹⁾ +少量,生长缓慢; ++较多,生长迅速; +++大量,生长旺盛。

¹⁾ + a few, growth slow; ++ many, growth rapid; +++ most, growth vigorous.

灯盏花的增殖主要依靠较高浓度的细胞分裂素,其中最有效的是 BA 和 Kt。但两种分裂素混合起来用,效果并不十分理想。通过实验,得到了 BA2.0 mg/L+IAA1.0 mg/L 和 Kt3.0 mg/L+IAA0.5 mg/L 两种较适宜的激素组合。但单用1种激素组合的培养基进行增殖继代培养,在3代后就会出现较严

重的“玻璃化”现象,而采用上述 2 种激素组合的培养基交替使用就会降低这种现象的出现率,这与其同科植物非洲菊极为相似(黄衡宇等,2001)。

根据根芽形成的激素控制理论,细胞分裂素与生长素的比例与绝对含量控制着植物组织的形态发生及细胞分化,当比值高时产生芽,低时产生根,比值适中时可能维持原组织生长而不分化(罗士伟,1979)。本实验对灯盏花瓶苗的生长状况观察表明,其组培苗的生长不仅与分裂素/生长素的浓度比值有关,且受生长素绝对含量的影响较大。实验中灯盏花诱导成苗的最佳分裂素/生长素浓度比值的细化范围有待于进一步研究,但通过本研究笔者初步推测其比值应保持在一个较高的水平上。

大量的研究表明,NAA、BA 对植物组织培养瓶苗生根均有一定的促进作用(李浚明,1986)。但在本实验中 BA 及较高水平的 NAA 对生根均有一定的抑制作用,幼苗生根培养基以 1/2MS 添加 NAA 1.0 mg/L 较好,其原因一方面可能是材料品种不同,另一方面可能是前期培养阶段所用培养基的激素种类及水平不同,导致培养产物的内源激素在质和量上有差异,从而表现出对生根的影响。

由于瓶苗在瓶中生长时,长期处于高营养、高湿度的环境下,其各个器官机能钝化,移栽后不能马上适应瓶外相对恶劣的环境,成活率很低。在实验中发现,如果在炼苗前打开瓶盖并加入一薄层蒸馏水,1 d 后再移栽,成活率明显提高,放置 5 d 后,成活率能达 95% 以上。

本研究中,因其他因素的影响,导致培养基出现部分不凝现象。综合诸多因素,可能是凝固剂(卡拉胶)的质量问题,因此笔者在配制培养基时,适当加入少量的 KCl,以起到助凝作用。通过观察,并未发现添加 KCl 会对培养物的培养产生不良影响。

本研究为灯盏花的无性繁殖提供了一种方法,有助于短期内提供大量的试管苗,通过人工栽培扩大资源,确保灯盏花资源的保持和可持续利用。

参考文献:

- 李浚明. 1986. 植物组织培养教程[M]. 北京:中国农业大学出版社:26
- 佐承益,杨生元,张桌中. 1991. 灯盏花素片剂原药的提取工艺[N]. 发明专利公报,7(32):31
- 陈馥馨. 1998. 新编中成药手册(第 2 版)[M]. 北京:中国医药科技出版社:475—476
- 张凤斋,李朝印,崔继福,等. 1999. 灯盏花素治疗脑梗塞 180 例临床疗效观察[J]. 药学实践杂志,17(1):21—22
- 林榕,陈艺林. 1985. 中国植物志 74 卷[M]. 北京:科学出版社:308—309
- 谭文澄,戴策刚. 1991. 观赏植物组织培养技术[M]. 北京:中国林业出版社:114—138
- Chen FQ(陈芳清),Qiu AJ(丘安机),Xu XH(徐祥浩). 1997. Tissue culture of medical plant *Knoxia valerianoides* (药用植物红芽大戟的组织培养)[J]. *Guihaia*(广西植物),17(2):149—151
- Feng DX(冯定霞),Chen B(陈勃),Dang CL(党承林),et al. 2002. Karyotype and allozyme analyses of three populations of *Erigeron breviscapus* from Yunnan(短葶飞蓬云南三个种群的核型与等位酶分析). [J] *Acta Bot Yunnan*(云南植物研究),24(6):754—758
- Huang HY(黄衡宇),Li L(李鹏),Yang SH(杨胜辉). 2001. Tissue culture of *Gerbera jamesonii* Bolus(非洲菊的组织培养)[J]. *J Jishou Univ (Nat Sci)*(吉首大学学报,自然科学版),22(1):4—6
- Li L(李鹏),Dang CL(党承林),Huang RF(黄瑞复). 2007a. Discovery of triploid *Erigeron breviscapus* (Compositae) and its potential for breeding(三倍体短葶飞蓬的发现及其在育种上的意义)[J]. *Acta Bot Yunnan*(云南植物研究),29(1):38—42
- Li L(李鹏),Dang CL(党承林). 2007b. Floral syndrome and breeding system of *Erigeron breviscapus* (短葶飞蓬的花部综合特征与繁育系统)[J]. *Acta Ecol Sin*(生态学报),27(2):571—578
- Lin X(林雄),Chu KD(褚克丹). 2005. Progress of pharmacological study on Breviscapine(灯盏花素的药理学研究进展)[J]. *Strait Pharm J*(海峡药学),17(6):5—8
- Luo SW(罗士伟). 1979. The survey of plant tissue and cell culture(植物组织与细胞培养概况)[J]. *Plant Physiol Commun*(植物生理学通讯),15(3):47—49
- Mo JY(莫静义),Xu Z(许政),Li H(李红),et al. 1991. Study on technology of Dengzhanxin capsules(*Herba Erigerontis*)(灯盏细辛胶囊工艺研究)[J]. *Chin Trad Patent Med*(中成药),13(12):5—6
- Shi SG(史树贵). 1998. Study of therapeutic effects of *Erigeron breviscapus* (Vant.) Hand.-Mazz preparation on cerebral ischemia-reperfusion damages in rats(灯盏花制剂减轻大鼠脑缺血再灌注损害的作用)[J]. *Acta Academiae Med Militaris Terrae* (第三军医大学学报),20(4):320—322
- Su WH(苏文华),Zhang GH(张光辉),Wang CY(王崇云),et al. 2001. Preliminary studies on the physiological ecology of photosynthesis of *Erigeron breviscapus* (短葶飞蓬光合生理生态的初步研究)[J]. *J Yunnan Univ(Nat Sci)*(云南大学学报·自然科学版),23(2):142—145
- Yu HY(俞宏渊),Chen ZL(陈宗莲). 2002. Study on artificial culture of *Erigeron breviscapus* (灯盏细辛的家化栽培)[J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究),24(3):115—120
- Zhou LJ(周利杰),Li NG(李南高),Yu H(虞泓),et al. 2005. RAPD analysis on the genetic variation of *Erigeron breviscapus* from Yunnan(云南灯盏花遗传变异的 RAPD 分析)[J]. *Acta Bot Yunnan*(云南植物研究),27(1):59—65
- Zhang WD(张卫东),Kong DY(孔德云),Li HT(李惠庭),et al. 2000. Study on chemical constituents of *Erigeron breviscapus*. III(灯盏花的化学成分研究 III)[J]. *Chin J Pharm*(中国医药工业杂志),31(8):347—348