

药用植物田基黄的组织培养与快速繁殖

黎明², 苏墩豪³, 王祝年², 莫廷辉¹

(¹海南大学儋州校区农学院, 生物技术系, 海南 儋州 571737; ²中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所, 海南 儋州 571737; ³海南中和药业股份有限公司, 海口 570216.)

摘要:以田基黄为材料, 应用组织培养和快速繁殖技术, 对适于活血丹增殖分化的培养基、培养方式进行了系统的研究。试验是以田基黄的茎尖为外植体, 采用 MS 为基本培养基, 附加不同植物生长调节剂进行试验; 结果表明采用 MS+6-BA3.0mg/L 的培养基能成功地诱导愈伤组织的分化; MS+6-BA 2mg/L+NAA0.5mg/L 能成功地诱导芽的分化, 对于芽增殖, 以此培养基也比较好; 诱导生根以 1/2MS+NAA0.2mg/L 培养基较好, 培养 20d 后生根率可达 90% 以上。

关键词:田基黄; 组织培养; 快速繁殖; 植物生长调节物质

中图分类号: S566.9 文献标识码: A

Tissue Culture and Rapid Propagation of Medicinal Plants *Hypericum japonicum* Thunb

Li Ming², Su Dunhao³, Wang Zhunian², Mu Tinghui¹

(¹Biotechnology of Agricultural College of Hainan University Danzhou Campus, Danzhou Hainan 571737;

²Tropical Crops Genetic Resources Institute of CATAS, Danzhou Hainan 571737;

³Hainan Zhonghe Pharmaceutical Co., LTD., Haikou 570216;)

Abstract: Tissue culture and rapid propagation of *Hypericum japonicum* Thunb. were systematically studied in order to explore suitable medium and culture conditions. The leaf as explants could induce the callus on the MS with different plant growth regulator. The results showed that: The best medium for the induction of tissue culture was MS+6-BA3.0mg/L; and the optimum medium for cluster bud was MS+6-BA2mg/L+NAA0.5mg/L; and the optimum medium for the induction of roots was 1/2MS+NAA0.2mg/L, the rooting rate could be up to 90% after 20d culture.

Key words: *Hypericum japonicum* Thunb., tissue culture, rapid propagation, plant growth regulator

田基黄, 民间别名有小元宝草、雀舌草、七层塔、地耳草、黄花草等, 为藤黄科植物田基黄 (*Hypericum japonicum* Thunb) 的全草, 广泛分布于中国南方, 华北地区也有产出。民间用其全草治疗肝炎, 疗效确切。其性味苦、甘、平, 能清热解暑、渗湿利水、消肿止痛。现已有制剂生产, 《中华本草》就记载有田基黄注射液制剂^[1]。田基黄的化学成分、药理作用及临床应用注射液等都有较深入的研究^[1-5], 其组织培养与快速繁殖则尚未见报道。田基黄主要用种子来繁殖, 但因其种子较小且

轻, 易被风吹落, 种子成熟也没有固定的季节, 难以收集。因此本研究进行了田基黄组织培养快速繁殖技术的研究, 为生产出高产、优质的田基黄种苗提供科学依据。初步建立了田基黄的组培快繁体系, 为中草药田基黄的快速繁殖奠定基础, 使工厂化生产田基黄种苗成为可能。

1 材料与方法

1.1 试验时间、地点

本试验于 2006 年 2 月~11 月, 在中国热带农业

基金项目:农业部科技教育司“农业生物资源保护与利用项目”。

第一作者简介:黎明, 男, 1982 年出生, 湖南省张家界人, 硕士, 研究方向为植物分类与植物资源开发利用。通信地址: 571737 海南省儋州市中国热带农业科学院 热带作物品种资源研究所 南药研究中心。E-mail: liming0898@163.com。

通讯作者:莫廷辉, 男, 1964 年出生, 广西贺州市, 副教授, 研究方向为作物遗传育种。通信地址: 571737 海南大学儋州校区农学院生物技术, Tel: 089823300162, E-mail: 31112409mth@163.com。

收稿日期:2008-03-17, 修回日期: 2008-03-27。

科学院热带作物品种资源研究所组织培养中心完成。

1.2 试验材料

供试材料采自海南东方。以种子、茎尖、叶片为外植体。

1.3 试验方法

1.3.1 外植体的处理 植体先用洗衣粉溶液浸泡约5min,然后用自来水冲洗干净,再在超净工作台内进行无菌操作。先用75%的酒精泡约6s,再用0.1%升汞泡10min,3瓶无菌水依次冲洗3次^[6],最后将此3种外植体分别接种于人工培养基中。

1.3.2 基本培养基的选择 本试验是以MS为基本培养

基,因为MS培养基适合固体培养,无机盐的数量和比例适中,能满足大多数植物的生长^[6]。

1.3.3 培养条件 以MS为基本培养基,附加不同浓度6-BA及NAA^[7]。蔗糖用量为30g/L,琼脂7g/L,pH值为5.3-5.8。培养基分装后在121℃下灭菌30min,培养温度20~29℃之间,光照强度1200lx,光照时间为10~12h/d。

2 结果与分析

2.1 外植体的消毒

对外植体的消毒主要采用75%的酒精和1‰的升汞来消毒^[6],酒精消毒时间为5~7s,种子可加长时间,升汞消毒时间约为10min最适合,结果见(表1)。

表1 不同酒精和升汞梯度消毒对外植体的影响

酒精消毒时间/(s)	升汞消毒时间/(min)	接种瓶数	种子	茎尖	叶片
5~7	8	5	一瓶污染	一瓶污染,无褐化	无污染,无褐化
5~7	10	5	无污染	无污染,无褐化	无污染,无褐化
5~7	12	5	无污染	无污染,一瓶褐化	无污染,两瓶褐化

2.2 诱导愈伤组织的分化

试验主要通过选用种子、茎尖和叶片来进行,结果表明采用茎尖作为外植体来诱导愈伤组织比较适合,结果见(表2)。因为种子在培养2个月后虽然也能长成愈伤组织,但时间比较长,而叶片最后都褐化。采用MS+6-BA3.0mg/L的培养基进行田基黄的茎尖培养^[8],接种1个星期后,茎尖整体膨大,且有愈伤组织形成,并逐渐伸长。培养2个星期后愈伤组织直径已有1cm大,颜色为鲜绿色。3个星期后组织表面全为小块状突起的胚状体,有的突起分化为小芽,但经以后观察,这

些小芽不能长高。在诱导愈伤组织的分化的试验中,有使用过MS+6-BA+IBA的不同浓度的培养基^[9],但诱导的愈伤组织几乎都是红褐色而不是绿色的,此愈伤组织也不好诱导使它分化成芽。

2.3 诱导芽的分化

6-BA和NAA不同梯度对田基黄愈伤组织分化出芽的影响,结果见(表3)。从表中可以看出,MS+6-BA3.0mg/L+NAA0.5mg/L培养基较为适合诱导芽的分化。把接种3个星期后表面全为小块状突起胚状体的组织转接入MS+6-BA3.0mg/L+NAA0.5mg/L

表2 不同外植体在6-BA3mg/L中的生长情况

培养基类型	MS+6-BA3mg/L	MS+6-BA3mg/L	MS+6-BA3mg/L
外植体类型	种子	茎尖	叶片
2周生长情况	无明显变化	茎尖基部或整体膨大,且有愈伤组织生成	无明显变化,有的褐化
4周生长情况	无明显变化	愈伤组织表面呈块状突起的胚状体,颜色为鲜绿色	基本上褐化

表3 6-BA和NAA不同梯度对田基黄愈伤组织分化出芽的影响

编号	6-BA/(mg/L)	NAA/(mg/L)	接种瓶数	2周后分化芽情况
1	1	0.2	5	愈伤组织和胚状体部分死亡
2	2	0.2	5	愈伤组织正常生长,但胚状体退化,无分化芽
3	2	0.3	5	愈伤组织正常生长,但胚状体退化,无分化芽
4	2	0.4	5	分化出芽,少量
5	2	0.5	5	分化出大量的芽,芽长1-2cm
6	2	0.6	5	分化出芽,少量
7	2	0.7	5	个别胚状体分化出芽,但芽不能正常生长
8	2	0.8	5	愈伤组织不生长,无芽分化

(续表 3)

编号	6-BA/(mg/L)	NAA/(mg/L)	接种瓶数	2 周后分化芽情况
9	3	0.2	5	愈伤组织不能正常生长,无芽分化
10	3	0.3	5	愈伤组织不能正常生长,无芽分化
11	3	0.4	5	愈伤组织不能正常生长,无芽分化
12	3	0.5	5	愈伤组织生长缓慢,无芽分化
13	3	0.6	5	愈伤组织颜色比较深,表面胚状体退化,无芽分化
14	3	0.7	5	愈伤组织不能正常生长,个别有褐化现象
15	3	0.8	5	愈伤组织不能正常生长,有褐化现象

培养基中培养^[10],2 个星期后分化出大量的芽,芽生长较快,3 个星期后已都高达 2cm 以上。

2.4 诱导芽的增殖

诱导田基黄芽苗增殖的培养基仍为 MS+6-BA3mg/+NAA0.5mg/L 基本培养基。因其分化的芽数量较多,可把其芽块分成小块后转接到新的 MS+6-BA3mg/L+NAA0.5mg/L 培养基中,其基部外围可产生大量的不定芽,随后不断有新的不定芽产生。此培养基也可以做为继代培养基。

2.5 壮芽

因芽增殖是数量较多,芽长的较细长,因此在让芽生根之前比须壮芽。壮芽和增殖一样,也须把芽块分成小块,一瓶约 10 棵芽较好。培养基采用 MS 培养基,不

加任何生长调节剂,2 个星期后即可让芽生根。

2.6 诱导芽生根

以 1/2MS 为基本培养基,附加 0.2mg/L 的 NAA,在室温下,生根效果均不理想。生根的速度也慢,根系较短,有许多网状毛细根生长于培养基表面。在所进行的处理中,1/2MS+IBA2.0mg/L 的培养基对根的诱导效果最好^[11],但 20d 后才可生根,生根率达 90%。但根生长较慢。生根速度慢,可能的原因是激素浓度不适宜或培养温度偏低,低于植物生长所需要的最适温度。在所进行的处理中,1/2MS 培养基加有不同浓度的 NAA 对生根的诱导效果影响很大,浓度越高效果越差,甚至使芽死亡,但根却长的很好,结果见(表 4)。

表 4 NAA 不同梯度对田基黄根分化的影响

编号	NAA (mg/L)	接种瓶数	3 周后记录	3 周后记录
1	0.1	5	无主根,毛细根也较少,芽生长最好	少量有主根,毛细根也较少,芽生长最好
2	0.2	5	有 2-4 条主根不等,较短,毛细根较少,芽生长良好	大多主根都在 5 条以上不等,毛细根也较少,芽生长良好
3	0.3	5	有 2-5 条主根不等,毛细根明显增多,芽生长不太好	主根增加较快,毛细根明显增多,芽生长不好,甚至不生长
4	0.4	5	主根 3-7 条,毛细根多,芽不生长	主根和毛细根生长较快,芽有死亡现象
5	0.6	5	主根 4-9 条,毛细根太多,芽不生长,有枯萎现象	毛细根太多,芽不生长,有枯萎现象

2.7 田基黄的生根苗移栽

把移栽苗用清水洗干净经过根部消毒后,直接移入沙中即可,沙土疏松,透气与保水性能较好,对根系的生长有利。没有经过根部消毒的,根有的会腐烂。组培苗的移栽是一个由无菌的环境转向有菌环境的过程,刚开始植株对环境的适应能力较弱,如果通过消毒处理,可减少细菌对植株的危害、能提高植株对环境的适应能力,从而提高植株的成活率。瓶盖不能一次性地揭开,应该逐渐地揭开,让植株慢慢地适应周围恶劣的环境。因杂菌感染而死亡的植株都是生长较细,叶片数较少的植株。因此,在移栽时选择生长健壮、具有绿叶

片数较多的壮苗进行移栽也是移栽成活的关键。

3 小结

3.1 MS+6-BA3.0mg/L+IBA0.3mg/L 为田基黄愈伤组织分化较佳的培养基;MS+6-BA3.0mg/L+NAA 0.5mg/L 为芽分化较佳的培养基;生根以培养基 1/2MS+NAA0.2mg/L 生根效果较好。

3.2 田基黄移栽基质,以细沙较好;移栽前,如用多菌灵等消毒液消毒有根苗,可能会明显提高移栽的成活率。移栽苗的环境如温度和湿度也决定着苗的成活率,温度以室温较好,更不能日照,环境的相对湿度要达到 85%以上。

参考文献

- [1] 《中华本草》编委会,国家中医药管理局.中华本草.上海:上海科学技术出版社,1999:第三卷 598-601.
- [2] 江苏新医学院.中药大词典.上册.上海:上海科学技术出版社,1986:813-814.
- [3] 黄泰康,等.现代本草纲目.上卷.北京:中国医药科技出版社,2001:948-949.
- [4] 王玉生,等.南方药用植物图鉴.汕头:汕头大学出版社,2005:163.
- [5] 傅芑,等.田基黄的研究进展.药学实践杂志,2004,22(2):98-101.
- [6] 周维燕.植物细胞工程原理与技术.北京:中国农业大学出版社,2001:6-36.
- [7] 田大恩.植物生长调节剂及其在化学调控中的应用.生物学教学,1994,(04):1-4.
- [8] 董诚明,许桂芳,周吉源,等.植物生长调节物质对华黄氏愈伤组织诱导、增殖及芽分化效应.华中师范学报,1994,4:529-532.
- [9] 白银市农科站.植物生长调节剂的作用和应用效果.农业科技与信息,1994,(03):3-4.
- [10] 周续邦.植物生长调节剂在不同作物上的应用及研究.青海农林科技,1994,(03):60-64.
- [11] 王九思,马思基,周菊英.911 植物生长调节剂的合成及应用研究.甘肃农业科技,1994,(08):33-34.

致谢:感谢组织培养中心的徐立,李志英等几位老师的热心帮助。