

文章编号:1674-7054(2011)02-0143-05

广藿香组织培养快繁技术的研究

曹嵩晓¹ 李碧英² 李娟玲¹ 刘国民¹ 韦江云¹

(1. 海南大学 苦丁茶研究所 海南 海口 570228; 2. 海南大学 应用科技学院(城西校区) 海南 海口 571101)

摘 要: 以广藿香幼嫩叶片为外植体,通过愈伤组织途径诱导出大量丛生芽,然后将丛生芽分别转接到含有不同质量浓度 6-BA 的增殖培养基和含有不同质量浓度 IBA 的生根培养基上,筛选出最适增殖培养基: MS+6-BA 0.1~0.2 mg·L⁻¹,最适生根培养基: 1/2 MS+IBA 0.25~1.0 mg·L⁻¹。广藿香组培苗株高达 5~6 cm 时进行炼苗移栽,移栽成活率高达 95%。

关键词: 广藿香; 丛生芽; 组织培养; 快繁技术; 移栽

中图分类号: S 567.21

文献标志码: A

广藿香(*Pogostemon cablin*)为唇形科刺蕊草属植物,原产于菲律宾、马来西亚、印度等国家,后传入我国。广藿香全草入药,味辛、性微温,具有芳香化浊、开胃止呕、发表解暑等功效。为《中华人民共和国药典》规定的著名国家中药保护品种“藿香正气丸(胶囊、水)”和“抗病毒口服液”的重要原料,同时,也是其他 30 多种中成药的主要原料^[1]。

广藿香在我国不能正常开花,或偶有开花,但不能结实,故生产上均采用扦插的手段繁育种苗。由于长期的扦插繁殖,导致病原累积并传播到下一代扦插苗,从而造成了种性退化。笔者以广藿香幼嫩叶片作为外植体,通过愈伤组织途径诱导丛生芽,再以丛生芽为实验材料筛选出最适的增殖和生根培养基,经生根壮苗培养形成无菌组培苗完整植株,然后炼苗移栽。广藿香组培苗繁育技术体系不仅可以为种植单位周年提供优质的无菌种苗,而且还能结合化学诱变技术高效地创造遗传突变体,为创造和丰富广藿香突变体基因库提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料 广藿香(*Pogostemon cablin*)嫩叶,取自海南大学苦丁茶种质资源圃。

1.2 主要化学试剂 MS 基本培养基母液(自配)、肌醇、烟酸、盐酸硫胺素、盐酸吡哆素、甘氨酸、蔗糖、卡拉胶、6-BA、NAA、IBA、乙醇,升汞。

1.3 主要仪器设备 CIRRUS 的 CR-3560 自动灭菌锅、超净工作台。

1.4 培养条件 本研究中各个阶段的广藿香组培苗均置于(25±2)℃培养室中进行培养,用日光灯照明,光照时间为 12 h·d(8:00~20:00),光照强度为 2 500 lx。

1.5 培养基配方

1.5.1 愈伤组织诱导培养基 MS 无机盐+肌醇 100 mg·L⁻¹+烟酸 0.5 mg·L⁻¹+盐酸硫胺素 1.0 mg·L⁻¹+盐酸吡哆素 0.5 mg·L⁻¹+甘氨酸 2.0 mg·L⁻¹+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+NAA 0.2 mg·L⁻¹+w(蔗糖)=3.0%+w(卡拉胶)=0.7% pH 5.8。

1.5.2 丛生芽诱导培养基 MS 无机盐+肌醇 100 mg·L⁻¹+烟酸 0.5 mg·L⁻¹+盐酸硫胺素 1.0 mg·

收稿日期: 2011-05-03

作者简介: 曹嵩晓(1985-)男,山东青岛人,海南大学农学院 2008 级种质资源学专业硕士研究生。

通信作者: 刘国民(1955-)男,湖南祁东人,海南大学农学院教授,博士,博士生导师。E-mail: 13005082258@

163.com

L^{-1} + 盐酸吡哆素 $0.5 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ + 甘氨酸 $2.0 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ + 6-BA $0.05 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ + w (蔗糖) = 3.0% + w (卡拉胶) = 0.7% pH 5.8。

1.5.3 丛生芽增殖培养基的基本成分 丛生芽增殖培养基的主要成分为: MS 无机盐 + 肌醇 $100 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ + 烟酸 $0.5 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ + 盐酸硫胺素 $1.0 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ + 盐酸吡哆素 $0.5 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ + 甘氨酸 $2.0 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ + w (蔗糖) = 3.0% + w (卡拉胶) = 0.7% 。

1.5.4 丛生芽生根培养基的基本成分 广藿香无菌苗的生根培养基的主要成分为: $1/2$ MS 无机盐 + 肌醇 $100 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ + 烟酸 $0.5 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ + 盐酸硫胺素 $1.0 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ + 盐酸吡哆素 $0.5 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ + 甘氨酸 $2.0 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ + w (蔗糖) = 2.5% + w (卡拉胶) = 0.75% 。

1.6 方法

1.6.1 无菌材料的建立 将采回的广藿香幼嫩叶片用自来水冲洗干净,再用 $\varphi = 10\%$ 的洗洁精冲洗 3 次(每次 5 min),用自来水洗净洗洁精后,在超净工作台上用 $w = 75\%$ 的乙醇消毒 30 s,倒去乙醇消毒液,再用 $w = 0.15\%$ 的 $HgCl_2$ 溶液浸泡消毒 10 min,倒去 $HgCl_2$ 消毒液,再用无菌水漂洗 5 ~ 8 次,把残留的 $HgCl_2$ 漂洗干净,沥干水备用。在超净工作台上将叶片周围部分切除,然后将剩余部分切成大约 $0.5 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm}$ 的小块,转接到愈伤组织诱导培养基上。诱导愈伤组织后,将其切成 $0.5 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm}$ 的小块转接到丛生芽分化培养基上。

1.6.2 广藿香丛生芽最适增殖培养基的筛选 选取长约 0.5 cm 且生长健壮的广藿香丛生芽,分别转接到质量浓度为 $0.05 \text{ } 0.1 \text{ } 0.2 \text{ } 0.4 \text{ } 0.8 \text{ } 1.6 \text{ } 3.2 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ 的 6-BA 增殖培养基中,以不加任何激素的 MS 培养基作为对照(CK)。每处理 10 瓶,每瓶 5 个单芽,2 个月后观察增殖情况。

1.6.3 广藿香丛生芽最适生根培养基的筛选 选取长约 0.5 cm 且生长健壮的广藿香丛生芽,分别转接到质量浓度为 $0.25 \text{ } 0.5 \text{ } 1.0 \text{ } 1.5 \text{ } 2.0 \text{ } 4.0 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ 的 IBA 的 $1/2$ MS 培养基中,以不加任何激素的 $1/2$ MS 培养基作为对照(CK)。每处理 10 瓶,每瓶 3 个单芽,1 个月后观察生根情况。

1.6.4 广藿香组培苗的移栽 当生根的广藿香组培苗株高达到 5 ~ 6 cm 时,即可进行炼苗移栽。移栽前,先将培养瓶从培养室中搬到无空调设备、无直射阳光的荫棚内放置 2 ~ 3 d,然后打开培养瓶盖再放置 2 d。炼苗结束后,用镊子将组培苗轻轻夹出,用清水洗净根部的培养基,移栽到装有营养土的花盆中。营养土采用锯末、茶园土及椰糠按 $V_{\text{锯末}}:V_{\text{茶园土}}:V_{\text{椰糠}} = 1:1:1$ 的比例混合而成,营养土配制后加入适量的益生菌肥,并经过 3 个月的堆沤发酵后再用。

组培苗移栽后立即浇定根水,然后将花盆搬至塑料大棚内(塑料大棚之上盖有双层 80% 遮阳网),每隔 5 ~ 7 d 喷水 1 次,保持营养土湿润。2 个月后,将盆苗搬至仅有 1 层 80% 遮阳网的荫棚下继续进行苗圃管理。

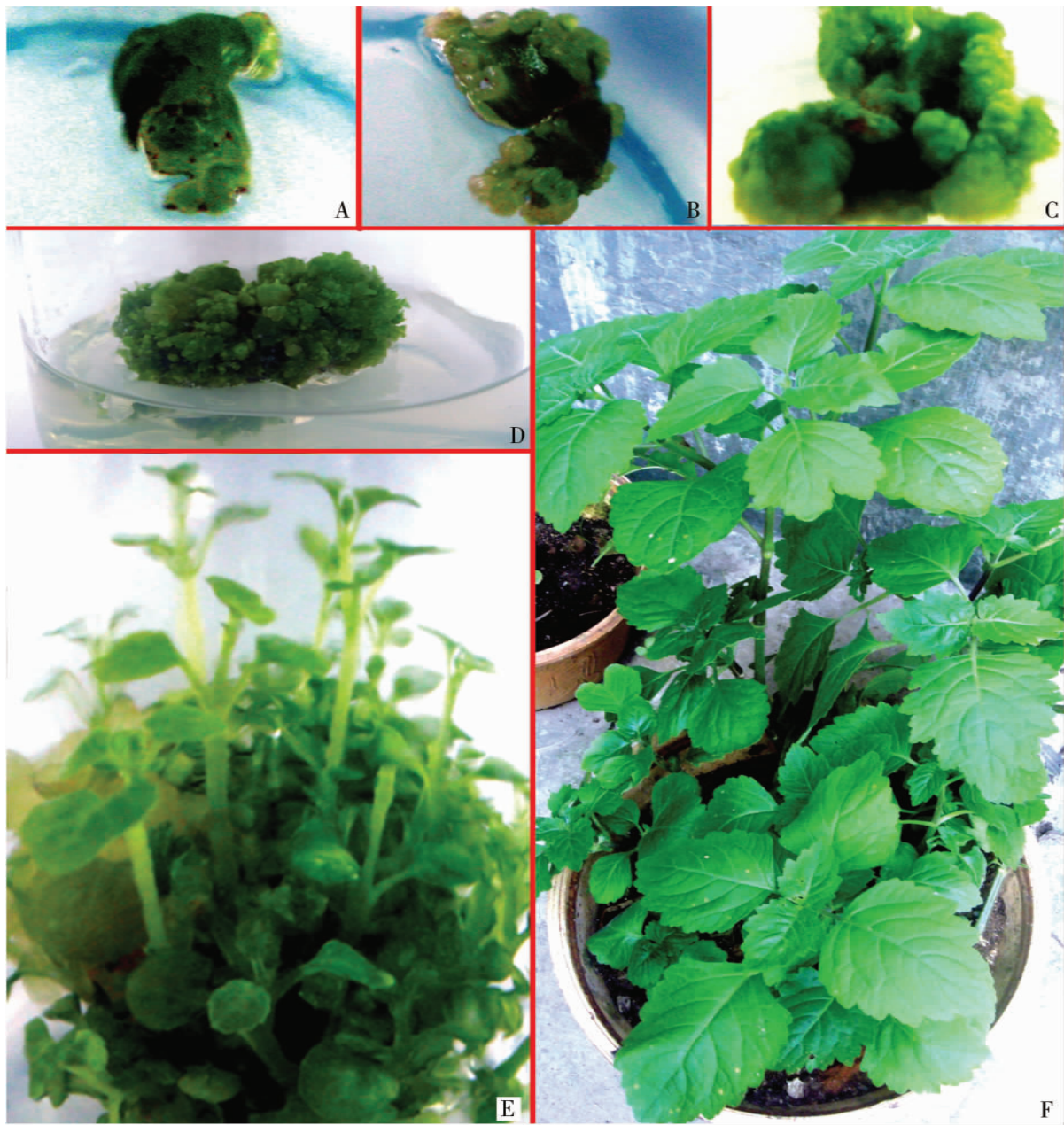
2 结果与分析

2.1 无菌材料的建立与增殖 叶片切块在愈伤组织诱导培养基上经过 7 d 的培养后开始膨大(见图版 A);培养 2 周时,切块的叶片周边开始愈伤化(见图版 B);培养 3 周时,切块的叶片基本全部愈伤化(见图版 C);继续在该诱导培养基上培养,至接种后 2 个月时,愈伤组织块已显著增大,并产生少量丛生芽(见图版 D)。此时,即可将这些愈伤组织切割成约 $0.5 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm}$ 的小块,再转接到丛生芽诱导培养基上。在丛生芽诱导培养基上培养 2 个月后,可形成大量的丛生芽,并布满整个培养基表面(见图版 E)。

2.2 不同质量浓度的 6-BA 对广藿香丛生芽增殖和生长发育的影响 从表 1 中可以看出,当 6-BA 的质量浓度太低($0 \sim 0.05 \text{ mg} \cdot L^{-1}$)时,丛生芽形成的数量较少,但植株高度则相对较高;当 6-BA 的质量浓度为 $0.40 \sim 0.80 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ 时,丛生芽的数量随着 6-BA 质量浓度的增加而增加,但芽体较小,且有少部分丛生芽基部出现愈伤化;当 6-BA 的质量浓度达 $1.60 \sim 3.20 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ 时,广藿香无菌材料会形成比较密实的瘤状愈伤组织;在包括 CK 在内的 8 个处理中,只有当 6-BA 的质量浓度为 $0.10 \sim 0.20 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ (处理 2 ~ 3)时,所形成的丛芽不仅数量较多,而且芽体较粗大,植株较高。根据试验结果,笔者认为广藿香丛生芽增殖的最适 6-BA 的质量浓度范围为 $0.10 \sim 0.20 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ 。

表 1 不同质量浓度的 6-BA 对广藿香丛生芽增殖和生长发育的影响

处理	6-BA/(mg·L ⁻¹)	丛生芽增殖及生长发育情况
1	0.05	芽体少,增殖系数约为 15,平均芽高约为 1.5 cm
2	0.10	芽体多,增殖系数约为 40,平均芽高约为 1.0 cm
3	0.20	芽体多,增殖系数约为 62,平均芽高约为 0.5 cm
4	0.40	芽体细小且密集丛生,高约 0.2 cm,少部分愈伤化
5	0.80	芽体细小且密集丛生,少部分愈伤化
6	1.60	芽体极小,少部分愈伤化,有的形成质地密实的瘤状的愈伤组织,且有褐化现象发生
7	3.20	大部分愈伤化,形成质地密实的瘤状愈伤组织,且有褐化现象发生
CK	0	芽体少,增殖系数约为 8,平均芽高约为 2.5 cm



图版说明

A: 外植体接种后培养 7 d 时,外植体开始膨大;B: 培养 2 周时,叶片周围开始愈伤化;C: 培养 3 周时,叶片基本全部愈伤化;D: 培养 2 个月时,愈伤组织明显增大,并分化出丛生芽;E: 转接到新培养基 2 个月后,长出大量的丛生芽;F: 植株移栽后生长情况

2.3 不同质量浓度的 IBA 对广藿香无菌苗生根和植株生长发育的影响 从表 2 中可以看出,广藿香无菌苗在无外源 IBA 的培养基上(CK)的生长情况,与添加了不同质量浓度的 IBA 的各个处理相比,其株高的差异不显著,而根数和根长则有显著性差异。在添加有不同质量浓度的 IBA 的各个处理中(处理 A~F),株高、根数及根长均无显著性差异。不含 IBA 处理(CK)的广藿香无菌苗与其他添加 IBA 的处理相比,其根数明显减少,虽然根比较长,但根系不够粗壮。由此可见,在 1/2 MS 培养基中添加适量的 IBA,对于广藿香无菌苗形成良好的根系是完全必要的。在本试验的质量浓度范围内(0.25~4.00 mg·L⁻¹),均能获得比较理想的促根效果。但从株高、根数、根长以及降低实验成本等方面综合考虑,以 1/2 MS 作为基本培养基,并添加 0.25~1.00 mg·L⁻¹的 IBA 效果较好。

表 2 不同质量浓度的 IBA 对广藿香无菌苗生根和植株生长发育的影响

处理	IBA/(mg·L ⁻¹)	株高/cm	根数/条	根长/cm
A	0.25	2.933±0.414 1 a	11.83±3.857 a	1.058±0.347 6 a
B	0.50	2.933±0.667 9 a	11.42±2.539 a	0.942±0.162 1 a
C	1.00	2.450±0.574 5 a	11.73±3.927 a	1.042±0.314 7 a
D	1.50	2.733±0.649 9 a	11.25±2.315 a	0.936±0.297 6 a
E	2.00	2.654±0.618 3 a	13.62±3.228 a	0.954±0.475 4 a
F	4.00	2.391±0.585 4 a	13.13±3.720 a	0.936±0.390 6 a
CK	0	2.775±0.606 2 a	7.83±2.125 b	1.564±0.452 3 b

注:表中数据的差异显著性采用 LSD 法进行测验。表中各列数据后不同小写字母表示其差异在 5% 水平上显著,相同字母表示差异不显著。

2.4 广藿香组培苗移栽成活情况 广藿香组培苗移栽后 7 d 恢复正常生长;移栽 15 d 后,植株达到 8 cm 左右;移栽 1 个月后,株高可达 10 cm 左右;移栽 2 个月后,植株已开始分枝,株高达 15 cm 左右。此时,可将盆苗搬到仅有 1 层 80% 遮阳网的荫棚进行日常管理(见图版 F)。广藿香试管苗的移栽成活率较高,为 95%。

3 讨 论

广藿香幼嫩叶片在 MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+NAA 0.2 mg·L⁻¹的培养基上诱导愈伤组织效果较好,2 个月后可以获得大量的愈伤组织。然后将愈伤组织转接到 MS+6-BA 0.05 mg·L⁻¹的培养基中,经培养 2 个月后可以分化出大量的丛生芽。林小桦等人^[2-3]认为 6-BA 有利于广藿香无菌苗的增殖,且增殖效果在各类不同细胞分裂素中最好,其适宜的质量浓度为 0.10~0.50 mg·L⁻¹。笔者在研究过程中也发现,低质量浓度的 6-BA 能促进丛生芽大量增殖,其质量浓度过高反而效果不好,因此 6-BA 的质量浓度以 0.10~0.20 mg·L⁻¹为宜。

把广藿香丛生芽转接到无激素的 1/2 MS 培养基中,虽然能生根且数量也较多,但是根系不够粗壮。当加入一定量的 IBA 后则有利其生根,而且根的数量更多、更加健壮。在一定的浓度范围内,IBA 质量浓度高低对广藿香丛生芽生根率无显著影响,但从降低实验成本等方面综合考虑,IBA 的质量浓度以 0.25~1.00 mg·L⁻¹为宜。

广藿香试管苗的移栽较容易,且生长较快。当广藿香的组培苗株高为 5~6 cm 时,即可进行移栽,其成活率高达 95%。

参考文献:

- [1] 中国医学科学院药用植物资源开发研究所. 中药志. 第 4 册 [M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 128.
- [2] 林小桦, 贺红, 吴立蓉, 等. 广藿香不同外植体离体培养的研究 [J]. 广西植物, 2007, 27(4): 658–661.
- [3] 潘超美, 贺红, 徐鸿华, 等. 广藿香组培苗快繁与工厂化生产程序的研究 [J]. 中药材, 2005, 28(11): 973–974.

Rapid Propagation of *Pogostemon cablin* via Tissue Culture

CAO Song-xiao¹, LI Bi-ying², LI Juan-ling¹, LIU Guo-min¹, WEI Jiang-yun¹

(1. The Kudingcha Research Institute, Hainan University, Haikou 570228, China;

2. College of Application Science and Technology, Hainan University, Haikou 571101, China)

Abstract: The young leaves of *Pogostemon cablin* were used as explants, and a large number of shoots were obtained through inducing callus. The shoots were transferred onto the multiplication media with different concentration of 6-BA, and onto the root-promoting media with different concentration of IBA. The optimum multiplication culture medium was obtained (MS + 0.1 mg · L⁻¹—0.2 mg · L⁻¹ 6-BA), and the optimum root-promoting medium was obtained (1/2 MS + 0.25 mg · L⁻¹—1.0 mg · L⁻¹ IBA). When the height of the plantlets of *Pogostemon cablin* amounted to 5—6 cm, the survival percentage of plantlets *Pogostemon cablin* in the transplantation was 95%.

Key words: *Pogostemon cablin*; clustered shoots; rapid propagation via tissue culture; transplantation