

韦坤华,李旻辉,徐建平,等.蒙药达乌里芯芭组织培养快速繁育技术[J].江苏农业科学,2017,45(24):49-51.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.24.011

蒙药达乌里芯芭组织培养快速繁育技术

韦坤华^{1,2},李旻辉^{2,3},徐建平³,朱虹³,李林轩²,缪剑华²,高文远¹

(1. 天津大学药物科学与技术学院,天津 300072; 2. 广西药用植物园/广西药用资源保护与遗传改良重点实验室,广西南宁 530023;
3. 内蒙古科技大学包头医学院,内蒙古包头 014060)

摘要:以达乌里芯芭种子为外植体建立无菌材料,采用正交试验设计研究不同植物生长调节剂(6-BA、IAA 和 KT)组合对达乌里芯芭增殖培养的影响,以及 NAA、IAA 对组培苗生根诱导的影响。结果表明,达乌里芯芭种子消毒以 0.1% HgCl₂ 溶液浸泡 8 min 后剥除种皮处理效果最佳;适宜增殖培养基为 MS + 1.5 mg/L 6-BA + 0.3 mg/L IAA + 0.2 mg/L KT,30 d 增殖系数为 20.5;最适生根培养基为 1/2MS + 1.0 mg/L IAA,生根率 93.33%;生根苗炼苗后移栽沙床上,成活率为 98%。

关键词:达乌里芯芭;组织培养;增殖;正交设计;丛生芽;生根

中图分类号:S567.904⁺.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)24-0049-03

达乌里芯芭(*Cymbaria dahurica* L.)为玄参科芯芭属植物,别称大黄花、白蒿茶,是蒙医专用药芯芭的基源植物,蒙名为兴安奈一哈吞一额布苏,达乌里芯芭属于轴根型旱生植物,常生长于荒漠草原和山地草原,是草原上的主要植被,主要分布于内蒙古、黑龙江、河北等地。达乌里芯芭全株入药,蒙药名为韩琴色日高^[1],味微苦,性凉,具有祛风除湿、活血调经、散瘀止痛的功效,用于治疗风湿关节炎、吐血、衄血、便血、外伤出血、肾炎水肿、黄水疮等症^[2-3]。

目前,市场上的芯芭药材主要来自野生资源,随着其药用价值的提高,市场对药材的需求增大,导致达乌里芯芭被过渡采挖,野生资源蕴藏量也日趋减少,资源濒临枯竭。虽然近年来国内外对蒙药的关注不断增加,蒙药芯芭也引起了诸多学者的重视,研究报道不断增加,但主要集中在资源分布、定性鉴别、化学成分及药理作用研究上^[4-8]。到目前为止,针对芯芭的人工种植、种苗繁育技术的相关研究未见报道。达乌里芯芭一般通过种子进行繁殖,但在初步的种苗繁育工作中发现,达乌里芯芭的种子繁殖存在发芽率低、发芽不整齐、种苗质量不稳定等问题,严重制约了达乌里芯芭的规范化种植和生产。本研究以蒙药芯芭的基源植物达乌里芯芭的种子为材料进行无菌苗的诱导,再通过正交试验筛选最适合达乌里芯芭丛生芽快速繁殖与生根培养基,为达乌里芯芭种苗的快速繁殖和工厂化生产提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

达乌里芯芭种子采于内蒙古自治区包头市石拐区赵长城遗址附近山地,经内蒙古科技大学包头医学院药学院生药教研室张春红副教授鉴定该品种为达乌里芯芭 *Cymbaria dahurica* L.,经筛选后选用饱满成熟的种子作为试验材料。

1.2 方法

1.2.1 培养基成分及培养条件 本试验以 MS 培养基为基本培养基,附加 0.4% 琼脂,3.0% 蔗糖,pH 值调至 5.8~6.0,在 121℃ 的温度下灭菌 20 min,平均照度 2 000 lx,光照时间 12 h/d,培养温度(25±3)℃。

1.2.2 外植体消毒

取饱满的达乌里芯芭成熟种子,使用洗洁精溶液清洗干净,洗净洗洁精后置于纱布中,珠状流水下冲洗 15 min。在超净工作台上,用滤纸吸干水分后,加入 0.1% HgCl₂ 溶液消毒,设置 6、8、10、12 min 等 4 个时间梯度,消毒完毕后,弃去 HgCl₂ 溶液,用无菌水漂洗种子 3 次,再用无菌滤纸吸干水分,接种到初代诱导培养基上。

1.2.3 初代诱导培养及初步增殖

将消毒好的种子设去种皮和不去种皮 2 种处理,接种到添加了 1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L IAA 的 MS 初代诱导培养基上,培养 25~30 d 诱导种子萌发。每种处理接种 10 瓶,每瓶接种 2 颗种子。

种子萌发后,将无菌萌发小苗顶芽切下继续接种到添加了 1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L IAA 的 MS 培养基上进行初步增殖,30 d 转接 1 次,继代培养 4~5 代后获得充足的试验材料。

1.2.4 丛生芽增殖培养

采用 3 因素 3 水平的正交试验设计 L₉(3⁴)(表 1),将初步增殖材料接种到分别添加了 6-BA、IAA、KT 等 3 种激素的 3 个水平的增殖培养基上进行增殖培养,每个处理 5 瓶,每瓶接种 5 个芽,选取的芽大小长势接近,30 d 后测定试管苗平均

收稿日期:2016-08-18

基金项目:国家科技重大专项(编号:2012ZX09304006);中组部西部之光访问学者项目(2015);广西科学研究与技术开发计划(编号:桂科合 14125008-2-21);广西博士后专项资金(2015 年);广西壮族自治区卫生厅中医药科技专项(编号:GZBZ14-14)。

作者简介:韦坤华(1980—),女,博士,副研究员,从事药用植物组织培养方面的研究。E-mail:divinekh@163.com。

通信作者:缪剑华,博士,研究员,从事药用植物保育研究。E-mail:mjh1962@vip.163.com。

生长率和芽增殖系数,并同时观察记录生长情况。

表 1 正交试验因素水平

水平	因素		
	A:6-BA 浓度 (mg/L)	B:IAA 浓度 (mg/L)	C:KT 浓度 (mg/L)
1	0.5	0.1	0.1
2	1.0	0.2	0.2
3	1.5	0.3	0.3

2.5 生根培养

将增殖的健壮丛生芽接种到分别添加不同浓度的 NAA (0.1、0.5、1.0 mg/L)、IAA (0.1、0.5、1.0 mg/L) 的 1/2MS 生根培养基上进行生根培养,每个处理 5 瓶,每瓶 3 个单芽,30 d 后观察并记录生根情况,计算试管苗生根率。

2.6 数据处理

培养 30 d 后计算平均生长率、芽增殖系数和生根率。平均生长率 = (材料质量 - 接种时材料质量) / 接种时材料质量;平均芽增殖系数 = (增殖后芽数 - 接种时材料数) / 接种时材料数;生根率 = 增殖后生根芽数 / 接种时芽数。将所有生根苗生长状况按大小分成 5 级,分别记为“+++++”

表 2 不同处理对达乌里芯芭外植体灭菌效果的比较

种子处理	消毒时间 (min)	接种数 (粒)	污染数 (粒)	萌发数 (粒)	无菌萌发数 (粒)	污染率 (%)	萌发率 (%)	无菌萌发率 (%)
消毒后不去种皮	6	20	15	12	3	75	60	15
	8	20	12	10	5	60	50	25
	10	20	8	8	5	40	40	25
	12	20	6	6	4	30	30	20
消毒后去种皮	6	20	10	14	6	50	70	30
	8	20	10	12	8	50	60	40
	10	20	6	9	6	30	45	30
	12	20	5	7	4	25	35	20

3.2 不同激素配比对达乌里芯芭丛生芽增殖率的影响

将达乌里芯芭的无菌芽接种到表 1 正交试验培养基中,培养 30 d 后测定平均生长率、芽增殖系数,并观察芽的生长情况,结果见表 3。

平均生长率结果(表 4)表明,试验的 3 种因素的各个浓度均能促进达乌里芯芭无菌苗的生长。无菌苗生长 30 d 后平均生长率在 7.03 ~ 18.14 之间。直观分析结果发现,3 种因素对达乌里芯芭平均生长率的影响顺序为 A(6-BA) > B(IAA) > C(KT),且 3 种因素浓度的升高均有利于促进达乌里芯芭无菌苗的生长。达乌里芯芭的最佳繁殖培养基为 A₃B₃C₃,即 MS + 1.5 mg/L 6-BA + 0.3 mg/L IAA + 0.3 mg/L KT。芽增殖系数结果(表 5)表明,3 种因素的各个浓度均能促进达乌里芯芭芽增殖系数的提高。根据试验结果,接种到繁殖培养基上培养 30 d 后的芽增殖系数在 12.6 ~ 25.8 之间,芽增殖系数最高的是 8 号培养基,为 25.8。3 种因素对达乌里芯芭芽增殖系数的影响顺序为 A(6-BA) > C(KT) > B(IAA),且 6-BA 和 IAA 浓度的升高有利于促进芽增殖系数的提高,但 KT 对芽增殖系数的影响无明显规律。达乌里芯芭最佳繁殖培养基为 A₃B₃C₁,即 MS + 1.5 mg/L 6-BA + 0.3 mg/L IAA + 0.1 mg/L KT。

比较分析发现,平均生长率的提高与芽增殖系数的提高

“++++”“+++”“++”“+”。

3 结果与分析

3.1 不同的处理方法对种子萌发的影响

由表 2 可见,HgCl₂ 消毒时间越长,消毒效果越好,污染率越低,不去皮和去处 2 种处理种子灭菌时间从 6 min 延长到 12 min 时,污染率分别从 75% 和 50% 下降到 30% 和 25%。但 HgCl₂ 消毒时间过长,易导致种子损伤甚至死亡。2 组试验的种子消毒 6 min 时萌发率分别为 60% 和 70%,当消毒时间延长到 12 min 时的萌发率分别为 30% 和 35%。结果也表明很多没有完全消毒的种子也能萌发,消毒时间为 6 min 时,2 种处理种子无菌萌发率分别为 15% 和 30%,分别占本组萌发种子的 25% 与 43%。综合考虑消毒时间对种子的影响以及种子消毒效果,确定达乌里芯芭的消毒时间为 8 min。

比较消毒后采取不同处理的 2 组种子的试验结果,发现去种皮处理组的污染率较不去种皮低,此外去种皮处理可提高种子的萌发率和无菌萌发率。因此,消毒后进行剥去种皮处理可提高达乌里芯芭的种子消毒效果。

并不完全同步,如 9 号培养基的平均生长率最高,达到 18.14 倍,但芽增殖系数为 20.5,低于 6、7、8 号培养基的芽增殖系数。但在试验过程中也发现,平均生长率较低的情况下,如果芽增殖系数过高,容易导致丛生芽细小、纤弱,容易出现玻璃化现象,不利于继代培养,也不利于后续的生根移栽。因此,综合考虑试验结果,认为达乌里芯芭最佳的繁殖培养基以 9 号培养基 A₃B₃C₂ 为宜,即 MS + 1.5 mg/L 6-BA + 0.3 mg/L IAA + 0.2 mg/L KT。

3.3 外源激素对达乌里芯芭生根的影响

生长健壮的丛生芽接种到生根培养基中培养 30 d 各处理生根情况见表 6。达乌里芯芭在添加不同浓度 NAA 和 IAA 的 1/2MS 培养基上均可生根,且随着 NAA 和 IAA 浓度的升高,生根率升高。比较 2 种激素的生根率结果发现,IAA 更有利于达乌里芯芭试管苗的生根,培养基中添加 NAA 的最高生根率为 83.33%,出现在 NAA 浓度为 1.0 mg/L 时;培养基中添加 IAA 的最高生根率为 93.33%,同样在 IAA 浓度为 1.0 mg/L 时。添加 IAA 培养基的试管苗较为健壮,根系较为发达,但添加 NAA 的培养基上培养材料的根系不发达,较为细长,且随着 NAA 浓度升高出现愈伤组织,不利于后续的驯化移栽。因此,确定达乌里芯芭最佳生根培养基为 1/2MS + 1.0 mg/L IAA,在此培养基上获得的试管苗植株健壮、根系发

表 3 达乌里芯芭繁殖培养基筛选正交试验结果

编号	6-BA	IAA	KT	CK	平均 生长率	芽增 殖倍率	生长 状况
1	1	1	1	1	7.03	15.5	++
2	1	2	2	2	9.52	12.6	+++
3	1	3	3	3	13.99	18.5	++++
4	2	1	2	3	12.54	16.3	+++
5	2	2	3	1	16.16	20.8	++++
6	2	3	1	2	15.82	23.7	++++
7	3	1	3	2	14.18	21.3	++++
8	3	2	1	3	16.70	25.8	++++
9	3	3	2	1	18.14	20.5	+++++

平均生长率直观分析

K_1	30.5	33.8	39.6	41.3
K_2	44.5	42.4	40.2	39.5
K_3	49.0	48.0	44.3	43.2
k_1	10.18	11.25	13.18	13.78
k_2	14.84	14.13	13.40	13.17
k_3	16.34	15.98	14.78	14.41
R	6.16	4.73	1.59	1.24

芽增殖倍率直观分析

K_1	46.6	53.1	65.0	56.8
K_2	60.8	59.2	49.4	57.6
K_3	67.6	62.7	60.6	60.6
k_1	15.53	17.70	21.67	18.93
k_2	20.27	19.73	16.47	19.20
k_3	22.53	20.90	20.20	20.20
R	7.00	3.20	5.20	1.27

表 6 不同培养基达乌里芯芭生根的影响

生长素	处理(mg/L)	接种数(棵)	生根数(棵)	生根率(%)	试管苗长势
NAA	0.1	30	13	43.33	苗短粗
	0.5	30	20	66.67	健壮,根较少
	1.0	30	25	83.33	苗细长,根细长,有愈合
IAA	0.1	30	15	50.00	苗健壮,根较少
	0.5	30	22	73.33	苗健壮,根适中、较粗壮
	1.0	30	28	93.33	苗健壮,根系发达,根较粗壮

消毒液的影响下暂时失去活力,剥除种皮时也将大部分暂时失去活力的微生物与种子分离开来,从而提高了消毒效果,这一处理也可作为有类似特性的种子消毒提供参考。

药用植物组织培养是种苗繁育最为快捷有效的途径,目前也有多种药用植物实现了组培苗的工厂化生产,如金线莲、白芨、番红花、铁皮石斛等^[9]。本研究通过组织培养途径繁殖达乌里芯芭丛生芽,芽的增殖系数达到 16.3~25.8。但是在进行培养基筛选的取舍时,不能仅考虑芽增殖系数,还应结合实际的生产需要,综合考虑芽的生长情况以及后续的生根移栽表现,从中筛选表现最佳的培养基才能节省生产成本,提高生产效率。因此,本研究所选出的达乌里芯芭最佳增殖培养基并不是芽增殖系数最高的培养基,而是芽增殖系数较高,丛生芽粗壮、长势良好,适合生产使用的培养基。

参考文献:

[1]王鸿宇. 达乌里芯芭茎部化学成分的研究[D]. 呼和浩特:内蒙古大学,2015.

表 4 达乌里芯芭繁殖培养基筛选平均生长率方差分析

方差来源	离均差平方和	自由度	方差	F 值	P 值
A	61.91	2	30.96	26.98	<0.05
B	34.13	2	17.06	14.87	<0.10
C	4.48	2	2.24	1.95	>0.10
误差	2.29	2	1.15	1	

表 5 达乌里芯芭繁殖培养基芽增殖倍率方差分析

方差来源	离均差平方和	自由度	方差	F 值	P 值
A	76.54	2	38.27	28.61	<0.05
B	15.74	2	7.87	5.88	>0.10
C	43.13	2	21.56	16.12	<0.10
误差	2.68	2	1.34	1	

达且粗壮,移栽成活率较高。

3.4 试管苗的移栽

根据达乌里芯芭的生长特性,将生根的健壮试管苗在室温下开盖炼苗 3~4 d,再洗净根部的培养基后,移栽到消毒过的沙床上,沙床隐蔽度约 75%,每天早、中、晚各喷雾 1 次,30 d 后移栽成活率达 98%。

4 讨论

达乌里芯芭种子长卵形,长 3.0~4.0 mm,宽 2.0~2.5 mm,外种皮黄褐色,表面较光滑并具有光泽,质地较软,但在显微镜下观察,发现种子表面覆满了蜂窝状的小洞,这些特点导致种子消毒不彻底。本研究采用消毒后剥除种皮的方法对达乌里芯芭种子进行消毒,有利于提高消毒效率,这可能是因为隐藏在种皮内的微生物可能并未完全被杀死,而是在

[2]国家中医药管理局中华本草编委会. 中华本草·蒙药卷[M]. 上海:上海科学技术出版社,2004:219-220.

[3]内蒙古自治区革命委员会卫生局. 内蒙古中草药[M]. 呼和浩特:内蒙古人民出版社,1972:374-375.

[4]赵一之. 芯芭属(*Cymbaria*)植物种类考证及其植物区系分析[J]. 内蒙古大学学报,1999,30(3):351-353.

[5]张春红,姚霞,哈斯巴特尔,等. 蒙药芯芭的研究进展[J]. 中国现代中药,2013,15(12):1068-1072.

[6]Li Z H,Long P,Bai S R,et al. Chemical constituents from *Cymbaria dahurica* L. (Scrophulariaceae)[J]. Biochemical Systematics and Ecology,2014,57:11-14.

[7]刘淑贞,赵俊萍. 芯芭的质量标准中薄层色谱鉴别研究[J]. 北方药学,2011,8(12):2-2.

[8]王振旺,董永和,邬国栋,等. 蒙药芯芭粉末及茎横切片的显微鉴别[J]. 包头医学院学报,2012,28(5):7-8.

[9]陈文武,彭兰华. 药用植物的组织培养的应用[J]. 陕西农业科学,2006(5):62-65.