

中药莪术组织培养研究进展

杨世萍,李 斌*

(广西中医药大学 药学院,广西 南宁 530200)

摘 要:目前中药莪术的组织培养研究涉及外植体处理、愈伤组织诱导、不定芽诱导、丛生芽增殖、试管苗生根及炼苗移栽等不同阶段,但对外植体自身激素、组培过程激素积累、组培前后成分变化以及组培苗易玻璃化等问题尚无研究明确解释。对莪术的组织培养研究进行归纳和综述,以期对中药莪术的快速繁殖提供一定参考。

关键词:中药莪术;组织培养;快速繁殖

中图分类号:R282.2

文献标识码:A

文章编号:1673-2197(2018)10-0078-04

DOI:10.11954/ytctyy.201801026

莪术为姜科姜黄属植物蓬莪术 *Curcuma phaeocaulis* Valetton、广西莪术 *Curcuma kwangsiensis* S. G. Lee et C. F. Liang 或温郁金 *Curcuma wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling 的干燥根茎,主要分布于我国四川、浙江、广西、广东、云南等地。莪术主要以根茎入药,味辛、苦,性温,归肝、脾经,具有破血行气、消积止痛、活血化瘀等作用。除此之外,莪术主要成分莪术油在抗肿瘤、抗血栓方面疗效显著,且具有抗早孕、抗菌、保肝、抗银屑病等作用^[1-3]。但是中药莪术主要以根茎进行繁殖,耗时长,而组织培养可大大缩短繁殖时间,使植物离体快速繁殖,扩大繁殖量,且耗材少。组织培养是生物技术的重要组成部分,其应用越来越广泛,因此研究学者开展了对莪术的组织培养研究。目前,国内学者对中药莪术进行组织培养所用的材料一般为蓬莪术、广西莪术以及温郁金,也有一部分学者对印尼莪术、南岭莪术进行了组织培养研究。但不同的莪术品种在组织培养不同阶段培养基的组成存在差异,培养效果也有一定的差异。目前国外研究学者对中药莪术的组织培养研究较少,主要集中于对姜科姜黄属植物姜黄 *Curcuma longa* L. 的组织培养研究^[4-7]。本研究对中药莪术组织培养的外植体处理、愈伤组织诱导、不定芽诱导、丛生芽增殖、试管苗生根及炼苗移栽等不同阶段研究进行总结和归纳,以期能够建立莪术组织培养的最佳培养方式,为莪术的快速繁殖提供一定参考。

1 外植体材料来源、预处理及表面灭菌

对莪术进行组织培养,首先要有适宜的外植体。大量文献显示^[8-21],最常用的外植体材料主要有2种:一种是莪术根茎上萌动的芽,一种是莪术根茎上芽的芽尖。除此之

外,还有一些其他来源,如花瓣、花萼片、叶片、茎以及块茎等。

对莪术根茎上萌动的芽进行预处理时,笔者认为,多数是先将根茎上1~5cm的芽切下,用清水洗去萌动芽带的泥土,再用中性肥皂水、洗衣粉溶液或0.1%高锰酸钾溶液浸泡5~15min,最后用流动的清水冲直至干净。王晓慧等^[11]则是先用清水清洗萌动芽2h,再用无菌水清洗4次。

对莪术根茎上芽的芽尖进行预处理时,汪洪等^[15-16]首先将莪术根茎上的须根和泥土清理干净,置于4℃冰箱2周后拿出,埋在50%多菌灵800倍液处理过的细沙苗圃中,并放在室温和高温下促进芽的萌发,待芽长至约10cm时,切取1~2cm茎尖。吕德任等^[17]则是先从根茎上切下5~10cm芽,用清水冲洗,待剥离叶鞘后,再切取2cm芽尖于洗洁精中浸泡10min,最后用清水冲干净。

对外植体表面灭菌时,笔者认为,多数是采用乙醇和氯化汞共同灭菌的方法。首先用75%乙醇浸泡,浸泡时间依据具体的外植体而定,倒去乙醇,无菌水清洗3~6次,再用0.1%~0.2%氯化汞浸泡6~12min,之后无菌水清洗3~6次,基本上可以达到灭菌要求,最后将无菌外植体接种到不同培养基上进行培养。

笔者认为,中药莪术的外植体主要为地下组织,通常比地上组织消毒困难,因此,在具体操作时要根据材料的大小、幼嫩、质地等差异做出判断后,再选择适宜的消毒剂种类、浓度和消毒时间,不可生搬硬套。消毒的最佳效果应以最大限度地杀死外植体上的微生物,而又对外植体的损伤最小为好。

收稿日期:2018-02-19

基金项目:2016年研究生教育创新计划资助项目(YJS201629)

作者简介:杨世萍,广西中医药大学硕士研究生,研究方向为天然药物资源开发与综合利用。

通讯作者:李斌,广西中医药大学副教授,硕士生导师,研究方向为中草药的研究与利用。E-mail:514521447@qq.com

2 愈伤组织诱导试验

大量文献显示^[11-13,15-16,18],诱导莖术愈伤组织的外植体材料多来自于无菌苗的不同部位,一般接种于添加2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)、6-苄基腺嘌呤(6-BA)、激动素(KT)、萘乙酸(NAA)等生长调节剂的MS基本培养基上诱导愈伤组织的发生。

王晓慧等^[11]认为无菌苗的不同部位做外植体诱导愈伤组织时,以茎基部1cm茎尖诱导率最高,可达95%。研究得出:MS+2,4-D2.0mg/L+KT5.0mg/L为愈伤组织诱导的最适培养基;MS+2,4-D1.0mg/L+KT0.5mg/L为愈伤组织的最适继代培养基;MS+KT5.0mg/L+NAA0.3mg/L为愈伤组织的最适分化培养基。

陈丽萍、张丹媚等^[12-13]分别以莖术的叶、块茎、根作为诱导愈伤组织的外植体,发现叶的诱导效果最好,并且在MS+2,4-D1.0mg/L+6-BA0.5~1.0mg/L+NAA0.3mg/L诱导培养基上诱导率最高,达到96%。根的最适诱导培养基为MS+2,4-D1.0mg/L+6-BA1.0mg/L。

汪洪等^[15-16]以不定芽作为诱导愈伤组织的外植体接种在MS+6-BA1.0mg/L+KT3.0mg/L中诱导率最高。

李春斌等^[18]对莖术试管苗不同部位进行愈伤组织诱导,结果显示只有试管苗基部诱导出了可以继代和分化的愈伤组织,其他部位如叶片、叶鞘及根的愈伤组织诱导并不理想。因此该实验以试管苗基部为外植体进行诱导,得出:MS+2,4-D1.0mg/L+KT4.0~6.0mg/L为愈伤组织诱导的最适培养基;MS+2,4-D1.0~2.0mg/L+KT0.2~0.5mg/L为愈伤组织继代的最适培养基;MS+KT4.0mg/L+NAA0.2mg/L为愈伤组织分化的最适培养基。

由此可知,目前诱导莖术愈伤组织诱导效率较好的外植体材料为莖术茎基部1cm茎尖、莖术试管苗基部、莖术不定芽以及莖术的叶。

3 不定芽诱导试验

除了经过愈伤组织再生外,通过不定芽诱导的方式也可以获得莖术再生苗。不定芽诱导是指不定芽可以直接从外植体表面受伤的或没有受伤的部位直接分化出来。此途径可以使无性系后代保持原品种,也可以很好地保持母株的优良品质。在对莖术的组织培养研究中,研究学者对不定芽诱导的最适培养基进行了探索。

杨小多等^[8]将无菌外植体莖术根茎上的萌动芽接种在添加不同浓度6-BA、吲哚乙酸(IAA)或2,4-D的MS基本培养基上,发现不定芽在MS+6-BA5.0mg/L上出现得最早,约1周即可出现,并且诱导出的芽健壮,长势好。张慧英、唐秀桦等^[19-20]则是将无菌外植体莖术根茎上的萌动芽接种在添加不同浓度6-BA、IAA或KT的MS或1/2MS培养基上,发现MS+6-BA3.0mg/L最适合不定芽的诱导,且6-BA的诱导效果大于KT。当6-BA浓度不变时,全量MS培养基的诱导效果优于1/2MS培养基的诱导效果。

王晓慧等^[11]研究了生长素和细胞分裂素配合使用对不定芽诱导的影响,最终发现MS+6-BA3.0mg/L+IAA1.0mg/L产生不定芽的时间最短,增殖倍数达到3.2倍。

吕德任、汪洪等^[15-17]切取0.6~0.8mm的无菌茎尖,接种在MS+6-BA2.0mg/L+NAA0.5mg/L的培养基上,诱导效果最好。吕平等^[9-10]则将 $0.8\text{cm}^2 \times 0.8\text{cm}^2$ 的无菌莖术根茎作为外植体进行不定芽诱导试验,发现不定芽诱导分化的最适培养基为MS+6-BA1.0mg/L+NAA0.5mg/L,诱导率可达80%,长势良好。张丹媚等^[13]也进行了NAA与6-BA的配合使用,发现MS+NAA0.01mg/L比NAA与6-BA配合使用的诱导效果更好,不定芽的诱导率达到100%。

在不定芽的诱导试验中,除了常用的6-BA、IAA、KT、NAA外,还有用到玉米素(ZT)和噻重氮苯基脲(TDZ)。张施君等^[14]发现MS+TDZ0.05mg/L对不定芽的诱导效果比BA更好,诱导率达到90%,每个外植体可以产生4~5个芽,诱导效果显著。李春斌等^[18]则将莖术试管苗基部约1cm作为外植体进行不定芽的诱导,研究了多种细胞分裂素与生长素的配合使用效果,最终发现MS+ZT4.0mg/L+IAA0.5~1.0mg/L适用于不定芽的诱导。

由此可知,6-BA为不定芽诱导常用的植物生长激素,但不同植物生长激素的配合使用有时候比单一激素的诱导效果好,这为我们今后的研究提供了方向。

4 丛生芽增殖试验

目前报道的增殖试验方法多采用莖术无菌芽或芽尖作为外植体进行增殖,从而实现无菌苗扩增的目的。丛生芽增殖是将顶芽或腋芽萌发形成的丛生芽分割成单芽,接种到几代培养基进行培养的方法。该方法不经过愈伤组织的再生,是最能使无性系后代保持原品种特性的一种增殖方式,而且成苗速度快,繁殖量大。

杨小多等^[8]将诱导后的3~4cm的萌动芽作为外植体,以MS为基本培养基,添加不同浓度的6-BA、NAA,最终发现各组浓度的增殖状况有显著差异,以MS+6-BA2.0mg/L+NAA0.5mg/L的配比最为合适,增殖倍数达到3.0,且单芽可生成粗壮根系。

王晓慧等^[11]以无菌芽为外植体,在基本培养基MS中添加不同浓度的6-BA和IAA的组合,发现MS+6-BA3.0mg/L+IAA1.0mg/L产生丛生芽的时间短,增殖效果最好,增殖倍数为3.2倍。

张丹媚、陈丽萍等^[12-13]将无菌幼芽作为外植体,以MS为基本培养基,添加不同种类与不同浓度的生长素和细胞分裂素,选取的植物激素为6-BA、KT、NAA,发现MS+6-BA3.0mg/L+NAA0.1mg/L+KT1.0mg/L为最适增殖培养基,增殖倍数为3.55倍。此外,发现6-BA、NAA对芽的增殖效果优于KT的增殖效果。

汪洪等^[15-16]增殖外植体为脱毒莖术苗,在MS基本培养基上分别附加1~6mg/L的6-BA进行统计观察,发现MS+6-BA3.0mg/L增殖最适宜,增殖倍数达3.0。并且发现,6-BA浓度在2~4mg/L之间时,增殖倍数随着6-BA浓度的增加而增加,当6-BA浓度在5~6mg/L之间时,增殖倍数随着6-BA浓度的降低而降低。6-BA浓度为3mg/L和4mg/L时,增殖效果无明显变化。

吕德任等^[17]以无菌芽为外植体,首先在MS基本培养

基上分别添加 2mg/L 的 6-BA、KT、TDZ,5 天后开始萌芽,发现 MS+TDZ2.0mg/L 增殖倍数最高,为 3.99 倍,MS+KT2.0mg/L 的增殖倍数最低,为 2.08 倍。然后以 MS+TDZ2.0mg/L 为基本培养基,研究了不同糖浓度对增殖的影响,发现糖为 30g/L 时,增殖倍数达到 3.92 倍,且芽生长良好。作者还研究了不同浓度的 TDZ 对增殖的影响,选取了 0~1.0mg/L 之间的 6 个浓度水平,在 TDZ0.4mg/L 时增殖效果最好,增殖倍数为 4.11 倍,且芽健康粗壮。

张慧英等^[19]选取的增殖试验外植体是约 1cm 的无菌单芽,并以 MS+6-BA3.0mg/L 为基本培养基,分别附加不同浓度的 NAA、吲哚丁酸(IBA)、氯化胆碱(CC)、多效唑(MET)。最终发现,MS+6-BA3.0mg/L+CC10mg/L 为最适增殖培养基,增殖倍数达 7.7 倍,并且苗健康粗壮。还发现 CC 和 MET 对芽的增殖效果优于 NAA 和 IBA,并且 CC 与 MET 对芽长成的无菌苗有复壮效果。

唐秀桦等^[20]以无菌芽为外植体,以 MS 为基本培养基,首先添加不同浓度的 6-BA 和 KT,发现当 6-BA 浓度为 3.0mg/L 时,增殖效果最好为 8.9 倍。然后以 MS+6-BA3.0mg/L 为基本培养基研究了不同糖浓度对芽增殖的影响,最终得出:MS+6-BA3.0mg/L+糖 3%+琼脂 0.4% 最适于增殖培养,增殖倍数为 8.8 倍。

由此可知,研究学者在丛生芽增殖阶段用到的植物生长激素种类比较多。在今后的研究中,我们可以选用一些统计学方法来筛选最适丛生芽增殖培养的激素组合,例如正交设计、响应面等方法,这样筛选出来的激素组合更全面更有说服力。

5 试管苗生根试验

莖术试管苗的移栽需要试管苗有健壮的根系才能保证苗的成活率。大量文献显示^[8-16,19-21],莖术试管苗容易生根,在不添加任何激素的 MS 培养基上即可生根,但是根比较细弱,不易成活,所以多在 MS 或 1/2MS 基本培养基上加入 NAA。生根效果不但好,而且根粗壮,易于莖术试管苗移栽成活。

杨小多等^[8]发现莖术试管苗在基本培养基 MS 中也可以生根,但是耗时长,需要 20~30 天,而且根长势差。在 MS 培养基上附加不同浓度的 6-BA 和 NAA,当 MS+6-BA2.0mg/L+NAA0.5mg/L 时,不仅丛生芽增殖效果好,芽健壮,而且有粗壮根系生成,生根率达 100%,易于移栽。

汪洪等^[15-16]切取 3~5cm 单芽,接种到附加不同浓度的 6-BA 和 NAA 的 MS 上,12d 出现根,以 MS+6-BA1.5mg/L+NAA2.0mg/L+糖 3%+琼脂 5.0g/L 生根效果最好,生根率达 100%。

陈丽萍、张丹媚等^[12-13]选取长 3~5cm 的丛生芽作为外植体,以 1/2MS 为基本培养基,添加不同浓度的 6-BA 和 NAA,发现随着 NAA 浓度的增大,根的数量增多,并且根的长度逐渐缩短健壮。含 6-BA 的培养基比没含 6-BA 的培养基芽的生根数量多。因此,得出 1/2MS+6-BA0.5mg/L+NAA1.0mg/L 最适于根的诱导。

王晓慧等^[11]切取增殖培养基中生长约 1 月的丛生芽作为生根外植体,以 MS 为基本培养基,附加不同浓度的

IAA,发现 MS+IAA1.0mg/L 生根效果最好,1 个月后即可移栽。

吕德任等^[21]取高约 3cm 的无菌芽,以 MS+活性炭 0.5g/L 为基本培养基,附加不同浓度的 NAA,发现 NAA 浓度为 0 时,也可以生根,但是根出现的时间晚。当 MS+NAA0.5mg/L+活性炭 0.5g/L 时,生根率达 100%,且移栽成活率达 100%。

张慧英等^[19]选取健壮、茎粗、叶色浓绿的试管苗单株为外植体,以 MS 为基本培养基,附加不同浓度的 NAA 或 IAA,在培养基中均加糖 3%、琼脂 0.4mg/L,发现 MS+NAA2.0mg/L 生根多,较健壮,平均单株生根数为 5.2 条,移栽成活率达 90%以上。唐秀桦等^[20]也得出同样的结果,同时也研究了 CC 和 MET 对生根试管苗壮苗的影响,发现生根试管苗在 MET1.0mg/L 的壮苗处理后,移栽成活率达 100%。

张施君等^[14]发现在 MS+TDZ0.3mg/L 下芽不仅增殖效果好,而且会明显产生不定根,因此,该试验并未用生根培养基进行生根试验,而是将增殖试验获得的生根苗接种到 1/2MS 基本培养基上,进行 1 个月的壮苗,待试管苗健壮、叶浓绿时,进行炼苗移栽,成活率达 98%以上。

吕平等^[9-10]将长 2~3cm 的无根苗作为外植体,以 MS 或 1/2MS 为基本培养基,附加不同浓度的 NAA,发现随着 NAA 浓度的增加,根健壮,发育良好。并且当 NAA 浓度不变时,1/2MS 比 MS 的生根效果好。因此得出最适生根培养基为 1/2MS+NAA0.5mg/L,移栽成活率达 90%以上。

由此可知,试管苗生根试验最常用的激素是 NAA。生根试验用的植物激素比较单一,在今后的研究中可以尝试其他激素或不同激素组合的生根效果。试管苗在炼苗移栽前,生根试验是非常重要的一步,试管苗的生根以生根数多、根健壮为佳。

6 试管苗的炼苗移栽

大量文献显示^[8-10,12-18,20-21],莖术试管苗移栽之前需要炼苗,方法多为将生长健壮,根系发达的试管苗移出培养室,置于温室放置,再将瓶盖打开进行炼苗。杨小多^[8]、张丹媚^[13]、李春斌^[18]等在打开瓶盖后,注入少量清水以淹没培养基来进行炼苗。经过 3~5 天,将试管苗取出,用清水小心清理干净根部的培养基以备移栽。杨小多等^[8]用稀释 1 000 倍的多菌灵溶液浸泡试管苗 5min 后再用清水清理根部培养基,最后将清理干净的试管苗移栽于经过灭菌的栽培基质中。

不同研究者使用的栽培基质略有不同。唐秀桦等^[20]用的栽培基质是黄泥+腐质土+沙子的混合基质;陈丽萍、张丹媚等^[12-13]用的栽培基质是 V 蛭石:V 沙土:V 腐殖土=1:1:1 的混合基质;吕平^[9-10]、张施君^[14]、李春斌^[18]等用的栽培基质是河沙基质;汪洪等^[15-16]用的栽培基质是经消毒的珍珠岩、河沙及腐质土等量混合的基质;吕德任等^[17,21]用的栽培基质是 V 河沙:V 表土:V 椰糠=1:1:1 的混合基质;杨小多等^[8]设计了 3 种不同栽培基质以期筛选出最佳移栽基质,发现经 0.4% 高锰酸钾消毒灭菌的 V 腐蚀土

: V 河沙=3:1 的混合基质最好。

炼苗移栽,需要搭建拱膜和遮光网,保湿保温,待数周后再逐渐揭网。

笔者认为,将已经生根的莖术试管苗及时移栽是十分关键的工作。试管苗是在无菌、有营养供给、适合光照、温度和100%相对湿度的环境中生长,因此刚出瓶的试管苗对外界环境不太适应,稍有不慎便会造成大量试管苗死亡。所以对刚出瓶的试管苗要给予细心的照顾,适当的温度、弱光照、高的空气湿度、适宜的基质及对病虫害的有效控制是提高试管苗成活率的关键。

目前,中药莖术的炼苗移栽技术已经成熟,但并未见研究学者将莖术的组培苗大量种植于大田,实现生产化。中药莖术组织培养实现生产化将是我们今后需要继续研究的方向。

7 结语

组织培养技术可以在不受植物体其他部分干扰下研究培养部分的生长和分化的规律,并且可以利用各种培养条件影响其生长和分化,以解决植物资源短缺等问题。在莖术的组织培养研究中,主要集中于莖术愈伤组织诱导,不定芽诱导,丛生芽增殖、试管苗生根最适培养基的筛选以及试管苗的炼苗移栽方面,在此过程中设计了多种培养基,附加了不同的生长调节剂,但是用于组织培养的莖术组织本身自带的激素对其各阶段培养是否存在一定影响尚不得而知。此外,莖术组织的各阶段培养连续进行,激素不断积累,这个因素是否会影响下一阶段最适培养基激素组合的筛选;莖术进行组织培养前后,主要成分以及含量是否发生明显变化,植株是否发生变异;莖术组培苗易玻璃化,如何做到高效获得莖术健康组培苗,缩短培养时间等,这些都是我们需要不断探索改进的问题,以期能够建立中药莖术组织培养的最佳培养方式,为其快速繁殖提供一定参考。

参考文献:

- [1] 赵小倩,钱英,胡姗姗,等.复方莖术油乳膏外用对大鼠长期毒性实验研究[J].中国药房,2016,27(7):882-885.
- [2] 宋爱莉,殷玉琨,孙子渊,等.莖术油干预治疗肿瘤的研究及应用概况[J].山东中医药大学学报,2008,32(2):172-174.
- [3] 张辉靠,王冬东,孙程,等.莖术油中吉马酮在小鼠组织内的分布研究[J].中国药房,2017,28(4):512-514.
- [4] EL-HAWAZ R F, BRIDGES W C, ADELBERG J W. In vitro growth of *Curcuma longa* L. in response to five mineral elements and plant density in fed-batch culture systems[J]. Plos One, 2015, 10(4): e0118912.
- [5] PISTELLI L, BERTOLI A, GELLI F, et al. Production of Curcuminoids in different in vitro organs of *Curcuma longa*. [J]. Natural Product Communications, 2012, 7(8): 1037-1042.
- [6] MUNSHI M K, HOSSAIN S N, ISLAM M R, et al. In vitro mass propagation of turmeric (*Curcuma longa* L.) using buds from rhizomes[J]. 2004, 33(2): 125-128.
- [7] SUNTIBALA H, DAMAYANTI M, SHARMA G J. In vitro propagation and rhizome formation in *Curcuma longa* Linn [J]. Cytobios, 2001, 105(409): 71.
- [8] 杨小多. 温郁金组培快繁体系的建立及质量初步评价研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2011.
- [9] 吕平, 韦丽君, 庞新华, 等. 印尼莖术快速繁殖技术初步研究[J]. 中药材, 2007, 30(4): 383-385.
- [10] LÜ P, WEI L J, PANG X H, et al. Primary study on rapid propagation of *Curcuma xanthorrhiza* [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2007, 30(4): 383.
- [11] 王晓慧, 杨恩秀, 庞实锋, 等. 温郁金愈伤组织培养及快速繁殖[J]. 北方园艺, 2008(10): 143-146.
- [12] 陈丽萍, 张丹媚, 孟亚婷, 等. 蓬莖术的离体快繁研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(11): 4889-4891.
- [13] 张丹媚. 广西莖术和蓬莖术离体快繁及莖术油抑菌效应的初步研究[D]. 成都: 四川师范大学, 2008.
- [14] 张施君, 刘念, 盛爱武, 等. 南岭莖术的组织培养技术研究[J]. 北方园艺, 2011(8): 151-153.
- [15] 汪洪, 蔡小军, 于晓敏, 等. 温郁金脱毒组织培养技术研究[J]. 药物生物技术, 2009, 16(6): 565-567.
- [16] 汪洪, 林观样, 李校堃. 温郁金的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学报, 2007, 43(3): 509-510.
- [17] 吕德任, 戚华莎, 潘梅, 等. 温郁金茎尖离体培养研究[J]. 中国园艺文摘, 2014(8): 36-37.
- [18] 李春斌, 方宏筠, 王关林. 药用植物莖术的组织培养快速繁殖与植株再生的研究[J]. 中草药, 2000(11): 55-58.
- [19] 张慧英, 唐秀桦, 王建. 莖术的组织培养[J]. 农业与技术, 2006(5): 62-65.
- [20] 唐秀桦. 广西莖术快速繁殖及后代植株性状调查的研究[D]. 南宁: 广西大学, 2007.
- [21] 吕德任, 潘梅, 戚华莎, 等. 温郁金组培苗移栽技术[J]. 中国园艺文摘, 2013(9): 155-156.

(编辑:尹晨茹)