

黄瑞香的组织培养和快速繁殖

庞晓斌¹, 高双成², 谢欣梅¹ (1. 河南大学中药研究所, 河南开封 475004; 2. 河南科技大学农学院, 河南洛阳 471003)

摘要 [目的]探索黄瑞香组织培养和快速繁殖的培养条件。[方法]以黄瑞香幼嫩茎尖为外植体,采用植物组织培养和生物统计的方法研究黄瑞香的组织培养和快速繁殖技术。[结果]确定黄瑞香茎尖诱导愈伤组织的最佳培养基为 WPM + IBA 0.1 mg/L + KT 0.1 mg/L, 茎尖诱导芽的适宜培养基为 WPM + IBA 0.2 mg/L + 6-BA 3 mg/L, 幼芽形成根的适宜培养基为 1/2 MS + IBA 3.0 mg/L。[结论]该研究结果为黄瑞香的快速繁殖及工厂化生产奠定了基础,该研究为黄瑞香组织培养和快速繁殖提供依据。

关键词 黄瑞香; 组织培养; 培养基

中图分类号 S567.1⁺9 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)26-11226-02

Tissue Culture and Rapid Propagation of *Daphne giraldii* Nitsch.

PANG Xiao-bin et al (Institute of Chinese Material Medical, Henan University, Kaifeng, Henan 475004)

Abstract [Objective] The study aimed to explore the condition for tissue culture and rapid propagation of *Daphne giraldii* Nitsch. [Method] Taking young stem tip of *Daphne giraldii* Nitsch. as explants, plant tissue culture and biostatistics methods were used to study the tissue culture and rapid propagation technique of *Daphne giraldii* Nitsch. [Result] The optimum medium for callus induction was WPM + IBA 0.1 mg/L + KT 0.1 mg/L. The appropriate medium for the shoot induction and the rooting were WPM + IBA 0.2 mg/L + 6-BA 3 mg/L and 1/2 MS + IBA 3.0 mg/L, respectively. [Conclusion] The research results laid a foundation for the quick propagation and factory production of *Daphne giraldii* Nitsch, and offered references for the tissue culture and rapid propagation of *Daphne giraldii* Nitsch.

Key words *Daphne giraldii* Nitsch.; Tissue culture; Medium

黄瑞香 (*Daphne giraldii* Nitsch) 为瑞香科瑞香属植物, 分布于长江流域以南各省及河南、陕西等地^[1]。其茎皮人称祖师麻, 具疏风通络、祛瘀止痛之功效, 主要用于头痛、牙痛、风湿关节痛、跌打损伤、肝区痛等诸多痛症。制剂有祖师麻膏药、祖师麻关节止痛膏、祖师麻片、祖师麻注射液。瑞香素 (daphnetin) 是黄瑞香的主要成分之一^[2], 具有降血脂^[3-4]、抗溶血活性^[5-7]、抗肿瘤活性^[8]和强镇痛^[9]等作用, 是其临床上用于治疗冠心病、血栓闭塞性脉管炎、癌症、风湿性关节炎、跌打损伤等疾病的药理学基础。黄瑞香雌雄蕊容易退化, 利用种子繁殖较困难, 常采用分株或扦插的繁殖方法, 而且黄瑞香对生长环境的要求较为苛刻, 且在原材料获得上需要大量的采挖, 这与环境保护和中药可持续发展方针相悖, 严重制约了其规模化生产, 尤其是瑞香素含量较低一直是进一步开发和利用的制约因素, 因此, 寻找新的繁殖黄瑞香的技术手段和方法已成为目前解决其资源不足的迫切需要。

近年来, 随着生物技术的迅猛发展, 组织培养技术已被广泛应用于各个领域, 许多中草药的组织培养技术也日趋成熟, 但关于黄瑞香的组织培养研究却未见报道^[10]。利用组织培养方法对黄瑞香进行快繁研究, 不仅可以解决黄瑞香种子繁殖困难的问题, 而且可以克服其常规无性繁殖速度慢、繁殖率低的缺点^[11]。另外, 组织培养不受季节、气候等因素的制约, 节省土地, 速度快, 质量高, 技术密集, 便于集约化管理和工厂化生产^[12]。因此, 将植物组织培养技术应用于黄瑞香的快速繁殖, 对保护黄瑞香的种质资源, 丰富药用植物黄瑞香多样性, 缓解国内优质中药材黄瑞香供应紧张的状况, 都具有重要的理论意义和实际应用价值。

1 材料与方

1.1 试验材料

多年生黄瑞香当年抽生枝条的茎尖为试验

材料。

1.2 外植体的消毒 剪取 4~5 cm 长的幼嫩茎段, 用自来水冲洗干净, 先在体积分数为 70% 的酒精中消毒 30 s, 再用质量分数为 0.1% 的 HgCl₂ 消毒 8 min, 然后用无菌水清洗 4~5 次, 在 10% 漂白粉中浸泡 15 min, 再次用无菌水清洗干净, 留取 1~2 cm 的茎尖放入培养基中。

1.3 培养条件 培养基中蔗糖质量浓度为 30 g/L, 琼脂 6 g/L, 培养条件为培养温度 (25 ± 2) °C, pH 值为 5.8, 光照强度 2 000 lx 左右。芽和根的诱导培养条件与此相同。

1.4 培养基选择

1.4.1 愈伤组织诱导培养基。 将黄瑞香的茎尖放入 WPM 和 MS 2 种培养基中进行愈伤组织的诱导 (表 1)。每处理接种 20 瓶, 每瓶 1 个外植体, 20 d 后统计愈伤组织诱导结果, 根据愈伤组织诱导情况选择适宜的培养基。

表 1 不同处理组合的愈伤组织诱导培养基

Table 1 Callus induction under different medium treatments

| 处理组合 | 基本培养基 | IBA | KT |
|-----------------------|--------------|------|------|
| Treatment combination | Basic medium | mg/L | mg/L |
| JB1 | MS | 0.1 | 0.1 |
| JB2 | MS | 0.2 | 0.1 |
| JB3 | WPM | 0.1 | 0.1 |
| JB4 | WPM | 0.2 | 0.1 |

1.4.2 芽诱导培养基。 分别以 WPM 和 MS 为基本培养基, 附加生长素 IBA 和细胞分裂素 6-BA, 采用正交设计组成 9 种处理组合 (表 2)。将黄瑞香树的茎尖接种在 9 种培养基上。每处理接种 20 瓶, 每瓶 1 个外植体, 30 d 后统计芽诱导结果。

1.4.3 根诱导培养基。 当培养瓶中的诱导芽长到 3~5 cm 长, 具有 4~5 个叶片时从茎的基部切下放入 1/2 MS 和 1/4 MS 的培养基中, 附加生长素 IBA 分别用 4 种浓度处理 (表 3)。每处理接种 10 瓶, 每瓶 1 个外植体, 分别在培养 20 和 30 d 后统计根诱导率。25 d 时统计根长。

基金项目 河南大学自然科学基金 (06YBZR079) 资助。

作者简介 庞晓斌 (1973-), 男, 河南洛阳人, 博士, 副教授, 从事生物制药方面的研究。

收稿日期 2008-06-30

表 2 不同处理组合的芽诱导培养基

Table 2 Shoot induction medium under different treatment combinations

| 处理组合 | 基本培养基 | IBA | 6-BA |
|-----------------------|--------------|------|------|
| Treatment combination | Basic medium | mg/L | mg/L |
| YD1 | MS | 0.4 | 1.0 |
| YD2 | WPM | 0.4 | 3.0 |
| YD3 | WPM | 0.1 | 1.0 |
| YD4 | MS | 0.1 | 3.0 |
| YD5 | WPM | 0.4 | 5.0 |
| YD6 | WPM | 0.2 | 1.0 |
| YD7 | WPM | 0.1 | 5.0 |
| YD8 | MS | 0.2 | 5.0 |
| YD9 | WPM | 0.2 | 3.0 |

表 3 不同处理组合的根诱导培养基

Table 3 Root induction medium under different treatment combinations

| 处理组合 | 基本培养基 | IBA |
|-----------------------|--------------|------|
| Treatment combination | Basic medium | mg/L |
| SG1 | 1/2 MS | 1 |
| SG2 | 1/2 MS | 2 |
| SG3 | 1/2 MS | 4 |
| SG4 | 1/2 MS | 8 |
| SG5 | 1/4 MS | 1 |
| SG6 | 1/4 MS | 2 |
| SG7 | 1/4 MS | 4 |
| SG8 | 1/4 MS | 8 |

2 结果与分析

2.1 基本培养基对愈伤组织诱导的影响 黄瑞香树的茎尖在 MS 和 WPM 培养基上都能诱导出愈伤组织,但是培养基上的愈伤组织发生情况是有差异的。由表 4 可看出,在 WPM 培养基上愈伤组织诱导率较高(83.0%),MS 培养基上则较低(48.9%)。方差分析表明,WPM 培养基优于 MS 培养基($P < 0.05$),由此可见,在生长调节物质质量浓度相同的条件下,在 WPM 培养基更适合黄瑞香茎尖愈伤组织的诱导。

表 4 不同培养基对黄瑞香茎尖愈伤组织诱导的影响

Table 4 Effects of different media on callus induction from stem tip of *Daphne giraldii*

| 处理组合 | 接种数量//个 | 愈伤组织发生率//% |
|-----------------------|-------------------|---------------------|
| Treatment combination | Inoculated number | Incidence of callus |
| JB1 | 20 | 47.6 |
| JB2 | 20 | 50.2 |
| JB3 | 20 | 84.6 |
| JB4 | 20 | 81.4 |

2.2 不同生长调节物质对黄瑞香茎尖愈伤组织芽诱导率的影响 由表 5 可看出,最适培养基是 YD9,同时方差分析表明,在诱导黄瑞香茎尖愈伤组织分化时,WPM 培养基优于 MS 培养基($P < 0.05$),同时,添加适量的 IBA 对愈伤组织的分化有利,当 IBA 浓度等于 0.2 mg/L 时,愈伤组织的芽诱导率明显高于其他浓度,且差异显著($P < 0.05$);另外,添加适量的 6-BA 对不定芽的形成也是必需的。当 6-BA 浓度为 3.0 mg/L 时,愈伤组织的芽诱导率明显高于其他浓度($P < 0.05$),这表明 6-BA 促进或抑制芽诱导,在诱导黄瑞香芽分

化时,IBA 浓度为 0.2 mg/L 效果为最佳,6-BA 浓度为 3.0 mg/L 时效果最佳。试验结果表明,黄瑞香芽诱导的最适培养基为 WPM + IBA 0.2 mg/L + 6-BA 3.0 mg/L 的培养基最有利于芽的诱导。

表 5 不同生长调节物质对黄瑞香树茎尖芽诱导率的影响

Table 5 Effects of different plant growth regulators on shoot induction from stem tip of *Daphne giraldii* Nitsch.

| 处理组合 | 接种数//个 | 分化数//个 | 分化率//% | 每个茎尖平均分化芽数//个 |
|-----------------------|-------------------|------------------------|----------------------|--|
| Treatment combination | Inoculated number | Differentiation number | Differentiation rate | Average differentiated bud number per stem tip |
| YD1 | 20 | 6 | 30 | 3 |
| YD2 | 20 | 14 | 70 | 14 |
| YD3 | 20 | 10 | 50 | 15 |
| YD4 | 20 | 5 | 25 | 6 |
| YD5 | 20 | 11 | 55 | 4 |
| YD6 | 20 | 13 | 65 | 16 |
| YD7 | 20 | 9 | 45 | 15 |
| YD8 | 20 | 5 | 25 | 3 |
| YD9 | 20 | 17 | 85 | 15 |

2.3 不同培养基组合对黄瑞香幼芽生根率的影响 由表 6 可看出,基本培养基对黄瑞香生根有较大的影响。1/2 MS 培养基的生根率明显高于 1/4 MS 培养基($P < 0.05$)。同时发现,在培养基中附加适量 IBA 的培养基中生根现象明显,同时由表 6 可看出,随着 IBA 浓度的增加,生根率也逐渐升高,当 IBA 浓度未超过 3.0 mg/L 后,随着浓度的增加,生根率开始下降。由试验结果可知,1/2 MS + IBA 3.0 mg/L 的培养基最有利于黄瑞香根的形成。

表 6 不同培养基组合对黄瑞香树幼芽生根的影响

Table 6 Effects of different media on seedling rooting of *Daphne giraldii* Nitsch.

| 处理组合 | 生根率//% | 平均根数//个 | 平均根长//cm |
|-----------------------|--------------|---------------------|---------------------|
| Treatment combination | Rooting rate | Average root number | Average root length |
| SG1 | 32 | 4 | 2.0 |
| SG2 | 56 | 5 | 3.8 |
| SG3 | 91 | 5 | 5.4 |
| SG4 | 74 | 4 | 4.0 |
| SG5 | 10 | 3 | 1.2 |
| SG6 | 31 | 4 | 3.1 |
| SG7 | 64 | 5 | 4.3 |
| SG8 | 43 | 3 | 3.6 |

2.4 炼苗移栽 当根长达到 5 cm 左右时,选择健壮的试管苗移栽到蛭石:珍珠岩:河沙为 1:1:2 混合的基质中,移栽后注意遮阴保湿,成活率可达 80% 以上。

3 结论与讨论

黄瑞香茎尖组织培养的适宜培养基为 WPM,愈伤诱导的最佳培养基是 WPM + IBA 0.1 mg/L + KT 0.1 mg/L,茎尖芽诱导的适宜培养基为 WPM + IBA 0.2 mg/L + 6-BA 3 mg/L,幼芽形成根的最佳培养基为 1/2 MS + IBA 3.0 mg/L。该研究通过对黄瑞香愈伤组织的诱导、芽分化以及生根情况研究,确定了适合黄瑞香组织培养的基本培养基和植物生长调节剂种类、水平及适用比例,为其无性繁殖及工厂化生产奠

(下转第 11229 页)

2.2 不同浓度 6-BA、2,4-D 对对节白蜡顶芽愈伤组织诱导的影响 将顶芽外植体分别接种于 25 个处理的培养基中,每个处理接种 60 个,从表 2 可看出,单因素植物激素对愈伤组织诱导不利,在 6-BA 一定的条件下,2,4-D 浓度增加,则愈伤组织的诱导率、质地、长势均发生明显的变化,在 2 种激素不同配比的培养基上,95% 的外植体在接种 5~8 d 后,开始拱起,切口处膨大,颜色渐渐淡黄,15~18 d 切口处形成松脆的颗粒状愈伤组织,处理⑬、⑭、⑱、⑳出愈率高,质地好,改变激素水平和配比继续培养就会有再生植株,其最佳培养基为 MS+2.0 mg/L 6-BA+1.5 mg/L 2,4-D。

表 2 不同浓度激素对对节白蜡愈伤组织诱导的影响

Table 2 Effects of different concentrations on the callus induction of *Fraxinus hupehensis*

| 处理 Treatment | 6-BA mg/L | 2,4-D mg/L | 外植体 数//个 Explant number | 出愈率 % Callus rate | 愈伤组织质量 Callus quality |
|-----------------|--------------|---------------|----------------------------------|----------------------------|--------------------------|
| ① | 0 | 0 | 60 | 0 | 很少生长 |
| ② | 1.0 | 1.0 | 60 | 50 | 小,生长缓慢 |
| ③ | 2.0 | 1.5 | 60 | 53 | 小,色泽暗淡,生长缓慢 |
| ④ | 3.0 | 2.0 | 60 | 55 | 稍大,色泽暗淡,生长缓慢 |
| ⑤ | 4.0 | 2.5 | 60 | 56 | 稍大,色泽暗淡,生长缓慢 |
| ⑥ | 0 | 1.0 | 60 | 47 | 稍大,色泽暗淡,生长缓慢 |
| ⑦ | 1.0 | 1.5 | 60 | 62 | 大,色泽淡黄,生长慢 |
| ⑧ | 2.0 | 2.0 | 60 | 65 | 大,色泽淡黄,生长慢 |
| ⑨ | 3.0 | 2.5 | 60 | 66 | 外部松软,内部实硬,生长慢 |
| ⑩ | 4.0 | 0 | 60 | 68 | 外部松软,内部实硬,有芽点 |
| ⑪ | 0 | 1.5 | 60 | 52 | 稍大,色泽暗淡,生长缓慢 |
| ⑫ | 1.0 | 2.0 | 60 | 67 | 外部松软,内部实硬,有芽点 |
| ⑬ | 2.0 | 2.5 | 60 | 68 | 外部松软,内部实硬,芽点多 |
| ⑭ | 3.0 | 0 | 60 | 68 | 外部松软,内部实硬,芽点多 |
| ⑮ | 4.0 | 1.0 | 60 | 70 | 外部松软,内部实硬,芽点多 |
| ⑯ | 0 | 2.0 | 60 | 50 | 稍大,色泽暗淡,生长缓慢 |
| ⑰ | 1.0 | 2.5 | 60 | 70 | 外部松脆,质地致密,生长快 |
| ⑱ | 2.0 | 0 | 60 | 94 | 外部松脆,质地致密,生长快,出现小硬颗粒 |
| ⑲ | 3.0 | 1.0 | 60 | 96 | 外部松脆,质地致密,生长快,表面有许多突起 |
| ⑳ | 4.0 | 1.5 | 60 | 96 | 外部松脆,质地致密,生长快 |
| ㉑ | 0 | 2.5 | 60 | 51 | 稍大,松软,生长慢 |
| ㉒ | 1.0 | 0 | 60 | 88 | 外部松软,内部实硬 |
| ㉓ | 2.0 | 1.0 | 60 | 90 | 外部松脆,生长过旺 |
| ㉔ | 3.0 | 1.5 | 60 | 94 | 外部松散,质地细软,属亢进型 |
| ㉕ | 4.0 | 2.0 | 60 | 91 | 外部松散,质地细软,属亢进型 |

2.3 愈伤组织的继代培养 将生长 21 d 的松脆愈伤组织转接到培养基中进行继代培养,10~20 d 后,再次长出新鲜的松脆型淡黄色的愈伤组织,生长速度明显加快,因此每隔 21 d 挑取长势好的愈伤组织继代,连续继代 3 次,同时将处理⑦、⑧、⑨、⑩、⑪、⑫、⑬、⑭、⑮、⑰、⑱、⑳的愈伤组织转接到优化培养基上继续培养,7~10 d 后相继长出新鲜的松脆型淡黄色的愈伤组织,连续继代 2 次,发现第 3 次继代后愈伤组织质地松软不理想。

3 讨论

(1) 对节白蜡萌发力强,目前繁殖多以扦插为主,在组织培养方面国内外均没有报道。用对节白蜡顶芽诱导愈伤组织,通过愈伤组织的途径获得组培苗,其特点是成功率高,繁殖系数大,但遗传稳定性较差,对要求遗传稳定性高的作物品种,一般不采用这一途径繁殖^[1]。而对节白蜡是以观赏、盆栽为主,即使产生变异也不会影响其商品价值和经济效益,所以适于采用愈伤组织增殖途径来进行种苗快速繁殖,是保护、开发和利用对节白蜡的有效途径。

(2) 在对节白蜡的顶芽组织培养中,3 月和 4 月取样出愈率没有明显差别,考虑到操作方便,4 月份顶芽较大,做外植体较理想;树龄对顶芽形成愈伤组织没有明显影响,不同激素的种类以及水平和它们之间浓度配比对对节白蜡愈伤组织的诱导有显著影响。试验结果表明,MS+2.0 mg/L 6-BA+1.5 mg/L 2,4-D 为最佳培养基,产生的愈伤组织生长快,质地松脆并有许多突起、芽点,将此愈伤组织继代培养可加速增殖,能在短期内获得大量遗传性一致的再生植株,可为盆景制作提供丰富的材料,从而达到保护野生对节白蜡,保护生物多样性的目的。

(3) 愈伤组织的继代培养要适可而止,不同基因型的外植体继代次数不同^[2],不同激素水平以及它们之间的浓度配比都和继代次数密切相关,要综合各方面因素,做到适中才能使愈伤组织有目的地生长。

参考文献

- [1] 薛庆善. 体外培养的原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [2] 李俊明. 植物组织培养教程[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2002.

(上接第 11227 页)

定了基础。

参考文献

- [1] 刘军民, 徐国华. 国产沉香研究进展[J]. 中药材, 2005, 28(7): 627-632.
- [2] 周光雄, 杨永春, 石建功. 祖师麻活性化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(7): 555-557.
- [3] 姜秀莲, 曲淑岩, 李伟. 瑞香素对血清脂质及脂蛋白胆固醇含量的影响[J]. 药学报, 1987, 22(1): 53-55.
- [4] 倪奕昌, 徐月琴, 王鸣杰. 瑞香素的抗溶血和抗膜脂质过氧化作用[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1999, 17(2): 87-89.
- [5] 倪奕昌, 倪齐珍, 徐月琴, 等. 瑞香素抗红外期疟原虫作用的研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2001, 19(1): 30-32.
- [6] QU S Y, JIANG X L, ZHAO X H, et al. Antithrombotic effect of daphnetin

in the rat[J]. Yao Xue Xue Bao, 1986, 21(7): 498-501.

- [7] 曲淑岩, 姜秀莲, 赵学慧, 等. 瑞香素抗血栓作用[J]. 药学报, 1986, 21(7): 498-501.
- [8] FINN G J, CREAVEN B S, EGAN D A. Daphnetin induced differentiation of human renal carcinoma cells and its mediation by p38 mitogen-activated protein kinase[J]. Biochem Pharmacol, 2004, 67(9): 1779-1788.
- [9] 叶和扬, 熊小琴, 邱伟, 等. 瑞香素对醋酸、热板及电刺激致痛小鼠的镇痛作用[J]. 中国临床康复, 2005, 9(22): 174-176.
- [10] 周彦志. 生物技术在农业上的应用[J]. 现代农业科技, 2008(4): 217-217.
- [11] 周艳, 陈训. 活性炭在高山杜鹃组织培养中的应用[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(4): 1419-1420, 1704.
- [12] 马慧, 张立军, 阮燕萍, 等. 植物组织培养技术的现状及发展趋势[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(6): 1602-1604.