

广藿香不同外植体离体培养的研究

林小桦, 贺红*, 吴立蓉, 张桂芳, 张燕玲

(广州中医药大学 中药学院, 广州 510006)

摘要: 以广藿香叶片、带节茎、不带节茎及根尖为材料进行离体培养, 对影响离体再生的因素进行了研究。结果表明: BA 有利于广藿香外植体出芽, 浓度以 0.1~0.5 mg/L 效果较好; 不同外植体的出芽能力有较大差异, 其中以叶片和带节茎出芽能力较强, 出芽率均达 100%; 外植体在培养基上的接种方式对出芽也有一定影响, 带节茎以形态学下端垂直插入, 可以缩短出芽时间及增加单个外植体出芽的数量。无根苗生根以 MT+IBA 0.2 mg/L 培养基为好, 苗的生长较为健壮。

关键词: 广藿香; 外植体; 离体培养

中图分类号: Q943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2007)04-0658-04

In vitro culture of different explants from *Pogostemon cablin*

LIN Xiao-Hua, HE Hong*, WU Li-Rong,
ZHANG Gui-Fang, ZHANG Yan-Ling

(College of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

Abstract: The leaf segments, nodular stem segments, stem segments and root tips from *Pogostemon cablin* were cultured *in vitro*. The factors affecting plant regeneration were studied. The results were as follows: BA was effective to induce shoot formation; the optimal BA concentration for shoot formation was 0.1~0.5 mg/L; there was significant difference on the shoot formation from different explants; the leaf segments and nodular stem segments were the most suitable for culture, with the highest shoot formation frequency of 100%; nodular stem segments oriented with their apical ends protruding from the medium could produce more shoots in less time than when they were placed with their basal end upright or were placed horizontally. Optimal rooting medium for regeneration shoots was MT+IBA 0.2 mg/L.

Key words: *Pogostemon cablin*; explant; *in vitro* culture

广藿香 (*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.) 为唇形科刺蕊草属植物, 以干燥地上部分入药, 其性辛、微温。具有芳香化湿, 开胃止呕, 发表解暑的功效(国家药典委员会, 2000)。广藿香为广东道地药材, “十大广药”之一, 是多种著名中成药“藿香正气丸”、“藿胆丸”等以及现代中药制剂“抗病毒口服液”的主要原料。广藿香原产于东南亚热带地区, 引种

到我国亚热带地区栽培(广东中药志编委会, 1994), 由于气温比原产地低, 很少见到开花, 即使开了花也不结实, 长期以来, 生产上用扦插繁殖, 病原体通过无性繁殖传递, 且逐代积累, 危害越来越严重, 迫切需要进行新品种选育。但由于广藿香在我国产区罕见开花结实, 传统育种工作难以进行。近年来, 基因转移及人工诱变等改良药用植物农艺性

收稿日期: 2005-12-19 修回日期: 2006-10-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(30472152)[Supported by the National Natural Science Foundation of China(30472152)]

作者简介: 林小桦(1980-), 女, 广东佛山人, 硕士研究生, 从事中药生物技术研究。

*通讯作者(Author for correspondence, E-mail: hehong67@yahoo.com.cn)

状的技术,为广藿香育种开辟了新途径,而要开展这些方面的研究,首先要建立高效的组织培养再生系统。本文以广藿香多种外植体为材料,进行离体培养的研究,为遗传转化及人工诱变育种奠定基础。

1 材料和方法

1.1 植物材料

广藿香采自广州中医药大学药圃。采集广藿香顶芽,经蒸馏水冲洗干净后,用 70%乙醇浸泡 30 s,转入 0.1%的 HgCl₂ 溶液浸泡消毒 10 min,再用无菌水漂洗 5~8 次,把残留 HgCl₂ 漂洗干净,接种于 MT 培养基上生长。待苗长至一定大小时,分别切取叶片、带节茎、不带节茎及根尖进行培养,外植体在培养基中的放置方式,叶片及根尖平放,带节茎及不带节茎为形态学下端下插。每个处理一般接种 30 块,设置 3 次重复。

1.2 培养条件

以 MT 为基本培养基,根据试验要求附加不同浓度的 BA、KT、NAA、IAA、IBA 及 2,4-D,每天光照 12 h,培养温度为 26±1 °C。

2 结果与分析

2.1 不同植物激素对外植体出芽的影响

取广藿香的叶片和带节茎分别接种至 MT、MT+BA 0.5 mg/L、MT+KT 0.5 mg/L、MT+2,4-D 0.5 mg/L、MT+IAA 0.5 mg/L、MT+IBA 0.5 mg/L、MT+NAA 0.5 mg/L 七种培养基中。从表 1 可知,添加细胞分裂素 BA 或 KT,对出芽有较好的效果,出芽率达 100%,而且,单个外植体出芽的数量也较多,如附加 BA 的处理,叶片及带节茎出芽数分别达 77.33 个及 156.33 个。添加生长素的处理,以 IAA 效果较好,叶片及带节茎的出芽率分别为 85.18%及 96.30%,而 2,4-D 及 NAA 对出芽都有抑制作用,在含有 2,4-D 的培养基上,基本未能诱导出芽,附加 NAA 时,出芽率也比对照明显降低,长出的芽生长不正常,在芽的基部长出少量灰白色愈伤组织,生长缓慢,植株矮小。叶片及带节茎比较结果表明,带节茎更易于出芽,在没有激素的 MT 培养基上,出芽率可达 94.44%,添加 BA 或 KT,单个外植体出芽数量明显上升。

表 1 不同植物激素对叶片及带节茎出芽的影响

Table 1 Effect of different hormones on shoot formation cultured by leaf segments and nodular stem segments

培养基 Medium (mg/L)	叶片 Leaf segment		带节茎 Nodular stem segment	
	出芽率 (%) Frequency of shoot formation	单个外植体出芽数(个) Number of shoots from single segment	出芽率 (%) Frequency of shoot formation	单个外植体出芽数(个) Number of shoots from single segment
MT	0.560.18±1.61	3.33±1.53	94.44±9.62	3.67±1.57
MT+BA 0.5	100±0	77.33±4.33	100±0	156.33±5.51
MT+KT 0.5	100±0	41.00±5.29	100±0	99.33±1.53
MT+2,4-D 0.5	0	0	1.85±3.20	1.33±0.58
MT+IAA 0.5	85.18±13.98	18.00±3.00	96.30±6.41	40.33±8.02
MT+IBA 0.5	30.00±8.66	1.67±0.58	92.59±6.41	4.33±0.58
MT+NAA	7.41±8.49	1.33±0.58	74.08±12.81	3.33±0.58

2.2 不同 BA 浓度对外植体出芽的影响

从表 2 可知,不同浓度的 BA 对诱导出芽有明显的差异。在不含 BA 的 MT 培养基上,也有较高的出芽率,但单个外植体诱导芽的数量少,仅为 3~4 个。附加 BA,出芽率和出芽数明显增加。叶片培养时,适宜的 BA 浓度为 0.1 mg/L~1.0 mg/L,出芽率达 100%,出芽数也较多,生长健壮;带节茎适合的 BA 浓度为 0.1 mg/L~0.5 mg/L。叶片和带节茎培养,适宜的 BA 浓度范围有所不同,可能由于外植体内原有激素水平不同造成的。带节茎带有芽

点,其体内所含的激素水平可能比叶片高,培养时所需的激素浓度相对要低些。从表 2 还可看出,随 BA 浓度继续升高,对出芽又表现抑制作用,如 BA 为 2.0 mg/L 时,叶片及带节茎出芽率及出芽数明显降低,而且长出的芽生长不良,芽致密、细小,生长缓慢。

2.3 不同外植体出芽能力的差异

广藿香不同外植体:叶片、带节茎、不带节茎及根尖,在附加 BA 0.1 mg/L 的培养基上进行培养,结果如表 3。广藿香的 4 种外植体均能不同程度地

诱导芽的发生(图版 I : 1-4),其中带节茎出芽速度最快,培养 10 d 时,86.11%的外植体已长出芽,而根尖最慢,30 d 后,才有少量外植体形成芽。培养 30 d 时,叶片及带节茎出芽率均达 100%,不带节茎次之,出芽率为 85.18%,而根尖出芽率最低,仅为 13.89%。单个外植体出芽的数量,以带节茎最多,

达 202.0 个,而根尖出芽数最少,仅为 3.0 个,且芽生长不良,叶片细小并有玻璃化现象,茎秆纤细,生长缓慢。因此,广藿香在进行无性系快速繁殖、遗传转化及人工诱变时,无菌苗的叶片、带节茎及茎段均可以作为培养的材料,附加低浓度的 BA 就能获得较高的再生频率。

表 2 不同 BA 浓度对叶片及带节茎出芽的影响

Table 2 Effect of BA concentration on shoot formation cultured by leaf segments and nodular stem segments

BA 浓度 Concentration of BA (mg/L)	叶片 Leaf segment		带节茎 Nodular stem segment	
	出芽率 (%) Frequency of shoot formation	单个外植体出芽数(个) Number of shoots from single segment	出芽率 (%) Frequency of shoot formation	单个外植体出芽数(个) Number of shoots from single segment
0	76.85±1.61	3.67±1.53	88.87±9.62	3.33±1.53
0.1	100±0	54.00±4.58	100±0	201.67±3.06
0.5	100±0	67.67±6.66	100±0	141.67±7.64
1.0	100±0	43.33±7.64	53.70±11.57	1.67±0.58
2.0	33.33±8.34	26.67±7.69	10.18±11.23	1.33±0.58

表 3 不同外植体出芽能力比较

Table 3 Comparison about the ability of shoot formation from different explants cultured

外植体 Explants	培养不同天数的出芽率 Frequency of shoot formation (%)			接种 30 d 单个外植体出芽数(个) Number of shoots from single segment after 30 d culture
	10 d	20 d	30 d	
叶片 Leaf segment	0	97.22±8.93	100±0	51.67±3.06
带节茎 Nodular stem segment	86.11±4.82	100±0	100±0	202.00±7.55
不带节茎 Stem segment	0	80.56±4.62	85.18±3.21	115.33±5.03
根尖 Root tip	0	0	13.89±4.82	3.00±1.00

表 4 外植体在培养基中放置方式对出芽的影响

Table 4 Effect of explant orientation on shoot formation

外植体放 置方式 Explant orientation	培养不同天数的出芽率 Frequency of shoot formation (%)		接种 30 d 单个外 植体出芽数(个) Number of shoots from single segment after 30 d culture
	10 d	20 d	
形态学下端下插 Apical end of the segment protruding	90.00±10.00	100±0	196.67±7.64
形态学上端下插 Basal end of the segment protruding	76.67±15.28	100±0	16.00±11.53
水平放置 Horizontal	51.67±12.58	100±0	39.67±13.80

2.4 外植体在培养基中放置方式对出芽的影响

以广藿香带节茎为材料,采用 3 种接种方式:形态学下端朝下垂直插入(直插)、形态学上端朝下垂直插入(倒插)及水平放置(平放),分别接种于 MT+BA0.1 mg/L 培养基中,结果见表 4。培养 1 周左右,外植体两端有所膨大,并在叶腋处长出 1~2 个小芽。以直插外植体出芽速度最快,接种 10 d

后,出芽率已达 90.0%,倒插及平放的外植体出芽率均较低,分别为 76.67% 及 51.67%,培养 20 d 时,3 种接种方式出芽率均达到 100%。培养 30 d 后,统计单个外植体出芽的数量,以直插最高,达 196.67 个,而倒插仅为 16.0 个。不同接种方式的外植体在出芽速度及出芽数上的差异,可能与外植体内激素的分布及再分配能力等因素有关。

2.5 无根苗生根

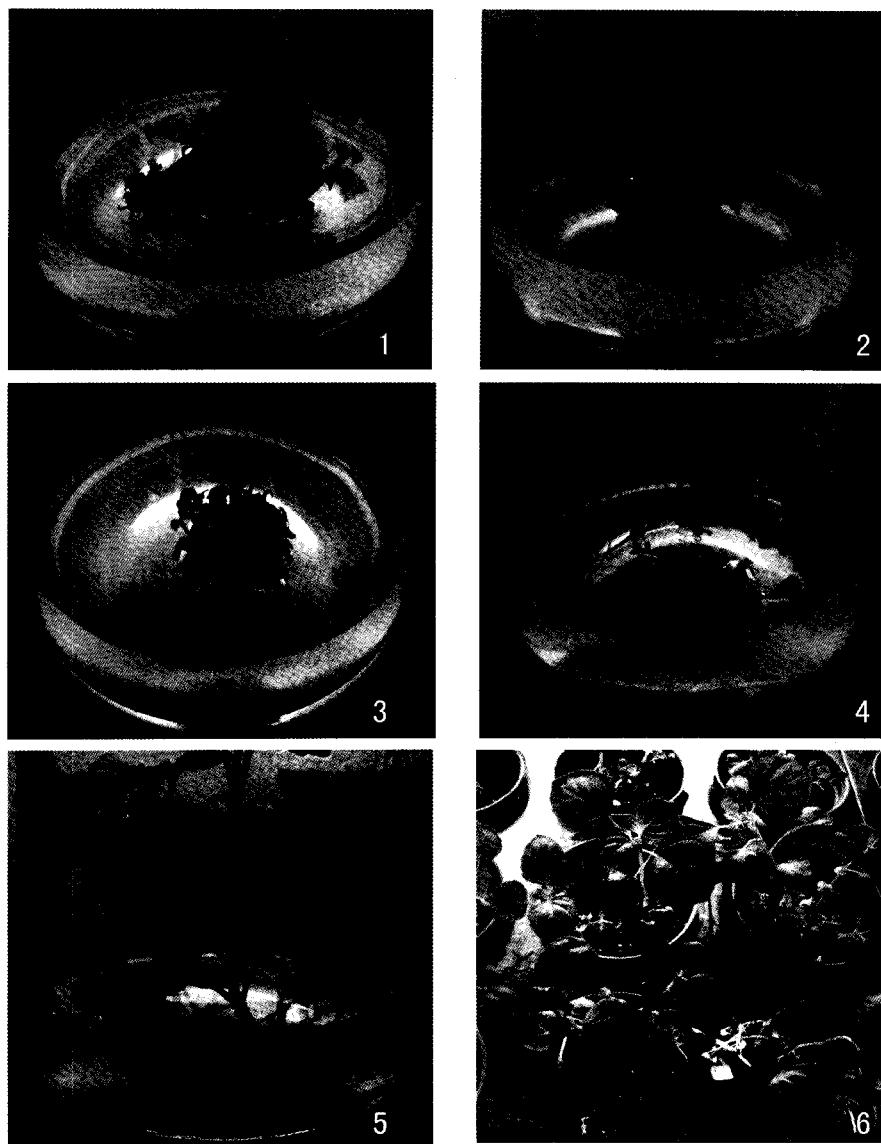
广藿香组培苗在没有添加激素的 MT 培养基上,亦能少量生根。为了促进根的生长旺盛,截取 3~4 cm 长的无根苗分别接种于 MT、MT+NAA0.2 mg/L、MT+IAA0.2 mg/L、MT+IBA0.2 mg/L 四种培养基中,观察其生根情况。结果表明,广藿香的无根苗在 4 种培养基种上均能长出根(图版 I : 5),接种 10 d 后生根率均为 100%。根的生长状况,以附加 IBA 的培养基效果最好,长出的根生长旺盛,植株生长良好。IAA 处理次之。而在含有 NAA 的培养基中,在根茎交接处,长出少量的愈伤组织,可能对上部茎叶的生长有一定的抑

制作用, 植株生长矮小, 生长缓慢。因此, 无根苗生根, 选择 MT+IBA0.2 mg/L 培养基效果较好。

2.6 试管苗移栽

将已经生根的健壮的广藿香试管苗, 转入装有

已消毒细沙的塑料杯中炼苗, 添加 MT 培养液作养分, 杯上罩上透明塑料袋保湿, 1 周左右将塑料袋移去, 使试管苗适应自然环境, 3 周左右可长出新根及新叶, 再将其移栽于露天种植, 一般成活率在 90%



图版 I 1. 叶片出芽; 2. 带节茎出芽; 3. 不带节茎出芽; 4. 根出芽; 5. 无根苗生根; 6. 试管苗移栽。

Plate I 1. shoots formation from leaf segment; 2. shoots formation from nodular stem segment; 3. shoots formation from stem segment; 4. shoots formation from root tip; 5. root formation from the regenerated shoots; 6. the transplant plantlets.

左右(图版 I :6)。

3 讨论

建立高效稳定的组织培养再生体系是利用遗传转化技术获得转基因植株的重要前提之一, 前人在其它植物方面做了较多的工作(李群等, 2004; 李国

平等, 2005)。广藿香的组织培养, 已有的报道主要是先诱导胚性愈伤组织, 再经体胚发生再生植株(张家明等, 1994), 再生时间较长。同时, 采用的外植体大多是叶片及茎段(肖省娥等, 2001; 杜勤等, 2002), 还未见根尖培养再生植株成功的报道。本试验以广藿香多种外植体为材料, 诱导直接出芽, 较大地提高(下转第 668 页 Continue on page 668)

现,随着座果日龄的增加,二糖甙逐渐减少,而相应三糖甙,四糖甙,五糖甙逐渐增加,成熟罗汉果以五糖甙为主,这种现象提示,罗汉果五糖甙(甜甙)可能是以幼果中的二糖甙作为前体,经历一个复杂的生源以葡萄糖残基逐步地转移,依次形成呈强甜味的四糖甙,五糖甙过程。这与文献报道结果一致(李典鹏等,2004)。为未成熟罗汉果为无味的或苦味的,而成熟罗汉果为甜味的这一事实提供科学证据。(2)通过实验发现,第50天后,罗汉果甙V的含量增加较快,作为罗汉果的主要甜味物质,甙V的含量影响到罗汉果的品质,因此用于提取甜味剂的罗汉果,其果龄应该在85d以上,而不应该是目前沿用的65~70d。在开展罗汉果规范种植同时,制定严格科学的采收标准,以保证罗汉果的质量。(3)HPLC法测定罗汉果甜甙简便易行,稳定性好,准确度高,适用于罗汉果品质的检验、确定罗汉果的最佳采收日期以及控制罗汉果深加工产品的质量。

参考文献:

- 中华人民共和国卫生部药典委员会. 2005. 中华人民共和国药典[M]. 北京:化学工业出版社:148
李锋,李典鹏,蒋水元,等. 2003. 罗汉果栽培与开发利用[M]. 北京:中国林业出版社

(上接第661页 Continue from page 661)

了出芽速度,同时考察了不同外植体、激素种类及浓度、外植体在培养基中放置方式等多种因素对出芽的影响,获得了很高的不定芽分化频率,为遗传转化工作的开展及转化效率的提高创造了条件。

人工诱变与植物组织培养技术相结合,较易获得数量较大而且较为一致的诱变群体,且能在有限的空间内对大量诱变群体进行选择,同时对突变材料在短期内进行扩大繁殖,产生数量较多的突变群体。许多研究表明,诱发突变与植物组织培养技术相结合能够大大提高突变频率(刘进平等,2004)。本试验以广藿香多种外植体为材料,获得了快速高效的植株再生系统,有利于将广藿香组织培养与人工诱变技术相结合,以促进诱变育种的进步,提高选择效率,从而加速育种的进程。

参考文献:

- 广东中药志编委会. 1994. 广东中药志(第1卷)[M]. 广州:广东科技出版社:13-16
国家药典委员会. 2000. 中华人民共和国药典(一部)[M].

- 竹本常松,在原重信,中岛正,等. 1983. 罗汉果成分研究(I)[M]. 药学杂志(日),103:1-151
Kasai R, Nie Rui Liu, Nashi K, et al. 1989. Sweet cucurbitane glycosides from fruits of *Siraitia siamensis* (chi-zi Luo-han-guo) a Chinese folk medicine[J]. *Agric Biol Chem*, 53(12): 3-374
Li DP(李典鹏), Chen YY(陈月园), Pan ZH(潘争红), et al. 2004. Study on variation of mogrol glycosides from fruits of *Siraitia grosvenorii* in different growing ages(不同日龄罗汉果甙类变化研究)[J]. *Guihaia*(广西植物), 24(6): 546-549
Li DP(李典鹏), Huang YL(黄永林), Liu JL(刘金磊), et al. 2006. Quantitative determination of mogrosides II E and III in the fruit of *Siraitia grosvenorii* by HPLC(HPLC法测定罗汉果中罗汉果苷II E、III的含量)[J]. *Nat Product Res Development*(天然产物研究与开发), 18(5): 850-853
Matsumoto K, Kasai R, Ohtani k, et al. 1990. Minor cucurbitane glycosides from fruits of *Siraitia grosvenorii* (Cucurbitaceae)[J]. *Chem Pharm Bull*, 38(7): 2-030
Si JY(斯建勇), Chen DH(陈迪华), Chang Q(常琪), et al. 1996. Isolation and determination of cucurbitane-glycosides from fresh fruits of *Siraitia grosvenorii*(罗汉果中三萜甙的分离和结构测定)[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报), 38(6): 489-494
Wang YP(王亚平), Chen JY(陈建裕). 1992. Studies on chemical constituents of *Siraitia grosvenorii*(罗汉果化学成分的研究)[J]. *Chin Trad Herb Drugs*(中草药),
Xu WK(徐位坤), Mong LS(孟丽珊), Li ZY(李仲瑶). 1992. Isolation and identification of a bitter constituent from Luo-han-guo's unripe fruits(罗汉果嫩果中一个苦味成分的分离和鉴定)[J]. *Guihaia*(广西植物), 12(2): 136-138

2000版. 北京:化学工业出版社:33

- Du Q(杜勤), Wang ZH(王振华), Xu HH(徐鸿华), et al. 2002. The prepare of breed plant of *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth(石牌广藿香试管苗的研制)[J]. *China J Chin Mat Med*(中国中药杂志), 27(3): 179-181
Liu JP(刘进平), Zheng CM(郑成木). 2004. Induced mutation in connection with *in vitro* culture for crop breeding(诱变结合植物组织培养在植物育种中的应用)[J]. *Acta Agric Shang Hai*(上海农业学报), 20(1): 19-22
Li Q(李群), Liu GY(刘光勇), Wang L(王丽). 2004. Effect of hormone on plantlet regeneration and studies of root regeneration culture of *Eustoma* sp.(激素对洋桔梗植物再生的影响及生根培养的研究)[J]. *Guihaia*(广西植物), 24(1): 40-42
Li GP(李国平), Huang QC(黄群策), Qin GY(秦广雍). 2005. *In vitro* culture of *Hedyotis diffusa* leaves and establishment of regeneration system(白花蛇舌草叶片离体培养及试管无性系的建立)[J]. *Guihaia*(广西植物), 25(1): 455-458
Xiao S E(肖省娥), He H(贺红), Xu H H(徐鸿华). 2001. Study on the tissue culture and plant regeneration of *Pogostemon cablin*(广藿香组织培养与植株再生研究)[J]. *J Chin Med Mat*(中药材), 24(6): 391-392
Zhang JM(张家明), Zhen XQ(郑学勤), Sun XP(孙雪飘). 1994. Plant regeneration from somatic cells of *cablin* Patchouli (*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth)(广藿香体细胞培养植株再生的研究)[J]. *Chin J Trop Crop*(热带作物学报), 15(1): 73-77