

3 讨论

试验结果表明:独活种子经浸种后,在20℃、光照条件下,发芽率较高。因此,在生产中独活播种前应进行一定时间的浸种处理,播种深度不宜太深。

去果皮和浸种均可提高独活种子的发芽率,同时独活果实水浸液对小白菜种子的发芽具有抑制作用,表明在独活果实中确实存在种子发芽抑制物质,在生产中应加以去除。才谦等在重齿毛当归等当归属多种植物中均发现了多种香豆素的存在^[6],而香豆素类成分正是一种种子发芽抑制物质。独活果皮中香豆素成分是否对其种子发芽起主要抑制作用及其作用机制均有待进一步研究。

致谢:湖北省中药研究所陈平教授,三九药业杨金兵先生的帮助。

References:

- [1] Wang Z Z, Su Z W, Li C H, et al. Bencaological study and resource investigation on traditional Chinese drugs Duhuo, Jiuyanduhuo and Qianghuo [J]. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1995, 20(9): 515-517.
- [2] Sun Z L, Yang G Z. *Practical Technology for Seeds Inspection* (实用种子检验技术) [M]. Beijing: Agricultural Press, 1993.
- [3] Sanahara T, Utsunormiya H, Katano M, et al. Cultivation of *Bupleurum falcatum* L. III. Growth and development of seeding sowed in Autumn [J]. *Pro Crop Sci Society Japan*, 1992(11): 51.
- [4] Zhang X B, Li A L, Zhang W M, et al. Advance on research in seeds dormancy of medicinal plants [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1997, 28(6): 376-378.
- [5] Cai Q, Shan M, Yang S S. Determination of columbianetin, columbianetin acetate and osthol in *Angelica pubescens* Maxim. f. *biserrata* Shan et Yuan by HPLC [J]. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1999, 24(9): 552-554.

灯盏花快速繁殖体系的建立

刘成洪,张孟魁,邓 华,张 磊,王 凯,张汉明*

(第二军医大学药学院,上海 200433)

摘 要:目的 为加速灯盏花的人工种植与品种改良,利用组织培养技术建立灯盏花快速繁殖体系。方法 利用种子直接萌发的无菌苗在培养基培养加速种苗繁殖,通过在消毒前对种子进行预处理,采用合适时间消毒种子来减少消毒剂对种子伤害从而提高发芽率;采用不同激素配比从叶片与叶柄诱导愈伤组织,并进一步分化获得再生植株。结果 种子去除冠毛后0.1% HgCl₂消毒6 min可获得最佳发芽率,MS₀上培养一个月后即可获得生长健壮的幼苗用于移栽;利用无菌苗的叶柄在MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L培养基上获得了大量分化能力强的愈伤组织,愈伤分割后在该培养基上可继续分化出苗,分化苗转接到MS₀上可形成正常植株。结论 利用种子灭菌处理获得无菌苗用于组织培养可实现灯盏花快速繁殖和缩短人工育苗时间。

关键词:灯盏花;种子消毒;快速繁殖

中图分类号:R282.21

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2005)04-0597-03

Establishment of rapid propagation system of *Erigeron breviscapus*

LIU Cheng-hong, ZHANG Meng-kui, DENG Hua, ZHANG Lei, WANG Kai, ZHANG Han-ming

(College of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Key words: *Erigeron breviscapus* (Vant.) Hand.-Mazz.; seed sterilization; rapid propagation

灯盏花又名灯盏细辛,原植物系菊科植物短葶飞蓬 *Erigeron breviscapus* (Vant.) Hand.-Mazz., 多年生草本,其干燥全草入药。灯盏花制剂在临床上主要用于心脑血管等疾病的治疗,近年来研究还表明该类制剂具有多种疗效^[1,2]。目前灯盏花野生资源由于多年采挖已遭到严重破坏,其主产地云南已开

展了人工种植研究^[3]。在灯盏花组织培养方面,已有通过幼苗消毒处理获得无菌苗^[4]和利用花盆消毒处理后诱导再生植株^[5]的初步报道,但这些方法由于材料来源限制不利于进行快速繁殖,本研究旨在通过种子消毒处理直接萌发的无菌苗在培养基上培养加速种苗的繁殖过程,并进一步诱导出再生植株建

收稿日期:2004-07-27

作者简介:刘成洪(1975-),男,湖北人,第二军医大学药学院生药学专业博士研究生,主要从事药用植物基因工程的研究。

Tel: (021)65513056 E-mail: dainney@etang.com

* 通讯作者 Tel: (021)65513056 E-mail: hmzhang@smmu.edu.cn

立起快速繁殖体系,为灯盏花的大面积人工种植与利用生物技术实施品种改良提供条件。

1 材料与方法

1.1 材料:灯盏花药材种子购自云南楚雄星升生物技术有限公司,为当年采收种子。

1.2 方法

1.2.1 种子消毒:灯盏花种子去除瘪粒及碎梗等杂物后,用手指揉搓去除种子前端冠毛,转到40目筛上除冠毛,转入50 mL小三角瓶中,加入一滴洗涤剂,用纱布封口,置于自来水下冲洗0.5 h后滤干水移至超净台上,用无菌水冲洗2次,加入75%乙醇浸泡1 min,无菌水冲洗2次,加入0.1%氯化汞后封口置于摇床上80 r/min振荡3~15 min后,用两倍体积无菌水冲洗4次,最后将种子转到不含任何激素的空白MS(MS₀)培养基上培养。室温(25±1)℃,光照10~12 h/d,光照强度2 000 lx(下同)。试验设置3个重复,每个重复50粒种子,10 d后统计发芽率。同时将种子置于大培养皿中润湿滤纸上水培发芽作为对照。

1.2.2 愈伤组织的诱导与分化:利用获得的无菌苗,将其叶片分割成块状(大小约0.5 cm²),叶柄分割成段(长约1 cm),置于不同激素浓度组合的培养基上诱导愈伤组织,每种培养基接种40个外植体,一个月后统计愈伤组织诱导结果;切取生长迅速的绿色愈伤组织,转接到6号培养基上继续培养,到分化芽长到约1 cm左右时切取芽转接到MS₀培养基上形成小植株。

1.2.3 再生苗的移栽:将以上种子实生苗与组培再生苗移栽到配制的培养基质(蛭石:珍珠岩:腐殖质:碎土=4:1:3:2)上,组培室内培养,培养钵底部浸入少量水中以保持湿润,最初一个星期每天喷施一次营养液(MS液体培养基),以后改为每3天喷一次水。

2 结果与分析

2.1 预处理与消毒时间对种子萌发获得无菌苗的影响:对种子消毒前进行简单预处理,可以缩短消毒时间,而消毒时间的选择既要保证种子萌发过程中无污染出现,又要最大程度地减少消毒过程对种子造成的伤害。通过种子水培发芽观察到首先出现污染的种子冠毛保留得比较完整,而冠毛残存较少的种子出现污染的机率相对较小(图1);在MS₀固体培养基上培养的经0.1% HgCl₂消毒过的种子在发芽过程中也可以观察到上述现象,这表明种子冠毛带菌较多,不容易彻底消毒,因此消毒前进行简单预处理去除种子冠

毛对于提高无菌苗得率是必要的。为了清洁种子表面,在预处理中加入了洗涤剂并用自来水冲洗,这样处理使种子消毒更为彻底,减少污染。HgCl₂的消毒处理时间对种子的发芽率影响较大,见表1,其中0.1% HgCl₂ 4 min的处理试验中种子在发芽后的一周出现严重污染。由表1可见,种子经0.1% HgCl₂处理后发芽率受到了一定的影响,而选择6 min的处理时间可以获得最佳发芽率,同时观察到未经消毒处理的种子在第3天左右开始发芽,而消毒处理的种子在第5天左右开始发芽,这表明消毒处理对灯盏花种子萌发速率也有一定影响。



图1 种子在滤纸上水培发芽

Fig. 1 Seed germination on filter paper soaked in water

表1 0.1% HgCl₂处理时间对灯盏花种子发芽率的影响(n=3)

Table 1 Effect of 0.1% HgCl₂ treatment time on germination rate of *E. breviscapus* seed (n=3)

对照	0.1% HgCl ₂ 处理时间/min				
	4	6	8	12	15
85	44	65	51	2	0

2.2 不同激素对比对叶片与叶柄愈伤组织诱导的影响:灯盏花种子萌发后从基部长出多丛叶片,以叶片和叶基部的叶柄为外植体在不同激素组合下诱导愈伤组织,观察到叶片难以诱导出愈伤组织,8个激素配比培养基中只有极少数叶片长出愈伤组织,大多数只是膨大卷曲;而叶柄则容易诱导出愈伤组织,诱导结果见表2。2号培养基愈伤诱导率最高,但观察到6号培养基诱导的愈伤组织生长最为迅速,平均体积最大(图2),并且诱导的愈伤团经分割后转接到6号培养基上可以继续分化出芽,这表明6号培养基适宜愈伤组织的进一步增殖与分化。分化芽长到1 cm左右时切下转到MS₀培养基上能够形成完整植株,因此可以通过叶柄诱导愈伤组织后再生植株,建立一个组培苗再生繁殖体系。

2.3 移栽条件对试管苗成活的影响:通过种子发芽与组培培养获得的无菌苗在MS₀培养基上培养一

个月后可以迅速长成健壮小植株,形成发达根系,长度可达4~5cm。发达根系的形成对于试管苗的移

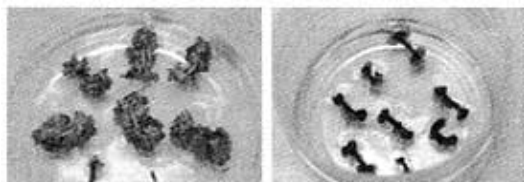


图 2 6号(左)与2号(右)培养基上生长的愈伤组织形态

Fig. 2 Form of callus cultured on No. 6 (left) and No. 2 (right) media

表 2 不同激素对比对灯盏花叶柄愈伤组织诱导的影响
Table 2 Effect of different hormone combination on callus inducement of *E. breviscapus* petiole

培养基 编号	6-BA/(mg· L ⁻¹)	NAA/(mg· L ⁻¹)	出愈率 /%	愈伤生长数量		
				+++	++	+
1	1	0.5	92.5	13	19	5
2	1	1	100	11	24	5
3	1	2	97.5	25	13	1
4	1	3	95	2	33	3
5	2	0.5	90	12	20	4
6	2	1	90	14	19	3
7	2	2	95	8	24	6
8	2	3	55	8	12	2

“+++”表示叶柄切段全部长满愈伤 “++”表示切段两端长满愈伤
“+”表示切段只有一端长满愈伤。

“+++” represents whole petiole segment covered with callus “++” represents both ends of segment covered with callus “+” represents only one ends of segment covered with callus

栽成活具有重要影响,移栽时要避免损伤根系,同时用清水轻轻洗净根部附着琼脂以防移栽苗根部腐烂,本试验中所有移栽苗均全部成活,生长良好(图3)。试管苗从无菌环境移栽到开放环境中很容易污染而迅速死亡,因此培养基质进行适当的灭菌处理是必要的,本移栽基质配制后经高压灭菌处理放置过夜后用于移栽未出现苗污染死亡现象。试管苗在培养基中可以通过根部获取充足养分而迅速生长,移栽到基质中后根部还需要一个生长恢复阶段,养分供应暂时无法跟上,因此移栽初期应给予叶片喷施营养液以补充养分。

3 讨论



图 3 移栽基质中生长良好的植株

Fig. 3 Grown well plantlet in transplant medium

灯盏花种子形成数量虽然很多,但种子瘦小,成熟率低,自然繁殖慢,在人工栽培中存在种苗繁殖困难,植株长势弱易受病害侵染,育苗周期长(80~90 d)等问题^[6]。而本研究通过种子灭菌处理后利用培养基发芽与再培养,可以迅速促进幼苗生长,40~50 d 即可获得健壮植株用于移栽,大大缩短了育苗周期。已有报道利用幼苗或花盆消毒处理获得无菌苗用于快繁,但这些方法材料来源有限并有获取时期限制难于实现规模化快繁,而种子收获后可以贮藏便于选择利于移栽种植的时期前进行大量繁殖。本研究利用灯盏花叶柄诱导获得了生长迅速分化能力强的愈伤组织并再生出完整植株,也为进一步利用生物技术对灯盏花植株进行品种改良提供了条件。

References:

- [1] Liu H, Yang X L, Xu H B. Advances in studies on *Erigeron breviscapus* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(6): 566-568.
- [2] Xiong J, Dai E Q, Guo S L. Recent study and application of breviscapin on cerebral vessels disease treatment [J]. *Mod J Integrated Tradit Chin West Med* (现代中西医结合杂志), 2003, 12(3): 329-330.
- [3] Yu H Y, Chen Z L. Study on artificial culture of *Erigeron breviscapus* [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 2002, 24(3): 115-120.
- [4] Lin C, Liu H G, Su Y B, et al. A brief report on the rapid propagation of herbal erigerontis [J]. *J Yunnan Agric Univ* (云南农业大学学报), 2003, 18(3): 323-326.
- [5] Yang Y W, Qian Z G, Duan M. Primary study on tissue culture of *Erigeron breviscapus* [J]. *J Yunnan Coll Tradit Chin Med* (云南中医学院学报), 2002, 25(2): 12-13.
- [6] Lin C, Liu H G, Yu X L, et al. Advances in studies on *Erigeron breviscapus* [J]. *Chin Wild Plant Resour* (中国野生植物资源), 2003, 22(1): 8-11.

《中草药》杂志为中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)

中国科学技术信息研究所经过多项学术指标综合评定及同行多位专家评议推荐,我刊被收录为国家科技部“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊)。