

耐寒茵陈蒿试管苗培养的研究

吕俊俐,荆 婷,张 瑜,杨文新,姜长阳

(辽宁师范大学 生命科学学院,辽宁 大连 116081)

摘要:为保存和利用耐寒茵陈蒿资源,以具有侧芽或顶芽的分枝嫩茎为材料,采用组织培养的方法,对茵陈蒿进行了生根培养、生根继代增殖培养以及试管苗的移栽和定植的研究。结果表明:1/2MS+NAA 0.08 mg·L⁻¹是具有顶芽或侧芽分枝嫩茎段生根培养生长为试管苗的适宜培养基;向培养瓶中加入 10 mL 浓度为 15 mg·L⁻¹的 NAA 溶液处理 4 h 后,把具有 2 个侧芽或者具有 1 个顶芽和 1 个侧芽的试管苗茎段,接种到 1/2MS 培养基上进行生根增殖培养的方法是试管苗生根增殖培养的理想方法。试管苗移栽成活率在 96.0% 以上;定植成活率在 99% 左右;定植的试管苗不仅保持了野生茵陈蒿的所有植物学性状,而且还保持了耐寒变异性状。

关键词:茵陈蒿;耐寒变异;试管苗

中图分类号:S567.2

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2013)02-0010-04

茵陈蒿(*Artemisia capilaris*)是菊科蒿属草本植物^[1],生长在沙质的河、湖、海岸,也生长于干燥丘陵地、草原、山坡和灌丛等环境中。分布于我国的很多地区,包括辽宁的大连、丹东和营口等地区^[2-3]。茵陈蒿的地上部分含柠檬烯、月桂烯、苯乙炔等挥发性成分。作为草药用,具有清热解毒退黄等功效,能治湿疮瘙痒、小便不利和黄疸等疾病^[4]。嫩茎叶可作野菜食用^[5],是近年来大连地区人们经常食用的野菜之一,每年春天人们都要到大连远郊采摘食用。正是由于茵陈蒿既是重要的草药,又是常见的野菜,多年来人们大量采收,使大连市近郊茵陈蒿基本绝迹,成了濒危植物。此外,不论是作为草药,还是用作野菜,都只能使用春天 3、4 月份的幼苗。即使在我国北方的大连,过了 4 月,茵陈蒿就丧失了食用和药用价值。所以,我国早有“三月茵陈四月蒿,七八九月当柴烧”之说。这不仅说明药用的茵陈蒿必须在春天采集,也说明具有价值的茵陈蒿采集的时间很短。但是,2005 年 12 月 6 日(当时大连的最低温度已经达到-4℃),研究者在对大连石门山的野生植物进行调查时,在一处没有特殊小气候的林缘旁发现了 1 株具有浓郁气味、生长旺盛的茵陈蒿。说明株茵陈蒿具有自然耐寒的有利变异植株。于

是,研究者将其挖出并栽到温室中,当其生长旺盛、植株长大时进行试管苗培养的研究,以期达到保存自然有利变异,使人们在冬季也能收获药用和食用茵陈蒿,从而把茵陈蒿的采集收获时间由每年春天的一季,扩大到春季和冬季两季。目前已有茵陈蒿化学成分研究的报道^[6-7],并且还有茵陈蒿组织培养和快速繁殖的报道^[8],但迄今未见具有耐寒性状茵陈蒿试管苗培养研究的报道。

1 材料与方法

1.1 材料及前处理

将在大连石门山发现的自然耐寒的有利变异的茵陈蒿幼苗挖回后,移栽到温室阳光充足地,并进行充足的肥水管理,待生长到高 30 cm、处于旺盛的营养生长期时,将其顶尖剪掉,促进分枝形成。20 d 后,待除掉了顶端优势出现 16 个长 8~16 cm 分支,向植株的地上部弥雾喷洒 20 mg·L⁻¹ 的青霉素溶液,进行灭菌。2 d 后将具有顶芽和侧芽的分支嫩茎采回实验室,作为培养材料。

材料灭菌参见郑媛媛等山麦冬的研究^[9];培养条件见高慧等翻白草的研究^[10]。

1.2 方法

1.2.1 嫩芽的生根培养 将无菌分枝嫩茎切成长 1.2 cm 左右、具有顶芽或侧芽分枝的嫩茎段,将其接种到以 1/2MS、White 为基本培养基,添加浓度各异的 NAA、IBA (0、0.04、0.08、0.12、0.16、0.20、0.24 mg·L⁻¹) 的培养基上,进行具有顶芽或侧芽分枝嫩茎段的生根培养试验。这种生根试验重复 2 次,每种处理接种 20 个茎段。

1.2.2 试管苗生根增殖培养 把由具有顶芽或

收稿日期:2012-12-10

基金项目:辽宁省普通高等教育本科教学改革研究资助项目(201203041-4);辽宁省大学生创新创业训练资助项目(201203015011)

第一作者简介:吕俊俐(1991-),女,山西省晋中市人,在读学士,从事植物组织培养研究。

通讯作者:姜长阳(1953-),男,辽宁省大连市人,学士,教授,从事植物技术研究。E-mail:changyangjiang@126.com。

侧芽分枝嫩茎段生根培养 42 d 的试管苗进行生根继代增殖培养的 4 种处理。处理 1:把培养的试管苗在培养瓶中剪成具有 2 个侧芽或者具有 1 个顶芽和 1 个侧芽的茎段后,接种到 1/2MS+NAA 0.08 mg·L⁻¹ 这种培养基上进行生根增殖培养;处理 2:向培养瓶中加入 10 mL 浓度为 15 mg·L⁻¹ 的 NAA 溶液处理 4 h 后,把试管苗在培养瓶中剪成具有 2 个侧芽或者具有 1 个顶芽和 1 个侧芽的茎段后,接种到 1/2MS 这种培养基上进行生根增殖培养;处理 3:操作过程在完全无菌的条件下进行,在培养瓶中把试管苗剪成具有 2 个侧芽或者具有 1 个顶芽和 1 个侧芽的茎段后,在浓度为 40 mg·L⁻¹ 的 IAA 溶液处理 0.5 h 后,接种到 1/2MS 培养基上进行增殖生根培养;处理 4:操作过程完全无菌的条件下,在培养瓶中把试管苗剪成具有 2 个侧芽或者具有 1 个顶芽和 1 个侧芽的茎段后,在浓度为 40 mg·L⁻¹ 的 IBA 溶液处理 0.5 h 后,接种到 1/2MS 培养基上进行生根增殖培养;生根继代增殖培养试验进行了 3 次重复,每种方法接种培养 150 个材料。

1.2.3 试管苗移栽与定植 把培养 20~22 d 还未长出茎的试管苗培养瓶塞打开,放到温室中炼苗 2~3 d 后,将试管苗取出,直接移栽到装有由 1/2 肥沃园土与 1/2 干净河沙混合土的营养钵中。移栽后 12 d 左右,待其成活并开始正常生长时,将其定植到没有特殊小环境的山林旁。移栽和定植分别于 2007 年 10 月 8 日(下称第一次定

植试验,前期移栽试验也简称为第一次移栽试验。)、2008 年 10 月 10 日(下称第二次定植试验)和 2011 年 10 月 11 日(下称第三次定植试验)进行了 3 次试验。移栽和定植后定期观察统计。

2 结果与分析

2.1 不同浓度生长素对生根的影响

接种后每隔 4 d 观察记录一次,培养至 42 d 时进行详细统计(见表 1)。不同基本培养基、不同浓度的生长素对具有顶芽或侧芽分枝嫩茎段生根培养的影响不同。在所使用的 2 种基本培养基中,以 1/2MS 为基本培养基的生根效果好;而在附加的 2 种生长素中,以附加浓度为 0.08 mg·L⁻¹ NAA 的生根效果好。也就是说 1/2MS+NAA 0.08 mg·L⁻¹ 这种培养基是具有顶芽或侧芽分枝嫩茎段生根培养生长为试管苗的适宜培养基。其生根率达到了 100%,并且试管苗生长较旺盛。试验表明,在 1/2MS+NAA 0.08 mg·L⁻¹ 培养基上培养 9 d 就有 55% 茎段生根生长为试管苗;然后,伴随着已经生根生长为试管苗的生长,其生根率不断增加,培养到 15 d 时,其生根率就达到了 100%;培养至 25 d 时,试管苗不长茎,但围绕着生长点会生长出 5~11 个叶片;从第 26 天开始,由中间的生长点逐渐生长出茎;培养到第 42 天时,试管苗就会生长为具有 5~13 条白色、7~12 片嫩叶、平均株高 3.3 cm、外观上生长旺盛的试管苗。

表 1 不同生长素对嫩茎生根培养的影响

Table 1 The effect of different growth substance on rooting culture of tender stems

基本培养基 Basic culture medium	NAA/mg·L ⁻¹	IBA/mg·L ⁻¹	培养茎段数 No. of cultural stems	生根率/% Rooting rate	试管苗长势 Seedling growth vigor
1/2MS	0	0	20	0	—
1/2MS	0.04	0	20	80	++
1/2MS	0.08	0	20	100	++
1/2MS	0.12	0	20	85	+
1/2MS	0.16	0	20	65	+
1/2MS	0.20	0	20	65	+
1/2MS	0.24	0	20	30	+
1/2MS	0	0.04	20	25	+
1/2MS	0	0.08	20	30	+
1/2MS	0	0.12	20	30	+
1/2MS	0	0.16	20	65	+
1/2MS	0	0.20	20	60	+
1/2MS	0	0.24	20	50	+

续表 1

Continuing Table 1

基本培养基 Basic culture medium	NAA/mg•L ⁻¹	IBA/mg•L ⁻¹	培养茎段数 No. of cultural stems	生根率/% Rooting rate	试管苗长势 Seedling growth vigor
White	0	0	20	0	—
White	0.04	0	20	35	+
White	0.08	0	20	30	+
White	0.12	0	20	55	+
White	0.16	0	20	75	+
White	0.20	0	20	50	+
White	0.24	0	20	45	+
White	0	0.04	20	0	—
White	0	0.08	20	15	+
White	0	0.12	20	25	+
White	0	0.16	20	25	+
White	0	0.20	20	45	+
White	0	0.24	20	35	+

注:++为长势旺盛;+为长势一般;—为不生长。下同。
Note:++ means luxuriantly growth;+ means general growth;— means no growth. The same below.

2.2 不同处理方法对试管苗生根增殖培养的影响

由表 2 看出,处理 2 对材料进行处理,试管苗生根增殖培养的效果最好,不仅生根数、生根率和平均每代重复试验的繁殖系数最高,而且试管苗的长势旺盛。这一结果说明,向培养瓶中加入 10 mL 浓度为 15 mg•L⁻¹ 的 NAA 溶液处理 4 h 后,把试管苗在培养瓶中剪成具有 2 个侧芽或者具有 1 个顶芽和 1 个侧芽的茎段后,接种到 1/2MS 这种培养基上进行生根增殖培养的方法是试管苗生根增殖培养的理想方法。把处理 2 生根增殖培养的试管

苗进行了 3 次重复试验,每次继代 7 代,接种培养 300 个材料的结果证明:培养 22 d 就能培养成不长茎、围绕着生长点生长出 6~13 个叶片,且外观上生长非常旺盛的试管苗;继续培养到 40 d 时,就会培养生长出一代以具有顶芽或侧芽分枝嫩茎段为材料生根培养 42 d 长势一致的旺盛试管苗。这一结果表明这种方法也是茵陈蒿试管苗生根增殖培养的理想方法。按照这种方法所得结果计算,1 株试管苗 1 a 能繁殖出约 4 万株生长着嫩茎的试管苗,也能繁殖出 7 万株不生长茎的试管苗。

表 2 不同处理方法对试管苗生根增殖培养的影响

Table 2 The effect of different treatments on tube seedlings propagation culture

处理 Treatment	接种材料 数量/段 No. of inoculation materials	生根数/条 Rooting number	生根率/% Rooting rate	试管苗长势 Tube seedlings growth vigor	平均每次重复试 验的增殖系数 Average propagation coefficient
1	150	116	77.3	++	2.8
2	150	150	100.0	++	3.4
3	150	89	59.3	+	1.6
4	150	64	23.3	+	1.4

2.3 试管苗移栽与定植

第一次移栽试验移栽了 248 株。移栽后 30 d 统计,成活了 241 株,成活率为 97.2%;第二次移栽试验移栽了 250 株。移栽后 30 d 统计,成活了 240 株,成活率为 96.0%;第三次移栽试验移栽了 316 株。移栽后 30 d 统计,成活了 312 株,成活率

为 98.7%。3 次移栽的成活率都在 96% 以上,表明试管苗移栽成活率较高,容易移栽成活。

第一次定植试验定植了 240 株。定植后 30 d 统计,成活了 238 株,成活率为 99.2%;第二次定植试验定植了 240 株。定植后 30 d 统计,成活了 237 株,成活率为 98.8%;第三次定植试验定植了

300 株。定植后 30 d 统计,成活了 298 株,成活率为 99.3%。3 次定植的成活率都在 98% 以上,说明在温室中移栽成活的试管苗,容易在无特殊小环境的山林旁定植成活,且成活率较高,容易定植成活。

2.4 定植成活试管苗的观察

试管苗定植后,每 7 d 观察统计记录 1 次。结果表明,3 a 共定植了 773 株,到 12 月 6 日共成活了 709 株,冬季的成活率为 91.7%。而同期定植的非耐寒茵陈蒿试管苗(试验中以非耐寒的茵陈蒿为材料进行了对照试验)已经全部冻死。由此证明,具有耐寒变异茵陈蒿的试管苗仍能保持耐寒的有利变异性状。定植成活的耐寒茵陈蒿试管苗,进入冬季的 12 月不仅保持了野生茵陈蒿叶面白色、芳香气味浓郁等所有植物学特征,而且根系非常发达,包括须根在内的根部,其大小与地上部分相当。但是,植株的生长速度却较缓慢,植株较小,不长茎。至 12 月上旬,已经定植了约 60 d 试管苗,其它上部分直径平均为 12.8 cm。虽然大小与野生的茵陈蒿幼苗一致,但其生长时间却延长了近一倍。

3 结论与讨论

黄振等^[8]对茵陈蒿的研究进行了芽的诱导研究,而该文研究采用具有顶芽或侧芽分枝嫩茎段直接进行生根培养,从而简化了培养过程,这更有利于试验和生产应用。黄振等的研究使用的生根培养基是 $1/2MS+NAA\ 0.1\ mg\cdot L^{-1}$,而该研究的生根培养基为 $1/2MS+NAA\ 0.08\ mg\cdot L^{-1}$ 。二者结果基本一致。

定植成活的耐寒茵陈蒿试管苗保持了茵陈蒿的所有植物学特征和耐寒性状,说明采用试管苗培

养的方法,能使野生茵陈蒿的有利变异性状保持不变,种质得到保存;同时还证明,采用这种耐寒试管苗技术,能使药用和食用茵陈蒿采收时间由每年春天的一季,变成了春天和冬天的两季,从而改写了“三月茵陈四月蒿,七八九月当柴烧”的历史。

该研究中,出现了试管苗生长缓慢的现象,产生这种现象的主要原因:一是试管苗本身就具有童龄期较长的特点^[11];二是由于其定植的时间是在 10 月 10 日前后,虽然大连地区此时还没有进入冬季,但是气温已经较低,并且气温正在迅速降低。在较低的温度条件下,也抑制了试管苗的正常生长。

参考文献:

- [1] 中国科学院北京植物所. 中国高等植物图鉴(第四册)[M]. 北京:科学出版社,1975:529.
- [2] 李书心. 辽宁植物志(下册)[M]. 沈阳:辽宁科学技术出版社,1991:518-519.
- [3] 韩全忠,王振兴. 大连地区植物志(下册)[M]. 大连:大连理工大学出版社,1993:768.
- [4] 南京中医药大学. 中草药大辞典(下册)[M]. 上海:上海科学技术出版社,2006:2044-2047.
- [5] 董淑炎. 营养保健野菜[M]. 北京:科学技术文献出版社,1996:395-397.
- [6] 董岩,王新芳,崔长军,等. 茵陈蒿的化学成分和药理作用研究进展[J]. 时珍国医国药,2008,19(4):874-876.
- [7] 谢韬,梁静钰,刘净. 茵陈化学成分和药理作用研究进展[J]. 海峡药学,2004,16(1):8-13.
- [8] 黄振,丁雪珍,任培华. 茵陈组织培养与快速繁殖[J]. 北方园艺,2011(19):116-118.
- [9] 郑媛媛,慈颖,曲杨乐,等. 山麦冬组织培养及无性系建立的研究[J]. 黑龙江农业科学,2009(5):14-16.
- [10] 高慧,李恬,李爽,等. 翻白草组织培养及无性系建立的研究[J]. 国土与自然资源研究,2010(4):84-85.
- [11] 安利佳,姜长阳. 植物组织培养导论[M]. 大连:辽宁师范大学出版社,1996:130-144.

Study on Clone Establishment of *Frigostabile Artemisia capillaris*

LYU Jun-li, JING Ting, ZHANG Yu, YANG Wen-xin, JIANG Chang-yang

(Life Science College of Liaoning Normal University, Dalian, Liaoning 116081)

Abstract: To preserve and use *frigostabile Artemisia capillaris* resources, with the method of tissue culture, tender stems with lateral bud and terminal bud of *Artemisia capillaris* were used as material to conduct the research on the rooting culture, root successive, transplantation of tube seedlings and stable planting of tube seedlings. The results showed that the ideal medium for rooting from lateral bud and terminal bud to tube seedlings was $1/2MS+NAA\ 0.08\ mg\cdot L^{-1}$. The ideal method was that inoculated two lateral buds or one lateral bud and one terminal bud which had been dealt with $10\ mL\ 15\ mg\cdot L^{-1}\ NAA$ for 4 hours into $1/2MS$. The percentage of transplant survival had been over 96.0% and the percentage of stable planting of tube seedlings had been almost 99.0%. The tube seedlings stable planted maintained all biological characteristics of the wild and the variation character of *frigostabile*.

Key words: *Artemisia capillaris*; variation character of *frigostabile*; tube seedling