

· 中药农业 ·

广豆根无菌播种产业化繁育技术研究[△]

李林轩, 梁莹, 秦双双, 缪剑华, 韦坤华*

广西药用植物园/广西药用资源保护与遗传改良重点实验室, 广西 南宁 530023

[摘要] 目的: 为推动广豆根种苗产业发展, 获得规模化快速成苗生产技术。方法: 以广豆根种子为外植体, 按照种子-丛生芽-植株-炼苗移栽的繁育途径, 对各阶段的培养基与其他影响因素开展研究, 结果: 结荚后生长 90~120 d 的种子在离体条件下均能萌发, 其中结荚 150~180 d 的种子萌发效果最好, 萌发率为 95.7%; 丛生芽增殖的最佳培养基为 $MS + 1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA} + 0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{IAA} + 0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{KT}$, 增值倍数约为 7 倍/30 d; 20 d 后转入 4000 lux 光照下培养 10 d, 获得叶片展开、木质化程度较高的健壮枝条; 将枝条转接到生根培养基 $1/2MS + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NAA} + 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{IBA} + 0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{AC}$ 上, 培养 20 d 后转入炼苗棚炼苗 10 d, 生根率达到 95%。在南宁地区, 生根苗以 3—5 月和 10—11 月为最佳移栽期, 以通过泥炭土、碳化稻谷壳和珍珠岩的质量比例为 4:4.5:1.5 混合后为基质, 移栽成活率可达 95%。结论: 通过组织培养技术建立了广豆根无菌播种规模化快速成苗生产技术, 推动广豆根种苗产业发展。

[关键词] 广豆根; 种子; 丛生芽

[中图分类号] R282.71 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2019)10-1392-05

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20190329001

Study on Industrialized Propagation Technology of Aseptic Seeding on *Sophora tonkinensis* Gagnep.

LI Lin-xuan, LIANG Ying, QING Shuang-shuang, MIAO Jian-hua, WEI Kun-hua*

Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plants, Guangxi Key Laboratory of Medicinal Resources
Conservation and Genetic Improvement, Nanning 530023, China

[Abstract] **Objective:** To develop the seedling industry of *Sophora tonkinensis* Gagnep. **Methods:** The effects of culture medium and other factors on the growth and reproduction of seeds (seed, cluster bud, transplanting plant, precision seedling) were studied by using the seeds of *Sophora tonkinensis* Gagnep as explants. **Results:** After pod setting, seeds growth for 90-120 days could germinate in vitro, Among them, the Seed Germination Effect of 150-180 days is the best, and the germination rate is 95.7%; The optimum medium for multiplication of cluster buds was $MS + 1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA} + 0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{IAA} + 0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{KT}$, The multiplication coefficient was 7 for 30 d; After 20 days, the materials were cultured under 4000 lux light for 10 days, the clustered buds grew rapidly, proliferated more, and the buds were robust; And then, the branches were transferred to rooting medium of $1/2MS + \text{NAA} 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{IBA} + 0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{AC}$ for 20 d before transferred to seedling shed, the rooting rate reached 95% after 10 days of seedling refining. The best transplanting time of rooting is March to May and October to November in Nanning city. Peat soil, carbonized rice husk and perlite are mixed according to the mass ratio of 4:4.5:1.5, and the survival rate of rooting seedlings is 95%. **Conclusion:** through the tissue culture technology, the large-scale and rapid seedling production technology of aseptic sowing of guangdougen was established to promote the development of guangdougen seedling industry.

[Keywords] *Sophora tonkinensis* Gagnep.; seeds; cluster buds

广豆根, 又称山豆根、南豆根, 为豆科植物越南槐 *Sophora tonkinensis* Gagnep. 的干燥根及根茎, 是著名的广西道地药材和常用中药, 为《中华人民共和

国药典》2015 版所收载^[1]。主要分布在广西、云南, 贵州亦有产, 但产量较小^[2]。广豆根药材味苦, 寒, 有毒, 具有清热解毒、消肿止痛等功效, 可以治疗喉

[△] **[基金项目]** 中央本级重大增减支项目(2060302); 广西科技计划项目(桂科 AD17129044); 广西科技基地和人才专项(桂科 2017AD19001); 广西医疗卫生适宜技术与开发项目(S201530); “广西八桂学者”专项经费; 桂林市科技计划项目重大专项(20180102-4)

* **[通信作者]** 韦坤华, 研究员, 研究方向: 药用植物生物技术研究; E-mail: divinekh@163.com

痢、喉风、喉痹、牙龈肿痛、喘满热咳、肝炎、便秘、黄疸、下痢、痔疾、秃疮、疥癣及蚊、虫、犬咬伤等^[3-4]。由于使用量的增加及药材使用与种植模式的改变,广豆根野生资源急剧下降,在某些区域几乎已经绝迹,很难满足市场需求^[5]。在野生资源的压力下,在过去的10年里,广豆根的药材价格增长了10倍左右,现在已经达到了210元/kg。在自然条件下,广豆根主要依靠种子进行繁育,但在开花结荚期广豆根的病虫害严重,且种子成熟时自然脱落的特性常造成种子产量低,生产上难以实现大面积栽培^[6]。

随植物组织培养技术的迅猛发展,许多濒危植物已经在组织培养工厂化生产上取得了成功^[7],对广豆根进行组织培养工厂化生产是最为快速获得广豆根种苗的途径,不仅可以解决市场需求不足的问题,对保护国家生态环境及药用资源都具有深远的意义。本研究通过无菌播种获取大量的基础生产材料,并通过丛生芽快速繁殖建立广豆根种苗的繁育体系,并应用于组织培养工厂化生产中,可以大大缩短生产周期,减低生产成本,提高种苗质量,从而提高种苗成活率及药材产量。

1 材料与方法

1.1 材料

广豆根野生植株引自靖西、那坡等地,种植于广西药用植物园广豆根种植基地,取其优良株系的果荚进行实验及生产。

1.2 方法

1.2.1 培养基及培养条件 以MS或1/2MS为基本培养基,植物生长调节剂选用6-BA、KT、NAA、IAA、IBA,根据实验目的和材料的生长情况添加不同的外源添加物(活性炭),并附20 g·L⁻¹蔗糖、0.5 g·L⁻¹的活性炭(AC)及4.0 g·L⁻¹的琼脂粉,pH值为5.8。培养基配置分装后于121℃、压力为105 Pa的条件下灭菌15 min。冷却后接入植物材料,在温度(25±3)℃,光照时间12 h·d⁻¹的条件下培养。

1.2.2 种子的灭菌消毒 采摘结荚后生长90~180 d的尚未开裂的果荚,用自来水洗去表面灰尘,并用刀片轻轻刮去表面的脏物,然后移至超净工作台内进行无菌操作,先放入75%乙醇中浸泡2 min后,转入0.1% HgCl₂溶液中消毒10 min,期间不断摇动,无菌水漂洗3遍,用无菌滤纸吸干材料表面水分后将果荚剖开,将里面的种子取出接种于培养基的表面。

1.2.3 种子成熟度对其萌发的影响 选取结荚后生

长90、120、150、180 d尚未开裂的广豆根果荚,灭菌消毒后转接到MS培养基上,培养30 d后分别观察种子的萌发情况并记录。

1.2.4 丛生芽的繁殖复壮一体化培养 以MS+0.2 mg·L⁻¹ AC为基本培养基,添加不同的激素组合(6-BA 0.5~2.0 mg·L⁻¹、KT 0~0.5 mg·L⁻¹)及单切接入由种子萌发后的胚,在不同时间放入不同的光照强度(日光灯光照强度2000~4000 Lux)下培养。30 d后,观测丛生芽生长的情况,筛选出丛生芽繁殖复壮一体化培养的最佳培养基配方。

1.2.5 生根炼苗同步化培养 将经过壮苗培养的健壮丛生芽分离成单芽,转移到不同的生根培养基中培养,实验中选定1/2MS+0.2 mg·L⁻¹ AC为基本培养基,附加不同质量浓度的NAA(0~1.5 mg·L⁻¹),生根培养30 d后统计生根率[(生根苗数/外植体数)×100%]和平均根数(根数/生根苗数)等指标,综合苗的生长情况,确定最佳生根培养基。

1.2.6 苦参碱及氧化苦参碱含量测定 参照《中华人民共和国药典》(2015)方法对广豆根组培苗不同时期(0个月、移栽3个月、移栽6个月)的根部药材进行含量检测,考察其有效成分含量。

2 结果与分析

2.1 种子的萌发培养

广豆根种子经消毒灭菌后播种到诱导萌发的MS培养基上进行培养,比较发现,不同成熟度种子的萌发情况不同,见表1。结荚后生长90~120 d的种子,萌发需时较长(60 d以上),生长缓慢,萌发率仅为42.5%,繁殖率低,大部分种子出现变黑、死亡的情况;结荚后120~150 d的种子,萌发时间短(25~40 d),生长较快,萌发率82.8%,少量种子变黑并死亡;结荚150~180 d的种子,萌发时间最短(15 d左右),30 d萌发率高达95.7%,且长出的芽健壮。因此,广豆根无菌播种应采用结荚后生长150~180 d未开裂的果荚为佳。

表1 不同成熟度种子的萌发情况

培养基组成	种子成熟度/d	萌发率/%
MS	90~120	42.5
	120~150	82.8
	150~180	95.7

2.2 丛生芽的繁殖复壮一体化培养

将种子萌发获得的丛生芽,单切转接到不同的光照和不同配方的培养基中进行继代增殖培养,结

果表明,不同光照和不同激素组合对广豆根的丛生芽继代增殖和生长情况有较大的影响。从表 2 可以看出,丛生芽增殖主要受 6-BA 影响,当激素组合为 6-BA1.5 mg·L⁻¹ + IAA0.3 mg·L⁻¹ + KT0.3 mg·L⁻¹、光照为 2000 lux 15 d 和 4000 lux 15 d 时,增殖速度快,增殖多,芽苗健壮,色较绿,展叶较好,见图 1,增殖倍数约 7 倍/30 d。当激素浓度 6-BA > 1.5 mg·L⁻¹、KT > 0.3 mg·L⁻¹ 时,丛生芽增殖速度快,但丛生芽逐渐出现玻璃化现象,不利于下一步生根。



图 1 广豆根丛生芽

2.3 生根炼苗同步化培养

将繁殖健壮一体化培养获得的叶片展开、木质化程度较高的健壮芽苗剪下,接种到生根培养基中进行生根炼苗同步培养,不同培养组合对广豆根组培苗的生根和生长情况有较大的影响。从表 3 可以看出,丛生芽生根受 NAA 影响最大,当 NAA 质量浓度在 0.5 ~ 1.0 mg·L⁻¹ 时广豆根组培苗生根率及平均生根数随浓度的升高而提高,当 NAA 质量浓度 > 1.5 mg·L⁻¹ 时,反而对广豆根丛生芽生根产生抑制作用,添加少量 IBA 对广豆根丛生芽生根有一定的促进作用,但质量浓度 > 0.5 mg·L⁻¹ 时则产生了副作用,使芽苗生长偏细。因此,当激素组合为 NAA1.0 mg·L⁻¹ + IBA0.2 mg·L⁻¹ 生根效果最好,综合生产能耗及污染情况考虑,在培养室培养 20 d 移植炼苗大棚培养炼苗效果最好,广豆根组培苗生根率高,根数多,生长良好,污染极少,见图 2。

表 2 不同组合对广豆根丛生芽繁殖的影响

激素组合 6-BA + IAA + KT/mg·L ⁻¹	光照情况		丛生芽增殖、生长情况
	2000 lux	4000 lux	
1.0 + 0.1 + 0.1	20 d	10 d	增殖速度中等,增殖少,部分展叶
1.0 + 0.3 + 0.3	20 d	10 d	增殖速度中等,芽苗健壮,增殖少,部分展叶
1.5 + 0.3 + 0.3	20 d	10 d	增殖速度快,增殖多,芽苗健壮,部分展叶
1.5 + 0.3 + 0.3	15 d	15 d	增殖速度快,增殖多,芽苗健壮,色较绿,展叶较好,适合增殖
1.5 + 0.3 + 0.5	15 d	15 d	增殖速度快,增殖多,呈翠绿,芽苗健壮,轻微玻璃化,展叶较好
1.5 + 0.5 + 0.5	15 d	15 d	增殖不多,呈翠绿,轻微玻璃化,芽苗细,展叶不多
2.0 + 0.3 + 0.3	15 d	15 d	增殖少,后期玻璃化明显
2.0 + 0.5 + 0.5	15 d	15 d	增殖少,芽苗细,后期玻璃化明显

表 3 不同组合对广豆根丛生芽生根炼苗的影响

激素组合 NAA + IBA/mg·L ⁻¹	培养环境		生根率/%	平均生根数/条	株高/cm	生长情况
	培养室	炼苗大棚				
0.5 + 0	10 d	20 d	83	4.4	4.0	后期污染多
0.5 + 0.2	15 d	15 d	87	5.1	4.4	生长良好,后期污染较少
1.0 + 0.2	15 d	15 d	98	6.3	5.5	生长良好,后期污染较少
1.0 + 0.2	20 d	10 d	95	6.1	5.4	生长良好,极少污染
1.0 + 0.5	20 d	10 d	93	5.3	5.8	芽苗偏细,极少污染
1.5 + 0.2	20 d	10 d	90	4.9	4.5	生长良好,极少污染
1.5 + 0.5	25 d	5 d	88	4.5	4.7	芽苗偏细

注: a. 培养室内生根苗; b. 炼苗棚内生根苗。

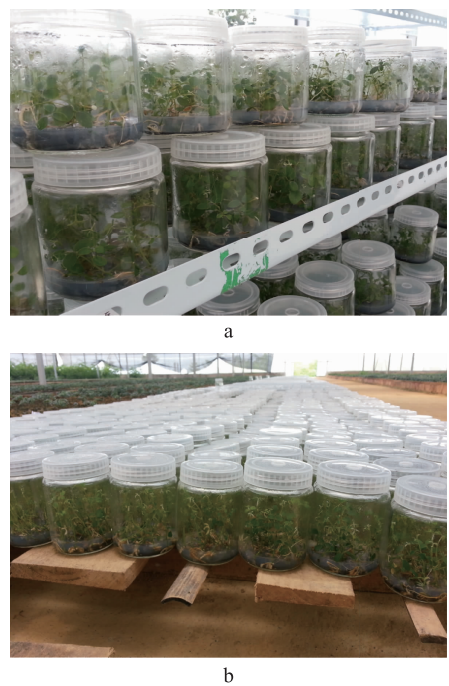


图 2 广豆根试管苗

2.4 驯化移栽

通过生根炼苗同步化培养，广豆根试管苗已经在大棚内形成完整的植株，可直接将生根苗的瓶盖打开，取出生根苗，洗净根部残留培养基（见图 3a），移栽至泥炭土、碳化稻谷壳和珍珠岩的质量比例为 4:4.5:1.5 混合后的基质最佳。育苗要求相对湿度为 75% ~ 90%，温度 20 ~ 25 ℃，遮光度 60% ~ 75%，30 d 后成活率能达到 95%（见图 3b）。



注：a. 清洗干净的试管苗；b. 移栽基质的试管苗。

图 3 广豆根试管苗移栽

2.5 苦参碱及氧化苦参碱的含量检测

采用高效液相色谱法（2015 年版《中华人民共和国药典》）对广豆根组培苗不同时期（0 个月、移栽 3 个月、移栽 6 个月）的根进行了含量测定，检测结果见表 4。

表 4 不同时期广豆根含量

时期	苦参碱	氧化苦参碱	总生物碱
St0	0.023 317 5	0.254 763	0.278 08
St3	0.039 763 5	0.692 865	0.732 65
St6	0.096 625 5	0.988 165	1.084 79

注：St0 广豆根组培苗；St3 组培苗大棚移栽生长 3 个月，St6 移栽生长 6 个月。

通过含量检测发现：在组培苗阶段，广豆根就含有少量的苦参碱和氧化苦参碱；随着生长周期的延长，含量逐步升高，移栽 3 个月、6 个月的广豆根组培苗的有效成分含量均符合《中华人民共和国药典》要求，与组培苗 St0 个月相比，移栽后 3 个月、6 个月的广豆根组培苗总生物碱、苦参碱和氧化苦参碱分别提高 3.9 倍、4.14 倍。因此广豆根组培苗适合作为药材种苗进行推广种植。

3 讨论与结论

在植物组织培养工厂化生产中无菌材料的快速获取至关重要，此项工作的成败直接决定了整个生产成功与否。广豆根无性繁殖所用的外植体主要有种子和茎段，但以种子效果最好^[8-11]。实验主要通过考察结荚后生长不同时间的广豆根种子作为外植体灭菌后的萌发情况，广豆根结荚后生长 90 ~ 180 d 以内的种子，均能作为外植体萌发。结荚 150 ~ 180 d 的种子，萌发时间最短（15 d 左右），30 d 萌发率高达 95.7%，且长出的芽健壮。因此，广豆根无菌播种应采用结荚后生长 150 ~ 180 d 未开裂的果荚为佳。

培养基中外源激素的种类与浓度对植物组织培养非常关键。在本研究中，我们使用 6-BA、IAA、KT 以及光照进行繁殖筛选，NAA 和 IBA 进行生根筛选。6-BA 是在植物组织培养领域一种重要的激素，可以促进植物细胞分裂、侧芽生长等^[12]。KT 是第一个植物激动素，也具有促进细胞分裂的作用^[13-14] IAA 在植物的生长与发育上起着非常关键的作用，可以通过调节或影响植物的多种反应来发挥作用^[15]。在研究中笔者发现，如果细胞分裂素的质

量浓度超过 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 芽的增殖就会出现异常, 如玻璃化等。如果 IAA 质量浓度低于 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 叶片又不能展开, 过高又使芽苗纤细, 同时激动素 KT 浓度也不易过高, 过高会加剧丛生芽玻璃化, 所以确定最佳的增殖培养基为 $\text{MS} + 1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA} + 0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{IAA}$ 和 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{KT}$ 。

植物的生长受到光合作用影响^[16]。在研究中发现, 培养室中合适时间内提高光照强度促使丛生芽展叶, 这就意味植物叶表面积越大, 能够获得的光合作用越强^[17], 从而为生长提供更多的物质与能量; 所获得的结果就是在丛生芽繁殖阶段能使丛生芽其木质化程度提高, 展叶良好, 利于下一步生根。同时, 通过生根炼苗同步化培养能有效地提升生产空间并节约炼苗时间, 促使试管苗更好适应移植环境, 加大了移栽后的质量及成活率。

总之, 通过组织培养技术, 建立了一种快速、有效、便捷的广豆根种苗繁育方法。在对广豆根组培苗进行综合的质量评价后, 笔者发现山豆根组培苗的质量符合《中华人民共和国药典》2015 版的质量要求, 由组培苗生产的广豆根药材可以替代种子药材使用。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
- [2] 黄宝优, 农东新, 黄雪彦, 等. 中药材山豆根资源调查报告[J]. 中国现代中药, 2014, 16(9): 740-744.
- [3] 南京中医药大学. 中药大辞典: 下册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002: 81.
- [4] 陈影, 陈两锦, 全燕, 等. 山豆根药理毒理研究进展[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(13): 2439-2442.
- [5] SHEN L, LUO Y, ZHANG P G, et al. The progress of resource status and quality standard in *Sophora Tonkinensis* [J]. Da Zhong Ke Ji, 2011(5): 145-146.
- [6] 覃柳燕, 唐美琼, 黄永才, 等. 贮藏温度及时间对山豆根种子活力的影响[J]. 中国种业, 2011(1): 35-37.
- [7] 付传明, 赵志国, 黄宁珍, 等. 铁皮石斛无菌播种产业化繁育技术研究[J]. 广西植物, 2012, 32(2): 238-242.
- [8] 覃文流, 凌征柱, 许鸿源, 等. 山豆根组织培养获得再生植株[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(4): 303-304.
- [9] 姚绍嫦, 凌征柱, 蓝祖裁, 等. 山豆根组培快繁技术优化的研究[J]. 北方园艺, 2011(6): 136-139.
- [10] 李林轩, 韦坤华, 唐美琼, 等. 正交试验优化山豆根组织培养条件[J]. 中药材, 2012, 35(2): 514-517.
- [11] 黄晓红. 药用植物广豆根组培快繁体系的建立[D]. 南宁: 广西大学, 2012.
- [12] POLANCO M C, PELGÉZ M I, RUIZ M L. Factors affecting callus and shoot formation from in vitro cultures of *Lens culinaris* Medik [J]. PCTOC, 1988, 15(2): 175-182.
- [13] MILLER C O, SKOOG F, SALTZ VON M H, et al. Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid [J]. J Amer Chem Soc, 1955, 77(5): 1392-1392.
- [14] MILLER C O, SKOOG F, OKUMURA F S, et al. Isolation, structure and synthesis of kinetin, a substrate promoting cell division [J]. J Amer Chem Soc, 1956, 78(7): 1375-1380.
- [15] HAGEN G, GUILFOYLE T. Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors [J]. Plant Mol Biol, 2002, 49(3/4): 373-385.
- [16] 申文辉, 刘建, 唐庆兰. 桉树无性系叶片性状和光合参数差异比较[J]. 林业科技开发, 2010, 24(6): 69-71.
- [17] WEI K H, MIAO J H M, HUANG H P, et al. Generation of autotetraploid plant of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) and its quality evaluation [J]. Phcog Mag, 2011, 7(27): 200-206.

(收稿日期: 2019-03-29 编辑: 王笑辉)

(上接第 1381 页)

- [15] 佟玲, 谭晓杰, 林景瑞, 等. RP-HPLC 法测定香加皮中异香草醛、杠柳毒苷和 4-甲氧基水杨醛的含量[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(6): 961-963.
- [16] AN R, YOU L, ZHANG Y, et al. A rapid UPLC method for simultaneous determination of eleven components in "Ge-Gen-Qin-Lian" decoction [J]. Pharmacogn Mag, 2014, 10(40): 464-469.
- [17] 孙冬梅, 林晓燕, 刘梦云, 等. 复方芪麻胶囊 UPLC 指纹图谱建立和同时测定 8 种成分研究[J]. 中草药, 2016, 47(23): 4186-4191.
- [18] 聂平, 肖炳燚, 罗晖明. 超高效液相色谱-质谱联用技术在中药指纹图谱中的应用[J]. 中南药学, 2013, 11(7): 524-527.

(收稿日期: 2019-05-29 编辑: 王笑辉)