

研究报告 Original Papers

鳄嘴花的组织培养和快速繁殖

王强^{1,2}, 陈冬怡², 杨国³, 陈国华^{2,*}, 陈红锋^{2,*}¹仲恺农业工程学院, 广州510230²中国科学院华南植物园, 中国科学院植物资源保护与可持续利用重点实验室, 广州510650³绍兴文理学院生命科学学院, 浙江绍兴312000

摘要: 以鳄嘴花 [*Clinacanthus nutans* (Burm. f.) Lindau] 幼嫩茎段为外植体, 研究不同植物生长调节剂对鳄嘴花茎段腋芽诱导、丛生芽分化、增殖及生根培养的影响。结果表明: 茎段在培养基MS+1.0 mg·L⁻¹ BAP+0.1 mg·L⁻¹ NAA上诱导产生腋芽, 将腋芽转入培养基MS+1.0 mg·L⁻¹ BAP+0.1 mg·L⁻¹ NAA诱导分化丛生芽, 分化率高达93.3%; 在培养基中分别加入30 g·L⁻¹椰汁、30 g·L⁻¹香蕉、0.5 g·L⁻¹蛋白胨, 都有壮苗的效果; 最佳的生根培养基为MS+0.5 mg·L⁻¹ NAA+2.0 mg·L⁻¹ IBA, 生根率达90%, 且根系发达, 芽苗生长健壮。移栽至混合基质(泥炭:椰糠:珍珠岩:河沙=3:2:2:1)中, 鳄嘴花的成活率达97%。

关键词: 鳄嘴花; 药用植物; 离体培养; 植株再生

鳄嘴花 [*Clinacanthus nutans* (Burm. f.) Lindau] 是爵床科 (Acanthaceae) 鳄嘴花属高大草本植物 (Deng等2011), 在东南亚国家作为一种传统药用植物有着广泛的应用 (Kamarudin等2017)。在我国, 鳄嘴花又名忧遁草, 产云南、广西、广东等地, 并且其使用方法也呈现一定的地域性, 在云南主要作为一种传统傣药, 用于治疗跌打损伤, 在广东、广西地区则多作为一种野生蔬菜, 药食同源, 治疗肝病、风湿等。现代研究表明, 鳄嘴花具有很好的抗癌 (刘旭等2014)、消炎 (Wanikiat等2008)、免疫调节 (Huang等2015)、降血脂 (Alam等2016) 等功效。

鳄嘴花作为一种传统药用植物和新兴的蔬菜, 野外采挖现象不断加重, 其野外生存情况日渐堪忧, 野生资源已经远远不能满足目前的需求, 因此, 人工繁殖势在必行。目前, 鳄嘴花主要以扦插繁殖为主, 但繁殖系数较低且冬季存在一定的病虫害现象。植物离体快繁体系的建立可以短时间内生产大量的优质种苗。Gunasekaran (2014) 和 Ying (2015) 以鳄嘴花的叶片为外植体诱导出了愈伤组织但并未成功建立离体快繁体系。Chen等 (2015) 以茎段为外植体成功建立了离体快繁体系, 但由于其出芽培养基采用了黑暗和弱光的条件, 导致芽体徒长, 且生根培养的外植体仍为此茎段, 这导致了繁殖系数偏低和幼苗生长不健壮等问题。本文以鳄嘴花无菌苗的腋芽茎段为外植体, 进行了组织培养离体快繁技术研究, 探究了不同的植物生长调节剂对丛生芽诱导

的影响, 以及有机添加物对丛生芽增殖和生长的影响, 建立了完整的鳄嘴花离体快繁技术体系, 解决其繁育问题的同时还能在短时间内提供大量的优质种苗, 可为其今后的规模化开发利用提供技术保障。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料取自中国科学院华南植物园种质资源圃。选择健壮无病虫害的鳄嘴花 [*Clinacanthus nutans* (Burm. f.) Lindau] 幼嫩茎段, 切除叶子后在流水下冲洗干净, 然后在超净工作台上用滤纸吸干其表面水分, 用75%酒精消毒30 s~1 min, 无菌水冲洗3遍, 接着用0.1% HgCl₂溶液消毒5~10 min, 无菌水冲洗4遍, 用无菌滤纸吸干水分, 待用。

1.2 培养条件

试验所用培养基MS基本培养基, pH 5.9; 光照时间12 h·d⁻¹, 光照强度40~60 μmol·m⁻²·s⁻¹, 培养温度23~25°C。

1.3 试验方法

1.3.1 鳄嘴花茎段的腋芽诱导

将消毒好的茎段, 切成长1~1.5 cm带有节位的

收稿 2018-01-09 修定 2018-02-01

资助 中国科学院战略性先导科技专项(XDA13020603)和广东省2013年中央农业技术推广与服务补助资金项目。

* 共同通讯作者: 陈国华(1664238741@qq.com)、陈红锋(h.f.chen@scbg.ac.cn)。

小茎段, 将其接种于含不同浓度及组合植物生长调节剂的5种MS培养基中(表1)。每个处理接种20个外植体, 重复3次。30 d后观察结果, 记录腋芽诱导率以及腋芽诱导状况。

1.3.2 鳄嘴花腋芽诱导丛生芽发生

将诱导出的腋芽从茎段上切下, 接种于含不同浓度及组合植物生长调节剂的8种MS培养基中(表2)。每个处理接种20个外植体, 共5瓶, 重复3次, 30 d后观察结果。记录丛生芽诱导率、繁殖系数以及丛生芽生长状况。

1.3.3 有机添加物对鳄嘴花腋芽增殖和生长的影响

以MS+1.0 mg·L⁻¹ BAP+0.1 mg·L⁻¹ NAA为基本培养基, 诱导出的腋芽为外植体。设置MS对照, 分别添加0.5 g·L⁻¹蛋白胍、30 g·L⁻¹椰汁、30 g·L⁻¹香蕉, 为壮苗培养基, 每个处理20个外植体, 每个处理重复3次, 培养30 d后观察结果, 统计腋芽的增殖系数、每个外植体的鲜重和腋芽平均长度。

1.3.4 鳄嘴花试管苗的生根和移栽

将3.5 cm高的芽苗转接到NAA (0、0.1和0.5 mg·L⁻¹), IBA (2和4 mg·L⁻¹)的生根培养基中。30 d后统计生根率及根系生长情况, 将生根小苗基部清洗干净, 移栽至温室内的混合基质(泥炭:椰糠:珍

珠岩:河沙=3:2:2:1)中, 30 d后统计组培苗的移栽成活率。以上每个处理25个外植体, 重复2次。

1.3.5 数据分析

数据分析和数据处理采用Excel和SPSS 16.0软件, 同列数据后小写英文字母不同者表示经LSD法检验差异显著($P<0.05$)。

2 实验结果

2.1 鳄嘴花茎段诱导腋芽发生

以鳄嘴花茎段为外植体, 放入含BAP的MS培养基中(表1), 10 d左右茎段的叶位处开始萌芽, 随后长出腋芽; 培养基MS+1.0 mg·L⁻¹ BAP+0.1 mg·L⁻¹ NAA最利于腋芽的萌发诱导, 诱导率为98.3%, 腋芽的生长状况良好, 叶片颜色翠绿, 芽体健壮(图1-A)。BAP浓度达到2.0 mg·L⁻¹时, 诱导的腋芽长势较差, 且部分的芽苗出现透明状现象。茎段在含TDZ的MS培养基中, 诱导出的腋芽长势较差, 芽体瘦小。

2.2 鳄嘴花腋芽外植体诱导丛生芽发生

由表2得知, 在单独使用BAP和TDZ时, 腋芽均能诱导丛生芽, 其中诱导率最高的为BAP 1.0 mg·L⁻¹, 诱导率达到78.3%, 繁殖系数为2.4; 当这两种与0.1 mg·L⁻¹ NAA或0.1 mg·L⁻¹ IBA结合使用时, 从

表1 不同植物生长调节剂对鳄嘴花茎段诱导腋芽的影响

Table 1 Effect of plant growth regulators (PGRs) on shoot axillary bud from stem segment explants of *C. nutans*

植物生长调节剂/mg·L ⁻¹	腋芽诱导率/%	腋芽生长状况
BAP 1.0	83.3±2.9 ^b	芽生长状况良好
TDZ 1.0	65.0±5.0 ^c	芽生长状况不佳, 瘦小
BAP 1.0+NAA 0.1	98.3±2.9 ^a	芽生长状况良好
TDZ 1.0+NAA 0.1	68.3±7.6 ^c	芽生长状况不佳
BAP 2.0+NAA 0.1	90.0±5.0 ^b	芽出现部分玻璃化现象

同列数据后小写英文字母不同者表示经LSD法检验差异显著($P<0.05$), 下表同此。

表2 不同植物生长调节剂对鳄嘴花腋芽诱导丛生芽发生的影响

Table 2 Effect of PGRs on shoot organogenesis from axillary bud of *C. nutans*

植物生长调节剂/mg·L ⁻¹	丛生芽诱导率/%	繁殖系数	芽苗生长状况
BAP 1.0	78.3±7.6 ^{bc}	2.40±0.09 ^c	生长状况良好
TDZ 1.0	66.7±7.6 ^d	1.62±0.25 ^d	基部愈伤化, 芽长势较差
BAP 1.0+NAA 0.1	93.3±2.9 ^a	6.07±0.33 ^a	芽苗深绿色、健壮, 生长良好
TDZ 1.0+NAA 0.1	68.3±2.9 ^d	1.63±0.15 ^d	长势不佳, 芽苗有部分愈伤化
BAP 3.0+NAA 0.1	71.7±2.9 ^{cd}	2.42±0.21 ^c	叶片、茎段透明, 部分玻璃化
TDZ 3.0+NAA 0.1	70.0±5.0 ^{cd}	1.78±0.12 ^d	叶片、茎段透明, 苗部分玻璃化
BAP 1.0+IBA 0.1	81.7±2.8 ^b	3.17±0.06 ^b	芽苗深绿色、健壮, 生长良好
TDZ 1.0+IBA 0.1	68.3±2.8 ^d	1.85±0.10 ^d	芽苗瘦弱, 生长状况不佳

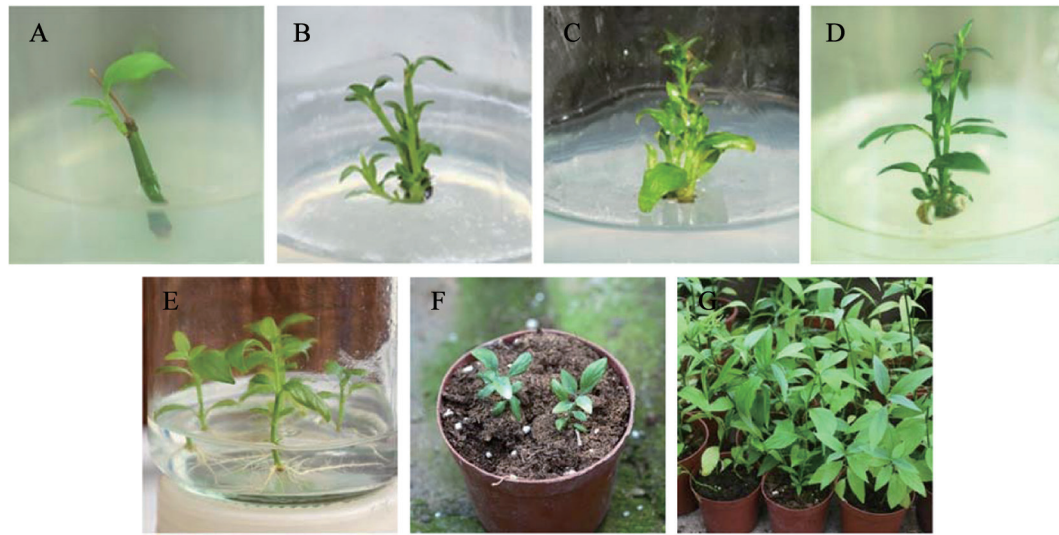


图1 鳄嘴花茎段的离体快繁

Fig.1 Rapid propagation *in vitro* via stem segment of *C. nutans*

A: 鳄嘴花茎段培养20 d左右, 腋芽萌发; B: 腋芽在增殖培养基上培养30 d后的芽丛; C: 腋芽在添加椰汁的增殖培养基上培养30 d后形成的芽丛; D: 腋芽在增殖培养基上增殖; E: 芽苗在改良生根培养基上培养30 d后, 根系形成; F: 鳄嘴花幼苗移栽至混合基质中; G: 田间管理120 d后的鳄嘴花植株。

生芽的诱导率和繁殖系数均高于单独使用, 其中以MS+1.0 mg·L⁻¹ BAP+0.1 mg·L⁻¹ NAA诱导效果最好, 丛生芽诱导率高达93.3%, 繁殖系数为6.07, 芽苗深绿色, 生长状况良好(图1-B)。当MS培养基中BAP浓度升高时, 丛生芽的诱导率与繁殖系数呈下降趋势, 腋芽的基部形成白色、疏松的愈伤组织, 诱导出的丛生芽也出现玻璃化现象, 长势较差; 而TDZ和NAA混合使用时, 芽苗长势不佳, 诱导的效果较差。

2.3 鳄嘴花壮苗及生根培养

在MS+1.0 mg·L⁻¹ BAP+0.1 mg·L⁻¹ NAA增殖培养基上进行丛生芽的继代培养(图1-D)。培养基中添加蛋白胨、椰汁、香蕉这些有机物对腋芽的增殖系数没有影响(表3), 但是对丛生芽的生长有很大的影响, 都可以增加腋芽的鲜重和长度, 其中壮苗效果最好的一组是30 g·L⁻¹椰汁, 平均外植体鲜重达到2.28 g, 长度达到3.30 cm(图1-C)。

将3.5 cm的芽苗接入各种生根培养基中(表4), NAA和IBA均能诱导鳄嘴花生根, 其中0.5 mg·L⁻¹ NAA+2.0 mg·L⁻¹ IBA时, 生根效果最好, 生根率达到90.0%, 平均的生根数量为2.85(图1-E)。当IBA的浓度达到4.0 mg·L⁻¹时, 芽苗基部易出现白色愈伤组织, 虽然生根率达到78%和87%, 但是诱导的根易呈愈伤化, 移栽成活率极低。

2.4 鳄嘴花组培苗移栽及田间管理

将3~4 cm的鳄嘴花生根组培苗放在温室大棚内炼苗, 10 d后将苗从培养基中取出, 洗净根部的培养基, 在500倍稀释的多菌灵溶液中浸泡3 min后, 移栽至混合基质中, 喷洒定根水(图1-F)。混合基质为泥炭:椰糠:珍珠岩:河沙=3:2:2:1, 生根苗移栽前, 将基质混匀, 用百菌清溶液浸湿。

生根苗移栽后, 混合基质保持70%的湿度, 空气湿度保持85%, 后逐渐降低至50%; 温室大棚内

表3 不同有机添加物对鳄嘴花腋芽增殖和生长的影响

Table 3 Effect of organic additions on shoot proliferation and growth of *C. nutans*

有机添加物/g·L ⁻¹	腋芽增殖系数	外植体鲜重/g	平均腋芽长度/cm
MS对照	6.00±0.44 ^a	1.45±0.02 ^d	1.63±0.03 ^d
蛋白胨 0.5	6.42±0.42 ^a	1.75±0.02 ^c	2.21±0.04 ^c
椰汁30	5.90±0.17 ^a	2.28±0.11 ^a	3.30±0.32 ^a
香蕉30	6.33±0.45 ^a	2.06±0.07 ^b	2.74±0.13 ^b

表4 鳄嘴花的生根培养

Table 4 Rooting of *C. nutans*

植物生长调节剂/mg·L ⁻¹	生根率/%	平均生根数量
IBA 2.0	65.0±5.0 ^{de}	1.20±0.26 ^d
NAA 0.5	56.7±7.6 ^e	0.85±0.13 ^e
NAA 0.1+IBA 2.0	73.3±10.4 ^{cd}	1.45±0.08 ^d
NAA 0.1+IBA 4.0	78.3±2.9 ^{bc}	1.98±0.10 ^c
NAA 0.5+IBA 2.0	90.0±5.0 ^a	2.85±0.13 ^a
NAA 0.5+IBA 4.0	86.7±2.9 ^{ab}	2.53±0.26 ^b

遮荫达到75%, 然后逐渐降低至25%; 10 d后鳄嘴花幼苗叶片舒展, 长出新根, 此时可以采用3%的叶面肥喷洒后, 浇透水。施肥频率为8 d一次。35 d后, 成活率达97%以上(图1-G)。

3 讨论

鳄嘴花为高大草本植物, 幼嫩茎段较少, 茎段上每个芽点只能诱导出一个新芽, 且诱导之后分化程度不高, 不适宜直接诱导丛生芽, 而茎段诱导出的腋芽, 具有高度分化能力, 是一种理想的外植体材料。Chen等(2015)以茎段为外植体诱导丛生芽的繁殖系数为2.73。而本实验以茎段诱导的腋芽为外植体, 相同条件下, 丛生芽的繁殖系数提高到了6.07。这也就进一步说明外植体的选择对于快繁体系建立的重要性。

在丛生芽诱导过程中随着TDZ浓度的不断提高, 芽体出现了一定的愈伤化甚至是玻璃体化现象。有研究显示, 低浓度的TDZ可以诱导芽的分化, 高浓度的TDZ则会诱导愈伤组织的形成抑制芽的分化(王关林等1997)。TDZ浓度增加到一定程度时则会使玻璃体化发生率提高(徐华松等1996)。由此可见, TDZ的临界浓度是控制分化方向的关键。在诱导培养基中, 1.0 mg·L⁻¹ BAP和0.1 mg·L⁻¹ NAA复配使用的腋芽诱导率高达98.3%, 继代培养中的丛生芽诱导率达93.3%。杨国等(2016)研究发现BAP和NAA结合的MS培养基非常利于黄花倒水莲丛生芽的诱导。聂王星和於丙军(2012)在以大豆子叶节为外植体诱导丛生芽时发现将1.0 mg·L⁻¹ TDZ和0.5 mg·L⁻¹ BAP复配使用诱导率最高, 出芽数最多(聂王星和於丙军2012)。由于TDZ具有生长素和细胞分裂素的双重作用(徐晓峰和黄学林2003), 故今后的试验中亦可考虑TDZ和BAP复配使用对

鳄嘴花丛生芽诱导的影响。

Chen等(2015)在诱导丛生芽时采用了黑暗或弱光的条件, 导致了丛生芽徒长, 芽伸长量虽然很高但叶片稀疏, 后期种苗纤细。本试验诱导丛生芽时光照时间为12 h·d⁻¹, 光照强度40~60 μmol·m⁻²·s⁻¹, 芽苗颜色深绿, 芽体健壮, 生长良好。光调控对于外植体的脱分化、器官发生、幼苗的形态建成起到了至关重要的作用(谷艾素等2011)。试验中还探究了不同有机添加物对腋芽增殖和生长状况的影响, 发现适当添加有机物能够促进鳄嘴花芽苗的生长, 有壮苗的作用, 其中以30 g·L⁻¹椰汁效果最好。椰汁的应用十分广泛, 尤其是在兰科植物蝴蝶兰、卡特兰的原球茎增殖方面具有很好的促进作用(李亮等2012; 马生建等2010)。

鳄嘴花作为一种传统的药食两用植物, 近年来受到了越来越多的关注, 野生资源已经远远不能满足市场的需求。本研究建立了完整且高效的鳄嘴花离体快速繁殖体系, 解决了这种药用植物的繁育问题, 能够在短时间内生产大量的优质种苗, 缓解其野外资源的压力, 为其工厂化育苗提供了良好的技术基础, 为鳄嘴花的开发利用提供了可靠的保障。

参考文献(References)

- Alam A, Ferdosh S, Ghafoor K, et al (2016). *Clinacanthus nutans*: A review of the medicinal uses, pharmacology and phytochemistry. *Asian Pac J Trop Med*, 9: 402–409
- Chen BH, Zhang J, Zhang C, et al (2015). The rapid propagation technique of the medicinal plant *Clinacanthus nutans* by tissue culture. *NY Sci J*, 8: 23–27
- Deng YF, Hu JQ, Daniel TF (2011). *Flora of China* (Vol. 19). Beijing: Science Press, 442
- Gu AS, Zhang H, Cui J (2011). Research advances of photoregulation and its utilization in plant tissue culture. *Acta Bot Bor-Occid Sin*, 31: 2341–2346 (in Chinese with English abstract) [谷艾素, 张欢, 崔瑾(2011). 光调控在植物组织培养中的应用研究进展. *西北植物学报*, 31: 2341–2346]
- Gunasekaran U (2014). Callus induction and plant regeneration studies of *Clinacanthus nutans* (Sabah snake grass) (dissertation). *Kampar, Malaysia*: University Tunku Abdul Rahman
- Huang D, Guo W, Gao J, et al (2015). *Clinacanthus nutans* (Burm. f.) Lindau ethanol extract inhibits hepatoma in mice through upregulation of the immune response. *Molecules*, 20: 17405–17428
- Kamarudin MNA, Sarker MMR, Kadir HA, et al (2017).

- Ethnopharmacological uses, phytochemistry, biological activities, and therapeutic applications of *Clinacanthus nutans* (Burm. f.) Lindau: A comprehensive review. *J Ethnopharmacol*, 206: 245–266
- Li L, Zhang DM, Lei HH, et al (2012). The review of organic additives in plant tissue culture. *Ningxia J Agric For Sci Technol*, 53: 28–30, 34 (in Chinese with English abstract) [李亮, 张冬敏, 雷华辉等(2012). 植物组织培养中有机添加物应用研究. *宁夏农林科技*, 53: 28–30, 34]
- Liu X, Guo WJ, Huang DM, et al (2009). Inhibitive effect *Clinacanthus nutans* (Burm. f.) Lindau *n*-butanol extracts on Heps hepatoma in mice. *J Jiangsu Univ (Med Edn)*, 24: 214–215 (in Chinese with English abstract) [刘旭, 郭文洁, 黄丹民等(2009). 鳄嘴花正丁醇提取物对小鼠Heps肝癌的抑制作用. *江苏大学学报(医学版)*, 24: 214–215]
- Ma SJ, Qin JF, Zeng FH (2010). The effect of organic compounds on the tissue culture of *Cattleya*. *Chin Agric Sci Bull*, 26: 32–35 (in Chinese with English abstract) [马生建, 覃金芳, 曾富华(2010). 有机添加物对卡特兰组织培养的影响. *中国农学通报*, 26: 32–35]
- Nie WX, Yu BJ (2012). Effects of TDZ and 6-BA on inducing multiple shoots in soybean cotyledonary node regeneration system. *J Nanjing Agric Univ.*, 35: 130–134 (in Chinese with English abstract) [聂王星, 於丙军(2012). TDZ和6-BA对大豆子叶节再生体系中丛生芽诱导的效应. *南京农业大学学报*, 35: 130–134]
- Wang GL, Fang HY, Na J (1997). Application of potent cytokinin-thidiazuron (TDZ) to plant tissue culture. *Chin Bull Bot*, 14: 47–53 (in Chinese with English abstract) [王关林, 方宏筠, 那杰(1997). 高活性细胞激动素TDZ在植物组织培养中的应用. *植物学通报*, 14: 47–53]
- Wanikiat P, Panthong A, Sujayanon P, et al (2008). The anti-inflammatory effects and the inhibition of neutrophil responsiveness by *Barleria lupulina* and *Clinacanthus nutans* extracts. *J Ethnopharmacol*, 116: 234–244
- Xu HS, Xu JL, Huang XL (1996). Effect of TDZ on plant tissue culture. *Guihaia*, 16: 77–80 (in Chinese with English abstract) [徐华松, 徐九龙, 黄学林(1996). TDZ在植物组织培养中的作用. *广西植物*, 16: 77–80]
- Xu XF, Huang XL (2003). TDZ: an efficacious plant growth regulator. *Chin Bull Bot*, 20: 227–237 (in Chinese with English abstract) [徐晓峰, 黄学林(2003). TDZ: 一种有效的植物生长调节剂. *植物学通报*, 20: 227–237]
- Yang G, Luo J, Mo YW, et al (2016) Tissue culture and rapid propagation *in vitro* of *Polygala fallax*. *Plant Physiol J*, 52: 349–355 (in Chinese with English abstract) [杨国, 罗洁, 莫亿伟等(2016). 黄花倒水莲的组织培养和快速繁殖. *植物生理学报*, 52: 349–355]
- Ying NY (2013). Establishment of axenic explants and callus culture of *Clinacanthus nutans* (Rumpet Belalai Gajah) (dissertation). Kota Samarahan Sarawak, Malaysia: University Malaysia Sarawak

Tissue culture and rapid propagation *in vitro* of *Clinacanthus nutans*

WANG Qiang^{1,2}, CHEN Dong-Yi², YANG Guo³, CHEN Guo-Hua^{2,*}, CHEN Hong-Feng^{2,*}

¹Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510230, China

²Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Sustainable Utilization, Chinese Academy of Sciences, Guangdong Provincial Key Laboratory of Applied Botany, South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China

³Shaoxing University, Academy of Life Sciences, Shaoxing, Zhejiang 312000, China

Abstract: The regeneration system of tissue culture of *Clinacanthus nutans* was established by utilizing its *in vitro*-derived stem as explant. We analyzed the differentiations characteristics of explant, and discussed affecting factors of tissue culture of hormone and additional nutrient. The results showed the optimal proliferation medium for *C. nutans* was MS with 1.0 mg L⁻¹ BAP and 0.1 mg·L⁻¹ NAA. The plantlets grew well when the organics was adding, 0.5 g·L⁻¹ peptone, 30 g·L⁻¹ coconut juice and 30 g·L⁻¹ banana were good for cultivating strong seedling. A rooting medium composed of MS with 0.5 mg·L⁻¹ NAA and 2.0 mg·L⁻¹ IBA provided 90% rooting and vigorous plantlets. Plantlets were transplanted to a potting mixture (3:2:2:1, peat: coconut coir: perlite: sand) in trays with about 97% survival percentage.

Key words: *Clinacanthus nutans*; medicinal plant; tissue culture; plant regeneration

Received 2018-01-09 Accepted 2018-02-01

This work was supported by the Strategic Priority Research Program of Chinese Academy of Sciences (XDA13020603) and Central Agricultural Technology Promotion and Service Project of Guangdong.

*Co-corresponding authors: Chen GH (1664238741@qq.com), Chen HF (h.f.chen@scbg.ac.cn).