

· 中药农业 ·

药用植物短蕊万寿竹的组织培养研究[△]

王一诺, 秦双双, 黄宝优, 韦莹, 李翠, 韦坤华*

(广西壮族自治区药用植物园 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: 更好的开发利用短蕊万寿竹。方法: 以短蕊万寿竹的幼嫩茎段为外植体, MS为基本培养基, 采用正交设计研究外源激素的种类和配比对诱导丛生芽和生根的影响。结果: 最适的启动培养基为MS + 6-BA 1.0 mg·L⁻¹ + NAA 0.2 mg·L⁻¹ + IBA 0.5 mg·L⁻¹, 诱导丛生芽的最佳培养基为MS + 6-BA 1.5 mg·L⁻¹ + NAA 0.2 mg·L⁻¹ + KT 1.0 mg·L⁻¹, 丛生芽的增殖系数达到6.88, 最佳的生根培养基为MS + 6-BA 0.5 mg·L⁻¹ + NAA 2.0 mg·L⁻¹ + AC 2.0 g·L⁻¹, 生根率达到96%以上。结论: 建立短蕊万寿竹的组织培养繁殖体系, 为人工种植提供大量种苗。

[关键词] 短蕊万寿竹; 组织培养; 丛生芽; 生根培养

Study on Tissue Culture of *Disporum brachystemon* Wang et Tang

WANG Yinuo, QIN Shuangshuang, Huang Baoyou, WEI Ying, LI Cui, WEI Kunhua*

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

[Abstract] **Objective:** The aim of the research was to develop and utilize *Disporum brachystemon* Wang et Tang better. **Methods:** To investigate the effects of different hormone combinations on cluster bud induction and root culture of *Disporum brachystemon* Wang et Tang. By orthogonal design, stem was used as the explants and the MS was used as the basic culture medium. **Results:** The results indicated that the best initial medium was MS + 6-BA 1.0 mg·L⁻¹ + NAA 0.2 mg·L⁻¹ + IBA 0.5 mg·L⁻¹. The most effective medium for cluster bud induction was MS + 6-BA 1.5 mg·L⁻¹ + NAA 0.2 mg·L⁻¹ + KT 1.0 mg·L⁻¹, and the multiplication coefficient of cluster bud reached 6.88. The best rooting medium was MS + 6-BA 0.5 mg·L⁻¹ + NAA 2.0 mg·L⁻¹ + AC 2.0 g·L⁻¹, and rooting ratio was above 96%. **Conclusion:** The tissue culture and propagation system was established and solve the shortage of large-scale planting.

[Keywords] *Disporum brachystemon* Wang et Tang; tissue culture; cluster bud induction; rooting culture

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.2017.2.016

短蕊万寿竹 *Disporum brachystemon* Wang et Tang 又名百味参、百尾笋, 为百合科万寿竹属多年生草本, 主要分布于云南、贵州、四川等地, 生于海拔2800~3000 m的灌丛中或林下^[1]。其叶色翠绿、叶形优美、四季常绿, 可用于林下种植或盆栽室内观赏, 是具有较高开发前景的野生花卉。根、茎可入药, 其味甘, 微苦, 性凉, 具有养阴润肺、止咳、止血的功效, 外用可治疗骨折和烧伤^[2]。随着观赏植物的发展和对药用植物的利用, 人们对其需求量日益的增大。但常规情况下, 短蕊万寿竹的繁育特性主要靠扦插和播种繁殖, 由于种皮比较硬, 播种发

芽率比较低, 且扦插繁殖倍数低在短期内难以得到有效的苗数, 不能满足生产上大量的种苗需求^[3-4]。鉴于短蕊万寿竹较高的药用和观赏价值, 采用组织培养技术建立无性快速繁殖体系, 对野生短蕊万寿竹种质资源的保护和优质种苗的规模化栽培提供一定的参考依据, 满足生产上的需要。而有关于短蕊万寿竹的组织培养快速繁殖技术尚未见有相关的报道。

1 材料与方法

1.1 材料

供试用的短蕊万寿竹当年生的幼嫩茎条采自广

[△] [基金项目] 国家中医药行业科研专项(201507002), 国家自然科学基金(81473309), 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科合14125008-2-21, 桂科重14124002-6, 桂科重14124002-1), 广西博士后专项资金(2015年)

* [通信作者] 韦坤华, 副研究员, 研究方向: 药用植物组织培养; E-mail: divinekh@163.com

西药用植物园科研基地内健壮无病虫害的植株。

1.2 外植体消毒

取短蕊万寿竹当年生的幼嫩枝条为外植体，依次用2% (v/v) 洗洁精水溶液浸泡5 min，用线状流水冲洗15 min，然后置于超净工作台内用75%的乙醇消毒15 S，无菌水冲洗1次，添加了2~3滴吐温-20的100 mL 0.1% (v/v) HgCl₂ 消毒8~12 min，用无菌水冲洗3次，将带芽茎段剪成1~2 cm的小段，接种至启动培养基中。

1.3 初代诱导培养

以MS为基本培养基，附加植物生长调节素6-BA(0.5~1.5 mg·L⁻¹)、NAA(0.1~0.5 mg·L⁻¹)、IBA(0.1~0.5 mg·L⁻¹)不同浓度组合的MS+蔗糖30 g·L⁻¹+琼脂5.0 g·L⁻¹和pH值为5.8的培养基中进行启动培养，每个处理10瓶，每瓶5个外植体，培养条件为平均照度2 000 lx，光照时间12 h·d⁻¹，温度25±3℃，并于30 d后统计萌发的芽数。

1.4 丛生芽的增殖培养

挑取初代培养的无菌苗单切为2 cm左右的带芽茎段，接种至以MS为基本培养基，附加植物生长调节素6-BA(1.0、1.5、2.0 mg·L⁻¹)、NAA(0.1、0.2、0.5 mg·L⁻¹)、KT(0.2、0.5、1.0 mg·L⁻¹)的MS+蔗糖30 g·L⁻¹+琼脂5.0 g·L⁻¹和pH值为5.8的增殖培养基中进行丛生芽的诱导，采用正交设计对各因素进行L₉(3⁴)试验筛选，并于40 d后统计增殖系数。同时观察生长情况并用5级表示：将所有丛生芽生长状况按大小分成5级，分别记为：“+++”“++++”“++”“+”。

1.5 生根培养

本试验采用附加不同激素的生根培养基，对短蕊万寿竹的最佳生根培养条件进行筛选。挑取长势良好的无菌苗单切为3 cm左右的茎段，接种于以MS为基本培养基，添加不同浓度配比的6-BA、NAA、AC的MS+蔗糖30 g·L⁻¹+琼脂5.0 g·L⁻¹的生根培养基中，培养40 d后观察并记录生根情况。同时观察生长情况并用5级表示：将所有生根苗生长状况按大小分成5级，分别记为：“++++”“+++”“++”“+”。

2 结果与分析

2.1 植物生长调节剂对启动培养的影响

在启动培养基中接入短蕊万寿竹的带芽茎段后，

观察并记录接入外植体的情况。试验结果表明(表1)，植物生长调节素的种类和不同配比对芽的诱导具有明显的差异，带芽茎段在处理号1~9启动培养基中培养6~7 d后，均有腋芽开始出现萌动，10 d后在叶腋处萌生出小芽，随着培养天数的增加，抽生的新芽逐渐明显，15 d后在A5的启动培养基中最先长出绿色的小叶。从数据可以看出，MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+NAA 0.2 mg·L⁻¹+IBA 0.5 mg·L⁻¹的激素配比组合时对芽的诱导效果最好，培养30 d后芽的诱导率达到82%，明显的优于其它激素配比的组合。

表1 不同培养基对短蕊万寿竹启动培养的影响

处理号	6-BA/ mg·L ⁻¹	NAA/ mg·L ⁻¹	IBA/ mg·L ⁻¹	接种数 /个	平均萌发 数/个	诱导率 (%)
1	0.5	0.1	0.1	50	18	36
2	0.5	0.2	0.2	50	21	42
3	0.5	0.5	0.5	50	25	50
4	1.0	0.1	0.2	50	32	64
5	1.0	0.2	0.5	50	41	82
6	1.0	0.5	0.1	50	35	70
7	1.5	0.1	0.5	50	33	66
8	1.5	0.2	0.1	50	36	72
9	1.5	0.5	0.2	50	31	62

2.2 植物生长调节素对丛生芽诱导的影响

表2 短蕊万寿竹丛生芽诱导正交试验L₉(3⁴)结果

处理号	6-BA/ mg·L ⁻¹	NAA/ mg·L ⁻¹	KT/ mg·L ⁻¹	空白	增值 倍数	生长情况
1	1.0	0.1	0.2	1	2.37	++
2	1.0	0.2	0.5	2	3.40	+++
3	1.0	0.5	1.0	3	4.60	+++
4	1.5	0.1	0.5	3	5.20	++++
5	1.5	0.2	1.0	1	6.88	+++++
6	1.5	0.5	0.2	2	4.80	++++
7	2.0	0.1	1.0	2	5.20	++++
8	2.0	0.2	0.2	3	4.60	++++
9	2.0	0.5	0.5	1	5.00	++++
K1	3.46	4.26	3.92	4.75		
K2	5.63	4.96	4.53	4.47		
K3	4.93	4.80	5.56	4.80		
R	2.17	0.70	1.64	0.33		

表3 丛生芽培养基方差分析结果

方差来源	离均差平方和	自由度	方差	F值	P值
6-BA	7.37	2	3.69	38.01	<0.05
NAA	0.82	2	0.41	4.21	>0.05
KT	4.10	2	2.05	21.17	<0.05
误差	0.19	2	0.10		

将无菌的试管苗剪切成 1.0 cm 左右带节茎段, 接种至附加不同浓度的植物生长调节素的丛生芽诱导培养基中, 比较多因素的组合对短蕊万寿竹丛生芽诱导的影响, 筛选出最佳的丛生芽诱导培养基。试验结果表明, 当 6-BA 的浓度为 $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、NAA 的浓度为 $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、KT 的浓度为 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 增殖的倍数高达 6.88。对丛生芽增殖系数影响最大的是 6-BA 的浓度, 极差 R 值为 2.17, 依次为 KT 的浓度、NAA 的浓度。方差的分析结果表明, 影响增殖系数的因素中 6-BA 的浓度、KT 的浓度在不同水平之间差异显著 ($P < 0.05$)。6-BA 的浓度在 $1.0 \sim 1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的范围时, 增殖倍数随着质量浓度的增加而变大, 6-BA 的浓度为 $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时增殖系数高达 5.63, 与浓度为 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理之间差异显著, 且生长情况良好, 植株健壮, 叶色浓绿。NAA 的浓度在不同水平之间差异不显著, NAA 增殖系数的范围 $4.26 \sim 4.96$, 当浓度为 $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 增殖系数最高为 4.96。KT 的浓度在各个水平之间处理差异显著, 浓度在 $0.2 \sim 1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内, 随着浓度的增加, 增殖系数也随着增加, 当 KT 的浓度为 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 增殖系数高达 5.56。综合考虑, 短蕊万寿竹丛生芽最佳的诱导培养基为 MS + 6-BA $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + NAA $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + KT $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 诱导出来的丛生芽生长状况良好, 苗茁壮, 增殖倍数大, 得到的有效苗数多。

2.3 生根培养

将短蕊万寿竹的丛生芽切成单芽接种至添加不同植物生长调节素的生根培养基中, 培养 30 d 后, 统计生根率, 记录实验结果, 初步筛选出最佳的生根培养基。试验结果表明(表 4), 在生根培养基中培养 10 d 后可观察到有白色的根状物突起, 15 d 后可以在培养基上观察到白色的细根。在 MS 的基本培养基上附加 6-BA、NAA 不同种类的植物生长激素, 激素的种类和浓度的配比对短蕊万寿竹的生根率具有明显的影响。NAA 对短蕊万寿竹的生根具有促进的作用, 当 NAA 的浓度在 $0.5 \sim 2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 范



图1 短蕊万寿竹的丛生芽诱导

围内, 平均生根数和生根率随着 NAA 的浓度增加而升高。活性炭(AC)对短蕊万寿竹的生根有较好的效果, 在不添加活性炭(AC)的情况下, 生根数比较少且根比较细弱。在生根培养基中添加活性炭, 生根率随着增加, 且根系主次分明, 长而粗壮, 每株苗的生根数都有 4~5 根, 利于后期的移栽。综上所述, 初步筛选出来短蕊万寿竹适宜的生根培养基为 MS + 6-BA $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + NAA $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + AC $2.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 生根较好, 植株长势健壮, 叶色浓绿, 生根率达到 96%。

表4 不同培养基对短蕊万寿竹生根的影响

处理号	6-BA/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	NAA/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	AC/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	接种数 /个	平均生根 数/个	生根率 (%)	生长 情况
1	0.1	0.5	0	50	5	10	++
2	0.1	1.0	0	50	12	24	++
3	0.1	2.0	0	50	28	56	+++
4	0.2	0.5	1.0	50	25	50	++
5	0.2	1.0	1.0	50	33	66	+++
6	0.2	2.0	1.0	50	40	80	+++
7	0.5	0.5	2.0	50	30	60	+++
8	0.5	1.0	2.0	50	44	88	+++
9	0.5	2.0	2.0	50	48	96	++++

2.4 再生苗的移栽

挑取经过壮苗生根后植株健壮、根系发达的组培苗移至温室内, 打开瓶盖并保持瓶内水分充足, 使其更好的适应外界的环境。3 d 后取出试管苗, 用清水缓慢的清洗干净根部的培养基, 于傍晚移栽至栽培基质中(沙土:有机肥 = 3:1), 浇透水定根。保

持棚内湿度85%左右,培养温度20~30℃,同时适度遮荫,15 d左右长出新根,叶片慢慢开始舒展,成活的小苗即可进行日常的栽培管理,2个月后成活率达到98%。

4 讨论

本实验利用短蕊万寿竹的带芽茎段为实验材料,在MS基本培养基中附加不同种类和配比的植物生长激素,筛选出短蕊万寿竹适宜的启动、丛生芽增殖、生根培养基。植物的组培苗在生长发育的过程中,适宜的激素有利于促进组培苗的生长、分化和快速繁殖^[5]。在培养基中加入适宜的6-BA、NAA、IBA,对短蕊万寿竹芽的诱导具有明显的促进作用。从实验结果可以得出,MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+NAA 0.2 mg·L⁻¹+IBA 0.5 mg·L⁻¹的激素配比组合时对芽的诱导效果最好,培养30 d后芽的诱导率达到82%。芽苗的增殖和分化是组织培养过程中快速繁殖的关键因素,而增殖的系数在很大的程度上受到细胞分裂素的影响^[6],在试验中对丛生芽增殖系数影响最大的是6-BA的浓度,在不同水平之间差异显著($P < 0.05$),当6-BA的浓度为1.5 mg·L⁻¹时增殖系数高达5.63。在丛生芽的诱导过程中,6-BA、NAA、KT多激素的联合使用对芽的增殖起到了较好的效果。短蕊万寿竹在MS+6-BA 1.5 mg·L⁻¹+NAA 0.2 mg·L⁻¹+KT 1.0 mg·L⁻¹培养基中,丛生芽

的诱导效果最好,芽苗生长状况良好,植株健壮,增殖倍数大,得到的有效苗数多。NAA能促进细胞的分裂和诱导不定根的形成^[7],对短蕊万寿竹的生根起到重要的作用,平均生根数和生根率随着NAA的浓度增加而升高。在生根培养基中添加活性炭(AC)可促进根的生长,在MS+6-BA 0.5 mg·L⁻¹+NAA 2.0 mg·L⁻¹+AC 2.0 g·L⁻¹的生根培养基中,培养出来的种苗植株健壮,主根系长而粗壮,利于后期试管苗的移栽。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京:北京科学出版社,2007.
- [2] 国家中医药管理局中华本草编委会. 中华本草[M]. 上海:上海科学出版社,1999,8:7162.
- [3] 蒋天仪,石大兴,王波. 长蕊万寿竹野生资源开发利用的组织培养研究[J]. 安徽农业科学,2008,36(31):13549.
- [4] 张雁萍. 民族药用植物百尾参野生种子(母代)与不同龄种子(子代)育苗比较[J]. 江西农业学报,2011,23(3):132-135.
- [5] 魏丽芳,于桂芬,冯国宝. 铁皮石斛组织培养与快速繁殖研究进展[J]. 安徽农业科学,2013,41(35):13561-13563.
- [6] 张明,夏鸿西. 石斛组织培养研究进展[J]. 中国中药杂志,2000,25(6):323-326.
- [7] 邱运亮,段鹏慧,赵华. 植物组培快繁技术[M]. 北京:化学工业出版社,2010:68-69.

(收稿日期 2016-07-22)

(上接第238页)

- [26] 孙欣,王晨,房经贵,等. 葡萄GRAS基因家族生物信息学分析[J]. 江西农业学报,2011,23(7):1-8.
- [27] Huang W, Xian Z, Xia K, et al. Genome-wide identification, phylogeny and expression analysis of GRAS gene family in

tomato[J]. BMC Plant Bio,2015,15(1):1-18.

- [28] 孙利军,李大勇,张慧娟,等. NAC转录因子在植物抗病和抗非生物胁迫反应中的作用[J]. 遗传,2012,34(8):993-100.

(收稿日期 2016-05-10)