

李林轩,唐美琼,韦坤华,等. 青天葵组织培养条件优化[J]. 江苏农业科学,2014,42(7):66-68.

# 青天葵组织培养条件优化

李林轩,唐美琼,韦坤华,韦荣昌,白隆华

(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:**分别以 MS、1/2MS 为基本培养基,采用正交试验研究植物生长调节剂对青天葵根状茎繁殖和新球茎诱导的影响,进而优化青天葵组织培养繁殖技术。结果表明:MS+2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA+0.2 mg/L IAA 利于根状茎增殖,增殖倍数为 6.5;MS+1.5 mg/L NAA+0.5 mg/L 6-BA+0.2 mg/L IBA 适于诱导新球茎获得再生植株,诱导系数为 11.5,球茎移栽发芽成活率达到 90%。

**关键词:**青天葵;根状茎;球茎;诱导;增殖

**中图分类号:** Q943.1      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1002-1302(2014)07-0066-03

青天葵为兰科植物毛唇芋兰 [*Nervilia fordii* (Hance) Schitr] 的叶或带球茎的叶,别名独叶莲、独脚莲、珍珠叶、坠千斤、铁帽子、山米子、青莲。青天葵性平,味苦,甘、凉,有清肺止咳、健脾消积、清热解毒、消结散瘀等功效,主治肺癆咯血、肺热咳嗽、小儿肺炎、急性喉炎、口腔炎、咽喉肿痛、瘰癧、疮疡肿毒、跌打损伤等<sup>[1]</sup>。青天葵是广西特产药材,也是我国出口创汇主要药材,经济价值较高,主产于广西、广东、四川、云南等地,属于多年生宿根小草本。该物种濒临近危,已被列入中国物种红色名录<sup>[2]</sup>。栽培试验发现,青天葵组培球茎不仅能正常生长,而且在相同条件下栽培组培球茎优于野生球茎<sup>[3]</sup>。为了解决青天葵产业发展中种源短缺的问题<sup>[4-7]</sup>,本研究利用现代生物技术优化青天葵组织培养条件,以期青天葵组织培养规模化生产育苗提供技术支撑。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

供试材料采自广西药用植物园科研基地内引种栽培、生长健壮、无病虫害的植株,经广西药用植物园鉴定,选取其球茎为外植体。将球茎在洗洁精溶液中浸泡 5 min,清洗干净,用自来水冲洗 10 min,置于 0.1% 氯化汞溶液(加 1~2 点的吐温)浸泡消毒 10 min,再用无菌水浸洗 5 次,然后直接将球茎接种于 1/2MS+2.0 mg/L 6-BA 培养基上<sup>[8]</sup>,培养条件为 pH 值 5.8,平均照度 2 000 lx,光照时间 12 h/d,温度(25±3)℃,30 d 后将其诱导出芽形成根状茎,作为试验材料(图 1)。

### 1.2 方 法

**1.2.1 根状茎繁殖** 取无菌根状茎约 2 cm 长的小段,接入添加不同浓度的 6-BA、NAA、IAA(表 1)的 MS 基本培养基中,观察其对青天葵根状茎繁殖的影响。



图1 球茎诱导出芽

表 1 青天葵根状茎诱导正交试验因素与水平

水平	因素		
	A:6-BA (mg/L)	B:NAA (mg/L)	C:IAA (mg/L)
1	1.0	0.2	0.0
2	2.0	0.5	0.2
3	2.5	0.8	0.5

**1.2.2 球茎诱导** 将根状茎接入添加不同浓度的 NAA、6-BA、IBA(表 2)的 1/2MS 基本培养基中,观察其对青天葵球茎诱导的影响。

表 2 青天葵生根培养正交试验因素与水平

水平	因素		
	A:NAA (mg/L)	B:6-BA (mg/L)	C:IBA (mg/L)
1	1.0	0.0	0.0
2	1.5	0.5	0.2
3	2.0	1.0	0.5

## 2 结果与分析

### 2.1 根状茎培养体系的建立

将根状茎分别接入继代增殖培养基 10 d 后,开始有新芽出现,随后培养基中根状茎大量繁殖,30 d 后统计增殖倍数。

从表 3、表 4 可以看出,外源激素对青天葵根状茎增殖的影响为 6-BA>IAA>NAA。6-BA 对青天葵根状茎增殖有极显著影响,当 6-BA 浓度为 0~2.0 mg/L 时,增殖倍数随着 6-BA 浓度的增大而增大;当 6-BA 浓度高于 2.0 mg/L 时,新芽数量减少,根状茎数量减少,增殖倍数降低,表明 6-BA 浓度过高对新芽诱导有抑制作用,从而影响根状茎形

收稿日期:2013-10-17

基金项目:广西自然科学基金(编号:2011GXNSFA018189)。

作者简介:李林轩(1986—),男,广西全州人,助理研究员,从事中药资源保护与开发利用研究。E-mail:starry1125@sina.com。

通信作者:白隆华,研究员,从事中药资源保护与利用研究。E-mail:whitefh2008@126.com。

成,降低根状茎增殖倍数。适当添加生长素可促进根状茎细胞生长,对根状茎增殖起一定的作用,其中 IAA 浓度对青天葵增殖率影响显著,当 IAA 浓度为 0~0.2 mg/L 时,增殖倍数随着 IAA 浓度的增大而增大;当 IAA 浓度高于 0.2 mg/L 时,增殖倍数降低,在一定程度上抑制根状茎的增殖。NAA 浓度对根状茎增殖有显著影响,并主要影响根状茎的粗壮度,当 NAA 浓度升至 0.5 mg/L 时,根状茎粗细适中,有利于诱导原球茎的形成。从表 3 极差分析结果可知,A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub> 为最佳组合,青天葵根状茎增殖的最适培养基为 MS+2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA+0.2 mg/L IAA,重复试验发现在该培养基上形成根状茎的数量最多,增殖率为 6.5 倍,且根状茎粗细适中(图 2)。

表 3 青天葵丛生芽诱导繁殖 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交试验结果

序号	A:GBA	B:NAA	C:IAA	增殖倍数 (倍)	根状茎 粗细程度
1	1	1	1	4.0	细
2	1	2	2	4.6	适中
3	1	3	3	3.8	粗
4	2	1	2	6.2	细
5	2	2	3	5.7	适中
6	2	3	1	5.2	粗
7	3	1	3	4.4	细
8	3	2	1	4.5	适中
9	3	3	2	4.6	粗
k <sub>1</sub>	4.13	4.87	4.57		
k <sub>2</sub>	5.70	4.93	5.13		
k <sub>3</sub>	4.50	4.53	4.63		
R	1.57	0.40	0.56		

表 4 青天葵丛生芽诱导繁殖方差分析结果

方差来源	离均差平方和	自由度	方差	F 值	P 值
A	4.030	2	2.010	259	0.01
B	0.276	2	0.138	18	0.05~0.10
C	0.576	2	0.288	37	0.01~0.05
SE	0.016	2	0.008		

注:F<sub>0.01</sub>(2,2)=99.0;F<sub>0.05</sub>(2,2)=19.0;F<sub>0.1</sub>(2,2)=9.0。

2.2 球茎诱导体系的建立

由表 5 可见,大部分处理均能诱导球茎产生。从表 6 可以看出,NAA 对青天葵球茎的诱导有显著作用。当 NAA 浓度高于 1.5 mg/L 时,球茎诱导系数开始下降。从生长情况看,当 NAA 与 6-BA 浓度比为 1:1 时会直接在根状茎上长出绿色的芽,并伸展成为叶柄和叶片,并在叶柄下端长出白色的根,形成再生植株(图 3)。当 IBA 浓度为 0~0.2 mg/L 时,诱导系数随 IBA 浓度增大而提高,当 IBA 浓度达到 0.5 mg/L 时对球茎的质量有影响,IBA 浓度过高使根状茎形成的球茎较小,不利于后期移栽。方差分析表明,最优组合是 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>,即 MS+1.5 mg/L NAA+0.5 mg/L 6-BA+0.2 mg/L IBA,重复试验表明在该培养基上青天葵球茎诱导系数为 11.5,且球茎质量好(图 4)。

2.3 再生苗的移栽

在遮阴度为 60% 的大棚中将球茎和再生植株栽培于疏松、透气、透水、肥效好的土壤(黄土与草炭土混合)内,移栽

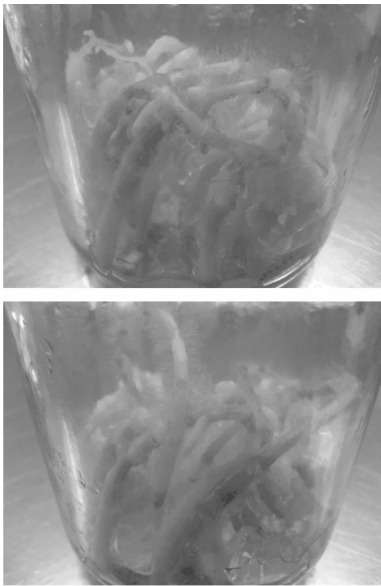


图2 青天葵继代培养

表 5 青天葵新球茎诱导正交试验结果

序号	A:NAA	B:GAB	C:IAA	诱导系数	生长情况
1	1	1	1	4.5	球茎较少
2	1	2	2	7.6	球茎多
3	1	3	3	3.8	根状茎形成植株
4	2	1	2	11.2	球茎多
5	2	2	3	10.7	球茎多但小
6	2	3	1	5.2	有部分球茎,根状茎上长出绿芽
7	3	1	3	4.4	球茎较少且小
8	3	2	1	4.5	球茎较少
9	3	3	2	4.6	球茎较少
k <sub>1</sub>	5.30	6.70	4.73		
k <sub>2</sub>	9.03	7.60	7.80		
k <sub>3</sub>	4.50	4.53	6.30		
R	4.53	3.07	3.07		

表 6 青天葵生根诱导试验方差分析结果

方差来源	离均差平方和	自由度	方差	F 值	P 值
A	35.13	2	17.56	26.04	0.01~0.05
B	14.91	2	7.45	11.05	0.05~0.1
C	14.11	2	7.05	10.46	0.05~0.1
SE	1.35	2	0.67		

注:F<sub>0.01</sub>(2,2)=99.0;F<sub>0.05</sub>(2,2)=19.0;F<sub>0.1</sub>(2,2)=9.0。



图3 再生植株

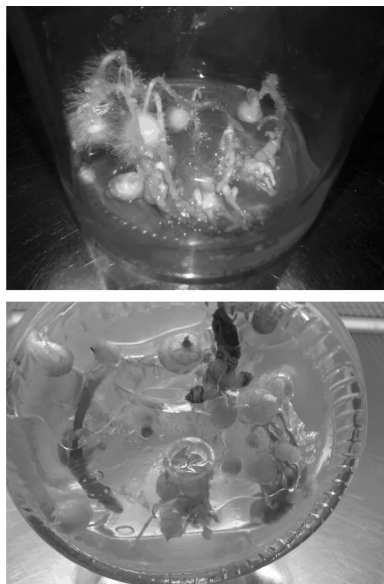


图4 球茎诱导

30 d 后球茎发芽成活率达到 90%, 但再生植株的成活率只有 65% (图 5)。相比之下, 球茎更有利于作为种源进行栽培。



图5 移植 30 d 球茎和再生苗发芽情况

### 3 结论与讨论

6-BA 是最重要的细胞分裂素, 能促进细胞分裂、非分化组织分化、侧芽生长等; NAA 是植物生长调节剂, 具有促进细胞分裂与扩大、诱导形成不定根等作用; IAA 是植物生长素, 能促进细胞分裂与细胞生长, 诱导形成不定根<sup>[9]</sup>。多种因素组合能更有效促进植物生长, 因此在 MS 培养基中配合使用 6-BA、NAA、IAA 对青天葵生长具有较大影响。本研究表明, 青天葵根状茎增殖的最适培养基为 MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA + 0.2 mg/L IAA, 在该培养基上形成

根状茎的数量最多, 增殖数为 6.5 倍, 且根状茎粗细适中。

青天葵为兰科植物, 和其他兰科植物一样靠球茎繁殖。兰科植物球茎的增殖方式在兰科植物工业化上尤为重要<sup>[10]</sup>。杜勤等对青天葵组织培养研究发现, 在 1/2MS + 2.0 mg/L 6-BA + 2.0 mg/L NAA 的生根培养基上培养 1 个月, 根茎上长出绿色的芽, 并伸展成为叶柄和叶片, 并在叶柄下端长出白色的根<sup>[8]</sup>, 这与本研究结果相似, 都是使用细胞分裂素和生长激素按 1:1 比例进行培养, 青天葵根状茎可以直接形成植株。但是直接形成植株的诱导率远低于新球茎诱导率, 植株移栽成活率也低于球茎, 且试管苗没有球茎便于携带和运送, 不利于青天葵大规模生产与种植。但可为新品种遗传改良提供材料。本研究表明, 球茎诱导的最佳培养基为 MS + 1.5 mg/L NAA + 0.5 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L IBA, 在该培养基中青天葵球茎诱导系数为 11.5, 且球茎质量好, 球茎发芽成活率达到 90%。这与凌征柱等使用的 MS + 2.0 mg/L NAA 诱导培养基<sup>[11]</sup>稍有不同, 但都是使用高浓度生长激素进行球茎诱导。

### 参考文献:

- [1] 国家中医药管理局. 中华本草: 第 8 册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 740-741.
- [2] 汪松, 解炎. 中国物种红色名录 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2004: 455.
- [3] 吴庆华, 凌征柱, 陆永梅. 中药青天葵组培球茎栽培的研究 [J]. 时珍国医国药, 2001, 12(10): 958-958.
- [4] 姜灵敏, 徐有明, 张冬梅, 等. 红刺玫愈伤组织诱导再生体系的建立 [J]. 江苏农业学报, 2012, 28(4): 914-916.
- [5] 余桂红, 张旭, 孙晓波, 等. 大麦苏啤 4 号幼胚愈伤组织的诱导及植株的高频再生 [J]. 江苏农业学报, 2013, 29(5): 953-956.
- [6] 张宁宁, 夏明霞, 张琼, 等. 卡特兰组织培养研究进展 [J]. 江苏农业科学, 2013, 41(4): 42-44.
- [7] 潘艳艳, 那少众, 王福维, 等. 全缘橐吾组培再生体系的研究 [J]. 江苏农业科学, 2012, 40(1): 56-59.
- [8] 杜勤, 陈文利, 王振华, 等. 青天葵组织培养及植株再生的研究 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(11): 812-814.
- [9] 周维燕. 植物细胞工程原理与技术 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2001.
- [10] 曹改义, 刘国民. 实用植物组织培养技术教程 [M]. 兰州: 甘肃科学技术出版社, 2002: 145.
- [11] 凌征柱, 梁学金, 潘素芬, 等. 青天葵诱导多球茎及丛生苗的研究 [J]. 种子, 1998(5): 35-36.