

唐凤鸾,郭丽君,赵 健,等.培养基及接种材料对走马胎瓶苗生根和移栽的影响[J].江苏农业科学,2020,48(19):30-34.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.19.006

培养基及接种材料对走马胎瓶苗生根和移栽的影响

唐凤鸾,郭丽君,赵 健,毛世忠

(广西壮族自治区中国科学院广西植物研究所,广西桂林 541006)

摘要:以走马胎(*Ardisia gigantifolia* Stapf.)健壮瓶苗为试验材料,通过正交设计研究了不同基本培养基、不同浓度 IAA 和 NAA 及培养材料类型对走马胎组培苗生根培养及移栽的影响。结果表明:(1)在生根培养中起主导作用的因素是基本培养基,在生根苗移栽中起主导作用的因素是培养材料类型和基本培养基;(2)生根率受影响最大,其次为根长,主根数最小;(3)走马胎生根培养最佳组合为 1/2 MS + 2.0 mg/L IAA + 1.0 mg/L NAA + 顶芽;(4)带叶茎段可用作走马胎组培苗生根培养材料,生根率达 88.95%,这与传统木本植物组织培养生根材料使用顶芽不同,具有一定创新性。本研究技术能有效提高培养材料使用率,减少药品用量,降低生产成本,可用于走马胎种苗规模化生产。

关键词:走马胎;规模生产;生根;材料类型;正交试验

中图分类号: S567.1⁺90.43 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)19-0030-05

走马胎(*Ardisia gigantifolia* Stapf.)属紫金牛科(Myrsinaceae)紫金牛属(*Ardisia*)常绿灌木,是我国西南地区少数民族常用药材,主治跌打损伤、风湿疼痛等,民间常有“两脚行不开,不离走马胎”之说。近年来,随着人们对植物化学和药理作用研究的深入,走马胎的新功能不断被发现,如三萜皂苷类成分对 HeLa、MCF-7、BCG-823、EJ、HepG2 等多种肿瘤细胞有明显抑制作用^[1-4],岩白菜素类衍生物能清除逆境产生的自由基,具有较强的抗氧化能力^[5],因此走马胎越来越受到人们的重视。

走马胎种子稀少,茎干分枝能力非常弱,利用传统的播种和扦插方法繁殖种苗难以满足生产需求。目前有关走马胎组织培养的研究已有报道^[6-8],在生根培养阶段,王强等均以不定芽单株为材料,MS 为基本培养基获得生根植株^[7-8];而唐凤鸾等发现,走马胎带叶茎段在以 1/2MS 为基本培养基的培养配方上也能获得较好的培养效果^[6];然而在木本植物组织培养中普遍认为,低浓度的无机盐更容易诱导其产生不定根^[9-10],并能减少药品用量,降低生产成本。笔者在试验中发现,利用腋芽繁殖的走马胎种苗叶片宽厚,茎干粗壮,质量好,但

由于该物种的顶端优势非常强,即使在组织培养中也基本只有 1 个侧芽萌发,极少出现 2 个或以上芽生长,这对木本植物以带叶顶芽为培养材料进行生根诱导的传统方法非常不利,严重降低了材料的使用效率,不利于生产成本的控制;同时发现,不同方法培养的走马胎组培苗对移栽管护技术要求不同,部分方法虽然能获得较好的生根率,但植株叶片质地薄,角质化程度低,极易失水萎蔫,非常不利于移栽,成活率也得不到保障。因此,为了明确培养基成分和各类培养材料对走马胎瓶苗生根及移栽的影响,提高种苗生产效率并控制成本,本试验研究不同基本培养基、培养材料类型及植物生长调节剂对走马胎组培苗生根培养的影响,以期而走马胎组培种苗的生产提供更实用的技术指导。

1 材料与方法

1.1 试验材料

用于走马胎(*Ardisia gigantifolia* Stapf.)生根培养的材料是由广西桂林周边地区的野生走马胎植株的幼嫩枝条经过启动、增殖培养获得的,为高度达 6.0 cm 以上的健壮瓶苗。

1.2 试验方法

试验于 2019 年 1—12 月分别在广西壮族自治区中国科学院广西植物研究所生物技术中心组培实验室及育苗大棚内进行。

1.2.1 不同因素对瓶苗生根培养的影响试验 在前期走马胎组织培养试验的基础上,选取叶片硕

收稿日期:2019-12-20

基金项目:广西科技计划(编号:桂科 AB16380212)。

作者简介:唐凤鸾(1978—),女,广西桂林人,副研究员,主要从事生物技术与珍稀濒危植物保育研究。E-mail:tf17288@163.com。

通信作者:赵 健,副研究员,主要从事栽培与生物技术研究。
E-mail:358788030@qq.com。

大、茎干粗壮、色泽纯正的走马胎组培苗,将其分别剪成带 2 张半张叶的顶芽、带 2 张半张叶的茎段和无叶茎段 3 类材料,茎长均达 2.0 cm 以上;将 3 类材料分别接种于含不同基本培养基、不同浓度生长

素(IAA)和萘乙酸(NAA)的生根培养基中,采用 4 因素 3 水平 $L_9(3^4)$ 正交设计进行试验(表 1)。试验共设 9 个处理,每个处理接种 20 瓶,每瓶接种 15 个材料,重复 3 次。

表 1 走马胎生根培养 $L_9(3^4)$ 正交试验设计

处理	基本培养基	IAA 浓度(mg/L)	NAA 浓度(mg/L)	培养材料类型
1	MS	1.0	0.5	顶芽
2	MS	1.5	1.0	带叶茎段
3	MS	2.0	1.5	无叶茎段
4	1/2MS	1.0	1.0	无叶茎段
5	1/2MS	1.5	1.5	顶芽
6	1/2MS	2.0	0.5	带叶茎段
7	1/2MS + 5 mg/L 维生素 B ₂	1.0	1.5	带叶茎段
8	1/2MS + 5 mg/L 维生素 B ₂	1.5	0.5	无叶茎段
9	1/2MS + 5 mg/L 维生素 B ₂	2.0	1.0	顶芽

1.2.2 生根培养试验结果验证 对正交试验结果进行统计分析,总结出优选培养方案,并通过验证试验及扩大生产对优选方案进行可靠性检验。验证试验每个处理接种 20 瓶,每瓶接种 15 个材料,重复 3 次;扩大生产每个处理至少接种 1 000 瓶,随机统计 100 瓶。向培养基中另加 30 g/L 蔗糖和 6.0 g/L 琼脂,调节 pH 值为 5.5 ~ 6.0。分装后于 124 ℃ 下消毒 22 min。培养室采用日光灯为光源,光照度为 40 ~ 60 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,照射时间为 12 h/d;培养温度为 (25 ± 2) ℃。

1.2.3 不同条件下培养的生根苗移栽试验 将通过正交试验获得的生根瓶苗从培养室移到大棚,炼苗 7 ~ 10 d 后取出,清洗干净培养基,并用甲基托布津 50 倍液浸泡 1 ~ 2 min,再移栽于园土、泥炭、珍珠岩体积比为 3 : 1 : 1 的混合基质中,在 85% 荫蔽度的大棚中培养。

1.3 统计分析

观测记录接种 50 d 后走马胎瓶苗的生根率、主根数、平均根长、侧根和茎叶生长情况及生根苗移栽 50 d 后的成活率。生根率 = 生根苗数/接种苗总数 $\times 100\%$,主根数为从苗茎基部长出的根数,平均根长 = 主根总长度/总根数,移栽成活率 = 移栽后成活苗数/移栽总苗数 $\times 100\%$ 。试验数据采用 Excel、SPSS 16.0 软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 不同因素对走马胎瓶苗生根培养的影响

将生根材料接入培养基约 1 周后茎段基部膨

大,2 周后可见白色粗壮的不定根形成,此时腋芽开始萌动生长,40 d 后形成完整植株。培养 50 d 后的观测结果(表 2)表明,各因素对走马胎组培苗生根培养中根系诱导和茎叶生长的影响差异较大。1 号处理至 6 号处理生根率高、主根数量多、侧根发达、根系生长均匀,且茎叶生长良好,色泽纯正(图 1);9 号处理虽然植株生根率达 97.78%,但根数少,根系弱,茎干细;7 号处理和 8 号处理不仅生根率低,分别只有 68.52% 和 58.89%,而且根茎叶整体生长效果差。

2.2 不同条件下走马胎组培苗生根培养的统计分析

对观测结果进行极差分析可知(表 3),各因素对走马胎组培苗生根培养中生根率的影响大小顺序为基本培养基 > 培养材料类型 > NAA > IAA,对主根数量的影响大小顺序为基本培养基 > IAA > NAA > 培养材料类型,对平均根长的影响大小顺序为基本培养基 > NAA > IAA > 培养材料类型;其中基本培养基对走马胎组培苗生根培养的影响最大,IAA、NAA、培养材料类型 3 个因素对生根率和主根数量的影响接近。进一步进行方差分析,结果显示,4 个测试因素对生根率的影响均达到极显著水平($P < 0.01$, $F_{0.01} = 8.02$),基本培养基和 NAA 对平均根长的影响达到极显著水平($P < 0.01$, $F_{0.01} = 8.02$),仅基本培养基对主根数量的影响达到极显著水平($P < 0.01$, $F_{0.01} = 8.02$)。由此可见,基本培养基类型在走马胎组培苗生根培养中起主导作用。

表 2 走马胎组培苗生根培养及移栽结果

处理	生根率 (%)	主根数 (条)	主根数范围 (条)	根长 (cm)	侧根生长情况	移栽成活率 (%)	茎生长情况	叶生长情况
1	98.81	3.90	3~5	3.47	侧根较多(10~30 条),长约 0.8 cm	95.44	粗壮	叶片大,数量多
2	98.33	3.60	3~5	4.64	侧根较少(4~20 条),长约 1.2 cm	66.43	粗壮	叶片较大,数量较多
3	97.78	3.28	3~4	4.61	侧根较多(10~40 条),长约 2.0 cm	43.97	中等	叶片小,数量少
4	100.00	4.26	3~6	4.72	侧根多(14~65 条),长约 1.6 cm	82.22	粗壮	叶片小,数量少
5	100.00	3.89	2~5	4.59	侧根较多(11~45 条),长约 2.1 cm	96.89	中等	叶片较大,数量较多
6	100.00	4.75	4~6	3.86	侧根少(0~18 条),长约 1.5 cm	95.00	粗壮	叶片较大,数量较多
7	68.52	1.24	1~2	2.59	侧根少(0~15 条),长约 0.5 cm	100.00	细弱	叶片较大,数量较少
8	58.89	1.2	1~2	1.91	侧根少(0~17 条),长约 0.3 cm	75.15	细弱	叶片小,数量少
9	97.78	1.61	1~2	3.52	侧根较少(3~25 条),长约 1.1 cm	95.48	细弱	叶片较大,数量较多

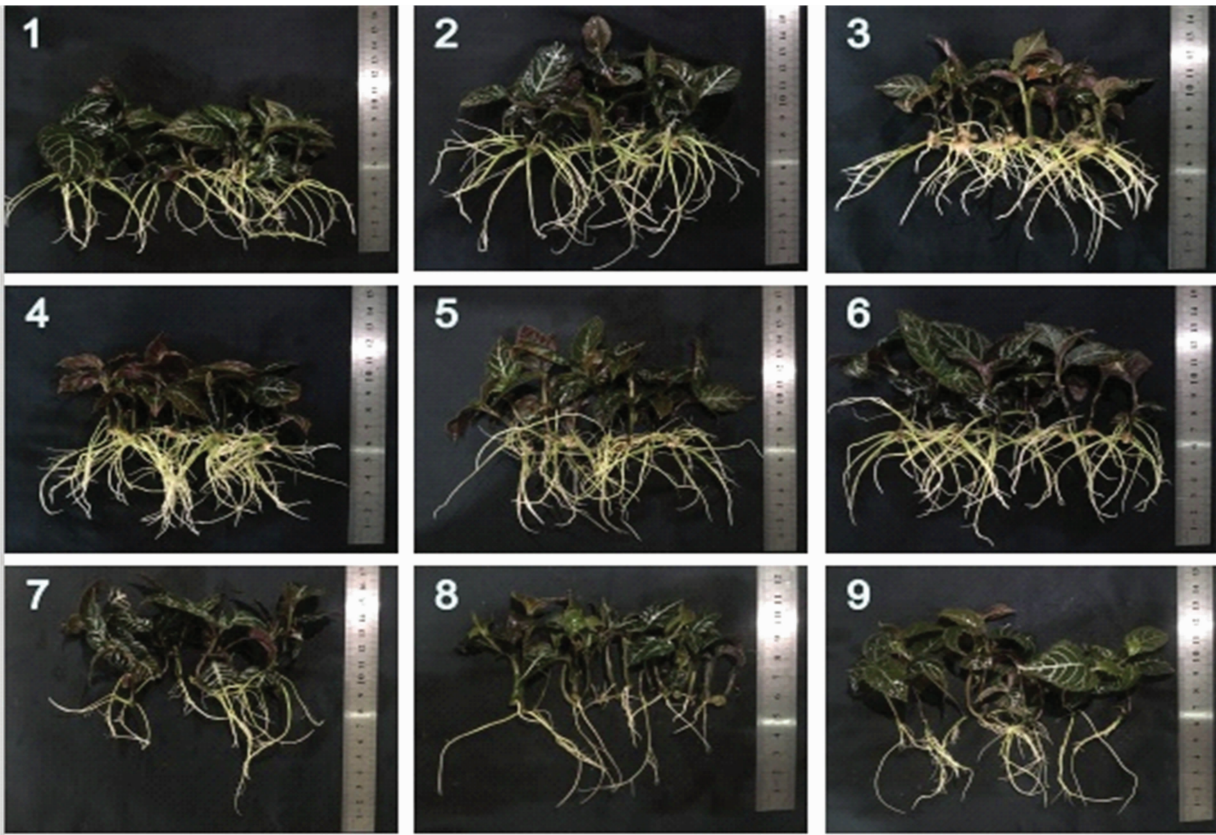


图1 不同处理的走马胎生根苗

对各因素不同水平培养条件下的植株生根率、平均主根数量和根长进行多重比较分析,结果(表 3)发现,使用不同基本培养基培养的效果差异显著($P<0.05$),当基本培养基为 1/2MS 时有利用走马胎组培苗生根培养,其生根率、主根数量和平均根长均最大;其次为 MS,除主根数量与 1/2MS 差异显著外($P<0.05$),其他培养效果与 1/2MS 接近;1/2MS + 5 mg/L 维生素 B₂ 培养效果最差,对应生根率、主根数量和平均根长分别只有 75.06%、1.21 条

和 2.67 cm。不同浓度 NAA 对生根率和平均根长的培养效果差异显著($P<0.05$),当 NAA 浓度为 1.0 mg/L 时有利于走马胎组培苗根系诱导及伸长,生根率和平均根长分别为 98.70%、4.29 cm,其次为 1.5 mg/L;不同浓度 IAA 和培养材料类型对生根率的影响差异也达显著水平($P<0.05$),其中 2.0 mg/L IAA 和顶芽的培养效果最好,生根率分别为 98.52%、98.86%;IAA、NAA 和培养材料类型对走马胎组培苗主根数量的影响差异不明显。

从分析结果可以看出,根据走马胎组培苗生根培养中生根率、平均根长各因素的最佳水平为 1/2MS、2.0 mg/L IAA、1.0 mg/L NAA、顶芽,根据主根数量各因素的最佳水平为 1/2MS、1.0 mg/L IAA、1.0 mg/L NAA、带叶茎段。但在植物组织培养中,当组培苗根系生长正常时,其生根培养的主要考核指标为生根率和根条数,又因 2.0 mg/L IAA、顶芽与 1.0 mg/L IAA、带叶茎段对生根率影响差异显著

($P < 0.05$),而对平均主根数量效果差异不明显($P > 0.05$),故综合考虑植株根系及茎叶生长情况、主效因素等认为,1/2MS + 2.0 mg/L IAA + 1.0 mg/L NAA + 顶芽为走马胎组培苗生根培养的最佳组合;带叶茎段的生根率和主根数量分别达 88.95% 和 3.20 条,均处于较好水平,也可用作走马胎组培苗生根培养。

表 3 走马胎生根率、主根数和根长的分析比较

分析	项目	生根率(%)				主根数量(条)				平均根长(cm)			
		基本培养基	IAA	NAA	材料类型	基本培养基	IAA	NAA	材料类型	基本培养基	IAA	NAA	材料类型
极差分析和多重比较	k_1	98.31a	89.11b	85.90b	98.86a	3.59b	3.31	3.15	3.13	4.24a	3.59	3.08b	3.86
	k_2	100.00a	85.74b	98.70a	88.95b	4.30a	2.76	3.16	3.20	4.39a	3.71	4.29a	3.70
	k_3	75.06b	98.52a	88.77b	85.56b	1.21c	3.21	2.80	2.78	2.67b	4.00	3.93b	3.75
	R	24.94	12.78	12.80	13.31	3.09	0.45	0.35	0.42	1.72	0.40	1.21	0.16
方差分析	自由度(df)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	均方(MS)	1747.94	395.27	406.28	429.96	21.75	0.29	0.51	0.24	8.10	0.39	3.51	0.06
	F 值	80.28 **	18.15 **	18.66 **	19.75 **	66.23 **	0.88	1.56	0.73	36.94 **	1.77	16.03 **	0.29

注:同列数据后不同小写字母表示相同因素不同水平间多重比较差异显著($P < 0.05$);**表示差异极显著($P < 0.01$); $F_{0.05} = 4.26$; $F_{0.01} = 8.02$ 。下表同。

2.3 验证试验及扩大生产结果

在正交试验基础上,对 1/2MS + 2.0 mg/L IAA + 1.0 mg/L NAA + 顶芽的生根组合(组合 1)及以 1/2MS + 2.0 mg/L IAA + 1.0 mg/L NAA 为生根培养基接种带叶茎段(组合 2)的实际培养效果进行验证。结果在验证试验中,组合 1 的生根率为 100.00%、主根数量为 4.95 条,组合 2 的生根率为 92.80%、主根数量为 4.24 条;在扩大生产中,组合 1 的生根率为 95.6%、主根数量为 4.18 条,组合 2 的生根率为 89.67%、主根数量为 4.35 条。可见以 1/2MS + 2.0 mg/L IAA + 1.0 mg/L NAA 为生根培养基时,顶芽和带叶茎段均可用于走马胎组培苗生根培养。

2.4 不同因素对走马胎生根苗移栽的影响

由表 2 可知,不同因素组合处理培养的走马胎生根苗在移栽环节成活率差异较大,其中 7 号处理移栽成活率为 100%,1、5、6、9 号等 4 个处理的成活率均达 95% 及以上,2 号和 3 号处理成活率较低,分别仅为 66.43% 和 43.97%。极差和方差分析结果表明,各因素对走马胎组培生根苗移栽成活率的影响大小顺序为培养材料类型 > 基本培养基 > IAA > NAA,且材料类型和基本培养基的影响达显著水平

($P < 0.05$)(表 4)。对各因素中不同水平间的成活率进行多重比较分析(表 4),发现在不同的基本培养基、培养材料类型和 IAA 浓度下差异显著($P < 0.05$),其中 MS、1/2MS、顶芽、带叶茎段及 1.0 mg/L IAA 的效果较好。这与生根培养和验证试验结果相呼应,进一步说明试验结果具有可靠性。

3 结论与讨论

从观测结果看,不同培养材料类型对走马胎组培苗生根培养的外观生长影响差异较明显,其中以顶芽和带叶茎段为材料培养形成的生根植株叶片宽厚、健壮,且数量较多;以无叶茎段培养的生根植株不仅叶片质地薄、叶面积小,而且数量也少。经统计分析后发现,培养材料类型可极显著影响走马胎组培苗的生根率($P < 0.01$, $F_{0.01} = 8.02$),生根率大小表现为顶芽 > 带叶茎段 > 无叶茎段,但对主根数量和平均根长的影响差异不明显。鉴于顶芽和带叶茎段对走马胎组培苗生根培养的整体影响,而且带叶茎段的生根率也可达 88.95%,因此在实际生产中可将较高的不定芽剪成符合要求的顶芽和带叶茎段进行生根培养,从而提高材料的利用率。

本研究发现,基本培养基种类在生根培养中起

表 4 走马胎生根苗移栽成活率的分析比较

分析	项目	移栽成活率(%)			
		基本培养基	IAA	NAA	材料类型
极差分析和多重比较	k_1	68.61b	92.55a	88.53	95.94a
	k_2	91.37a	79.49b	81.37	87.14a
	k_3	90.21a	78.15b	80.29	67.11c
	R	22.76	14.40	8.24	28.82
方差分析	自由度(df)	2	2	2	2
	均方(MS)	1471.59	34.16	37.52	1536.21
	F 值	4.41*	0.1	0.11	5.23*

主导作用,并能极显著地影响培养结果($P<0.01$, $F_{0.01}=8.02$)。其中 1/2MS 处理生根效果最好,3 个处理、3 类培养材料的生根率均达 100%,平均主根数量达 3.89~4.75 条/株,且根系发育良好,其次是 MS。对比发现,本试验中 1/2MS 的培养效果,比以 MS 为基本培养基,且以不定芽单株为培养材料好^[7-8],说明低盐浓度的 1/2MS 较高盐浓度的 MS 更适合走马胎组培苗生根培养,这与低盐浓度的 WPM 培养基更适合木本植物组织培养的结论相类似^[11]。可见,1/2MS 较 MS 更适合走马胎组培苗生根培养。

维生素 B₂ 别称核黄素,是生物氧化还原中黄酶类辅基的组成部分,起递氢作用,可影响机体生物氧化和代谢,能促使木本植物扦插生根,提高成活率^[12],如添加 5 mg/L 维生素 B₂ 可促进苏玛栎试管苗生根^[13],在一定范围内防风组培苗生根率随维生素 B₂ 浓度的增加而升高^[14]。然而,本研究中添加了维生素 B₂ 处理的生根率下降,主根和侧根数量也严重减少,且植株的茎叶生长受到影响,原因可能是维生素 B₂ 不利于走马胎试管苗生根,或是本试验使用浓度不当,但具体原因有待进一步研究。

促进植物生根的生长素在细胞分裂和生长旺盛的部位(通常为茎端分生组织)形成,这也正是木本植物组织培养中生根材料使用不定芽或顶芽的原因。然而,由于走马胎植株自体的特殊性,导致采用以芽繁芽方式繁殖苗木时芽数极少,如果只采用顶芽为生根材料则存在使用率低、培养成本高等问题。利用本研究技术,接种带叶茎段进行走马胎生根培养,可在保证生根率和种苗质量的情况下提高材料的利用率,为木本植物生根培养材料的选择利用提供了新的参考。

与播种和扦插等传统育苗方法相比,组织培养技术具有生产速度快、不受季节影响、种苗整齐等优势,但其生产成本低,如何控制成本、提高生产效

益显得尤为重要。本研究证明,1/2MS 比 MS 的生根效果更好,因此在生产时可以减少药品使用量;将较高的走马胎芽苗剪成多段材料培养,减小继代材料培养量,可大幅降低生产成本,这对走马胎种苗组培快繁及产业发展具有重要意义。

参考文献:

[1] 穆丽华,赵海霞,龚强强,等. 走马胎中的三萜皂苷类成分及其体外抗肿瘤活性研究[J]. 解放军药学报,2011,27(1):1-6.

[2] 穆丽华,张 静,刘 屏,等. 走马胎三萜皂苷衍生物的生物转化制备及其抗肿瘤活性研究[J]. 中草药,2018,49(6):1266-1271.

[3] 郑小丽,董宪喆,穆丽华,等. 走马胎中皂苷成分 AG4 对 MCF-7 肿瘤细胞增殖的影响及机制研究[J]. 中国药理学通报,2013,29(5):674-679.

[4] 谷永杰,穆丽华,刘 屏,等. 走马胎生物转化产物 S1 的抗肿瘤活性及对 Bel-7402 肝癌细胞凋亡及细胞周期的影响[J]. 中药药理与临床,2018,34(3):26-29.

[5] 杨 竹,黄敬辉,王乃利,等. 走马胎中新的岩白菜素衍生物的提取分离及体外抗氧化活性测定[J]. 沈阳药科大学学报,2008,25(1):30-34.

[6] 唐凤鸾,赵 健,赵志国,等. 走马胎的组织培养与快速繁殖[J]. 植物学报,2019,54(4):378-384.

[7] 王 强,陈国华,陈冬怡,等. 民族药用植物走马胎快繁技术[J]. 农业工程,2019,9(4):104-110.

[8] 符连柳,徐 立,李志英,等. 走马胎离体培养及植株再生[J]. 北方园艺,2017(4):98-101.

[9] 周玉洁,韦雪芬,申长青,等. 濒危植物四药门花的组培快繁[J]. 植物生理学报,2018,55(5):635-641.

[10] 吴玲利,柯镇峰,龚 春,等. 白木通组织培养及快速繁殖[J]. 植物生理学报,2015,51(6):903-908.

[11] 邓小梅,吴乔娜,李蕊萍,等. 壳斗科植物组织培养研究进展[J]. 南京林业大学学报(自然科学版),2018,42(4):171-180.

[12] 李 胜,杨德龙,李 唯,等. 植物试管苗离体生根的研究进展[J]. 甘肃农业大学学报,2003,38(4):373-384.

[13] 吕秀立,沈烈英,施季森,等. 苏玛栎离体培养和植株再生研究[J]. 植物研究,2015,35(2):185-190.

[14] 毕 博. 防风多倍体种质资源创新技术研究[D]. 长春:吉林农业大学,2011.