

# 金铁锁腋芽诱导离体培养技术研究

杨泽雄<sup>1</sup>, 尹丽莎<sup>2</sup>, 张俊<sup>3</sup>, 唐军荣<sup>2</sup>

(1. 西南林业大学团委, 云南 昆明 650224; 2. 云南省林业高级技工学校, 云南 昆明 650213;

3. 西南林业大学 云南省高校林木遗传改良与繁育重点实验室, 云南 昆明 650224)

**摘要:**以金铁锁带叶腋的嫩茎为外植体, 开展了基本培养基、腋芽诱导和增殖培养较优培养条件的筛选, 并对所获得的生根苗进行了移栽练苗试验。结果表明: MS 培养基适合作为金铁锁离体培养的基本培养基; 金铁锁腋芽诱导培养的适宜培养基为 MS+3.0 mg/L 6-BA+0.01 mg/L TDZ+0.20 mg/L NAA, 平均诱导芽数为 4.15; 在培养基 1/2MS+0.30 mg/L IBA+0.10 mg/L NAA+0.3 g/L 活性炭中进行生根培养, 生根率可达 89.6%; 在腐殖土: 红土: 珍珠岩=1:1:1 的基质中练苗, 金铁锁组培苗的成活率可达 90.5%。

**关键词:**金铁锁; 腋芽诱导; 组织培养

**中图分类号:**S 681.903.6 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2016)08-0081-04

金铁锁(*Psammosilene tunicoides* W. C. Wu et C. Y. Wu)属石竹科(Caryophyllaceae)金铁锁属(*Psammosilene*)植物, 是我国传统的药用植物, 又名独定子、小霸王、金丝矮陀陀、象牙七、对叶七、土人参等<sup>[1]</sup>, 主要分布在贵州、四川、云南等地<sup>[2]</sup>, 作为传统中药材, 首载于明代本草学家兰茂著的《滇南本草》中, 谓其: “味辛辣, 性大温, 有小毒, 吃之令人多吐, 专治面寒疼, 胃气心气痛, 攻疮痈

排脓<sup>[3]</sup>。金铁锁以根入药, 具有活血化瘀、消炎、止血、止痛化脓等作用, 传统中医适用于胃痛、跌打扭伤以及风湿类风湿等症<sup>[4]</sup>, 具有较好的镇痛和抗炎作用<sup>[5]</sup>。

我国对中药材的利用和研究已有 3 000 年的历史, 传统的中药采集一般以野外挖采为主, 野生资源随着近几年中药用量的加大而变得紧张。中药材的缺乏导致价格上涨, 同时加剧了这种植物资源的开采力度, 导致药用植物资源的匮乏<sup>[6]</sup>。近年来, 药用植物金铁锁的需求量日益增加, 其自然繁殖力低, 致使资源无序利用, 自然蕴藏量下降, 从而出现了野生资源缺乏的问题。因此通过植物组织培养技术快速繁殖金铁锁种苗, 对解决金铁锁资源紧缺问题有着重要意义。

**第一作者简介:**杨泽雄(1978-), 男, 云南洱源人, 硕士, 讲师, 现主要从事教学管理及风景园林等工作。E-mail: ynsyxny@163.com.

**基金项目:**云南省高校林木遗传改良与繁育重点实验室基金资助项目。

**收稿日期:**2016-02-01

changes under warm-water soaked and gibberellin (GA) treatments were analyzed, to determinate seedling growth regularity. The results showed that the average fruit fresh weight and thousand-grain weight were 1.45 g, 173.62 g. The coefficient of variation was from 2.08% to 10.87%. The biggest coefficient of variation among them was of seeds height, and the coefficients of variation of fruit were smaller than those of seed. Warm-water soaked and GA treatment could improve seeds moisture content and amylase activity, furthermore break seeds dormancy and promote seeds germination. The gained better seed germination rate were treated by 400 mg/L GA till 800 mg/L GA, and the seed germination rate reached up to more than 75%. With the increase of sowing depth the germination rate increased at first and then decreased. 2—4 cm were the best sowing depth. The one-year seedling stage showed a bimodal curve, and peak value were obtained at 110 d and 150 d, which were corresponded with the twice pumping shoots a year at the seedling stage. The high oil yielding could be achieved by the bigger-seeded selection, while cotyledon thickness was the key selecting factors, and also the nutrient accumulation in cotyledons could be attained by using corresponded nutrient measures. Warm-water soaked and GA treatment could improve seeds water absorption and the activity of amylase, thus to break seeds dormancy and promote seeds germination. Strengthened fertilizer and water management at the spring shoot and autumn shoot stage could promote seedling growth especially.

**Keywords:** *Sapium japonicum*; seed characters; seed dormancy; growth rhythms

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试金铁锁采自云南省丽江市玉龙县,挖取长势好、健壮、无病虫害的植株带回,盆栽于实验室内,待其长出嫩枝后,备用。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 基本培养基的筛选** 取金铁锁带叶腋的幼嫩茎段用水冲洗干净,75%酒精消毒 30 s,0.1%升汞消毒 10 min,最后用无菌水冲洗 3~5 次,作为外植体。采用单因素试验,培养基选 KC、N6、MS、1/2MS、B5,上述基本培养基中均附加 NAA 1.00 mg/L,30.0 g/L 蔗糖,5.0 g/L 琼脂,pH 5.7。接种时将茎段平铺于基本培养基上培养。每种培养基接种 5 瓶,每瓶接种 4 枚,30 d 后统计平均增殖系数及幼苗的生长情况,最终筛选出适宜金铁锁的离体培养的基本培养基。

**1.2.2 腋芽诱导** 以 1.2.1 中筛选的培养基为基本培养基(下同),设计不同配比的外源激素组合,并设空白对照(CK),共计 10 个处理,将外植体接种于培养基中,每处理接种 5 瓶,每瓶接种 4 枚,30 d 后统计平均诱导腋芽数、平均苗高及幼苗的生长情况,最终筛选出适宜的金铁锁腋芽诱导培养的较优培养条件。腋芽诱导的不同外源激素组合方案如表 1 所示。

**1.2.3 增殖培养** 待诱导出的生长健壮的腋芽长至 4~5 cm,将其截为 1~2 cm 带有叶腋的茎段,平铺于增殖培养基上进行增殖培养。增殖培养时,在基本培养基中添加不同配比的外源激素组合并设空白对照(CK),共计 10 个处理,每处理接种 5 瓶,每瓶接种 4 枚,30 d 后统计平均增殖系数、平均苗高及幼苗的生长情况,最终筛选出适宜的金铁锁茎段增殖培养的较优条件。增殖培养时不同外源激素组合方案如表 2 所示。

表 1 金铁锁腋芽诱导培养方案

Table 1 The scheme on axillary bud induction culture of *P. tunicoides* mg/L

处理	6-BA	TDZ	NAA
CK	0	0	0
M1	1.0	0.01	0.05
M2	1.0	0.05	0.10
M3	1.0	0.10	0.20
M4	3.0	0.05	0.05
M5	3.0	0.10	0.10
M6	3.0	0.01	0.20
M7	5.0	0.10	0.05
M8	5.0	0.01	0.10
M9	5.0	0.05	0.20

**1.2.4 生根培养** 选取增殖培养中健壮的无菌苗,切取长约 2 cm 的顶芽接入 1/2MS+0.3 mg/L IBA+0.10 mg/L NAA+0.3 g/L 活性炭并附加 30.0 g/L 蔗糖和 5.0 g/L 琼脂的培养基(pH 5.7)中。观察并统计植

表 2 金铁锁茎段增殖的培养方案

Table 2 The scheme on stem multiplication culture of *P. tunicoides* mg/L

处理	6-BA	TDZ	NAA
CK	0	0	0
A1	0.1	0.01	0.01
A2	0.1	0.05	0.05
A3	0.1	0.10	0.10
A4	0.2	0.05	0.01
A5	0.2	0.10	0.05
A6	0.2	0.01	0.10
A7	0.3	0.10	0.01
A8	0.3	0.01	0.05
A9	0.3	0.05	0.10

株生长和生根情况。

**1.2.5 练苗** 将生长健壮的金铁锁生根苗从培养室中移至温室大棚,瓶内练苗 7 d 后,移栽至腐殖土:黄土:珍珠岩=1:1:1 的基质中进行练苗,并统计移栽成活率及生长情况。培养条件为温度 20℃,光照强度 1 200 lx,光照周期 12 h/d。

## 2 结果与分析

### 2.1 基本培养基对金铁锁生长情况的影响

金铁锁幼嫩带叶腋的茎段经消毒后,接种于不同的基本培养基中。由表 3 可以看出,经 30 d 的培养,增殖倍数可达 0.8~1.7 倍,MS 培养基不定芽增殖系数最高为 1.7,KC 培养基不定芽增殖系数最低为 0.8,说明不同类型的基本培养基对金铁锁茎段培养有明显影响。方差分析表明,在 MS、B5 和 1/2MS 培养基中,金铁锁茎段的平均增殖系数之间无显著差异,说明在这 3 种基本培养基中,均可获得较好的培养效果。但是,MS 培养基中生长的芽苗长势粗壮、浓绿,生长效果明显优于 B5 和 1/2MS 培养基,因此认为,MS 培养基适合作为金铁锁茎段培养的基本培养基。

表 3 不同基本培养基对金铁锁增殖的影响

Table 3 The influence on *P. tunicoides* proliferation in different basic culture medium

培养基种类	平均增殖系数	生长情况	综合评定
MS	1.7 a	色浓绿,芽粗壮	优
B5	1.6 a	色较绿,芽较壮	良
1/2MS	1.6 a	色较绿,芽较壮	良
N6	1.1 b	色黄白,芽细弱	差
KC	0.8 c	色黄白,芽细弱	差

注:同列相同字母表示在 0.05 水平上差异不显著,不同字母表示差异显著,下同。

### 2.2 诱导培养

金铁锁带叶腋的茎段在不同的分化培养条件下,其腋芽的诱导效果不同。由表 4 可知,对照组 CK 平均分化芽数和苗高最低,说明外源激素的加入是金铁锁培养的必要条件。处理 M4、M6 及 M8 中,金铁锁的平均分化芽数差异不显著,说明在这 3 种处理下,均可获得较为理想的诱导效果。平均苗高方面,处理 M5 中,其丛生

芽平均苗高为除 CK 以外处理中最低的,为 1.9 cm;而 M4、M6 及 M8 处理的平均苗高较高且无显著差异。但从芽的生长情况来看,以 M6 号处理中苗的生长最为浓

绿粗壮,且无玻璃化现象。因此,金铁锁腋芽诱导培养的最佳培养方案为 M6 号处理,即:MS+3.0 mg/L 6-BA+0.01 mg/L TDZ+0.20 mg/L NAA(图 1)。

表 4 不同培养基对金铁锁腋芽诱导的影响

Table 4 The influence on axillary bud induction of <i>P. tunicoides</i> in different culture medium						
处理	6-BA/(mg·L <sup>-1</sup> )	TDZ/(mg·L <sup>-1</sup> )	NAA/(mg·L <sup>-1</sup> )	平均分化芽数	平均苗高/cm	生长情况
CK	0	0	0	0.53e	0.8e	色绿、弱短
M1	1.0	0.01	0.05	3.02c	2.3c	色绿、弱短
M2	1.0	0.05	0.10	2.67c	2.2c	色绿、较弱
M3	1.0	0.10	0.20	3.43b	2.6b	色嫩绿、较壮、少量玻璃化
M4	3.0	0.05	0.05	4.49a	3.0a	色浓绿、较弱
M5	3.0	0.10	0.10	3.57b	1.9d	色嫩绿、较壮、少量玻璃化
M6	3.0	0.01	0.20	4.15a	3.1a	色浓绿、粗壮
M7	5.0	0.10	0.05	3.23b	2.3c	色嫩绿、较弱、大量玻璃化
M8	5.0	0.01	0.10	4.57a	2.9a	色浓绿、较壮、少量玻璃化
M9	5.0	0.05	0.20	2.12d	2.6b	色绿、较壮



图 1 金铁锁腋芽诱导培养(30 d)

Fig. 1 *P. tunicoides* differentiation culture(30 days)

2.3 增殖培养

在不同的增殖培养条件下,金铁锁茎段的增殖效果不同。从表 5 可以看出,没有添加激素的处理 CK 增殖系数最低为 1.33。在添加了外源激素的处理中,A2 处理的增殖系数和苗高均为最高(分别为 5.33 和 4.0 cm),且与其它处理均有显著差异。且在该处理中增殖苗长势粗壮、色浓绿,生长效果明显优于其它处理。因此,金

表 5 不同培养基对金铁锁茎段增殖的影响

Table 5 The influence on <i>P. tunicoides</i> multiplication in different culture medium						
处理	6-BA/(mg·L <sup>-1</sup> )	TDZ/(mg·L <sup>-1</sup> )	NAA/(mg·L <sup>-1</sup> )	平均增殖系数	平均苗高/cm	生长情况
CK	0	0	0	1.33e	2.0e	色绿、较壮
A1	0.1	0.01	0.01	4.00b	2.3d	色嫩绿、较壮
A2	0.1	0.05	0.05	5.33a	4.0a	色浓绿、粗壮
A3	0.1	0.10	0.10	3.33c	2.7c	色浓绿、较壮
A4	0.2	0.05	0.01	4.00b	3.0b	色浓绿、粗壮
A5	0.2	0.10	0.05	3.00c	2.0e	色绿、弱短
A6	0.2	0.01	0.10	4.00b	3.3b	色浓绿、较壮
A7	0.3	0.10	0.01	3.33c	2.3d	色绿、较壮
A8	0.3	0.01	0.05	2.10d	2.0e	色嫩绿、弱短
A9	0.3	0.05	0.10	2.00d	1.7e	色嫩绿、弱短

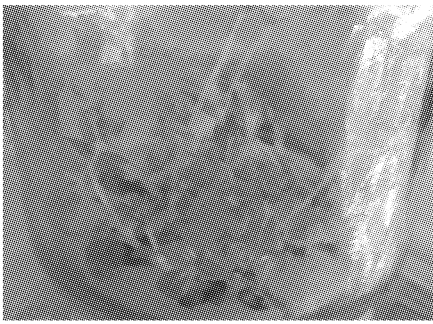


图 2 金铁锁增殖培养(30 d)

Fig. 2 *P. tunicoides* proliferation culture(30 days)

铁锁带叶腋茎段的最佳增殖培养基为 A2 号处理组合(MS+0.1 mg/L 6-BA+0.05 mg/L TDZ+0.05 mg/L NAA)(图 2)。

2.4 生根培养

试验选取增殖培养中健壮的无菌苗为材料,切取长约 2 cm 的顶芽接入 1/2MS+0.3 mg/L IBA+0.10 mg/L NAA+0.3 g/L 活性炭的生根培养基中,植株生长健壮,生根条数为 5.3 条,生根率达 89.6%(图 3)。



图 3 金铁锁生根培养(30 d)

Fig. 3 *P. tunicoides* rooting culture(30 days)



### 2.5 练苗移栽

将生根良好,生长健壮的金铁锁组培瓶苗从组织培养室移至普通实验室或温室大棚,瓶内练苗7 d,然后将苗从组培瓶中移栽至黄土:腐殖土:珍珠岩=1:1:1的基质中,植株生长健壮,成活率达到90.5%(图4)。



图4 金铁锁移栽练苗

Fig. 4 *P. tunicoides* transplanting and exercising

### 3 讨论与结论

试验结果表明,MS培养基适合作为金铁锁生长的基本培养基。这与杨耀文等<sup>[7]</sup>和欧阳志勤等<sup>[8]</sup>的研究结果相一致,说明MS基本培养基组分比较适合金铁锁离体培养。而试验中发现,在MS和B5培养基中,金铁锁茎段的平均增殖系数之间无显著差异。但是,MS培养基中生长的芽苗长势粗壮、浓绿,生长效果明显优于B5培养基中的芽苗。而李景滨等<sup>[9]</sup>以B5为基本培养基,分别对金铁锁茎段进行无菌苗诱导、增殖和生根培养,均取得了较理想的效果,这与该研究结果有差异,可能与培养时的条件、培养周期及金铁锁取材的基因型不同有关。

研究表明,金铁锁腋芽诱导培养的适宜培养基为MS+3.0 mg/L 6-BA+0.01 mg/L TDZ+0.20 mg/L NAA,平均分化芽数为4.15,诱导不定芽颜色浓绿,长势较粗壮。李景滨等<sup>[9]</sup>在B5培养基中附加了0.5 mg/L 6-BA和0.5 mg/L IAA,诱导金铁锁新生苗效果最好,所得芽苗生长快,叶色浓绿。可见,不同的基本培养基中,附加不同激素,均可获得较理想的诱导效果。而杨耀文等<sup>[7]</sup>和欧阳志勤等<sup>[8]</sup>在以MS为基本培养诱导分化时,均通过了愈伤诱导途径。但是,从腋芽长出的植株生长健壮,具备优良的遗传性,可作为进一步增殖和生根的材料。因此,为确保优良试验材料的来源,应尽量减少植株从愈伤中增殖,多从腋芽中增殖。

### 参考文献

- [1] 金虹,谭克勤.西南民族药金铁锁的研究现状与展望[J].中医药导报,2005,12,11(12):66-67,73.
- [2] 王用平,赵英瑞.贵州珍稀濒危药用植物金铁锁的初步研究[J].中国野生植物,1992(1):26.
- [3] 兰茂.滇南本草[M].昆明:云南人民出版社,1976,1:861.
- [4] 邱德文,杜江,夏同珩.中华本草苗药卷彩色图谱[M].中医古籍出版社,2006(6):258.
- [5] 刘潇潇,王磊,王强.金铁锁根的化学成分研究[J].中国中药杂志,2007,32(10):921-923.
- [6] 赵迎春,王新安.我国药用植物资源开发利用问题的探讨[J].中国林副特产,2005(4):76.
- [7] 杨耀文,钱子刚,谢晖,等.珍稀濒危药用植物金铁锁的组织培养和快速繁殖研究[J].世界科学技术(中医药现代化),2003,5(4):56-59.
- [8] 欧阳志勤,黄家林,胡虹.金铁锁的离体培养和快速繁殖[J].植物生理通讯,2002,38(4):361.
- [9] 李景滨,易继财,张宗申.金铁锁组织培养快速繁殖技术研究[J].广东农业科学,2011,46(2):29-31.

## Study on *vitro* Culture Technology by Axillary Bud Induction of *Psammosilene tunicoides* W. C. Wu et C. Y. Wu

YANG Zexiong<sup>1</sup>, YIN Lisha<sup>2</sup>, ZHANG Jun<sup>3</sup>, TANG Junrong<sup>2</sup>

(1. Communism Youth League of Southwest Forestry University, Kunming, Yunnan 650224; 2. Yunnan Forestry Senior Technical School, Kunming, Yunnan 650213; 3. Key Laboratory for Forest Genetic and Tree Improvement and Propagation in Universities of Yunnan Province, Southwest Forestry University, Kunming, Yunnan 650224)

**Abstract:** The tender stem with leaf axil of *Psammosilene tunicoides* was used as explants to select the basic culture medium, the best culture condition of axillary bud induction and multiplication culture. The transplanting and exercising of rooting seedling were also be carried out. The results showed that MS culture medium was suited to use as the basic culture medium to *vitro* culture of *P. tunicoides*. The good medium for axillary bud induction of *P. tunicoides* was MS+3.0 mg/L 6-BA+0.01 mg/L TDZ+0.20 mg/L NAA, the average induction buds was 4.15. In rooting medium of 1/2MS+0.30 mg/L IBA+0.10 mg/L NAA+0.3 g/L CA, the rooting rate was 89.6%; planting in the matrix of humus: laterite: perlite=1:1:1, the survival rate of *P. tunicoides* was 90.5%.

**Keywords:** *P. tunicoides*; axillary bud induction; tissue culture