

DOI:10.11937/bfyy.201704022

走马胎离体培养及植株再生

符运柳^{1,2}, 徐立^{1,2}, 李志英^{1,2}, 黄碧兰^{1,2}, 李克烈^{1,2}

(1. 中国热带农业科学院 热带作物品种资源研究所, 海南 儋州 571737; 2. 农业部华南作物基因资源与种质创制重点实验室, 海南省热带作物种质资源遗传改良与创新重点实验室, 海南 儋州 571737)

摘 要:以走马胎幼嫩叶片为外植体, 研究不同培养基对走马胎叶片愈伤组织诱导、不定芽分化、增殖及生根培养的影响。结果表明:叶片在 MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+NAA 1.0 mg·L⁻¹ 培养基上诱导产生的愈伤组织最适合用于进行分化和增殖;愈伤组织分化不定芽的最适培养基为 MS+6-BA 2.0 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹, 分化率高达 88.9%;壮苗培养基为 MS+6-BA 0.5 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹+10% 椰子水(CW);最适的生根培养基为 MS+NAA 0.1 mg·L⁻¹+IBA 1.0 mg·L⁻¹, 生根率达 100%, 根系发达, 植株生长健壮。经生根培养及练苗, 走马胎的假植成活率达 85%。

关键词:走马胎;叶片;离体培养;植株再生

中图分类号:S 793.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)04-0098-04

走马胎(*Ardisia gigantea* Stapf.) 属紫金牛科(Myrsinaceae)紫金牛属(*Ardisia*)常绿直立灌木, 又名大叶紫金牛, 分布于我国云南、江西、福建、广东、广西等省(区)。多生于海拔 1 300 m 以下的山谷、溪旁的疏、密林下潮湿处^[1]。走马胎的根茎及全株具有祛风湿壮筋骨、活血化瘀、消肿止痛、止血生肌等功效^[2-3];可治疗类风湿关节炎^[4]、筋骨疼痛、跌打损伤、产后瘀血、半生不遂等病症。作为一种民间常用中草药, 随着近年来对走马胎需求量的与日俱增, 其野生资源已日趋枯竭, 甚至在有些分布点已经很难见到。因此, 为满足市场需求, 人工种植势在必行。

在自然条件下, 走马胎通常采用种子繁殖, 也可采用扦插繁殖方法^[5]。扦插繁殖耗费植物材料较多, 繁殖效率较低, 且长期的无性繁殖会带来品种退化、病虫害等问题;在种子繁殖方面, 据科研人员

多年研究发现, 走马胎开花坐果率不到 5%, 且野生资源分散, 成熟时间不一致, 造成了种子采集困难等问题。另外, 种子萌芽需要的时间较长, 不利于种苗快速繁育。所以, 扦插和播种都不能作为走马胎种苗批量繁殖的方法。

植物组织培养具有原材料需求量少、不受时间和地点限制、繁殖系数高、可保持母本优良性状等特点, 在植物种苗繁育上广泛应用。关于紫金牛属植物的组培技术已有一些报道, 如朱砂根^[6]、虎舌红^[7]、九节龙、紫金牛^[8]、堇叶紫金牛^[9]等, 但走马胎的组织培养和快繁技术的研究尚鲜见报道。该研究以走马胎叶片为外植体, 研究影响其植株再生的因素, 旨在为走马胎的工厂化育苗提供技术支持, 为有效保护和可持续利用走马胎的野生资源, 满足走马胎人工栽培对种苗的需求提供保证。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试的马胎植株幼嫩叶片取自中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所快繁中心大棚。

1.2 试验方法

1.2.1 叶片消毒 选取健壮无病虫害的走马胎幼嫩叶片, 在流水下冲洗干净, 然后在超净工作台上用吸水纸吸干材料表面水分, 再用 75% 酒精消毒 30 s~1 min, 无菌水冲洗 2 次, 接着用 0.1% HgCl₂ 溶液消

第一作者简介:符运柳(1978-), 女, 硕士, 助理研究员, 现主要从事植物种质资源保存等研究工作。E-mail:fyfj_2007@126.com.

责任作者:李志英(1971-), 女, 博士, 研究员, 研究方向为植物种质资源保存与利用。E-mail:xlizhiying@vip.163.com.

基金项目:农业部引进国际先进技术资助项目(2015-Z22);农业部物种资源保护专项资助项目(16RZZY-101)。

收稿日期:2016-10-08

毒 8 min, 无菌水冲洗 5 次, 最后用无菌滤纸吸干材料表面的水分待用。

1.2.2 愈伤组织的诱导 将消毒好的叶片切掉叶缘, 然后沿与叶脉垂直方向切成约 $0.5\text{ cm} \times 1.0\text{ cm}$ 的小块接种于不同培养基: 1) MS+6-BA $1.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 2) MS+6-BA $1.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +NAA $1.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 3) MS+NAA $1.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 上诱导愈伤组织。每处理接种 10 个外植体, 3 次重复, 30 d 后统计结果。愈伤组织诱导率(%)=产生愈伤组织的外植体/接种外植体 $\times 100$ 。

1.2.3 诱导愈伤组织分化不定芽 将愈伤组织切割成小块接种于以下几种不定芽诱导(分化)培养基上: 1) MS+6-BA $1.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 2) MS+6-BA $1.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +NAA $0.1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 3) MS+6-BA $2.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 4) MS+6-BA $2.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +NAA $0.1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 5) MS+6-BA $3.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 6) MS+6-BA $3.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +NAA $0.1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 上, 筛选出适宜的不定芽诱导培养基配方。每处理接种 30 个外植体, 3 次重复, 40 d 后统计不定芽诱导情况。不定芽诱导率(%)=分化不定芽外植体/接种外植体 $\times 100$ 。

1.2.4 继代增殖 将从愈伤组织分化的不定芽切割成小块转入继代增殖培养基中, 形成丛芽, 再将丛芽切割成小丛后接种到相同的培养基上继代增殖培养。

1.2.5 壮苗及生根培养 生根前将丛芽切割成小块, 转到 MS(改良)+6-BA $0.5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +NAA

$0.1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +10%椰子水(CW)的培养基上进行壮苗培养。待不定芽长到 2~3 cm 时, 切取单芽, 接种于生根诱导培养基上进行生根培养。再生苗生根率(%)=生根苗株数/接种总株数 $\times 100$ 。

1.2.6 培养条件 试验所用培养基除壮苗培养基为 MS 改良培养基外, 基本培养基均为 MS。蔗糖用量为 $30\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、卡拉胶 $6.5\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH 5.8; 光照时间 $12\text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$, 光照强度 $30\sim 40\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 培养温度 $(26\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 。

1.3 数据分析

采用邓肯氏新复极差法对试验数据进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 不同培养基配方对走马胎叶片愈伤诱导的影响

由表 1 可知, 单独添加细胞分裂素 6-BA, 叶片不能诱导产生愈伤。6-BA 与 NAA 结合使用或单独添加 NAA, 外植体均能诱导产生愈伤组织, 但配方不同, 诱导产生的愈伤组织质地、颜色也不一样。单独添加 $1.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 的外植体产生的愈伤组织黄白色, 质地软绵(图 1-A), 不易分化; 而 $1.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 与 $1.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 结合使用时, 外植体先是在切口处产生黑色愈伤, 继而形成质地较硬的翠绿色愈伤组织(图 1-B), 将此种愈伤组织切割成小块接于分化培养基上可分化不定芽(图 1-C)。

表 1 不同植物生长物质对走马胎叶片愈伤诱导的影响

基本培养基 Medium		植物生长物质浓度 Concentration of plant growth substances/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)		愈伤组织诱导率 Callus induction frequency/%	愈伤组织质地和生长状态 Status and quality of callus
		6-BA	NAA		
MS		1.0	0.0	0	叶边缘变褐, 叶片变黄, 无愈伤产生
		1.0	1.0	100	叶边缘或叶脉处产生黑色或翠绿色愈伤, 质地较硬
		0.0	1.0	100	黄白色愈伤, 质地软绵

2.2 不同植物生长物质对走马胎不定芽诱导的影响

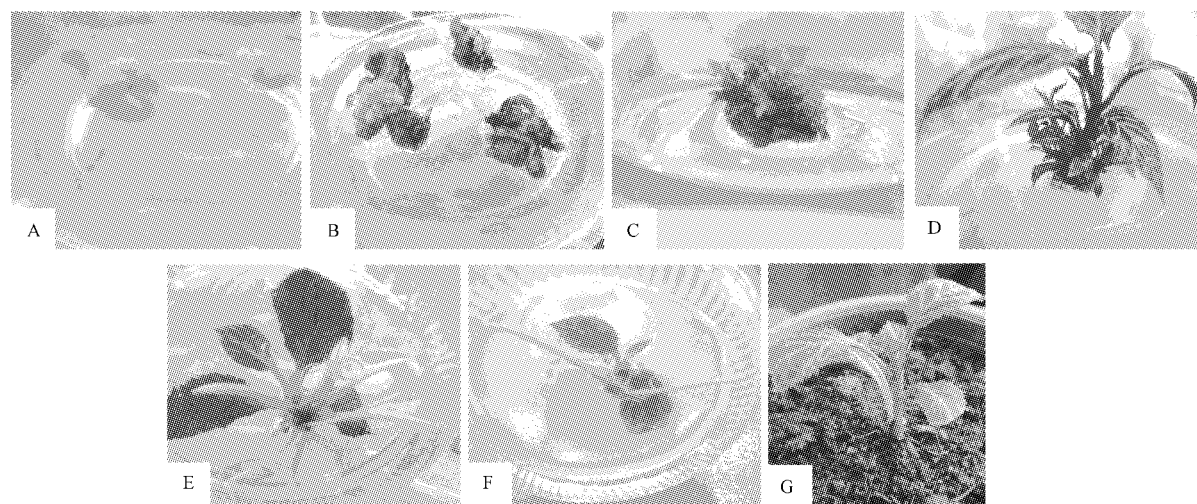
将翠绿色愈伤组织切成小块, 接种于附加 6-BA、NAA 配比的培养基上诱导分化不定芽。由表 2 可知, 在相同的 6-BA 浓度下, 单独添加 6-BA, 分化不定芽诱导率显著低于 6-BA 与 NAA 配合使用; 而在相同浓度的 NAA 与不同浓度的 6-BA 进行配比时, 6-BA 浓度越高, 产生的不定芽数越多, 增殖系数越高, 但芽较细弱, 且不易长高(图 1-C)。因此, MS+6-BA $2.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +NAA $0.1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 配方为较适宜的不定芽诱导及继代增殖培养基。

表 2 植物生长物质对走马胎不定芽诱导的影响

植物生长物质及浓度 Concentration of plant growth substances/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)		不定芽分化率 Shoot regeneration frequency/%	不定芽生长状态 Status of shoots
6-BA	NAA		
1.0	0.0	70.0c	外植体分化不定芽数较少, 粗壮
1.0	0.1	78.9b	外植体分化不定芽数较少, 粗壮
2.0	0.0	78.9b	外植体分化不定芽数较多, 较壮
2.0	0.1	88.9a	外植体分化不定芽数较多, 较壮
3.0	0.0	62.2d	外植体分化不定芽数较多, 较细
3.0	0.1	66.7c	外植体分化不定芽数较多, 较细

注: 邓肯氏新复极差法显著性测验, 不同字母表示 2 个处理之间存在显著差异($P=0.05$)。

Note: Duncan's new multiple process test of significance. Different letters mean there is significant difference between two treatments ($P=0.05$).



注:A. MS+NAA 1.0 mg · L⁻¹诱导产生愈伤组织;B. MS+6-BA 1.0 mg · L⁻¹+NAA 1.0 mg · L⁻¹诱导产生的愈伤组织;C. 愈伤组织诱导分化不定芽;D. 壮苗培养;E. 2~5号生根培养基不定芽生根情况;F. 6~9号生根培养基不定芽的生根情况;G. 移栽6周后走马胎生根苗生长情况。

Note: A. Callus induced on medium MS+NAA 1.0 mg · L⁻¹; B. Callus induced on medium MS+6-BA 1.0 mg · L⁻¹+NAA 1.0 mg · L⁻¹; C. Adventitious buds induced from callus; D. Strong seedlings; E. Rooting of adventitious buds on medium 2-5; F. Rooting of adventitious buds on medium 6-9; G. Growth of *A. giganti folia* Stapf. seedlings 6 weeks after transplanting.

图1 走马胎叶片离体培养及植株再生

Fig. 1 *In vitro* culture and plant regeneration from *A. giganti folia* Stapf. leaf

2.3 壮苗及生根培养

不定芽在继代培养基上继代增殖形成丛芽后, 芽苗不易长高, 要切取单芽生根比较困难, 因此, 把丛芽切割成小丛转接到壮苗培养基 MS(改良)+6-BA 0.5 mg · L⁻¹ + NAA 0.1 mg · L⁻¹ + 10% 椰子水 (CW) 上进行壮苗培养(图 1-D), 待不定芽长到 2~3 cm 高时, 单株切取, 接种于生根培养基上培养形成完整植株。

不定芽单株切取接种于生根培养基 10 d 后, 开始从切口处产生不定根, 1 个月后形成良好根系。从表 3 可以看出, 不定芽在不添加任何激素的 MS 培养基上没有不定根产生; 在添加 NAA、IBA 或 NAA 与 IBA 配合使用的培养基中均能 100% 生根。其中, 接种于单独添加 NAA 或较高浓度 NAA 与 0.1 mg · L⁻¹ IBA 配合使用的生根培养基上的不定芽所产生的根较为粗壮, 根系发达, 试管苗生长健壮(图 1-E); 而接种于单独添加 IBA 或较高浓度 IBA 与 0.1 mg · L⁻¹ NAA 配合使用的生根培养基上不定芽所产生的根较细长, 根数较少, 试管苗长势较弱(图 1-F)。根据苗的长势及根的生长情况, 该试验选用的不定芽生根的较适宜培养基为 MS+NAA 0.1 mg · L⁻¹ + IBA 1.0 mg · L⁻¹。

2.4 生根苗移栽及管理

将 3~5 cm 高的生根苗连培养瓶放置在控温大

表3 植物生长物质对不定芽生根的影响

Table 3 Effects of plant growth substances on rooting of adventitious shoot of *A. giganti folia* Stapf.

植物生长物质及浓度 Concentration of plant growth substances/(mg · L ⁻¹)		生苗的生根率 Frequency of rooting /%	根生长状态 Status of root
NAA	IBA		
0.0	0.0	—	—
0.5	0.0	100	细长, 根系不发达
0.5	0.1	100	细长, 根系不发达
1.0	0.1	100	细长, 根系不发达
2.0	0.1	100	细长, 根系不发达
0.0	0.5	100	粗壮, 根系发达
0.1	0.5	100	粗壮, 根系发达
0.1	1.0	100	粗壮, 根系发达
0.1	2.0	100	粗壮, 根系发达

注: ‘—’表示没有产生不定根。

Note: ‘—’ means no adventitious roots.

棚内练苗, 1 周后将苗移出培养瓶外, 洗净小苗根部的培养基, 放入 600 倍液的多菌灵溶液中浸泡 30 s 至 1 min, 移栽于经多菌灵溶液消毒的混合基质中, 40 d 后, 成活率达 85% 以上(图 1-G)。

基质配比及移栽前处理: 草炭土: 椰糠: 河沙体积比为 3: 2: 1, 移栽前将基质混匀后, 用多菌灵溶液淋透, 盖上薄膜捂 3~5 d 后揭开, 用清水淋透后种苗, 种苗后淋足定根水。

移栽后 7~10 d, 覆盖薄膜保湿, 基质湿度保持

85%左右,然后逐渐降低到70%;空气湿度90%以上,然后逐渐降低到60%~70%;遮阴60%~70%,然后逐渐减少到30%左右;15~20 d后幼苗生新根,晴天上午采用0.2%~0.3%尿素溶液喷雾后,并用清水淋洗,每7 d施肥1次。

病虫害防治:利用500倍多菌灵、500倍百菌清、800倍甲霜灵复合防病,利用菊酯类杀虫剂除虫。

3 讨论

走马胎作为一种民间常用野生中草药,其生存状况不容乐观,市场供应日益紧张。为了缓解市场压力,保护野生资源,该试验以走马胎幼嫩叶片为外植体,研究了走马胎离体培养及植株再生技术。该研究表明,单独添加6-BA不能诱导叶片产生愈伤或分化芽苗;单独添加 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA或 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA与 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA配合使用,均能诱导产生愈伤组织,但所产生的愈伤因植物生长调节剂的不同,愈伤组织的质地和进一步的分化再生能力也有较大差别。该研究筛选出附加 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA与 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA配合使用诱导产生的愈伤组织作为诱导不定芽分化的起始材料。将愈伤组织切割成小块,接种于添加不同浓度6-BA与NAA的诱导培养基上,最后筛选出适宜诱导不定芽分化、增殖的培养基为MS+6-BA $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,该培养基诱导率高、增殖系数高,但分化的不定芽不易长高,对下一步切取单株生根不利

操作。因此,该研究在壮苗阶段对MS培养基进行了改良,将丛芽切割成小块转接入MS(改良)+6-BA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 椰子水(CW) 10%培养基中诱导不定芽伸长生长,但仍不能高频诱导不定芽增高。因此,下一步再结合现有的研究基础,优化增殖及壮苗培养基,提高能生根的有效苗数,为工厂化育苗提供良好的技术基础。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编写委员会. 中国植物志,第58卷[M]. 北京:科学出版社,1979:93.
- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典:上册[M]. 上海:上海人民出版社,1997:1087.
- [3] 广西壮族自治区卫生厅. 广西中药材标准[M]. 9版. 南宁:广西科学技术出版社,1992:58.
- [4] 唐亚平. 中药走马胎治疗类风湿关节炎的临床观察[J]. 四川中医,2007,25(1):54-55.
- [5] 唐文秀,骆文华,隗红燕,等. 莽草酸对野生药用植物走马胎扦插繁殖的影响[J]. 江苏农业科学,2010(4):241-243.
- [6] 黄美娟,刘小辉,邓娅玲,等. 朱砂根的组织培养和快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2007,43(6):1149-1150.
- [7] 罗吉凤,程治英,龙春林. 虎舌红的组织培养[J]. 植物生理学通讯,2004,40(4):465-466.
- [8] GOO D H, KWON O K, LEE Y R, et al. Micropropagation of *Ardisia pusilla* and *Ardisia japonica* in vitro[J]. Acta Hort (ISHS), 2008,766:237-242.
- [9] 王刘圣丹,邱丝丝,夏国华,等. 莖叶紫金牛的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2010,46(6):615-616.

In vitro Culture and Plant Regeneration of *Ardisia gigantea* Stapf.

FU Yunliu^{1,2}, XU Li^{1,2}, LI Zhiying^{1,2}, HUANG Bilan^{1,2}, LI Kelie^{1,2}

(1. Institute of Tropical Crop Genetic Resources, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou, Hainan 571737; 2. Ministry of Agriculture Key Laboratory of Crop Gene Resources and Germplasm Enhancement in Southern China/Key Laboratory of Tropical Crops Germplasm Resources Genetic Improvement and Innovation, Danzhou, Hainan 571737)

Abstract: *A. gigantea* Stapf. leaves were used as explants, the effects of different mediums on leaf callus induction, adventitious bud differentiation, proliferation and rooting were studied. The results showed that the callus induced from leaf explants on medium MS+6-BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ were easy to produce auxiliary shoots. The differentiation rate was 88.9%. The suitable medium for bud subculture and proliferation was MS+6-BA $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. The elongation medium was MS+6-BA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 10% coconut water. The optimal rooting medium was MS+NAA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + IBA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ with rooting rate as high as 100%. The roots developed well and the plantlets grew vigorously. The plantlets with well-developed roots were successfully acclimatized and planted with a survival rate of 85%.

Keywords: *Ardisia gigantea* Stapf.; leaf; *in vitro* culture; regenerated plantlet