

植物生长调节剂对多花黄精芽体外发生过程中性状的影响

徐红梅¹, 赵东利²

(1. 北京农学院 学报编辑部, 北京 102206 2 大连大学医学院, 辽宁 大连 116622)

摘要: 目的 研究不同植物生长调节剂组合对多花黄精芽体外发生过程中每块外植体上的平均芽数、叶片发生频率、根的自然发生率及生根外植体上的平均根数、根茎发生率等性状的影响;探索通过组织培养快速繁殖该植物的最佳途径。方法 多花黄精的不定芽切块在 MS+ BA 1.0 mg/L+ 2, 4-D 0.5 mg/L 的培养基上可被诱导产生颗粒状愈伤组织, 将该愈伤组织继代于不同植物生长调节剂组合的 MS 培养基上, 2 个月后观察并统计不同植物生长调节剂组合对各性状的影响。结果 TDZ 1.5 mg/L+ 2, 4-D 1.0 mg/L 对芽增值最有利, 平均每块外植体上可长出 8.6 个芽; BA 1.0~2.0 mg/L+ NAA 1.0~2.0 mg/L 促进叶片形成, 93% 以上的外植体长出形态正常的叶片; 在 BA 2.0 mg/L+ NAA 1.0 mg/L 的培养基上, 根的自然发生率最高, 达到 51.9%, 但不及单独生长素如 NAA、IAA、IBA 或 2, 4-D 等以 0.5~1.0 mg/L 对根的诱导作用, 后者可使 90% 以上的再生芽生根, 且根生长繁茂; BA 2.0 mg/L+ 2, 4-D 1.0~2.0 mg/L 组合最适合根茎生长, 直径大于 0.5 cm 的根状茎超过 100%。结论 多花黄精的体外快速繁殖可通过如下途径实现: TDZ 1.5 mg/L+ 2, 4-D 1.0 mg/L 诱导不定芽扩增, BA 1.0~2.0 mg/L+ NAA 1.0~2.0 mg/L 诱导健康叶片的发育, 1/2 MS+ NAA、IAA、IBA 或 2, 4-D 0.5~1.0 mg/L 诱导再生芽生根; BA 2.0 mg/L+ 2, 4-D 1.0~2.0 mg/L 用于以繁殖药用器官为目的的根茎的生长。

关键词: 多花黄精; 组织培养; 芽诱导; 根状茎; 植物生长调节剂

中图分类号: R282.21

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2003)09-0855-04

Effect of plant growth regulators on several characteristics during *in vitro* bud regeneration of *Polygonatum cyrtonema*

XU Hong-mei¹, ZHAO Dong-li²

(1. Editorial Office of Journal, Beijing Agricultural College, Beijing 102206, China;

2 Medical College of Dalian University, Dalian 116622, China)

Abstract **Object** To study the effects of plant growth regulators (PGR) with various combinations on several characteristics including numbers of per explant, production frequencies of leaves, abiogenesis of root and rhizome during *in vitro* bud regeneration process of *Polygonatum cyrtonema* Hua so as to search for the optimum *in vitro* regeneration process for *P. cyrtonema*. **Methods** Granular calli were induced on MS+ BA 1.0 mg/L+ 2, 4-D 0.5 mg/L by bud explant cuttings of *P. cyrtonema*. The calli were inoculated into MS media with various combined PGR. The characteristics described above were observed and the effects of various combined PGR were obtained by statistics in two months. **Results** Among various combined PGR, TDZ 1.5 mg/L+ 2, 4-D 1.0 mg/L showed the best effect for the proliferation of buds, BA 1.0~2.0 mg/L+ NAA 1.0~2.0 mg/L for improving of leave development, BA 2.0 mg/L+ NAA 1.0 mg/L for root production and BA 2.0 mg/L+ 2, 4-D 1.0~2.0 mg/L for rhizome growth. The number of buds per explant was up to 8.6 in average, and the production rates of leaves, root, and rhizome over 0.5 cm in diameter were up to 93%, 51.9% and exceeding 100%, respectively. However, the medium containing only auxin such as NAA, IAA, IBA or 2, 4-D with 0.5~1.0 mg/L is much better for root induction of new buds than the original media with BA 2.0 mg/L+ NAA 1.0 mg/L on which the explants can naturally root. **Conclusion** The *in vitro* regeneration process of *P. cyrtonema* can be achieved by the following steps. Firstly, proliferation of buds can be realized on medium with TDZ 1.5 mg/L+ 2, 4-D 1.0 mg/L. Then, normal leaves can be developed after the new buds have been transferred to medium with BA 1.0~2.0 mg/L+ NAA 1.0~2.0 mg/L. Finally, vigorous roots can be formed from regenerated buds on

1/2 MS medium with+ NAA, IAA, IBA or 2, 4-D 0. 5- 1. 0 mg /L. Medium with BA 2. 0 mg /L+ 2, 4-D 1. 0- 2. 0 mg /L can be specially applied to improving the grow th of rhizomes, the medicinal part of *P. cyrtonema*.

Key words *Polygonatum cyrtonema* Hua; tissue culture; bud induction; rhizome; plant growth regulators (PGR)

多花黄精 *Polygonatum cyrtonema* Hua系百合科黄精属药用植物,其根茎作中药黄精用,含糖、氨基酸、蒽醌类化合物等成分,具有抗菌、降压、抗衰老及治疗风湿痛等作用^[1]。在我国南方的一些地区有栽培。其繁殖方式主要依靠根茎的无性生殖,繁殖系数低,无法提供大量种源,因而扩大面积种植受到限制。另外长期依靠无性生殖易造成种质性状退化。目前,改良植物种质性状的方法主要有有性杂交及基因工程手段。而实现这一目的同样需要有大量的种源供应。实践证明,组织培养是一种十分有效的快速繁殖手段,其应用技术也较为成熟。应用该方法,可在短期内得到大量的种苗。而且,在组织培养过程中,可能产生多倍体的变异,由此也为创造优良新品种开辟了一条途径。目前,已建立了众多经济植物的商品化大规模栽培基地,均依靠组织培养实现了快速繁殖。关于多花黄精的组织培养,未见类似报道。用 2, 4-D及 BA两种植物生长调节剂即可实现其芽的体外再生, IAA, IBA, NAA及 2, 4-D中任一生长调节剂均可诱导新芽生根。在诱导其再生过程中,发现外植体在 MS+ BA 0. 5 mg /L+ 2, 4-D 1. 0 mg /L的培养基上不仅能产生芽,也能形成根状茎结构,并可自然生根,为此,进一步研究了多种激素组合对其

再生芽、根状茎及根的形成的影响。

1 材料与方法

1. 1 材料: 将多花黄精根茎萌发形成的不定芽横切成约 2 mm厚的小片接种于 MS+ BA 1. 0 mg /L+ 2, 4-D 0. 5 mg /L的培养基上, (26± 1) °C,每天光照 16 h,光强 24 lx条件下培养约 2个月,在外植体切口及周缘产生较多的颗粒状愈伤组织,本实验以该愈伤组织为外植体,将其分成直径约 3 mm的小团,接种于不同植物生长调节剂组合 (BA, TDZ, 2, 4-D及 NAA)的 MS培养基 (表 1)上, MS培养基中另含 3%蔗糖、0. 6%的琼脂。

1. 2 方法: 培养基 pH值调至 5. 8, 15 Pa(121 °C)灭菌 15 min(电热手提高压蒸汽消毒器, YXQ- SG 41. 280,上海医用核子仪器厂)。每瓶接种 15块左右外植体,每处理接种 3瓶。在 (26± 1) °C,每天光照 16 h,光强 24 lx条件下培养。2个月后统计每组处理的如下性状: 每块外植体上芽长超过 0. 5 mm的平均芽数、长出叶片的外植体的百分率、外植体自然生根率、生根外植体的平均根数、直径大于 0. 5 cm根茎发生频率 (直径大于 0. 5 cm的根茎数/外植体数× 100%)。

2 结果与分析

表 1 不同植物生长调节剂组合对多花黄精芽增殖、叶片发生、生根及根茎形成的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Effects of various combined PGR on bud proliferation, formation of leaves, root and rhizome of *P. cyrtonema* ($\bar{x}\pm s$)

植物生长调节剂 ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	每块外植体 上的芽数*	叶片发生 率 %	外植体生 根率 %	生根外植体 的平均根数	根茎发生频 率△ %
BA 1. 0+ 2, 4-D 0. 5	5. 2± 1. 2 ^b	65. 8± 3. 9 ^b	45. 5± 1. 4 ^b	1. 4± 0. 4 ^b	84. 2± 0. 8 ^c
BA 2. 0+ 2, 4-D 1. 0	3. 6± 0. 7 ^b	72. 5± 10. 6 ^b	40. 1± 5. 6 ^b	2. 2± 0. 9 ^a	107. 2± 10. 1 ^a
BA 2. 0+ 2, 4-D 2. 0	3. 3± 0. 7 ^b	73. 1± 11. 5 ^b	33. 5± 6. 4 ^b	1. 7± 0. 3 ^a	100 ^{ab}
BA 1. 0+ NAA 2. 0	3. 6± 0. 6 ^b	97. 2± 4. 8 ^a	33. 2± 6. 8 ^b	1. 2± 0. 2 ^c	69. 8± 8. 7 ^d
BA 2. 0+ NAA 1. 0	5. 0± 0. 4 ^b	95. 9± 5. 9 ^a	51. 9± 9. 1 ^a	2. 0± 0. 6 ^c	95. 5± 2. 4 ^b
TDZ 1. 5+ NAA 1. 0	5. 3± 1. 3 ^b	84. 6± 5. 4 ^{ab}	13. 0± 4. 1 ^c	1. 5± 0. 9 ^a	55. 1± 5. 9 ^c
TDZ 1. 5+ 2, 4-D 1. 0	8. 6± 1. 9 ^a	89. 0± 3. 6 ^a	0 ^d	0 ^b	82. 2± 7. 5 ^c

每处理 3个重复,每个重复含有 15块左右外植体;每一纵栏中的数据标以相同字母者表示差异不显著 ($P<0. 05$);* 高度超过 0. 5 mm的芽列入统计范围;△直径大于 0. 5 cm的根茎列入统计范围。

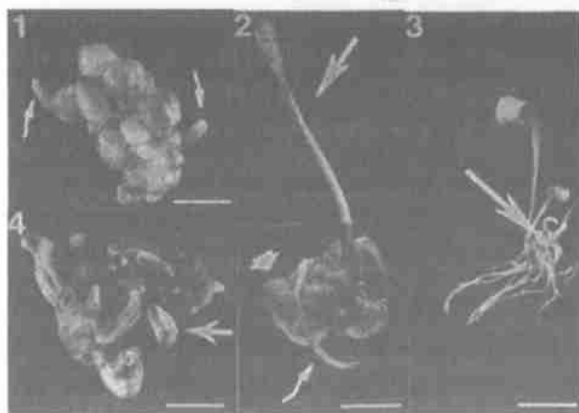
Three repeated experiments with about 15 explants per replica; means followed by same letter in each column are not significantly difference ($P<0. 05$) according to Duncan's Multiple Range Test; * the height of bud over 0. 5 mm is listed above; △ the diameter of rhizome over 0. 5 cm is listed above

2.1 不同植物生长调节剂组合对多花黄精芽发生过程中几种性状的影响: 本实验采用的任一培养基均可诱导芽的再生。颗粒状愈伤组织接种于表 1 所列培养基中后, 逐渐增殖, 形成颗粒团, 大约 40 d 后, 可见到颗粒表面产生不定芽突起 (图 1-1), 之后叶片会逐步在芽的两侧发育形成 (图 1-2), 偶尔也会有叶片直接从颗粒表面产生。同时, 颗粒状结构本身也逐步长大, 并且变得形状不规则, 继而发育成根状茎结构 (图 1-2)。除了 TDZ 与 2, 4-D 组合的培养基外, 均可看到少量根在外植体的表面或再生芽的基部周围自然发生 (图 1-2)。即本实验采用的其他培养基均可同时诱导芽、根茎及根的发生。

可能为根茎类植物的原因, 多花黄精的再生芽的发育要慢于其他的一些草本类植物, 故在培养 2 个月后进行各性状的统计。

根据表 1 结果显示, TDZ 1.5 mg/L+ 2, 4-D 1.0 mg/L 的培养基最适合芽的增殖, 每个外植体上的平均芽数达到 8.6 个, 显著高于其他类激素组合, 而 BA 与 2, 4-D 的组合则远不如此, 最高也只有 5.2 个芽。外植体显然, TDZ 对芽数的增殖起主要作用。在 BA 1.0~2.0 mg/L+ NAA 1.0~2.0 mg/L 及 TDZ 1.5 mg/L 与 2, 4-D 1.0 mg/L 或 NAA 1.0 mg/L 组合的培养基上, 84% 以上的芽产生了叶片, 且 4 个处理之间无统计学上的差异, 因此单从叶片发生频率来看, BA 与 NAA 组合及 TDZ 与 2, 4-D 或 NAA 组合较适合于叶片的发育。对根的发生而言, BA 2.0 mg/L+ NAA 1.0 mg/L 的植物生长调节剂组合是最佳的, 51.9% 的外植体生了根, 但根数并不理想, 平均为 2.0 条, 不及 NAA, IBA 等生长素的诱导效果, 后者可使 90% 以上的再生芽生根, 且根生长繁茂, 数量多 (图 1-3)。BA 2.0 mg/L+ 2, 4-D 1.0~2.0 mg/L 的组合对根茎再生及生长是最佳的, 再生出的直径大于 0.5 cm 的根状茎数量超过了接种的外植体数, 这对于以根茎为药用部位的中药材来说, 无疑为实现工厂化试管内直接繁殖其药用器官创造了一条途径。

2.2 不同植物生长调节剂组合对芽形态发育的影响: 在含 TDZ 的培养基上 (表 1), 如果允许芽进一步发育长大, 则会看到变态叶的形成, 叶片较厚, 不规则弯曲 (图 1-4), 而以 BA 为细胞分裂素的培养基上, 叶片形态是正常的 (图 1-2, 3), 因而, 尽管在叶片发生频率上, TDZ 加 NAA 或 2, 4-D 的组合与 BA 加 NAA 的组合没有统计学上的显著性差异, 但这里, 显然前者不适合用于诱导叶片正常生长。



1-颗粒状愈伤组织增殖后形成的颗粒团, 部分颗粒的表面已经分化出不定芽 (箭头)。来自于 TDZ 1.5 mg/L+ 2, 4-D 1.0 mg/L 培养 40 d 的材料。Bar= 0.36 cm; 2-芽进一步发育产生叶片 (大箭头), 颗粒状组织本身发育形成根状茎结构 (短箭头), 根可直接在根状茎结构表面发生 (小箭头)。在 BA 2.0 mg/L+ NAA 1.0 mg/L 的培养基上培养 60 d 的材料。Bar= 0.39 cm; 3-在 BA 1.0 mg/L+ NAA 2.0 mg/L 的培养基上培养 60 d 后, 形成了叶片及根茎 (箭头), 将该发育完好的小植株转移到含有生长素 (NAA 1.0 mg/L) 的 1/2MS 培养基上培养 30 d 后, 长出多条根。Bar= 2.25 cm; 4-在 TDZ 1.5 mg/L+ NAA 1.0 mg/L 的培养基上培养 50 d 后, 芽进一步发育产生变态叶 (箭头)。Bar= 0.47 cm

1-granular cluster was produced from the original granular callus as its proliferation on fresh medium, and buds were differentiated from the surface of some granules (arrows) after 40 days in culture on medium with TDZ 1.5 mg/L+ 2, 4-D 1.0 mg/L. Bar= 0.36 cm 2-young leaves developed from new bud (big arrow), and rhizome-like structure formed from explants as for these explants' further growth (short arrow) on medium supplemented with BA 2.0 mg/L+ NAA 1.0 mg/L, and a few root naturally produced on the surface of the rhizome (small arrow) after 60 days in culture. Bar= 0.39 cm 3-plantlet with well-developed leaves and rhizome (arrow), from medium with BA 1.0 mg/L+ NAA 2.0 mg/L after 60 days in culture, rooted on 1/2 MS medium containing NAA 1.0 mg/L after transferred 30 days. Bar= 2.25 cm 4-tetramorphous leaves developed from buds maintained on medium with TDZ 1.5 mg/L+ NAA 1.0 mg/L after 50 days in culture (arrow). Bar= 0.47 cm

图 1 来源于多花黄精不定芽外植体的再生苗形成过程

Fig. 1 Plantlets regeneration from adventitious buds explants of *P. cyrtonema* in vitro

3 讨论

本实验结果表明诱导各器官发生的最佳培养基组合是不同的, 说明不同器官的发生对同一植物生长调节剂的反应是不同的。这也正如郝玉蓉等在研究百合科另一药用植物伊贝母及孙敬三等研究浙贝母的组织培养中得到的结果一样, 即器官发生与植物生长调节剂的种类及浓度都有关系, 适合于芽分

化及增殖的植物生长调节剂组合,在诱导根形成时,往往需要改变其种类或浓度,才能得到最佳效果。

多花黄精的再生过程中,首先在外植体上形成一些球形颗粒,之后在这些球形颗粒上再分化出芽,属于器官发生途径。该过程在番红花、百合、伊贝母及浙贝母等球茎类的植物中也存在^[3-7]。这一类植物在用鳞茎瓣作为外植体时,再生芽既可直接在外植体的边缘或中央形成,也可由外植体脱分化形成的愈伤组织进一步分化而来,在后一条件下,先在愈伤组织上形成小颗粒,而后再由这些小颗粒分化出芽。另外,在这一类植物中还存在体胚发生途径,如王仑山等用伊贝母的鳞瓣作为外植体,在 MS+ NAA 1.0 mg/L+ Kt 0.5 mg/L 及 NAA 1.0 mg/L+ BA 2.0 mg/L 的培养基上诱导产生了体胚;徐元红等同样以伊贝母的鳞瓣为外植体在 MS+ 2,4-D 1.0 mg/L+ Kt 0.1 mg/L 的培养基上诱导产生了愈伤组织,之后转移到 MS+ 2,4-D 0.5 mg/L+ BA 0.2 mg/L 的培养基上诱导产生了体胚;有时器官发生途径和体胚发生途径可以同时共存。如刘明志等以百合鳞片为外植体,在 MS+ 2,4-D 的培养基上诱导产生了体胚,而在 MS 培养基中添加 BA 时可直接形成芽(属器官发生途径),若同时既添加 BA,又添加 2,4-D,则既可产生不定芽又能同时形成体胚。依靠组织培养快速繁殖,可使繁殖系数成千上万倍地提高,对于繁殖一些经济类植物来说,无疑带来了巨大的优势。

TDZ 是具有很强细胞分裂素活性的人工合成激素,经多种植物组织培养实验表明,对愈伤组织发生、离体芽增殖及再生有显著的促进作用,但对植物生根有抑制作用^[8]。本实验表明,TDZ 对多花黄精芽的增殖优于 BA 的效果,但对芽的进一步生长不利,导致畸形叶片的产生,同时也抑制芽生根。因而可将 TDZ 1.5 mg/L+ 2,4-D 1.0 mg/L 的培养基专用于芽或其前体——颗粒愈伤组织的增殖,在芽未分化形成之前,即将其分割继代,通常以 30 d 为一个周期,这样可保证用于芽诱导的充足的外植体供应。若欲诱导小植株再生,则可待芽从颗粒表面分化出来后,及时将带芽的颗粒组织剥离下来转移到 BA 1.0~2.0 mg/L+ NAA 1.0~2.0 mg/L 的培养基上,继续培养,诱导叶片的健康发育。

尽管在部分原始培养基上,外植体可直接生根,但由于根数较少,不利于后期再生苗的驯化培养,因而有必要将再生芽转移到含生长素的根诱导培养基上加速根的发生,1/2 MS+ NAA, IAA, IBA 或 2,

4-D 0.5~1.0 mg/L 均适合根的诱导。

综上所述,多花黄精组织培养快速繁殖途径可总结为如下步骤:

(1)原植物根茎不定芽切片在 BA 1.0 mg/L+ 2,4-D 0.5 mg/L 培养基上可被诱导形成颗粒状愈伤组织;(2)该颗粒状愈伤组织转移到 TDZ 1.5 mg/L+ 2,4-D 1.0 mg/L 的培养基上可被诱导芽的分化和自身的增殖;(3)将芽及其连带组织剥离转移到 BA 1.0~2.0 mg/L+ NAA 1.0~2.0 mg/L 的培养基上,诱导叶片发生;(4)将形成叶片的小植株转移到 1/2 MS+ NAA, IAA, IBA 或 2,4-D 0.5~1.0 mg/L 的培养基上诱导生根。通过上述 4 个步骤,可获得来源于多花黄精不定芽外植体的试管苗。

若以繁殖药用器官——根茎为目的,可将上述(1)中形成的颗粒愈伤组织转移到 BA 2.0 mg/L+ 2,4-D 1.0~2.0 mg/L 的培养基上诱导根茎增殖与生长。

在植物的愈伤组织或再生器官中往往含有天然植物中的有效成分,因而依靠该方法来生产一些药用成分、色素、香料等植物次生代谢物似乎已经成为一种趋势。由于该方法还具有不受原植物产量、产地及气候等因素影响的优点,因而可做到人工控制。目前已经在部分植物中实现了工厂化大规模生产,如人参皂苷、紫草宁、青蒿素的生产等^[9]。随着该技术的日益成熟,有望在更多的植物中实现其有效成分的工厂化生产,从而完全摆脱天然植物的限制,也使生态环境得以保护。

References

- [1] Jiangsu New Medical College. *Dictionary of Chinese Materia Medica* (中药大辞典) [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Publishers, 1986.
- [2] Hao Y R, Li M S, Wu Y W. Callus induction and plant regeneration in tissue culture of *Fritillariae pallidiflorae* [J]. *Acta Bot Bor-Occ Sin* (西北植物研究), 1982, 2(1): 38-43.
- [3] Sun J S, Zhu Z Q, Wang J J. Callus formation and organ regeneration in the tissue culture of *Fritillaria thunbergii* Miq [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1977, 19(2): 161-162.
- [4] Gui Y L, Xu T Y, Gu S R, et al. Corm formation of *Saffron corocus in vitro* [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1988, 30(2): 338-340.
- [5] Liu M Z, Lin X Y. Effects of hormone on plant regeneration of lily (*Lilium davaii* Duch) [J]. *Guihaia* (广西植物), 2002, 22(2): 167-170.
- [6] Wang L S, Yang H M, Wang Y F, et al. Formation of somatic embryo in tissue culture of *Fritillariae pallidiflorae* and cytological observation [J]. *J Lanzhou Univ-Nat Sci* (兰州大学学报·自然科学版), 1988, 14(1): 109-110.
- [7] Xu Y H, Zhu S Y. Comparison of embryoid-induction condition of *Fritillaria siberian* and *F. ussuri* [J]. *J Shaanxi Norm Univ-Nat Sci* (陕西师范大学学报·自然科学版), 1998, 26(2): 119-121.
- [8] Xu H S, Xu J L, Huang X L. Effect of TDZ on plant tissue culture [J]. *Guihaia* (广西植物), 1996, 16(1): 77-80.
- [9] Chang Y, Liu D H, Z B. Progress of large-scale culture of plant cells and organs [J]. *Letters Biotechnol* (生物技术通讯), 2001, 12: 31-36.