

箭根薯愈伤组织诱导及无性系的建立

韦莹, 黄雪彦, 韦坤华, 黄宝优, 李翠, 张占江*

广西壮族自治区药用植物园, 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: 目的 诱导箭根薯愈伤组织及建立无性系。方法 以箭根薯野生种为材料, 采用不同激素组合对不同部位(根茎、叶片、叶柄)进行诱导, 对比诱导效果, 筛选出最佳部位及各个生长阶段的最佳激素组合。结果 外植体的消毒以 0.1% HgCl_2 溶液处理 8 min 的效果最佳; 诱导愈伤组织最佳外植体为叶柄; 愈伤组织诱导的最佳培养基是 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L+2, 4-D 1.0 mg/L, 在此培养基上使用叶柄诱导愈伤组织的诱导率达到 100%; 不定芽诱导分化的最适培养基为 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L, 分化率高达 90%; 生根诱导的最佳培养基为含 1/2 MS+NAA 0.5 mg/L, 生根率高达 100%。结论 筛选出诱导箭根薯愈伤组织最佳诱导外植体及激素组合。

关键词: 箭根薯; 愈伤组织; 诱导; 分化; 无性系

中图分类号: R282.21 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)17-2466-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.17.023

Callus induction and asexual line establishment of *Tacca chantrieri*

WEI Ying, HUANG Xue-yan, WEI Kun-hua, HUANG Bao-you, LI Cui, ZHANG Zhan-jiang

Guangxi Medicinal Resources Conservation and Genetic Improvement Laboratory, Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plant, Nanning 530023, China

Abstract: Objective To induce the callus and to establish the asexual line for *Tacca chantrieri*. **Methods** The wild *T. chantrieri* was used to investigate the induction effects on different hormone combinations and different explants (rhizomes, leaves, and leaf stalks), and the best explants and proper hormone combination for every growth period were established. **Results** The treatment with 0.1% HgCl_2 for 8 min was suitable to sterile the explants, the leaf stalk was the best material in callus induction among the three explants, and the best hormone combination for callus induction was MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L + 2, 4-D 1.0 mg/L. The callus induction rate from leaf stalk was 100%, the suitable medium for differentiation on bud was MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L, the differentiation rate was 90%, the best rooting medium was 1/2 MS + NAA 0.5 mg/L, and the rooting rate was 100%. **Conclusion** The best explants and hormone combination are screened out.

Key words: *Tacca chantrieri* Andre; callus; induction; differentiation; asexual line

箭根薯 *Tacca chantrieri* Andre 又名老虎须、蒟蒻薯, 为箭根薯科箭根薯属多年生常绿草本植物^[1]。其产于我国云南、广西、广东、湖南南部, 在我国西藏的墨脱也有分布^[2]。其多生长于海拔 170~1 300 m 的热带雨林下、水边或山谷阴处^[3]。箭根薯具有较高的药用价值和观赏价值, 根、茎药用, 具有清热解毒、理气止痛的功效, 用于治疗肠炎、痢疾、消化不良、肝炎、烫伤、烧伤等^[4-5]。该植物株形优美, 花朵紫褐色至黑色, 形状独特, 花期长,

适合作鲜切花或室内观赏植物, 为植物界中所罕见。箭根薯一般以种子繁殖, 但因种子结实率低, 难以满足生产种植的需要; 再加上其生境日益恶化, 天然更新不良, 野外幼株日渐稀少, 箭根薯处于濒危状态, 被列为国家三级保护植物^[6]。迄今为止, 国内外有关箭根薯药用植物组培繁殖的研究已有报道, 并取得一定的研究进展^[7-13]。本实验在前人工作的基础上, 以野生箭根薯叶片为外植体进行愈伤组织诱导, 并进行根茎、叶片、叶柄外植体的比较实验, 筛选出最佳

收稿日期: 2012-12-15

基金项目: 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科合 0895001-3-2); 广西卫生厅自筹经费科研课题(Z2009345); “中药新产品开发与产业化(二)子项目(桂科攻 0992003B-32); 亚洲区域合作专项资金项目: 中国-东盟药用植物交流与栽培研究项目(外亚函[2009]59号)

作者简介: 韦莹(1980—), 女, 广西都安人, 助理研究员, 从事药用植物组织培养方面的研究。E-mail: wendy371@sohu.com

*通信作者 张占江 Tel: (0771)5603824 E-mail: zzj1811@yahoo.com.cn

部位及各个生长阶段的最佳激素组合。建立了箭根薯的无性体系,为箭根薯的保护和科学的开发利用提供技术支持,并为进一步研究提供参考依据。

1 材料与试剂

1.1 材料

2010年6月从云南引种植于广西药用植物园繁育圃,经广西壮族自治区药用植物园黄宝优老师鉴定该品种为箭根薯 *Tacca chantrieri* Andre,经筛选后采摘健康无病虫害植株作为实验材料。

1.2 仪器

AIR TECH 超净工作台;立式压力蒸汽灭菌锅;EL 电子天平。

1.3 试剂

奈乙酸(NAA)、吲哚丁酸(IBA)、6-苄基腺嘌呤(6-BA)、2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)均为上海阿拉丁化学试剂有限公司产品。

2 方法

2.1 外植体消毒处理

取箭根薯根茎、叶片、叶柄,先用洗洁精水溶液清洗表面污垢,置于烧杯中进行流水冲洗15 min,然后移至超净工作台上,用无菌水冲洗1遍,再用0.1% HgCl₂消毒5~15 min,无菌水浸泡5次。用备用的无菌滤纸吸干外植体表面水分后,剪切成0.8~1.2 cm 叶柄和1.2 cm×1.2 cm 的根茎、叶片,平放到培养基上,每瓶接种3个外植体,每个处理接种8瓶。

2.2 培养基成分筛选

基本培养基为MS,附加5 mg/L 琼脂,30 mg/L 蔗糖 pH 5.8~6.0。将消毒好的根茎、叶片、叶柄接种到6-BA(1.0、2.0、3.0) mg/L+NAA 0.1 mg/L,6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L+2,4-D(0.5、1.0、1.5) mg/L 不同梯度处理的诱导培养基上培养25~30 d,诱导愈伤组织。取叶片、叶柄所产生的愈伤组织切成片状,接种到分化培养基分别为6-BA 1.0 mg/L+NAA(0.1、0.5、1.0) mg/L、6-BA(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5) mg/L+NAA 0.5 mg/L 的固体培养基上进行分化培养。

2.3 培养条件和统计方法

培养温度(25±2)℃,光照时间12 h/d,光照强度20~30 μmol/(m²·s)。愈伤组织诱导率及分化率计算公式如下:

$$\text{愈伤组织诱导率} = \frac{\text{形成愈伤组织外植体数}}{\text{接种外植体数}}$$

$$\text{分化率} = \frac{\text{分化出绿芽的愈伤组织数}}{\text{接种愈伤组织总数}}$$

3 结果与分析

3.1 不同灭菌时间的灭菌效果

采用4种不同的灭菌时间对箭根薯外植体灭菌,结果见表1。对植物不同部位采用不同的灭菌,获得的灭菌效果不同。用0.1% HgCl₂对箭根薯3个不同部位进行灭菌时,灭菌时间为6 min 的污染率最高,3种外植体最高污染率分别为70.8%、25%和12.5%;随着灭菌时间的延长,污染率逐渐下降;灭菌时间为8 min 时,效果最好,污染率最低,其中叶片、叶柄的灭菌污染率仅为4.2%,出愈率及愈伤组织长势均比较理想,叶柄最高出愈组率可达91.7%;但是当灭菌时间为10~12 min 时又开始出现污染和褐化,褐化率有上升的趋势。3个不同部位中,根茎污染率最高,经多次诱导均未能产生愈伤组织,叶柄污染率最低,愈伤组织长势最好。

表1 不同灭菌时间处理对箭根薯外植体灭菌效果的比较
Table 1 Effects of different sterilant time on explants sterilization of *T. chantrieri*

部位	消毒时间 / min	出愈率 / %	污染率 / %	褐化率 / %
根茎	6	0	70.8	29.2
	8	0	37.5	62.5
	10	0	45.8	54.2
	12	0	41.7	58.3
叶片	6	62.5	25.0	12.5
	8	75.0	4.2	20.8
	10	58.3	16.7	25.0
	12	50.0	8.3	41.7
叶柄	6	75.0	12.5	12.5
	8	91.7	4.2	4.2
	10	79.2	8.3	12.5
	12	70.8	4.2	25.0

3.2 不同激素组合对箭根薯愈伤组织诱导的影响

不同外植体在不同质量浓度6-BA和相同NAA质量浓度中进行诱导,经统计愈伤组织发生时间存在差异,在激素组合为6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L中培养,叶柄在培养15 d 两端切口便开始膨胀,20 d 后出现浅绿色突起物,逐渐形成愈伤组织;叶片培养10 d 便开始朝培养基方向内卷(图1-A),但出现愈伤组织时间比叶柄延后,35 d 后开始形成乳白或浅绿色颗粒组织(图1-B),诱导60 d 情况见表2。

在不同培养阶段,选择适当质量浓度的激素有助于愈伤组织的形成和苗的生长。从表2可看出,箭根薯的叶片和叶柄在含有不同浓度激素组合培养基中诱导的愈伤组织诱导率有差异,双因子组

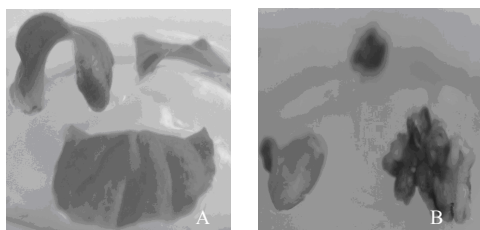


图1 箭根薯叶片愈伤组织诱导初期 (A) 和叶片愈伤组织 (B) 图

Fig. 1 Incipient stage of callus induction on leaves (A) and leaves callus (B)

合比较实验发现, 组合为 6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L 最为理想, 叶片和叶柄最高愈伤组织诱导率分别为 76.7%和 87.5%, 愈伤组织质量也较好; 在此基础上添加了不同浓度的 2, 4-D, 经观察发现, 未添加 2, 4-D 的激素组合也能够成功诱导外植体产生愈伤组织, 而在附加 2, 4-D 后, 愈伤组织诱导率在一定范围内随 2, 4-D 浓度升高而递增, 适当浓度 2, 4-D 对箭根薯叶片、特别是叶柄愈伤组织诱导起到显著的促进作用, 愈伤组织诱导率均高于未添加 2, 4-D 的双因子组合, 尤其

表2 不同激素组合对箭根薯愈伤组织诱导的影响

Table 2 Effects of different hormone combinations on callus induction of *T. chantrieri*

部位	不同激素处理	外植体个数	愈伤组织数	愈伤组织诱导率 / %	愈伤组织质量
叶片	6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L	30	15	50.0	小, 褐化较多
	6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L	30	23	76.7	乳白色颗粒状
	6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L	30	16	53.5	皱缩卷曲, 稍黄
	6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L+	30	20	66.7	乳白颗粒组织
	2, 4-D 0.5 mg/L				
	6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L+	30	26	86.7	肥大, 海绵状
	2, 4-D 1.0 mg/L				
叶柄	6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L+	30	19	63.3	绿色颗粒状、少量褐化
	2, 4-D 1.5 mg/L				
	6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L	40	30	75.0	切口膨胀、少量褐化
	6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L	40	35	87.5	切口膨大、出现绿色突起
	6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L	40	31	77.5	切口膨大
	6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1+2, 4-D	40	34	85.0	切口膨大、有浅绿色突起
	0.5 mg/L				
	6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L+	40	40	100.0	切口膨大、呈团状颗粒
	2, 4-D 1.0 mg/L				
	6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L+	40	33	82.5	切口膨大、少量褐化
	2, 4-D 1.5 mg/L				

是 2, 4-D 质量浓度为 1.0 mg/L 时, 不仅愈伤组织诱导率可达到 100%, 而且愈伤组织较大, 质量最好, 没有发生褐化现象, 而随着 2, 4-D 的升高, 愈伤组织诱导率呈下降趋势, 两种外植体在同一处理愈伤组织诱导上, 叶柄出愈组率均高于叶片。实验结果表明: 激素组合为 6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L+2, 4-D 1.0 mg/L 是箭根薯愈伤组织诱导的理想培养基。

3.3 不同激素组合对丛生芽分化的影响

在实验中发现, 叶片和叶柄诱导出的愈伤组织在形状上有差异, 叶片在培养 15 d 后开始皱缩, 后

期颜色变暗, 呈褐色, 愈伤组织为乳白色颗粒或浅绿色球状; 相同时间观察, 叶柄两端切口膨大, 出现绿色突起。因此丛生芽分化实验中, 分别对 2 种外植体愈伤组织的诱导分化进行比较。首先将不同部位的外植体诱导产生的生长良好的愈伤组织, 剪切成同样大小的块状接种到分化培养基上培养, 培养 30 d 后的结果见表 3。

在不同分化培养基中培养, 15 d 后开始发现绿色芽点; 从表 3 可以看出, 在空白处理 (CK) 中, 叶片和叶柄芽诱导分化率均很低, 芽丛也很少或者没有。在添加不同激素组合中, 叶片和叶柄诱导出

表3 不同激素浓度对箭根薯不同部位诱导分化的影响

Table 3 Effects of hormone at different concentration on callus differentiation of different parts in *T. chantrieri*

部位	激素 / (mg·L ⁻¹)	接种数	分化数	分化率 / %	芽丛诱导率 / %
叶片	CK	30	5	16.7	0
	6-BA 1.0+NAA 0.1	30	14	46.7	0
	6-BA 1.0+NAA 0.5	30	19	63.3	3.3
	6-BA 1.0+NAA 1.0	30	16	53.3	0
	6-BA 0.5+NAA 0.5	30	15	50.0	0
	6-BA 1.5+NAA 0.5	30	17	56.7	6.6
	6-BA 2.0+NAA 0.5	30	24	80.0	6.6
	6-BA 2.5+NAA 0.5	30	20	66.7	0
叶柄	CK	20	4	20.0	0
	6-BA 1.0+NAA 0.1	20	11	55.0	20.0
	6-BA 1.0+NAA 0.5	20	15	75.0	25.0
	6-BA 1.0+NAA 1.0	20	12	60.0	30.0
	6-BA 0.5+NAA 0.5	20	13	65.0	65.0
	6-BA 1.5+NAA 0.5	20	16	80.0	70.0
	6-BA 2.0+NAA 0.5	20	18	90.0	75.0
	6-BA 2.5+NAA 0.5	20	15	75.0	60.0

的愈伤组织分化出芽的几率较高,但芽丛分化率相对较低。同一处理中,叶柄丛芽诱导率均高于叶片(表3和图2)。本实验研究表明,使用6-BA 2.0 mg/L与NAA 0.5 mg/L进行组合可以促进愈伤组织分化,6-BA浓度过高则会对分化存在抑制作用;此外,适当浓度的NAA有助于试管苗壮苗生根。叶片和叶柄最佳分化培养基为6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L,最高分化率达90%。

3.4 不同培养基对生根的影响

将愈伤组织分化出的芽或者芽丛接种到壮苗生根培养基上,培养30 d。从表4中可以看出,在培养基的选择上,1/2 MS培养基对箭根薯生根效果较好。几种激素处理组合对生根效果差异不是很大,平均根数在7~10个/株,生根率均较高。相比而言,添加适当浓度的NAA比IBA效果好,生根株数、生根率和平均根数均比后者好。最佳生根培养基为1/2 MS+NAA 0.5 mg/L,其生根率可达100%,平均根数为9.5个/株,生根比较整齐,根系发达(图3)。

表4 不同培养基对箭根薯生根的影响

Table 4 Effects of different culture media on rooting of *T. chantrieri*

培养基	接种苗数	生根株数	生根率 / %	平均根数 / (个·株 ⁻¹)	试管苗长势
MS+NAA 0.5 mg/L	16	13	81.3	7.8	根细、苗弱、叶少数枯黄
1/2 MS+NAA 0.5 mg/L	16	16	100	9.5	根白、粗,苗壮
1/2 MS+NAA 0.1 mg/L	16	14	87.5	8.4	苗一般,根短、细
1/2 MS+NAA 1.0 mg/L	16	14	87.5	8.9	苗壮,根短、较粗
1/2 MS+IBA 0.1 mg/L	16	12	75.0	6.2	根一般、苗稍弱
1/2 MS+IBA 0.5 mg/L	16	11	81.3	7.8	苗较壮、根细、少数叶黄
1/2 MS+IBA 1.0 mg/L	16	13	68.8	7.3	根粗、短,苗一般

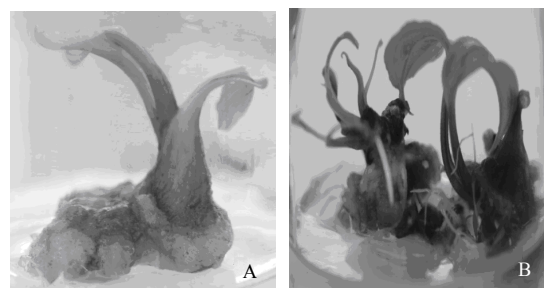


图2 箭根薯叶片(A)和叶柄(B)愈伤组织诱导分化图

Fig. 2 Callus induction and differentiation for leaves (A) and leaf stalks (B) of *T. chantrieri*

3.5 试管苗移栽

待苗长至8~10 cm时,选择生长良好、整齐、健壮的瓶苗,打开培养瓶的盖子,并注入少量水淹没培养基,于室内自然光下炼苗7 d,用镊子小心取出试管苗,洗净培养基后移栽到适宜的基质中(图4-A)。基质以疏松透气、排水良好、不易发霉为宜。



图3 生根情况

Fig. 3 Rooting conditions



图4 移栽前洗苗 (A)、试管苗移栽 (B) 和移栽后开花 (C) 情况

Fig. 4 Seedlings washed before transplant (A), tube seedling transplant (B), and blossom situation after transplant (C)

织诱导对比实验,发现除了根茎外,叶片和叶柄均能诱导出愈伤组织,叶柄比叶片容易诱导产生愈伤组织,且愈伤组织质量及效果最好。

在培养基中加入抗氧化剂和其他抑制剂,可以有效地减轻外植体在组培中的酶促褐变^[14]。在进行愈伤组织诱导和壮苗生根培养过程中,外植体较易褐化,同时,由于箭根薯本身的分泌物和细菌污染,导致无菌材料接触培养基部位容易产生细菌,从而使无菌材料逐渐腐烂。添加 0.1%腺苷酸环化酶能在一定程度上对褐化、细菌污染有抑制作用。同时,变黄的叶片在数次更换培养基后仍能产生愈伤组织(图 1-B)。

箭根薯组织培养研究目前报道的不多,本实验与前人报道的箭根薯在组织培养过程中从野外采回的嫩叶片接种未能诱导出愈伤组织^[7]有所突破,从而也说明了不同来源及不同部位外植体对愈伤组织诱导有不同的特性,为植物组织培养的取材提供借鉴。建立的箭根薯无性系为进一步探讨其离体快繁,提高繁殖系数、药用及花卉品质提供参考。

参考文献

- [1] 贺善安. 中国珍稀植物 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2001.
- [2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第十六卷第一分册) [M]. 北京: 科学出版社, 1985.

每周喷施 1~2 次 10 倍稀释的 MS 营养液,移至遮阳棚培养,根据需要适当喷施 0.1%的叶面肥,视基质的干湿程度喷雾补水,移栽 1 个月时统计,成活率为 85%左右。结果表明,移栽 20 d 左右可见成活并开始生长(图 4-B)。移植的试管苗初期生长较慢,1 个月左右开始迅速生长并长出新根,株型整齐。一般第 2 年即可开花(图 4-C)。

4 讨论

本研究分别采用根茎、叶片和叶柄进行愈伤组

- [3] 何惠英, 文彬, 殷寿华. 箭根薯种子发芽试验 [J]. 中南林学院学报, 2003, 23(4): 120-122.
- [4] 唐德英, 何明荣. 珍稀濒危药用植物箭根薯的研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(7): 1831-1833.
- [5] 云南省药物研究所. 云南天然药物图鉴 (第 1 卷) [M]. 昆明: 云南科技出版社, 2003.
- [6] 国家环境保护局, 中国科学院植物研究所. 中国珍稀濒危植物 [M]. 上海: 上海教育出版社, 1989.
- [7] 何惠英, 兰芹英, 张艳军. 箭根薯的试管繁殖 [J]. 广西农业生物科学, 2002, 21(2): 108-110.
- [8] 刘颂颂, 叶永昌, 招晓东, 等. 蒟蒻薯的组织培养及植株再生 [J]. 植物生理学通讯, 2002, 38(3): 254.
- [9] 唐德英, 李学兰, 余东莉, 等. 蒟蒻薯的组织培养 [J]. 植物生理学通讯, 2003, 30(12): 348.
- [10] 高燕, 白燕冰, 赵云翔. 箭根薯茎尖培养快速繁殖试验 [J]. 热带农业科技, 2006, 29(3): 11-13.
- [11] 张文珠, 林炳英, 林德钦. 老虎须的组织培养与植株再生 [J]. 热带农业科学, 2010, 30(12): 20-23.
- [12] Charoensub R, Thiantong D, Phansiri S. Micropropagation of Bat Flower Plant, *Tacca chantrieri* Andre [J]. *Kasetsart J: Nat Sci*, 2008, 42: 7-12.
- [13] 中国科学院昆明植物研究所. 西双版纳高等植物名录 [M]. 昆明: 云南民族出版社, 1996.
- [14] 赵蓬晖, 张江涛, 马红卫. 植物组织培养中的几个常见问题与对策 [J]. 河南林业科技, 2001, 21(2): 27-28.