

五指毛桃组织培养获得再生植株的研究

李林轩¹, 吴庆华¹, 蔡锦源², 林伟¹, 韦坤华^{1*}

1. 广西药用植物园 广西药用资源保护与遗传改良重点实验室, 广西 南宁 530023

2. 广西科技大学鹿山学院, 广西 柳州 545616

摘要: **目的** 采用组织培养快繁技术培养五指毛桃种苗, 为人工种植提供种源。**方法** 采用五指毛桃叶片作外植体, 以MS和1/2 MS为基本培养基, 采用正交设计研究植物生长调节剂多因素组合(6-BA、NAA、2, 4-D、IAA、KT和IBA)对五指毛桃初代诱导、不定芽分化和诱导生根的影响。**结果** 不定芽最佳诱导培养基为MS+1.0 mg/L 6-BA+0.3 mg/L NAA, 外植体经20 d诱导培养, 可分化形成不定芽72个; MS+1.0 mg/L 6-BA+0.3 mg/L IAA+0.3 mg/L KT最利于不定芽继代增殖, 增殖倍数6.67; 1/2 MS+1.0 mg/L IBA+0.3 mg/L NAA最适于诱导生根获得再生植株, 生根率100%; 宜移栽于泥炭-珍珠岩(1:1)的基质上, 成活率为93%。**结论** 此途径繁殖速度快、再生率高, 能为栽培五指毛桃提供大量种苗。

关键词: 五指毛桃; 组织培养; 外植体; 快繁技术; 植株再生; 不定芽; 生根; 基质

中图分类号: R282.21 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)17-2547-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.17.023

Research on tissue culture and plant regeneration for roots of *Ficus hirta*

LI Lin-xuan¹, WU Qing-hua¹, CAI Jin-yuan², LIN Wei¹, WEI Kun-hua¹

1. Guangxi Key Laboratory of Medicinal Resources Protection and Genetic Improvement, Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plant, Nanning 530023, China

2. Lushan College, Guangxi University of Science and Technology, Liuzhou 545616, China

Abstract: Objective To solve the shortage problem of large-scale planting the seedlings in the roots of *Ficus hirta* by rapid propagation *in vitro* tissue culture. **Methods** The MS and 1/2 MS media were used as basic media, The multi factor combination of plant growth regulator (6-BA, NAA, 2, 4-D, IAA, KT, and IBA) on the seedling subculture and root culture was studied by orthogonal design. **Results** The best medium for the adventitious bud induction was MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.3 mg/L, 72 adventitious buds were obtained by differentiation with 20 d induction of explants; The best medium for cluster inducing and subculture was MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.3 mg/L IAA + 0.3 mg/L KT; The best rooting medium was 1/2 MS + 1.0 mg/L IBA + 0.3 mg/L NAA, and the rooting rate was 100%. Being suitably Transplanted to peat-perlite (1:1) matrix, the 30 d survival rate was 93%. **Conclusion** The tissue culture for the roots of *F. hirta* could be used to produce test-tube seedlings for large scale planting.

Key words: roots of *Ficus hirta* Vahl; tissue culture; explant; adventitious bud; rooting; matrix

五指毛桃又名五爪龙、五指牛奶、土北芪等, 来源于桑科植物粗叶榕 *Ficus hirta* Vahl 的干燥根, 为华南地区习用中药材。五指毛桃味辛、甘, 性平, 有健脾补肺、利湿舒筋之功, 用于脾虚浮肿、食少无力、肺癆咳嗽、盗汗、风湿痹痛、产后无乳等症^[1], 是抗癆丸、喘息丸、复方川贝止咳糖浆、滋肾宁神丸、脑萎缩丸、胃炎平胶囊、胃炎平分散片、妇炎净片等多种中成药的重要原料^[2]。由于自然繁殖缓慢, 加上滥

采乱挖, 致使五指毛桃野生资源面临枯竭。为确保五指毛桃资源的可持续利用, 发展家种是唯一途径, 据此, 本课题组对其组织培养快繁技术进行了研究, 试图获得大量优质的种苗, 为五指毛桃生产提供种源。

1 材料

五指毛桃样品于2013年3月采自广西药用植物园科研基地内引种栽培生长健壮, 无病虫害的优良植株, 经笔者鉴定为粗叶榕 *Ficus hirta* Vahl 的全株。

收稿日期: 2014-04-15

基金项目: 广西壮族自治区卫生厅中医药科技专项 (GZKZ10-081)

作者简介: 李林轩 (1986—), 男, 在职研究生, 助理研究员, 从事中药资源保护与开发利用研究。Tel: 18577195096 E-mail: stary1125@sina.com

*通信作者 韦坤华 (1983—), 女, 博士, 副研究员, 从事药用植物生物技术研究。E-mail: divinekh@163.com

1.1 外植体及培养条件

切取其叶片作为外植体。先置洗洁精水中浸泡 10 min, 再用自来水反复冲洗 15 min, 用 75%乙醇灭菌 30 s 后, 无菌水冲洗 1 遍, 再置于 0.1%升汞溶液浸泡消毒 5~10 min, 用无菌水浸洗 2 次, 每次浸洗 5 min, 用备用的无菌滤纸吸干外植体表面水分后, 接种于附加不同质量浓度的植物生长调节剂的培养基上培养, 培养条件为蔗糖 3%, 琼脂 0.6%, pH 5.8~6.2, 培养温度 (26±2) °C, 光照强度 1 500~2 200 lx, 12 h/d。

1.2 灭菌时间筛选

用 0.1% HgCl₂ 灭菌, 分别设 5、6、7、8、9 和 10 min 6 个灭菌时间进行试验。

1.3 初代培养

在 MS 为基培养基的基础上以 6-BA (0.5、1.0、1.5 mg/L)、NAA (0.1、0.3、0.5 mg/L)、2,4-D (0.1、0.3、0.5 mg/L) 3 个水平为正交试验 L₉(3⁴), 筛选出较为适合诱导丛生芽的激素组合。

1.4 不定芽继代增殖培养基筛选

在 MS 为基培养基的基础上以 6-BA (0.5、1.0、1.5 mg/L)、IAA (0.1、0.2、0.4 mg/L)、KT (0.1、0.2、0.4 mg/L) 3 种激素的 4 个水平进行正交试验对五指毛桃的繁殖培养基进行优化, 每个处理 10 瓶, 每瓶 3 个单芽, 以 30 d 后管苗生长情况和芽增殖倍数 [芽增殖倍数=(30 d 后芽数-接种时芽数)/接种

时芽数] 为主要考察指标来优化繁殖培养基。

1.5 生根培养基筛选

为了筛选最佳的生根培养基, 在 1/2 MS 为培养基的基础上以 IBA (0.5、1.0、1.5 mg/L)、NAA (0.1、0.3、0.5 mg/L) 和活性炭 (AC, 0、0.5、1.0 g/L) 3 种因素的 3 个水平进行正交试验对五指毛桃的生根培养基进行优化, 每个处理 10 瓶, 每瓶 10 个单芽, 30 d 后统计生根率 (生根率=生根根数/接种总数) 及平均生根数 (生根数=总生根数/接种总数)。

1.6 移栽基质筛选

在大棚内将生根试管苗移栽至黄沙、珍珠岩、泥炭、泥炭-珍珠岩 (1:1)、泥炭-黄沙 (1:1) 5 种不同基质上。用塑料膜覆盖, 每天喷洒水以保持湿度, 10 d 后逐步打开塑料膜。30 d 后分别统计不同基质中组培苗的成活率。

2 结果分析

2.1 灭菌时间筛选

用 0.1% HgCl₂ 灭菌, 分别设 5、6、7、8、9、10 min 6 个灭菌时间进行试验。接种后 15 d 统计污染率及成活率。

由表 1 可以看出消毒 8 min 的效果最好, 消毒成功率达 85%, 低于 8 min 的处理污染率较高, 高于 8 min 的处理污染率虽然降低, 但是死亡率明显上升, 消毒 10 min 的外植体死亡率为 75%。

表 1 0.1% HgCl₂ 不同消毒时间对五指毛桃诱导分化的影响

Table 1 Effect of 0.1% HgCl₂ in different sterilizing time on induction of differentiation for roots of *F. hirta*

消毒时间 / min	接种数 / 个	污染数 / 个	死亡数 / 个	成活数 / 个	污染率 / %	死亡率 / %	成功率 / %
5	20	20	0	0	100	0	0
6	20	15	0	5	75	0	25
7	20	6	1	13	30	5	65
8	20	2	1	17	10	5	85
9	20	1	7	12	5	35	60
10	20	0	15	5	0	75	25

2.2 不定芽诱导

用叶片作为外植体接入初代诱导培养基, 7 d 左右切口处开始增大疏松, 颜色逐渐变乳黄色, 15 d 左右在培养基上长出翠绿色成簇生长的不定芽, 且 20 d 时不定芽成簇生长, 高约 1 cm, 呈翠绿色。从表 2、3 中可以看出, 添加激素 6-BA 1.0 mg/L、NAA 0.3 mg/L、2,4-D 0.5 mg/L 时不定芽最多; 各激素对不定芽的诱导重要性为 6-BA>NAA>2,4-D, 6-BA 对不定芽诱导有显著影响, 诱导的不定芽数量在 6-BA 0.5~1.0 mg/L 随着质量浓度的增加而增多, 当

6-BA 质量浓度高于 1.0 mg/L 时, 不定芽诱导数量减少, 不利于五指毛桃的初代丛生芽诱导。实验表明, 添加低质量浓度的生长素有利于不定芽诱导和生长, 其中 NAA 对诱导五指毛桃不定芽的增殖有影响; 2,4-D 对不定芽的诱导影响不显著, 可以不考虑, 因此五指毛桃不定芽初代诱导的最适培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L。

2.3 不定芽快繁培养基优化

将长 0.5~1.0 cm 的不定芽切下接种到继代增殖培养基上。由表 4、5 分析可见, 6-BA 对五指毛

表2 初代诱导培养基筛选正交试验 L₉(3⁴) 结果

Table 2 Selection result of early induction media by L₉(3⁴) orthogonal test

组合	6-BA / (mg·L ⁻¹)	NAA / (mg·L ⁻¹)	2, 4-D / (mg·L ⁻¹)	空白	不定芽数 / 个
1	0.5	0.1	0.1	1	33
2	0.5	0.3	0.3	2	48
3	0.5	0.5	0.5	3	43
4	1.0	0.1	0.3	3	68
5	1.0	0.3	0.5	1	72
6	1.0	0.5	0.1	2	63
7	1.5	0.1	0.5	2	45
8	1.5	0.3	0.1	3	53
9	1.5	0.5	0.3	1	56
K ₁	41.33	48.67	49.67	53.67	
K ₂	67.67	57.67	57.33	52.00	
K ₃	51.33	54.00	53.33	54.67	
R	26.33	9.00	7.67	2.67	

表3 初代诱导培养基筛选方差分析

Table 3 Variance analysis of early induction medium selection

方差来源	离均差平方和	自由度	方差	F 值	P 值
6-BA	1060.22	2	530.11	97.37	P<0.05
NAA	122.89	2	61.44	11.29	
2, 4-D	88.22	2	44.11	8.10	
误差	10.89	2	5.44		

F_{0.01}(2, 2) = 99.0 F_{0.05}(2, 2) = 19.0 F_{0.1}(2, 2) = 9.0, 下同
 F_{0.01}(2, 2) = 99.0 F_{0.05}(2, 2) = 19.0 F_{0.1}(2, 2) = 9.0, same as below

表4 丛生芽继代增殖正交 L₉(3⁴)试验结果

Table 4 Results of subculture proliferation of clustered bud for roots of *F. hirta*

组合	6-BA / (mg·L ⁻¹)	NAA / (mg·L ⁻¹)	KT / (mg·L ⁻¹)	空白	增殖倍数	苗的生长情况
1	0.5	0.1	0.1	1	4.0	较弱, 长势慢
2	0.5	0.3	0.3	2	5.5	翠绿色, 长势快
3	0.5	0.5	0.5	3	3.5	绿色, 长势快
4	1.0	0.1	0.3	3	7.2	较弱, 长势慢
5	1.0	0.3	0.5	1	6.5	翠绿色, 长势快
6	1.0	0.5	0.1	2	6.3	绿色, 长势快
7	1.5	0.1	0.5	2	6.0	较弱, 长势慢
8	1.5	0.3	0.1	3	6.2	翠绿色, 长势快
9	1.5	0.5	0.3	1	6.5	绿色, 长势快
K ₁	4.33	5.73	5.50	5.67		
K ₂	6.67	6.07	6.40	5.93		
K ₃	6.23	5.43	5.33	5.63		
R	2.33	0.63	1.07	0.30		

表5 丛生芽增殖方差分析结果

Table 5 Variance analysis of clustered bud proliferation times

方差来源	离均差平方和	自由度	方差	F 值	P 值
6-BA	9.24	2	4.62	56.97	P<0.05
NAA	0.60	2	0.30	3.71	
KT	1.98	2	0.99	12.19	
误差	0.16	2	0.08	1.00	

桃不定芽增殖倍数具有显著影响。进一步分析表明, 6-BA 的增殖倍数的范围为 4.33~6.67, 增殖倍数最高的是 6.67, 出现在 6-BA 质量浓度为 1.0 mg/L 时,

当质量浓度超过 1.5 mg/L 时, 出现生长异常现象, 有轻微玻璃化, 但质量浓度在 1.0 mg/L 时, 植株健壮、展叶良好。比较另外 2 种外源激素发现, 其中

NAA 质量浓度的变化虽然对五指毛桃增殖倍数的影响不显著,但对苗的质量有影响,当 NAA 质量浓度为 0.3 mg/L 时芽苗为翠绿色,长势快,质量最好,有利于后期诱导生根。KT 对五指毛桃试管苗不定芽的影响较大,在 KT 质量浓度为 0.3 mg/L 时,增殖倍数最高为 6.4。因此,根据上述试验结果,本课题组发现不定芽快速繁殖的最佳培养基为 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.3 mg/L NAA+0.3 mg/L KT。在此培养基上形成不定芽的频率较高,增殖倍数最大,芽苗质量最好。

2.4 不定芽诱导生根试验

将五指毛桃丛生芽切成单芽接入生根培养基中,30 d 后统计生根率及平均生根数见表 6。为了筛选获得最佳的生根培养基,使用 IBA、NAA 和 AC 3 个水平设计正交试验,结果发现(表 6~8)IBA 的质量浓度对试管苗的生根率和平均生根数具有显著影响,NAA 对生根率和平均生根数有影响,AC 对五指毛桃生根率和平均生根数影响不大。进

一步分析发现生根率和平均生根数都主要受 IBA 质量浓度的影响,在 0.5~1.0 mg/L 质量浓度范围内,随着 IBA 质量浓度的增加生根率和平均生根数上升,当 IBA 质量浓度高于 1.0 mg/L 时,生根率和平均生根数都下降。实验表明,添加低质量浓度的 NAA 有利于提高生根率和平均生根数,当 IBA 质量浓度不变,NAA 质量浓度为 0.1~0.3 mg/L 时,生根率和平均生根数随着质量浓度的增加而升高,当质量浓度高于 0.5 mg/L 时生根率和平均生根数有所下降。添加 AC 对生根率和平均生根数影响不显著。因此,最佳的生根培养基为 1/2 MS+1.0 mg/L IBA+0.3 mg/L NAA,在此培养基上的生根率达到 100%,平均生根数为 7.8。

2.5 再生苗移栽基质筛选

根据五指毛桃的生长特性在大棚内将已生根的试管苗开盖炼苗 2~3 d,然后将根部培养基洗净后,移栽于黄沙、珍珠岩、泥炭、泥炭-珍珠岩(1:1)、

表 6 五指毛桃丛生芽生根诱导正交试验结果 L₉(3⁴)

Table 6 Result of rooting induction for roots of *F. hirta* by L₉(3⁴) orthogonal test

组合	IBA / (mg·L ⁻¹)	NAA / (mg·L ⁻¹)	AC / (g·L ⁻¹)	空白	生根率 / %	平均生根数 / 个
1	0.5	0.1	0	1	87	6.0
2	0.5	0.3	0.5	2	90	6.3
3	0.5	0.5	1.0	3	75	5.8
4	1.0	0.1	0.5	3	96	6.8
5	1.0	0.3	1.0	1	100	7.8
6	1.0	0.5	0	2	92	6.1
7	1.5	0.1	1.0	2	77	5.4
8	1.5	0.3	0	3	80	5.8
9	1.5	0.5	0.5	1	70	4.9
生根率						
K ₁	84.00	86.67	86.33	85.67		
K ₂	96.00	90.00	85.33	86.33		
K ₃	75.67	79.00	84.00	83.67		
R	20.33	11.00	2.33	2.67		
平均生根数						
K ₁	6.03	6.07	5.97	6.23		
K ₂	6.90	6.63	6.00	5.93		
K ₃	5.37	5.60	6.33	6.13		
R	1.53	1.03	0.37	0.30		

表 7 生根培养基生根率的方差分析

Table 7 Variance analysis of rooting rate for rooting media

方差来源	离均差平方和	自由度	方差	F 值	P 值
IBA	626.89	2	313.44	54.25	P<0.05
NAA	190.89	2	95.44	16.52	
AC	8.22	2	4.11	0.71	
误差	11.56	2	5.78	1.00	

表8 生根培养基平均生根数的方差分析

Table 8 Variance analysis of average rooting number for rooting media

方差来源	离均差平方和	自由度	方差	F 值	P 值
IBA	3.55	2	1.77	25.33	$P < 0.001$
NAA	1.61	2	0.80	11.48	$P < 0.05$
AC	0.25	2	0.12	1.76	$P > 0.05$
误差	0.14	2	0.07	1.00	

泥炭-黄沙(1:1) 5种不同基质上,用塑料膜覆盖,每天喷洒水以保持湿度,10 d后逐步打开塑料膜。30 d后统计生根率见表9。不同基质成活率高低的顺序依次为泥炭-珍珠岩(1:1) > 泥炭-黄沙(1:1) > 珍珠岩 > 黄沙 > 泥炭。因此,试管苗移栽最好的基质为泥炭-珍珠岩(1:1),移栽30 d成活率为94%。

表9 不同基质对移栽成活率的影响

Table 9 Effect of different matrices on survival rate of transplantation

移栽基质	移栽苗数 / 株	成活苗数 / 株	成活率 / %
黄沙	50	39	78
珍珠岩	50	42	84
泥炭	50	37	74
泥炭-珍珠岩(1:1)	50	47	94
泥炭-黄沙(1:1)	50	44	88

3 讨论

本实验分别选取不同的影响因子进行试验,筛选出五指毛桃不定芽诱导、不定芽分化和生根培养的最佳培养基,建立了五指毛桃组织培养快速繁殖体系,对提供五指毛桃栽培生产优质种苗具有较大使用价值,为五指毛桃的遗传转化奠定了坚实的技术基础。

植物生长调节剂种类和质量浓度,对五指毛桃的诱导、分化和生根有较大影响。在试验中,使用6-BA、NAA和2,4-D进行初代诱导筛选,6-BA、IAA和KT进行快速繁殖筛选,IBA、NAA和AC进行生根筛选。许多研究表明细胞分裂素可以促进丛生芽的增殖^[3-4]。6-BA是一种十分重要的植物激素,主要作用是促进芽的形成,也可以诱导愈伤组织发生^[5],发现其对五指毛桃的诱导、分化都有显著的影响。KT作为促进侧芽发生发育的外源性细胞分裂素,组织培养中主要用于促进细胞分裂和分化,在本研究中,添加少量的KT对五指毛桃不定芽的增殖有较大效应,这与姚绍常等^[6]研究中KT具提高植株再生频率的效果相符。2,4-D对大多植物愈伤组织的形成是必要的,但2,4-D的使用往往导致某些植物愈伤组织不能分化成芽^[7],实验也表明2,4-D对五指毛桃的不定芽诱导没有显著影响。NAA具有促进细胞分裂与扩大、诱导形成不定根等

作用^[8],在对五指毛桃不定芽诱导中有较大影响,但是在组织培养过程中也容易形成愈伤组织和致使材料老化。因此,在不定芽的分化时,我们选用IAA这种自身能够形成的内源生长素,来促进五指毛桃不定芽的细胞分裂与细胞生长,其在植物的生长与发育上起着非常关键的作用,主要影响和控制了五指毛桃的长势和质量。IBA是一种内源生长素,是植物主根生长促进剂能提高发芽率、成活率,能促进细胞分裂与细胞生长,诱导形成不定根,其对五指毛桃试管苗生根有显著的影响。

试管苗的移栽对于基质的选择十分重要,合适的基质能够非常好的保证试管苗移栽的成活率。试验结果表明,黄沙的保水性较差,珍珠岩的保水性较,但两种基质间隙均较大,五指毛桃组培苗根太细不易吸收水分;而泥炭虽然保水保肥能力很好,但其在喷施洒定根水后,变得较紧密,透气性下降,会对根的生长不利;而泥炭-黄沙(1:1)和泥炭-珍珠岩(1:1)这2种混合的基质基本上弥补了上述3种基质的缺点,疏松透气,保水保肥能力较好;在移栽五指毛桃试管苗过程中,泥炭-珍珠岩(1:1)要比泥炭-黄沙(1:1)具有更好的效果。

参考文献

- [1] 宋立人,洪 恂,丁续亮,等.《现代中药学大词典》[M].北京:人民卫生出版社,2001.
- [2] 董青松,欧 彪,陈乾平.五指毛桃研究进展[J].广西医学,2006,28(6):950-952.
- [3] 陈丽静,齐 欣,王玉坤,等.北五味子快繁体系的建立[J].中草药,2011,42(3):575-577.
- [4] 丁 伟,张立红,潘晟昊,等.水半夏组培快繁体系的建立[J].中草药,2011,42(3):585-588.
- [5] Polanco M C, Peléez M I, Ruiz M L. Factors affecting callus and shoot formation from *in vitro* cultures of *Lens culinaris* Medik [J]. *Plant Cell Tissue Org Cult*, 1988, 15: 175-182.
- [6] 姚绍嫦,潘丽梅,蓝祖裁,等.馥芳艾纳香快繁体系的建立[J].中草药,2012,43(6):1182-1185.
- [7] 邱 璐,王 波,范树国,等.青羊参遗传转化中组织培养系统的研究[J].中草药,2007,38(11):1707-1712.
- [8] 李林轩,凌征柱,李 翠,等.珙菲亚组织培养条件的优化研究[J].中草药,2013,44(10):1334-1337.