

华重楼植株的快速繁殖研究

刘银花^{1,2}, 王跃华^{2*}, 唐旭^{1,2}, 陈燕³, 黄鹏², 梅英²

1. 四川师范大学生命科学学院, 四川 成都 610101

2. 成都大学生物产业学院, 四川 成都 610106

3. 四川金土地中药材种植集团有限公司, 四川 成都 611130

摘要: 目的 以华重楼 *Paris polyphylla* var. *chinensis* 根茎为外植体, 建立华重楼植株的快速繁殖技术。方法 以 MS 为基本培养基, 通过研究激素 6-BA、2,4-D、NAA、IBA、KT、IAA 和头孢曲松钠、活性炭等对愈伤组织诱导、不定芽分化和不定根产生的影响, 找出组培苗诱导培养的最佳培养基配方。结果 华重楼最佳愈伤组织诱导培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 1.5 mg/L+2,4-D 3.0 mg/L; 最佳不定芽分化培养基为 MS+6-BA 3.0 mg/L+IAA 0.3 mg/L+KT 1.0 mg/L+头孢曲松钠 300 mg/L; 最佳生根培养基为 1/2 MS+IBA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L+活性炭 0.5%。当组培苗长出第 1 片叶且不定根长出 4 条以上时将组培苗取出, 先放在无菌水中栽培 5 d, 再移栽至松软土壤中, 组培苗生长健壮, 成活率为 100%。结论 在获得愈伤组织的基础上, 进一步完成对不定芽的诱导与无根苗生根培养, 筛选出了培育华重楼组培苗的最佳条件。

关键词: 华重楼; 根茎; 组培苗; 快速繁殖; 6-BA; 2,4-D; NAA; IBA; KT; IAA; 头孢曲松钠; 活性炭

中图分类号: R282.21 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2015)19-2925-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.19.018

Rapid propagation of *Paris polyphylla* var. *chinensis*

LIU Yin-hua^{1,2}, WANG Yue-hua², TANG Xu^{1,2}, CHEN Yan³, HUANG Peng², MEI Ying²

1. College of Life Science, Sichuan Normal University, Chengdu 610101, China

2. Department of Biological Engineering, Chengdu University, Chengdu 610106, China

3. Sichuan Jintudi Cultivation of Chinese Herbal Medicines Group Co., Ltd, Sichuan 611130, China

Abstract: Objective The roots of *Paris polyphylla* var. *chinensis* were used as explants to establish a rapid propagation technique. **Methods** The effects of hormone 6-BA, 2,4-D, NAA, IBA, KT, IAA, ceftriaxone, activated carbon, etc on callus induction, differentiation of adventitious bud, and formation of adventitious roots were studied to find out the best culture medium formulation by using MS as basic culture medium. **Results** The best medium for callus induction of *P. polyphylla* var. *chinensis* was MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 1.5 mg/L + 2,4-D 3.0 mg/L, and the best medium for differentiation of adventitious bud was MS + 6-BA 3.0 mg/L + IAA 0.3 mg/L + KT 1.0 mg/L + ceftriaxone 300 mg/L, while the best medium for formation of adventitious roots was 1/2 MS + IBA 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L + activated carbon 0.5%. The tissue cultured seedling was moved to sterile water for 5 d when the first leaf emerged and four adventitious roots appeared, then the seedling was transplanted into the soft soil. The tissue cultured seedling would grow strongly with 100% survival rate. **Conclusion** The adventitious bud is induced and then the root from bare-root seedling is cultured on the basis of obtained callus. Finally the best conditions to foster the tissue cultured seedling of *P. polyphylla* var. *chinensis* have been screened.

Key words: *Paris polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.) Hara; rhizome; tissue cultured seedling; rapid propagation; 6-BA; 2,4-D; NAA; IBA; KT; IAA; ceftriaxone; activated carbon

药用植物重楼为百合科植物云南重楼(滇重楼) *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch.) Hand.-Mazz 和华重楼 *Paris polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.) Hara 的干燥根茎^[1]。甾体皂苷是重楼的主要活性物质, 具有抗肿瘤、消炎、止血、抗氧化、促进子宫收缩和保护血管内皮细胞等药理

作用, 临床上内服用于止血、止痛、抗肿瘤, 外用抗感染、抗炎镇痛等^[2-5]。而且是云南白药、宫血宁胶囊、季德胜蛇药片、抗病毒颗粒等产品的主要原料^[6]。由于重楼具有多种药理作用且药效好, 制药工业对重楼的需求量逐年递增, 以致供不应求。巨大的需求缺口驱动药材价格飞涨, 并进一步刺激药

收稿日期: 2015-01-18

基金项目: 四川省科技支撑计划项目(2014ZC2103)

作者简介: 刘银花(1990—), 女, 四川内江人, 硕士在读, 研究方向为细胞工程。Tel: 13880132460 E-mail: 763302549@qq.com

*通信作者 王跃华(1963—), 女, 硕士, 教授, 硕士生导师, 主要从事药用植物生物技术研究。Tel: 13980021790 E-mail: 1961689636@qq.com

农滥采滥挖,使得道地产区野生重楼资源严重枯竭,濒临灭绝^[6],所以采用人工栽培重楼已势在必行。然而重楼植物种子具有自然繁殖率低,种胚发育不完全,胚乳坚硬和胚轴后熟等明显“双重休眠”的特性,重楼种子播种后通常需要经历 2 个冬天才能萌发,其成苗生长时间长,是典型的“二年生种子”^[7]。重楼植物的个体发育过程十分缓慢,由种子萌发到开花结实,至少需 4~5 年,其中苗期(幼年期)可以持续 4 年以上^[8]。因此,采用种子繁殖花费时间长且繁殖率低,较难大规模生产以满足人们对重楼药材的需求。

植物组织培养技术是实现植株快速繁育的有效途径;但目前在重楼植物的组织培养研究中,取得的成功报道却甚少。现研究发现重楼植物的地上茎、根、叶和花蕾等外植体都不能诱导出愈伤组织,而采用幼芽诱导的愈伤组织生长缓慢,且不含原植物中的皂苷^[9-12]。王跃华等^[13]研究发现,采用重楼植物的特定部位根茎,可成功地诱导出生长速度较快的愈伤组织,并且还发现了经过多次继代的愈伤组织中含有重楼皂苷。本研究采用华重楼根茎为外植体,在获得愈伤组织的基础上,进一步完成对不定芽的诱导与无根苗生根培养,采用正交试验方法筛选出培育华重楼组培苗的最佳条件,并进一步开展了炼苗和移栽条件研究,获得了华重楼再生植株的快速繁育方法,最终实现华重楼植物在短时间和低成本条件下大批量生产。

1 材料

华重楼植物采自四川省都江堰,经四川大学张浩教授鉴定为百合科植物华重楼 *Paris polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.) Hara。本实验选取生长健康、无病虫害的华重楼植物根茎为外植体。

2 方法

2.1 愈伤组织诱导

选取生长健康、无病虫害的华重楼植物的根茎,先用流水洗净泥土后吸干表面的水分,然后切除根茎上的不定根,再在超净工作台上切取根茎前端带芽体部分的第 1 个茎节,先用 0.1% 升汞消毒 9 min,然后用无菌水冲洗 5 次后切除根茎上的芽体,最后将第 1 个茎节切成 1.0 cm³ 大小后接入以 MS 为基本培养基附加不同质量浓度激素配比的愈伤组织诱导培养基中,采用 3 因素 4 水平(表 1) L₁₆(4³) 实验设计研究 6-BA (A)、NAA (B)、2,4-D (C) 3 种激素对愈伤组织诱导的影响。外植体接入培养基后,

先置于 6 ℃ 冰箱中低温处理 15 d,再转放在温度为 22 ℃、每天光照 6 h、光照强度为 1 000 lx 的条件下进行培养,培养 55 d 后统计其愈伤组织诱导率。

2.2 不定芽的诱导

选取质地紧密、无褐变和玻璃化现象产生、颜色为黄白色的愈伤组织,将其切成 2.0 cm³ 大小后接入以 MS 为基本培养基,并附加不同质量浓度激素和头孢曲松钠的不定芽诱导培养基中,采用 4 因素 4 水平 L₁₆(4⁴) 试验设计研究 6-BA (D)、IAA (E)、KT (F) 3 种激素和头孢曲松钠 (G) 对不定芽分化的影响。愈伤组织接入培养基后,先在培养温度为 10 ℃、每天光照 2 h、光照强度为 500 lx 的条件下进行诱导培养 30 d 后,再转放在培养温度为 20 ℃、每天光照 10 h、光照强度为 1 200 lx 的条件下进行诱导培养,培养 30 d 后统计其不定芽诱导率。

2.3 不定根的诱导

当不定芽长至 1.0 cm 以上时,将不定芽按 1~2 个为 1 组连同其基部的愈伤组织一同切下并转接到以 1/2 MS 为基本培养基附加不同质量浓度激素和活性炭的生根培养基中,采用 3 因素 4 水平 L₁₆(4³) 试验设计研究 IBA (H)、NAA (I) 2 种激素和活性炭 (J) 对不定根产生的影响。外植体接入培养基后,在温度为 20 ℃、每天光照 4 h、光照强度为 800 lx 的条件下进行培养,培养 55 d 后统计其生根率。

2.4 炼苗和移栽

选取生长健壮的组培苗从培养瓶中取出,先放在无菌水中,在温度为 15 ℃、每天光照 5 h、光照强度为 500 lx 的条件下栽培一段时间后,再移栽至松软土壤中,在温度为 18 ℃、相对湿度 80%、每天光照 6 h、光照强度为 800 lx 的条件下培养,培养 30 d 后统计组培苗成活率。

所有培养基的 pH 值为 6.0,琼脂 6.5 g/L、蔗糖 30 g/L。

2.5 数据分析

利用正交助手 II 进行正交试验设计和数据分析。

3 结果与分析

3.1 愈伤组织诱导

将准备好的外植体接入按正交试验(表 1)设计的培养基中,培养 55 d 后统计其愈伤组织诱导率,并对实验结果进行极差分析和方差分析,结果见表 2 和 3。

表 1 愈伤组织诱导因子水平表

Table 1 Factors and levels of callus induction

水平	A/(mg·L ⁻¹)	B/(mg·L ⁻¹)	C/(mg·L ⁻¹)
1	0.5	0.5	1.0
2	1.0	1.0	1.5
3	1.5	1.5	2.0
4	2.0	2.0	3.0

表 2 愈伤组织诱导 L₁₆(4³) 正交试验设计与结果Table 2 Results of callus induction by L₁₆(4³) orthogonal test

编号	A	B	C	误差	愈伤组织诱导率/%
1	1	1	1	1	34.18
2	1	2	2	2	34.87
3	1	3	3	3	39.21
4	1	4	4	4	36.13
5	2	1	2	3	32.63
6	2	2	1	4	35.43
7	2	3	4	1	41.08
8	2	4	3	2	34.39
9	3	1	3	4	31.10
10	3	2	4	3	38.64
11	3	3	1	2	33.79
12	3	4	2	1	31.88
13	4	1	4	2	33.04
14	4	2	3	1	30.18
15	4	3	2	4	38.31
16	4	4	1	3	29.13
X ₁	36.097	32.737	33.130	34.330	
X ₂	35.880	34.777	34.422	34.022	
X ₃	33.852	38.097	33.720	34.903	
X ₄	32.665	32.883	37.223	35.240	
R	3.432	5.360	4.093	1.218	

表 3 愈伤组织诱导结果方差分析

Table 3 Variance analysis of callus induction

因素	偏差平方和	F 值	显著性
A	32.727	9.038	
B	74.722	20.636	P<0.05
C	39.368	10.872	P<0.05
误差	3.620		

$$F_{0.05}(3, 3)=9.280 \quad F_{0.01}(3, 3)=29.500$$

由表 2 结果可以看出, 愈伤组织诱导率最高的是 7 号组合 A₂B₃C₄, 即华重楼愈伤组织诱导的最佳培养基配方为 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 1.5 mg/L+2,4-D 3.0 mg/L, 经培养 55 d 后统计愈伤组织的诱导

率最高为 41.08%。

由表 2 极差值 (R) 大小分析结果表明, 影响愈伤组织诱导率高低因素依次为 B>C>A, 即培养基中 NAA 对愈伤组织诱导的影响最大, 其次是 2,4-D, 影响最小的是 6-BA。

从表 3 的方差数据分析结果可见, 本实验设置的 3 个因素中 B 和 C 2 个因素对实验结果有显著性影响。其中因素 B 检验值 $F=20.636$, $F_{0.05}(3, 3)=9.280$, $F_{0.01}(3, 3)=29.500$, $F_{0.05}<F<F_{0.01}$, 因而因素 B 有显著影响 ($0.01<P<0.05$); 因素 C 检验值 $F=10.872$, $F_{0.05}(3, 3)=9.280$, $F_{0.01}(3, 3)=29.500$, 检验值 $F_{0.05}<F<F_{0.01}$, 说明因素 C 有显著影响 ($0.01<P<0.05$); 因素 B 检验值 $F=20.636$ 大于因素 C 检验值 $F=10.872$, 所以影响愈伤组织诱导率的最主要因素为培养基中 NAA 的质量浓度, 其次为培养基中 2,4-D 的质量浓度, 此结果与极差分析的结果相吻合。

李群等^[14]以展叶时旺盛生长的根茎作外植体, 其愈伤组织的诱导率最高为 16.6%, 并且诱导出的愈伤组织质地较疏松、易纤维化, 失去增殖能力。本研究利用重楼植物的根茎为外植体, 采用不同的培养基配方, 并且将外植体接入愈伤组织诱导培养基之后先置于 6 ℃ 的冰箱中低温处理, 因为低温有促进根茎外植体细胞打破休眠和完成脱分化进行快速分裂的能力, 可使愈伤组织诱导率最高达到 41.08%, 同时还具有防止褐化的作用。

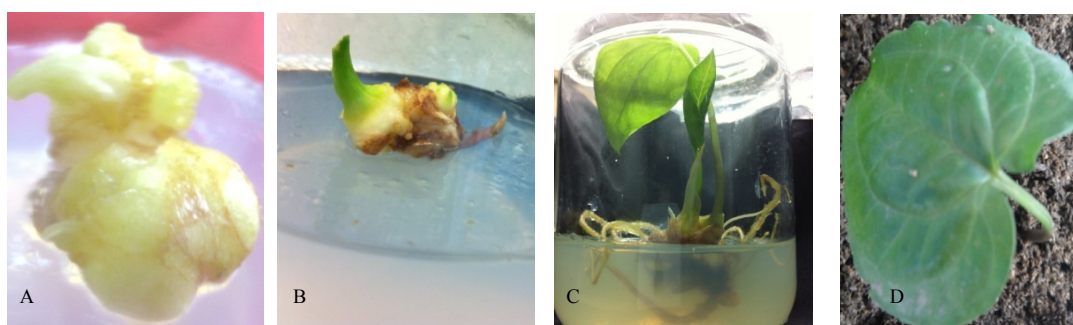
3.2 不定芽的诱导

将选取的愈伤组织 (图 1-A), 接入按正交试验设计 (表 4) 的培养基中, 在 2 种条件下先后分别培养 30 d 后统计其不定芽诱导率, 并对实验结果进行极差分析和方差分析, 结果见表 5 和 6。

由表 5 结果可以看出, 不定芽诱导率最高的是 10 号组合 D₃E₂F₄G₃, 即华重楼不定芽诱导的最佳培养基配方为 MS+6-BA 3.0 mg/L+IAA 0.3 mg/L+KT 1.0 mg/L+头孢曲松钠 300 mg/L, 经培养 60 d 后统计不定芽的诱导率最高为 49.05%。

由表 5 极差 R 值大小分析结果表明, 影响不定芽诱导率高低因素依次为 D>G>E>F, 即培养基中 6-BA 对不定芽诱导的影响最大, 其次是头孢曲松钠, 影响最小的是 KT。

从表 6 的方差数据分析结果可见, 本实验设置的 4 个因素中 D 和 G 2 个因素对实验结果分别有极显著和显著影响。其中因素 D 检验值 $F=35.846$,



A-根茎诱导产生愈伤组织 B-由愈伤组织诱导产生不定芽 C-不定芽诱导生根形成组培苗 D-移栽成活的华重楼幼苗
A-callus induced by roots B-adventitious buds induced by callus C-adventitious roots induced by adventitious buds to formation tissue culture seedling D-survival seedling of *P. polyphylla* var. *chinensis* by transplanting

图 1 华重楼再生植株诱导及移栽过程

Fig. 1 Inducing and transplanting of plant regeneration of *P. polyphylla* var. *chinensis*

表 4 不定芽诱导因子水平表

Table 4 Factors and levels of adventitious buds induction

水平	D/(mg·L ⁻¹)	E/(mg·L ⁻¹)	F/(mg·L ⁻¹)	G/(mg·L ⁻¹)
1	1.0	0.1	0.1	0
2	2.0	0.3	0.3	200
3	3.0	0.5	0.5	300
4	4.0	1.0	1.0	500

$F_{0.01}=29.500$, 检验值 $F>F_{0.01}$, 因而因素 D 有极显著影响 ($P<0.01$); 因素 G 检验值 $F=29.465$, $F_{0.05}(3, 3)=9.280$ 、 $F_{0.01}(3, 3)=29.500$, 检验值 $F_{0.05}<F<F_{0.01}$, 说明因素 G 有显著影响 ($0.01<P<0.05$); 所以影响不定芽诱导率的最主要因素为培养基中 6-BA 的质量浓度, 其次为培养基中添加的头孢曲松钠的质量浓度, 此结果与极差分析的结果相吻合。

表 5 不定芽诱导 $L_{16}(4^4)$ 正交试验设计与结果

Table 5 Results of adventitious buds induction by $L_{16}(4^4)$ orthogonal test

编号	D	E	F	G	误差	不定芽诱导率/%
1	1	1	1	1	1	25.13
2	1	2	2	2	2	31.14
3	1	3	3	3	3	33.32
4	1	4	4	4	4	31.05
5	2	1	2	3	4	37.86
6	2	2	1	4	3	35.18
7	2	3	4	1	2	28.32
8	2	4	3	2	1	35.54
9	3	1	3	4	2	46.32
10	3	2	4	3	1	49.05
11	3	3	1	2	4	47.04
12	3	4	2	1	3	32.56
13	4	1	4	2	3	40.04
14	4	2	3	1	4	29.35
15	4	3	2	4	1	40.33
16	4	4	1	3	2	42.16
Y_1	30.160	37.337	37.377	28.840	37.513	
Y_2	34.225	36.180	35.472	38.440	36.985	
Y_3	43.742	37.252	36.133	40.597	35.275	
Y_4	37.970	35.328	37.115	38.220	36.325	
R	13.582	2.009	1.905	11.757	2.238	

表 6 不定芽诱导结果方差分析

Table 6 Variance analysis on adventitious buds induction

因素	偏差平方和	F 值	显著性
D	399.934	35.846	$P<0.01$
E	10.970	0.983	
F	9.347	0.838	
G	328.739	29.465	$P<0.05$
误差	11.160		

刘萍等^[15]研究报道,在组织培养过程中青霉素对愈伤组织的诱导、分化及试管苗的生长有很大影响,适宜质量浓度的青霉素对诱导叶片愈伤组织的产生有抑制作用,而对愈伤组织的分化有促进作用,对试管苗的生长也有促进作用,同时也促进根系的发育。青霉素和头孢曲松钠都是医用抗生素,本研究在不定芽诱导培养基中特别添加并研究了不同质量浓度头孢曲松钠对不定芽诱导的影响,结果表明添加适宜质量浓度的头孢曲松钠有促进华重楼芽分化的作用,这与刘萍等^[15]的研究结果一致,说明适宜质量浓度的抗生素有激素的作用。

3.3 不定根的诱导

当不定芽长至 1.0 cm 以上时(图 1-B),将不定芽连同其基部的愈伤组织一同切下并转接到按正交试验设计(表 7)的生根培养基中,培养 55 d 后统计其生根率,并对试验结果进行极差分析和方差分析,结果见表 8、9。

表 7 不定根诱导因子水平表

Table 7 Factors and levels of adventitious roots induction

水平	H/(mg·L ⁻¹)	I/(mg·L ⁻¹)	J/%
1	0.1	0.1	0.1
2	0.3	0.2	0.3
3	0.5	0.3	0.5
4	1.0	0.5	1.0

由表 8 结果可以看出,不定根诱导率最高的是 9 号组合 H₃I₁J₃,即华重楼不定根诱导的最佳培养基配方为 1/2 MS+IBA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L+活性炭 0.5%,经培养 55 d 后统计不定根的诱导率最高为 100%,培育的组培苗见图 1-C。

由表 8 R 值大小分析结果表明,影响不定根诱导率高低因素依次为 H>J>I,即培养基中 IBA 对不定根诱导的影响最大,其次是活性炭,影响最小的是 NAA。

从表 9 的方差数据分析结果可见,本实验设置的 3 个因素中 H 和 J 2 个因素对试验结果有极显著影响。其中因素 H 检验值 $F=86.719$, $F_{0.01}(3, 3)=$

表 8 不定根诱导 L₁₆(4³) 正交试验设计与结果Table 8 Results of adventitious roots induction by L₁₆ (4³) orthogonal test

编号	H	I	J	误差	不定根诱导率/%
1	1	1	1	1	80.69
2	1	2	2	2	89.87
3	1	3	3	3	90.35
4	1	4	4	4	79.63
5	2	1	2	3	85.64
6	2	2	1	4	84.81
7	2	3	4	1	82.63
8	2	4	3	2	86.31
9	3	1	3	4	100.00
10	3	2	4	3	88.97
11	3	3	1	2	90.37
12	3	4	2	1	97.65
13	4	1	4	2	82.64
14	4	2	3	1	92.25
15	4	3	2	4	85.27
16	4	4	1	3	84.35
Z ₁	85.135	87.242	85.055	88.305	
Z ₂	84.847	88.975	89.607	87.297	
Z ₃	94.248	87.155	92.227	87.328	
Z ₄	86.127	86.985	83.468	87.427	
R	9.401	1.990	8.759	1.008	

表 9 不定根诱导结果方差分析

Table 9 Variance analysis on adventitious roots induction

因素	偏差平方和	F 值	显著性
H	240.038	86.719	$P<0.01$
I	10.377	3.749	
J	195.992	70.806	$P<0.01$
误差	2.770		

29.500, 检验值 $F>F_{0.01}$, 因而因素 H 有极显著影响 ($P<0.01$); 因素 J 检验值 $F=70.806$, $F_{0.01}(3, 3)=29.500$, 检验值 $F>F_{0.01}$, 说明因素 J 有极显著影响 ($P<0.01$); 因素 H 检验值 $F=86.719$ 大于因素 J 检验值 $F=70.806$, 所以影响不定根诱导率的最主要因素为培养基中 IBA 的质量浓度, 其次为培养基中添加的活性炭的质量分数, 此结果与极差分析的结果相吻合。

杨丽云等^[16]采用 1/2 MS+NAA 0.5 mg/L+IAA 0.5 mg/L 的生根培养基, 将分化出的芽切下, 接种于培养基上进行根的诱导, 在培养过程中芽的基部逐步褐化伸长成根茎状, 培养 60 d 左右, 在褐化伸长前端芽的基部可长出 2~3 条根, 生根率为 76.3%。本研究选择当不定芽长至 1.0 cm 以上时, 将不定芽按 1~2 个为 1 组连同其基部的愈伤组织一同切下并

转接到生根培养基中,由实验结果可以看出采用本研究所选择的培养基配方,不定根诱导率最低为 79.63%,最高可达 100%。本研究选择了和杨丽云等^[16]研究中不同的培养基配方,并在培养基中特别添加了活性炭,由以上实验结果分析可以看出,培养基中添加的活性炭浓度对不定根的诱导有极显著的影响,可见培养基中加入活性炭可以促进不定根生长,提高不定根诱导率。

3.4 炼苗和移栽

选取生长健壮的组培苗(图 1-C),先在无菌水中栽培一段时间(0、3、5、7 d),再移栽至土壤中,培养 30 d 后统计组培苗成活率,统计结果见表 10。

杨丽云等^[16]在移栽时将根长为 2~3 cm 的芽取出,洗净培养基后移栽于腐殖质土中,置于 18~20℃ 温度下,土壤湿度保持 50%~60%,180 d 左右芽可生长出土展叶,形成完整植株,出土展叶成活率为 65%。本研究选取长出第 1 片叶且不定根长出 4 条以上的组培苗进行移栽,并且在移栽至土壤前先在无菌水中栽培一段时间,由表 10 可以看出先在无菌水中栽培 5 d 后再移栽至土壤中成活率可高达 100%。

表 10 组培苗的移栽时期和水培时间对组培苗成活率的影响
Table 10 Impact of tissue culture seedling survive rate by transplanting period and hydroponic time

编号	组培苗的移栽时期	水培时间/d	成活率/%
A ₁	组培苗未长出第 1 片叶且不定根少于 2 条	5	30.62
A ₂	组培苗长出第 1 片叶且不定根长出 4 条以上	0	56.12
A ₃	组培苗长出第 1 片叶且不定根长出 4 条以上	3	94.23
A ₄	组培苗长出第 1 片叶且不定根长出 4 条以上	5	100.00
A ₅	组培苗长出第 1 片叶且不定根长出 4 条以上	7	91.45

由表 10 中 A₁ 和 A₄ 可以看出,选取重楼组培苗移栽的时期非常重要,同样在移栽至土壤前先水培 5 d 的条件下,选还未长出第 1 片叶且不定根数少于 2 条的重楼组培苗,移栽后成活率仅为 30.62%;而选长出第 1 片叶且不定根长出 4 条以上的重楼组培苗,成活率可达到 100%。由 A₂ 可以看出,若组培苗从培养瓶中取出,不进行水培直接移栽至土壤,成活率较低,仅为 56.12%;由 A₃~A₅ 可以看出重

楼组培苗在移栽到土壤前,在选定的培养条件下进行一定时间的水培后,可明显提高组培苗的成活率,使成活率高达 90% 以上;由 A₄ 可以看出,组培苗从培养瓶中取出先水培 5 d 后再移栽至土壤中效果最好,可使成活率高达 100%。即应选择长出第 1 片叶且不定根长出 4 条以上的组培苗进行移栽,并且在移栽至土壤前应先在无菌水中栽培 5 d,以提高组培苗的成活率。

4 讨论

张翔宇等^[17]利用组织培养来繁殖重楼的难度很大,只有芽段可成功诱导出植株,而茎尖、根茎和子房虽可诱导愈伤组织,都存在增殖、分化以及诱导率低等问题。本研究选择根茎上带芽体的茎节为外植体诱导愈伤组织,再在愈伤组织的基础上进一步完成其不定芽的诱导与无根苗生根,从而获得华重楼组培苗,解决了华重楼以组织培养技术获得再生植株难的问题,为华重楼优良品种的培育和组培苗的大量快速繁殖提供了一条新途径,可实现华重楼植物在短时间和低成本条件下大批量生产。

在不定根的诱导培育中,还发现选取的不定芽必须要连同其基部的愈伤组织一同切下后,再转接到生根培养基中才能最终培育出不定根,这可能是与华重楼植物的器官结构特点有关;因为华重楼植物的不定根主要都是从其根茎上长出的,而在华重楼组培苗培育过程中,其不定芽基部的愈伤组织是可进一步形成组培苗的根茎;所以,通过本实验研究可以得知,在华重楼组培苗的生根培养过程中,选取的不定芽需连同其基部的愈伤组织是非常重要的。

在华重楼组培苗移栽时,采用了先将组培苗用水培养一段时间后,再移栽至土壤中栽培的新方法,使组培苗的成活率大大地提高了。分析其原因可能是因为培育的华重楼组培苗自身结构特点决定了对水的需求,以及本研究筛选的适宜水培条件的结果。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 付宝慧. 论中药重楼的开发利用及进展 [J]. 求医问药, 2011, 9(11): 325-327.
- [3] 付绍智, 李楠, 刘振, 等. HPLC 法测定不同产地重楼属植物中 7 种甾体皂苷成分 [J]. 中草药, 2012, 43(12): 2435-2437.
- [4] 赵保胜, 朱寅荻, 马勇, 等. 中药重楼研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(11): 267-270.
- [5] 韩燕全, 洪燕, 夏伦祝, 等. UPLC-ELSD 法同时测定

- 重楼中重楼皂苷 I、II、VI、VII [J]. 中草药, 2012, 43(2): 305-307.
- [6] 尹鸿翔, 张 浩. 濒危民族药重楼种质资源调查及质量评价研究 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(11): 2863-2865.
- [7] 孟繁蕴, 汪丽娅, 张文生, 等. 滇重楼种胚休眠和发育过程中内源激素变化的研究 [J]. 中医药学报, 2006, 34(4): 36-38.
- [8] 张丽琼. 重楼组织培养研究现状 [J]. 农业研究与应用, 2011(6): 23-25.
- [9] 李 恒. 重楼属植物 [M]. 北京: 科学出版社, 2010.
- [10] 唐炳兰. 中药重楼的研究进展 [J]. 右江民族医学院学报, 2006, 28(6): 1062-1064.
- [11] 侯玉平, 胡晓立, 沙 莎, 等. 重楼的繁殖技术研究进展 [J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2004, 26(6A): 60-62.
- [12] 崔宝禄, 唐德华, 王兴贵. 重楼无性繁殖研究进展 [J]. 河北林果研究, 2009, 24(4): 399-401.
- [13] 王跃华, 陈 燕, 张 珏, 等. 华重楼愈伤组织培养及薯蓣皂苷含量测定 [J]. 湖北农业科学, 2014, 53(8): 1936-1940.
- [14] 李 群, 陈丽萍, 葛方兰. 重楼属植物愈伤组织的诱导和培养 [J]. 四川师范大学学报: 自然科学版, 2006, 29(1): 120-122.
- [15] 刘 萍, 丁义峰, 齐付国, 等. 医用抗生素对高等植物的作用研究现状 [J]. 河南师范大学学报: 自然科学版, 2004, 32(2): 66-70.
- [16] 杨丽云, 陈 翠, 吕丽芬, 等. 云南重楼的组织培养与植株再生 [J]. 植物生理学通讯, 2008, 44(5): 947-948.
- [17] 张翔宇, 唐映军, 周茂嫦, 等. 珍惜药用植物重楼研究进展 [J]. 现代中药研究与实践, 2014, 28(1): 78-83.