

青叶胆组织培养条件优化及不同交配方式子代植株再生能力比较研究

黄衡宇^{1*}, 黄 骥², 王美蓉¹, 马雪妮¹, 席银凯¹

1. 云南中医学院 中药材优良种苗繁育工程研究中心, 云南 昆明 650500

2. 上海师范大学生命与环境科学学院, 上海 200234

摘要: 目的 优化青叶胆 *Swertia mileensis* 组织培养快速繁殖技术, 同时比较不同交配方式后代植株的再生能力, 从而探讨青叶胆片断化居群繁殖保障机制。方法 以自交、近交、远交和自然结实种子为材料, 相同方法消毒后接种于空白 MS 培养基上, 60 d 后统计各组萌发率; 在此基础上, 以各组无菌苗带节茎段为外植体, 采用正交试验考察不同来源外植体在添加不同植物激素及质量浓度组合的 MS 培养基中诱导愈伤组织及丛芽分化能力。结果 自交、近交、远交和自然结实种子萌发率之间无显著性差异 ($P>0.05$); 适宜的愈伤组织诱导培养基为 MS+ZT 0.5 mg/L+2,4-D 0.05 mg/L, 在此培养条件下, 自交、近交、远交和自然结实种子苗带节茎段愈伤组织诱导率分别达 100%、96.67%、96.55%和 96.29%, 各组间无显著性差异; 适宜的丛芽发生培养基为 MS+BA 2.0 mg/L+KT 0.1 mg/L+NAA 1.0 mg/L, 4 种来源不同的愈伤组织丛芽分化率均为 100%; 生根则在 1/2 MS+NAA 1.0 mg/L 中进行, 4 种来源不同的试管苗生根率均为 100%, 生根苗在生长势上亦无明显差别。结论 优化的青叶胆组织培养快速繁殖技术, 为保护其野生资源、种苗繁殖提供了有效途径, 同时从植物生理学角度初步推测青叶胆近交的获益可以补偿与近交相伴的适合度损失, 其后代植株在再生能力方面与异交无显著差异。

关键词: 青叶胆; 愈伤组织; 丛芽; 近交; 适合度

中图分类号: R282.21 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)03-0480-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.03.022

Comparison on progeny regeneration capacity among different mating patterns and optimization of cultivation condition in *Swertia mileensis*

HUANG Heng-yu¹, HUANG Ji², WANG Mei-rong¹, MA Xue-ni¹, XI Yin-kai¹

1. Engineering Research Center for Reproducing Fine Varieties of Chinese Medicinal Plants, Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China

2. College of Life and Environmental Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China

Abstract: **Objective** To establish and optimize the technique of tissue culture and rapid propagation, and compare the progeny regeneration capacity among different mating patterns in *Swertia mileensis*, meanwhile, to explore the reproductive assurance of the fragment populations. **Methods** Sterilized seeds from different mating patterns were cultured on MS media for germination, which included self-breed, inbreeding, outbreeding, and nature pollinating, and counted the germination rate 60 d later. The study used the different source explants maintained on MS medium supplemented with different types and concentration of plant growth regulator combinations to explore its capacity of callus induction and adventitious shoots differentiation with orthogonal design. **Results** There is no significant difference in the germination rates among all kinds of seed as touched above. The optimal medium for callus induction is MS + ZT 0.5 mg/L + 2,4-D 0.05 mg/L, the callus induction rates were 100%, 96.67%, 96.55%, and 96.29%; The optimal medium for adventitious shoots differentiation was MS + BA 2.0 mg/L + KT 0.1 mg/L + NAA 1.0 mg/L, and the differentiation rates all reached up to 100%; The optimal medium for rooting was 1/2 MS + NAA 1.0 mg/L, the rooting rate both were as high as 100% and there was no significant difference in the growth of plantlets. **Conclusion** This study optimizes the cultivation conditions and provides an effective solution for protecting the wild resources and sprouts multiplication of *S. mileensis*. Meanwhile, from the plant physiological basis, it could be preliminarily predicted that the advantage of inbreeding would make up the fitness cost associated with it and the progeny regeneration capacity shows no significant difference between inbreeding and outbreeding.

Key words: *Swertia mileensis* T. N. Ho et W. L. Shi; callus; adventitious shoots; inbreeding; fitness

收稿日期: 2015-09-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31260077); 云南省教育厅重点项目 (2012Z005); 湖南省高校创新平台开放项目 (11K053)

作者简介: 黄衡宇 (1969—), 男, 博士, 主要从事药用植物发育生物学教学和科研工作。E-mail: hhyhy96@163.com

青叶胆 *Swertia mileensis* T. N. Ho & W. L. Shi 为龙胆科獐牙菜属多枝组多枝系一年生草本，主要分布于云南红河州的弥勒、开远等地，生于海拔 1 300~1 650 m 的荒坡稀疏小灌木丛或黄茅草丛间，生长在沙地的阳性山坡或向阳石灰岩坡地上^[1]。青叶胆在云南红河哈尼族、彝族地区用于治疗肝炎等疾病具有悠久的历史^[2-3]。青叶胆自 20 世纪 70 年代从开远、弥勒等地民间发掘出来后，即作为新的药物资源被《云南省药品标准》1974 年版以及《中国药典》1977~2015 年版所收载。

国内学者对青叶胆化学成分及药理活性进行了一些研究^[4-6]，表明青叶胆具有保肝、抗菌、降血糖、抗胆碱及解痉等多种药理活性，应用于临床治疗急性病毒性肝炎，疗效显著。随着青叶胆药用价值的发现，经过近 20 年的滥采滥挖，加上生境不断丧失和遭到破坏（如道路建设、开荒、开发沙场等），青叶胆在本课题组调查的所有区域中均呈星散残余分布，多数生长在临时或半临时生境，分布区域已渐成“岛屿状”，片断化明显。此外，青叶胆具有鲜艳的花和显著的腺体，并有一系列机制来保证其异花受粉，但生境片断化后增大了个体之间近交和自交的概率，可能产生近交或自交衰退^[7-8]。本实验以青叶胆自交、近交、远交和自然结实无菌种子苗为材料，利用现代生物技术通过正交试验优化青叶胆组织培养条件，改良青叶胆试管苗生长繁殖方法，以建立其高效稳定的再生体系，也为其快速繁殖规模化生产及育苗提供技术支持。同时初步比较青叶胆不同交配方式后代植株在组织培养中的再生能力，以期对青叶胆保护生物学提供有关不同交配方式后代适合度方面的资料。

1 材料

材料来自云南省弥勒县小苍窝（24°15'N，103°29'E 及附近，海拔 1 620 m），标本经云南中医学院钱子刚教授鉴定为青叶胆 *Swertia mileensis* T. N. Ho & W. L. Shi。2013 年 10~12 月进行青叶胆繁育系统检测，同株异花人工授粉（套袋）所产生种子视为自交种子；2 m² 内植株相互异株人工授粉（套袋）所产生种子视为近交种子；采集距小苍窝种群 15 km 的习水哨种群花粉人工授粉至小苍窝居群植株（套袋）所产生种子视为远交种子；小苍窝和习水哨居群自然结实种子视为自然结实种子。

2 方法

2.1 无菌苗的获得

2013 年 12 月收取已成熟各处理组蒴果，带回

实验室后因多数蒴果已裂开，故用细纱布将不同来源种子按每包 100 粒包好，流水冲洗 30 min 后置于超净工作台内。75%乙醇溶液处理 10~15 s，再经 0.1%升汞水溶液消毒 10 min，最后无菌水冲洗 8 次，每次不低于 3 min。处理后的种子接种于空白 MS 培养基中，置于温度控制在（22±1）℃，光照度 1 500~2 000 lx，光照时间 6 h/d 的培养室内。培养 60 d 后统计各组萌发率，待无菌种子苗长至 5~6 cm 时，取其带节茎段为外植体。

2.2 培养基

基本培养基为 MS、蔗糖 3%、琼脂 0.46%，pH 值 5.8~6.0。在前期工作的基础上^[9]，选择 5 种植物激素玉米素（ZT）、6-苄基腺嘌呤（6-BA）、激动素（KT）、2,4-二氯苯氧乙酸（2,4-D）和萘乙酸（NAA）作为外源激素。培养基在 121 ℃灭菌 22 min 备用。

2.2.1 愈伤组织诱导培养基 以材料来源于自交、近交、远交和自然结实种子苗带节茎段为外植体（A），在 MS 培养基中添加不同质量浓度 ZT（B）、2,4-D（C）和 NAA（D），采用 L₁₆(4⁵) 正交试验考察不同来源外植体及不同激素组合对青叶胆愈伤组织诱导的影响，见表 1。20 d 后统计出愈率。

表 1 不同来源外植体愈伤组织诱导培养基 L₁₆(4⁵) 正交设计
Table 1 L₁₆(4⁵) orthogonal design for callus induction of explants from different origins

水平	因素			
	A	B/(mg·L ⁻¹)	C/(mg·L ⁻¹)	D/(mg·L ⁻¹)
1	自交	0.1	0.01	0.1
2	近交	0.5	0.05	0.5
3	远交	1.0	0.10	1.0
4	自然	2.0	0.50	2.0

2.2.2 丛芽发生培养基 在愈伤组织诱导结果的基础上，采用 L₁₆(4⁵) 正交试验考察不同来源愈伤组织（A）及不同质量浓度 BA（B）、KT（C）和 NAA（D）组合对青叶胆丛芽发生的影响，见表 2。30 d 后统计丛芽发生率，40 d 继代培养时统计增殖系数。

2.2.3 生根培养基 采用完全组织试验，将不同来源试管苗分别接于添加不同质量浓度 NAA 的 1/2 MS 培养基上，30 d 后统计生根率。

表 2 不同来源愈伤组织丛芽发生培养基 $L_{16}(4^5)$ 正交设计
Table 2 $L_{16}(4^5)$ orthogonal design for callus adventitious shoots from different origins

水平	因素			
	A	B/(mg·L ⁻¹)	C/(mg·L ⁻¹)	D/(mg·L ⁻¹)
1	自交	0.5	0.05	0.1
2	近交	1.0	0.10	0.5
3	远交	2.0	0.50	1.0
4	自然	3.0	1.00	2.0

2.3 培养条件

培养室温度控制在 $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$, 光照度 1 500~2 000 lx, 光照时间 10 h/d。

2.4 统计指标

所得数据采用 Excel 和 SPSS 19.0 软件处理, 利用单因素方差分析法对正交数据进行方差分析。

愈伤组织诱导率 = 产生愈伤组织的外植体数 / 接种外植体总数

丛芽发生率 = 产生丛芽愈伤组织数 / 愈伤组织总数

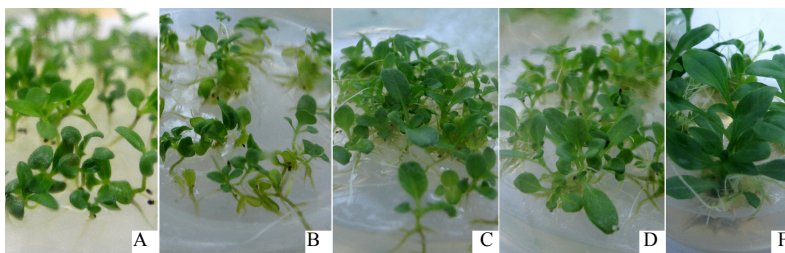
丛芽增殖系数 = 增殖后的有效丛芽总数 / 起始接种总数

生根率 = 产生不定根的单苗数 / 接种单苗总数

3 结果与分析

3.1 无菌种子苗的获得

将 4 种不同来源的种子消毒后接种于空白 MS 培养基中 30 d 后开始萌发, 60 d 后统计各组萌发率, 发现各组种子在萌发率上无显著性差异 ($P > 0.05$), 均达到 90% 以上, 在生长势上亦无显著性差异, 生长情况见图 1-A~D。此时, 由于每一培养瓶种子数过多, 不利于继续生长, 将每一幼苗移至新鲜空白 MS 培养基中, 30 d 后各组种子苗长势良好, 高度均达 5~6 cm (图 1-E)。取各组种子苗带节茎段进行愈伤组织诱导。



A-自交种子苗 B-近交种子苗 C-异交种子苗 D-自然结实种子苗 E-自交种子幼苗 F-成熟苗

A-seedlings of self-breeding B-seedlings of inbreeding C-seedlings of cross-breeding D-seedlings of nature seeds E-plantlet of self-breeding F-mature seedlings

图 1 不同来源种子萌发及幼苗生长情况

Fig. 1 Germination and seedling of seeds from different origins

3.2 愈伤组织诱导

将不同来源种子幼苗带节茎段接种于 $L_{16}(4^5)$ 正交试验中的培养基中, 考察外植体来源 (A)、ZT (B)、2,4-D (C)、NAA (D)、误差 (E) 对愈伤组织诱导率的影响, 结果见表 3, 方差分析见表 4。从 K 值上看, A 和 D 因素各水平间无明显差异, 而 B 和 C 因素各水平间具明显差异, 其中 B_2 、 C_2 均优于同组其他水平。各因素对愈伤组织诱导的极差 (R_1) 大小依次为 $B > C > D > A$, 即对愈伤组织诱导影响最大的为 ZT, 其次是 2,4-D、NAA, 影响最小的是外植体来源。ZT 和 2,4-D 的极差为 33.569 和 9.823, 均大于对照项 8.655; NAA 和外植体来源极差分别为 7.422 和 3.608, 均小于对照项 8.655, 其中外植体来源极差远小于对照项。表明 ZT 和 2,4-D 对诱导愈伤组织的效应是可靠的, NAA 的效应不可靠, 而外植体来源则极不可靠。由方差分析 (表 4) 可知, ZT 对愈伤组织诱导有显著影响 ($P < 0.05$), 而其他 3 项均无显著影响

($P > 0.05$)。结合极差与方差分析结果, 可以不考虑 NAA 和外植体来源对愈伤组织诱导的影响。通过平均值分析可知, 青叶胆愈伤组织诱导的最佳组合激素组合为 B_2C_2 , 配方即为 $MS + ZT 0.5 \text{ mg/L} + 2,4-D 0.05 \text{ mg/L}$ 。由此可知, 来源于自交、近交、远交和自然结实种子苗外植体对于青叶胆愈伤组织诱导无显著影响, 造成出愈率差异的仅是不同激素种类及其质量浓度的配比, 而与外植体来源无关。

将 4 种不同来源的外植体分别接入 $MS + ZT 0.5 \text{ mg/L} + 2,4-D 0.05 \text{ mg/L}$ 中, 培养 20 d 后与正交结果基本一致, 自交、近交、远交和自然结实来源的带节茎段出愈率分别为 100%、96.67%、96.55% 和 96.29%。以近交带节茎段为例, 接种 10 d 后, 随着节上休眠芽 (腋芽) 的萌动, 在材料基部开始出现绿色、质地紧密的愈伤组织 (图 2-A); 15 d 后愈伤组织迅速生长 (图 2-B); 20 d 后休眠芽伸长, 愈伤组织成为深绿色且呈现分化迹象 (图 2-C、D), 非常有利于丛芽诱导。

表 3 不同来源外植体愈伤组织诱导培养基 $L_{16}(4^5)$ 正交试验结果

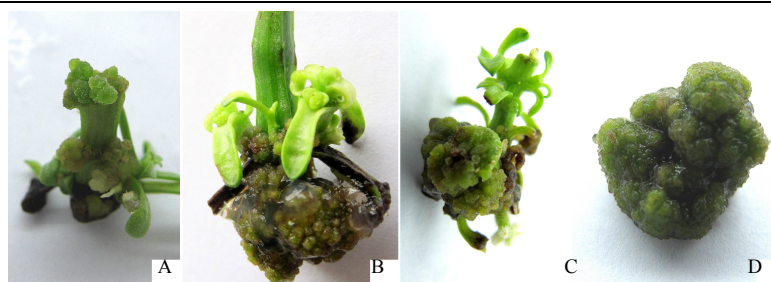
Table 3 Results of callus induction of explants from different origins by $L_{16}(4^5)$ orthogonal test

编号	A	B/(mg·L ⁻¹)	C/(mg·L ⁻¹)	D/(mg·L ⁻¹)	E	愈伤诱导率/%
1	自交	0.1	0.01	0.1	1	53.65
2	自交	0.5	0.05	0.5	2	96.38
3	自交	1.0	0.10	1.0	3	72.33
4	自交	2.0	0.50	2.0	4	67.23
5	近交	0.1	0.05	1.0	4	81.35
6	近交	0.5	0.01	2.0	3	95.33
7	近交	1.0	0.50	0.1	2	66.67
8	近交	2.0	0.10	0.5	1	58.28
9	远交	0.1	0.10	2.0	2	60.25
10	远交	0.5	0.50	1.0	1	95.67
11	远交	1.0	0.01	0.5	4	76.36
12	远交	2.0	0.05	0.1	3	65.25
13	自然	0.1	0.50	0.5	3	52.50
14	自然	0.5	0.10	0.1	4	94.65
15	自然	1.0	0.05	2.0	1	78.38
16	自然	2.0	0.01	1.0	2	61.67
K_1	72.398	61.938	71.753	70.055	71.495	
K_2	75.408	95.508	80.340	70.880	71.243	
K_3	74.383	73.435	71.378	77.755	71.353	
K_4	71.800	63.108	70.518	75.298	79.898	
R_1	3.608	33.570	9.822	7.700	8.655	

表 4 不同来源外植体愈伤组织诱导方差培养基方差分析结果

Table 4 Variance analysis on callus induction of explants from different origins

来源	III 型平方和	自由度	均方	F 值	显著性
A	34.091	3	11.364	0.156	$P>0.05$
B	2 904.119	3	968.040	13.284	$P<0.05$
C	252.959	3	84.320	1.157	$P>0.05$
D	160.274	3	53.425	0.733	$P>0.05$
E	218.924	3	72.875		



A-培养 10 d 后, 材料出现愈伤组织 B-15 d 后, 愈伤组织生长迅速 C、D-培养 20 d 后的愈伤组织
A-explant generates callus after cultured 10 d B-callus growth rapidly after 15 d C, D-callus after 20 d

图 2 近交种子苗带节茎段愈伤组织诱导

Fig. 2 Callus induction of stems from inbred seedlings

3.3 丛芽发生培养基

将不同来源愈伤组织切割成适当大小接种于 $L_{16}(4^5)$ 正交试验组的中, 考察不同来源愈伤组织 (A) 及不同质量浓度 BA (B)、KT (C)、NAA (D) 和误差 (E) 对丛芽发生率的影响, 结果见表 5, 方差分析见表 6。正交各因素对丛芽发生的极差 (R_2) 大小依次为 $B > C > D > A$, 即对丛芽发生影响最大的是 BA, 其次是 KT 和 NAA, 影响最小的是愈伤来源。BA、KT 和 NAA 的极差分别为 40.400、12.172 和 9.127, 均大于对照项 9.010; 而愈伤组织来源极差为 9.010, 等于对照项 9.010, 说明愈伤组织来源

这一因素对丛芽发生的效应不可靠, 其他 3 个因素的效应则是可靠的。由方差分析 (表 6) 可知, BA 对丛芽发生有显著影响 ($P < 0.05$), 其他 3 个因素则无显著影响 ($P > 0.05$)。结合极差与方差分析结果, 可以不考虑愈伤组织来源对丛芽诱导的影响。通过平均值分析可知, 青叶胆丛芽诱导的最佳激素组合为 $B_3C_2D_3$, 即 MS+BA 2.0 mg/L+KT 0.1 mg/L+NAA 1.0 mg/L。由此可知, 来源于自交、近交、远交和自然结实外植体所产生的愈伤组织对于青叶胆丛芽发生无显著影响, 造成丛芽发生率差异的仅是不同激素种类及其质量浓度的配比, 而与愈伤组织来源无关。

表 5 不同来源愈伤组织丛芽发生培养基 $L_{16}(4^5)$ 正交试验结果

Table 5 Adventitious shoots induction of callus from different origins by $L_{16}(4^5)$ orthogonal test

编号	A	B/(mg·L ⁻¹)	C/(mg·L ⁻¹)	D/(mg·L ⁻¹)	E	丛芽发生率/%
1	自交	0.5	0.05	0.1	1	78.58
2	自交	1.0	0.10	0.5	2	80.46
3	自交	2.0	0.50	1.0	3	97.67
4	自交	3.0	1.00	2.0	4	40.86
5	近交	0.5	0.10	1.0	4	72.33
6	近交	1.0	0.05	2.0	3	82.52
7	近交	2.0	1.00	0.1	2	91.65
8	近交	3.0	0.50	0.5	1	46.68
9	远交	0.5	0.50	2.0	2	59.33
10	远交	1.0	1.00	1.0	1	86.56
11	远交	2.0	0.05	0.5	4	92.37
12	远交	3.0	0.10	0.1	3	71.26
13	自然	0.5	1.00	0.5	3	56.50
14	自然	1.0	0.50	0.1	4	66.35
15	自然	2.0	0.10	2.0	1	94.67
16	自然	3.0	0.05	1.0	2	55.96
K_1	74.393	66.685	77.358	76.960	76.623	
K_2	73.295	78.973	79.680	69.003	71.850	
K_3	77.380	94.090	67.508	78.130	76.988	
K_4	68.370	53.690	68.893	69.345	67.978	
R_2	9.010	40.400	12.172	9.127	9.010	

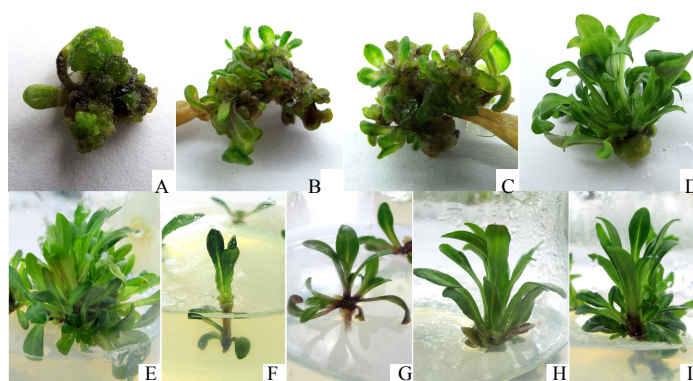
表 6 不同来源愈伤组织丛芽发生培养基方差分析结果

Table 6 Variance analysis on adventitious shoots induction of callus from different origins

来源	III 型平方和	自由度	均方	F 值	显著性
A	168.523	3	56.174	0.765	$P > 0.05$
B	3 570.790	3	1 190.263	16.215	$P < 0.05$
C	440.531	3	146.844	2.000	$P > 0.05$
D	283.284	3	94.428	1.286	$P > 0.05$
E	220.216	3	73.405		

本研究在正交试验基础上, 亦对丛芽发生实验进行了重复。将 4 种不同来源的愈伤组织分别接入 MS+BA 2.0 mg/L+KT 0.1 mg/L+NAA 1.0 mg/L 培养基上, 培养 30 d 后结果与正交试验基本一致, 4 种不同来源的愈伤组织丛芽发生率均达 100%。以近交来源愈伤组织为例, 将诱导出的愈伤组织接入上述培养基 5 d 后即有芽点出现 (图 3-A); 10 d 后可见明显的不定芽 (图 3-B); 15 d 后不定芽迅速生长 (图 3-C); 随着培养时间的增长, 愈伤组织不断

增殖, 丛芽不断发生与生长, 至 30 d 时, 在主芽伸长的同时, 其基部亦分化出大量丛芽 (图 3-D); 40 d 时, 整个培养物呈簇状, 继代时繁殖系数可达 6.0 以上 (图 3-E)。继代扩繁时将每 1 单苗按节分段切下接入新鲜培养基中 (图 3-F), 10 d 后可见腋芽萌动, 其基部开始出现愈伤组织 (图 3-G); 15 d 后愈伤组织开始分化丛芽 (图 3-H); 30 d 后可见基部大量大小不一的丛芽及培养基内的愈伤组织和小丛芽 (图 3-I), 繁殖系数亦达 6.0 以上。



A-培养 5 d 后的愈伤组织 B-10 d 后不定芽出现 C-15 d 后不定芽生长 D-30 d 时基部分化大量丛芽, 新的愈伤组织不断出现 E-40 d 时培养物呈簇状, 可进行分割继代增殖 F-继代时的单芽 G-培养 10 d 后在腋芽萌动的同时基部分化出愈伤组织 H-15 d 后基部愈伤组织开始分化丛芽 I-30 d 后主苗伸长, 基部分化出大量丛芽

A-callus for 5 d B-adventitious shoots generated after 10 d C-adventitious shoots growth after 15 d D-abundant adventitious shoots were differentiated from the bases after 30 d and new callus generating E-cluster cultures could be cut for proliferation after 40 d F-single bud for proliferation G-sprouting axillary bud and differentiating callus from the bases after 10 d H-callus differentiated

图 3 近交来源愈伤组织的丛芽分化

Fig. 3 Adventitious shoots induction of callus from inbred seedlings

3.4 瓶内生根

通过不同来源试管苗与不同质量浓度 NAA (0.1、0.5、1.0 mg/L) 的完全组合实验, 结果表明青叶胆试管苗生根较易, 各来源不同的试管苗在各实验组中表现基本一致, 即使无添加 NAA 的各组生根率亦达 70%以上, 其中在 NAA 1.0 mg/L 中各组试管苗生根率均达 100%, 见表 7。故青叶胆最佳生根培养基为 1/2 MS+NAA 1.0 mg/L, 在此培养基中培养 10 d 即有绿色不定根产生 (图 4-A), 30 d 后试管苗生长良好, 根长且壮, 无愈伤组织产生 (图 4-B、C)。

4 讨论

4.1 外植体和中间繁殖体类型对青叶胆组织培养的影响

在青叶胆愈伤组织诱导过程中, 外植体的选择对其诱导质量、后续丛芽分化都有较大影响。本课题组在前期研究中, 分别采用过无菌种子苗带节茎尖和叶片 2 种外植体材料。茎尖和叶片均能诱导出

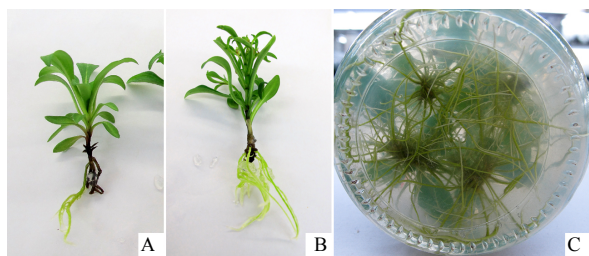
表 7 不同来源试管苗生根实验

Table 7 Rooting tests on test-tube plantlets from different origins

编号	材料来源	NAA/(mg·L ⁻¹)	接种数*	生根率/%
R01	自交	0	20	75.00 b
R02	自交	0.1	27	85.19 ab
R03	自交	0.5	30	93.33 a
R04	自交	1.0	27	100.00 a
R05	近交	0	27	77.78 b
R06	近交	0.1	30	86.67 ab
R07	近交	0.5	30	90.00 a
R08	近交	1.0	24	100.00 a
R09	远交	0	27	74.07 b
R10	远交	0.1	30	83.33 ab
R11	远交	0.5	24	91.67 a
R12	远交	1.0	24	100.00 a
R13	自然结实	0	30	73.33 b
R14	自然结实	0.1	30	86.67 ab
R15	自然结实	0.5	30	93.33 a
R16	自然结实	1.0	30	100.00 a

*除去污染数的实际外植体数, 同列不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

*Excepting numbers of pollution, different lowercase letters in same column indicated significant difference at $P < 0.05$



A-培养 10 d 后即有绿色不定根出现 B-30 d 后的生根苗 C-生根苗瓶底根系
A-green adventitious roots generated after 10 d B-rooting plantlets after 30 d C-bottom roots of rooting plant

图 4 近交来源试管苗的生根

Fig. 4 Rooting of test-tube plantlets from inbreeding

愈伤组织，出愈率分别达 83.65%和 90.33%，但愈伤组织质量较差，多为白色疏松状，以后不断生长膨大，逐渐死亡。尽管尝试了各种激素浓度和组合，均无不定芽产生；带节茎尖由于具有较强的顶端优势，能不断伸长，但抑制了节上休眠芽的萌动，在后续的培养中只能靠茎和腋芽的生长以“微扦插”的方式进行繁殖，繁殖系数较低，培养效果亦不理想。而采用带节茎段，不仅材料相对易得，而且在培养过程中随着其节上休眠芽的萌动，基部切口处在 10 d 内就有绿色、质地紧密的愈伤组织发生，培养 20 d 后即有再分化迹象。愈伤组织转接入丛芽发生培养基中 10 d 后迅速分化出绿色锥形小丛芽，继而形成具有茎、叶和顶芽的小植株；在丛芽分化过程中，愈伤组织不断进行增殖和分化，重复进行“愈伤组织-丛芽-愈伤组织-丛芽”，即所谓的“芽繁芽”过程。此外，与本课题组另一研究材料地皮消 *Pararuellia delavayana* (Baill.) E. Hossain 类似(另文发表)，青叶胆带节茎段基部切口处愈伤组织均在节上腋芽萌发 3~5 d 后出现，表明带节茎段愈伤组织的诱导与节上腋芽的萌发关系密切，估计腋芽萌发后可以合成某些刺激愈伤组织发生的激素类或其他物质，而带节茎尖不仅没有合成这类物质的能力，而且抑制或部分“优势”利用了自身腋芽萌发后合成的这类物质，导致产生的愈伤组织质量低下、无再分化能力。本研究在带节茎段愈伤组织产生以前，将其已萌发的腋芽剪去后继续培养，发现愈伤组织诱导率大幅下降，即使有愈伤组织产生，其再分化能力也大幅下降。初步证实了青叶胆带节茎段具分化能力的愈伤组织发生与其腋芽萌发具紧密联系。

在青叶胆的增殖培养中，中间繁殖体的选择至关重要，在分割材料时，应将带顶芽枝条切下作为生根材料转入生根培养基中，而将中部和基部带节

茎段作为单独的中间繁殖体继续转入增殖培养基中，这样随着节上休眠芽的萌动，又可从其基部产生愈伤组织，进而分化出丛芽；由于腋芽与丛芽的共同生长，中间繁殖体最终形成微型的、多枝多芽的小灌木丛状结构，繁殖系数可达 6.65，实现了高效、快速繁殖的目的。此外，与水半夏^[10]、紫背金盘^[11]等物种相似，可以利用青叶胆在增殖培养过程中具有的“芽繁芽”现象进行扩繁，从而节省用外植体诱导愈伤组织过程，从而大大提高繁殖效率。

4.2 外源激素对青叶胆体组织培养的影响

外源激素的选择对青叶胆愈伤组织诱导、休眠芽萌动和丛芽发生均有较明显影响。在前期的单因素实验中发现，在不添加外源激素的空白 MS 培养基上未能诱导出愈伤组织，仅少量材料有休眠芽萌动；ZT 和 2,4-D 较适合愈伤组织的诱导，BA 和 KT 则不适宜作为愈伤组织诱导的外源激素；而在丛芽诱导的预实验中则发现 BA 的效果好于 ZT。推测 ZT 在诱导青叶胆愈伤组织方面活性远较 BA 高，而在促进丛芽分化方面活性则低于 BA。

正交试验结果表明，在愈伤组织诱导方面，ZT 具显著效应，与低浓度 2,4-D 配合使用，愈伤组织出愈率大幅提高，表明 ZT 和 2,4-D 之间的协同作用效果远远大于单独作用的效果。实验表明，对于青叶胆愈伤组织诱导最佳培养基配方为 MS+ZT 0.5 mg/L+2,4-D 0.05 mg/L。在丛芽发生方面，BA 具显著效应，尽管和 NAA 配合使用也得了较为理想的效果，但在培养过程中愈伤组织数量增多、质量下降，丛芽发生数相对减少；本课题组结合珊瑚樱 *Solanum pseudocapsicum* L. 的研究经验^[12]，选择 KT 作为丛芽发生和增殖培养基优化的另一个生长调节素。实验结果表明青叶胆丛芽发生与增殖的最佳培养基配方为 MS+BA 2.0 mg/L+KT 0.1 mg/L+NAA 1.0 mg/L。

4.3 不同来源材料对青叶胆组织培养的影响

青叶胆具有鲜艳的花和显著的腺体，并有一系列机制来保证其异花受粉，花部综合特征表明该植物应为异花授粉，但在其生境片段化后，由于遗传漂变的作用，增大了种群内个体之间近交和自交的概率。在被子植物中，异花授粉向自花授粉的演变是植物进化研究中的一个焦点问题^[13]。尽管普遍存在近交或自交衰退，但近交或自交的优势在于繁殖保障。因此，由于各种原因（包括生境片段化）造成缺乏长距离传粉昆虫而限制异交时，缺乏营养繁

殖能力的一年生植物更趋向选择近交或自交为主的繁育系统以保证种子的产生和种群的更新^[14]。通过繁育系统检测,本课题组发现青叶胆自交、近交座果率和结籽率与自然授粉无显著差异,而与远交有显著差异($P<0.05$),这样的结果暗示座果率和结籽率低是青叶胆近交或自交衰退的表现之一。本研究从愈伤组织诱导、丛芽发生和试管苗生根方面对青叶胆自交、近交、远交和自然结实无菌种子苗的再生能力进行了比较研究,结果表明4种来源不同的种子在萌发率和幼苗生长势上无显著差异,离体器官在脱分化、再分化与不定根发生方面亦无显著差异。据此,初步推测青叶胆近交或自交的获益可以补偿与之相伴的适合度损失,其后代植株在生活力和再生能力方面不存在衰退表现。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (62卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1988.
- [2] 何仁远, 裴瑞麟. 青叶胆植物中的红白金内酯和青叶胆内脂的结构 [J]. 云南植物研究, 1980, 6(3): 325-328.
- [3] 吴征镒. 新华本草纲要 (第2册) [M]. 北京: 科学出版社, 1991.
- [4] 杜光明, 李国源. 青叶胆治疗急性病毒性肝炎422例疗效观察 [J]. 云南中医杂志, 1981(3): 35-37.
- [5] 程淑敏, 周干南. 青叶胆胶囊治疗急性肠炎120例报告 [J]. 中药材, 1990, 13(8): 37.
- [6] 杨永红, 杨林福, 范建, 等. 青叶胆可持续利用策略研究 [J]. 中国民族民间医药杂志, 2003, 61: 107-109.
- [7] Young A G, Brown A H D. Comparison population structure of the rare woodland shrub *Daviesia suaveolens* and its common congener *D. mimosoides* [J]. *Conserv Biol*, 1996, 10: 1220-1228.
- [8] Frankham R, Ballou J D, Briscoe D A. *Introduction to Conservation Genetics* [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 2002: 121-136.
- [9] 黄衡宇. 药用植物青叶胆的组织培养 [J]. 中草药, 2005, 36(2): 261-265.
- [10] 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.
- [11] 黄衡宇, 王美蓉. 紫背金盘愈伤组织诱导与再生体系的建立 [J]. 中草药, 2014, 45(9): 1313-1318.
- [12] 李鹏, 龙华, 高洁, 等. 珊瑚樱丛芽高效诱导体系及植株再生研究 [J]. 中草药, 2015, 46(9): 1360-1367.
- [13] Fausto J J A, Eckhart V M, Geber M A. Reproductive assurance and the evolutionary ecology of self-pollination in *Clarkia xartiana* (Onagraceae) [J]. *Am J Bot*, 2001, 88: 1794-1800.
- [14] Wyatt R. Ecology and evolution of self-pollination in *Arenaria uniflora* (Caryophyllaceae) [J]. *J Ecol*, 1986, 74: 403-418.