

短葶山麦冬茎尖培养快速繁殖技术研究

万学锋^{1,2,3}, 赖钟雄³, 陈菁瑛^{1,2}

(1. 福建省农业科学院农业生物资源研究所, 福建 福州 350003; 2. 福建省农业科学院药用植物研究中心, 福建 福州 350003; 3. 福建农林大学园艺植物生物工程研究所, 福建 福州 350002)

摘要:以短葶山麦冬茎尖为外植体, 通过对其采取不同消毒时间、茎尖诱导分化、壮苗与生根及移栽条件等快速繁殖条件进行研究。结果表明: 0.1% HgCl₂ 消毒时间为 12 min; 短葶山麦冬茎尖分化培养基 MS+BA 2.0 mg·L⁻¹ + NAA 0.2 mg·L⁻¹, 茎尖分化率高, 最高分化率达到 90%。丛生芽增殖培养基选择 MS+BA 4.0 mg·L⁻¹ + NAA 0.2 mg·L⁻¹ 为佳, 一定高浓度的 BA 对麦冬茎尖丛生芽分化起着促进作用。短葶山麦冬壮苗生根培养基选择 1/2MS+IBA 0.5 mg·L⁻¹ 时最佳, 生根系数达到 6.87, 泥炭土为最佳的移栽基质。

关键词: 短葶山麦冬; 茎尖培养; 快速繁殖

中图分类号: S 567.239

文献标识码: A

Micropropagation for *Liriope muscari* (Desne.) Bailey

WAN Xue-feng, LAI Zhong-xiong, CHEN Jing-ying

(1. Agricultural Bio-resources Institute of Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350003, China; 2. Medicinal Plant Research Center, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350003, China; 3. Institute of Horticultural Biotechnology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China)

Abstract: Shoot tips from *Liriope muscari* (Desne.) Bailey were used as explants to grow on media with varied sterilization time, under induced differentiation, as well as different strengthening and rooting treatments, and transplantation conditions. The shoot tips were cut from the plants and cultured on MS medium containing 2.0 mg·L⁻¹ BA and 0.2 mg·L⁻¹ NAA. The highest differentiating rate of 90% was achieved. The medium with 4.0 mg·L⁻¹ BA and 0.2 mg·L⁻¹ NAA was suitable for multiple-shoot proliferation. A certain concentrations of BA promoted the shoot differentiation. The optimized medium for seeding and rooting was when MS was mixed with 0.5 mg·L⁻¹ IBA, which improved the root coefficient to 6.87. Peat soil was found to be the best medium material for the transplantation.

Key words: *Liriope muscari* (Desne.) Bailey; shoot tip culture; micropropagation

短葶山麦冬 *Liriope muscari* (Desne.) Bailey, 又名福建麦冬, 为百合科山麦冬属植物, 是《中国药典》(1995 年版) 收录的麦冬类基源植物之一^[1], 已逐渐成为药材市场的麦冬主流品种^[2]。它以块根入药, 具有生津润肺, 养阴清热的功能, 用于治疗肺燥干咳、虚劳咳嗽、津伤口渴、心烦失眠、肠燥便秘等病症, 是一种常用大宗中药材。短葶山麦冬在福建泉州、莆田等地已有 60 多年种植历史, 当地药农一直采用无性分株繁殖, 容易导致种性退化和病毒积累, 影响麦冬药材的产量和质量, 为此开展短葶山麦冬种质提纯复壮及种苗快速繁殖研究具

有重要实践意义。有关麦冬组织培养的研究已见报道^[3-7], 主要研究了山麦冬属的湖北麦冬和沿阶草属的麦冬, 山麦冬属的短葶山麦冬的快速繁殖研究未见报道。本试验采用短葶山麦冬茎尖为外植体进行离体培养, 建立快速繁殖技术, 旨在提纯复壮并保存短葶山麦冬的种质, 以期提高产量和质量, 为中药材的优质高效生产提供支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验材料为短葶山麦冬 *Liriope muscari*

收稿日期: 2011-05-04 初稿; 2011-08-16 修改稿

作者简介: 万学锋 (1983-), 男, 硕士, 主要从事植物生物技术研究 (E-mail: wxfl25@163.com)

通讯作者: 陈菁瑛 (1966-), 女, 研究员, 从事药用植物资源与植物生物技术研究 (E-mail: cgy6601@163.com)

基金项目: 福建省科技平台建设项目 (2008Y2003); 国家“十一五”科技支撑计划 (2006BAI06A11-03)

(Desne.) Bailey, 取材于福建省莆田市仙游县短葶山麦冬生产基地。在连续晴天 3 d 以上中午时分取材, 剪去多余的叶片和根茎。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的表面消毒与接种 将采集短葶山麦冬剥离老叶和翘质膜, 留取 2~3 cm 长的茎尖, 晾干 1 h, 在超净工作台里试验采用不同的消毒剂 and 不同的消毒时间 (表 1), 20 d 后统计。

1.2.2 不同生长调节剂组合对短葶山麦冬茎尖诱导分化 将在空白培养基中没有污染的短葶山麦冬外植体, 转接到以 MS 为基本培养基的诱导分化培养基中, (25±1)℃培养 30 d 后统计。

1.2.3 不同 BA 浓度对短葶山麦冬增殖的影响 将初代培养中获得的丛生芽切下后转移至增殖培养基中, 增殖培养基中主要考察不同 BA 浓度对丛生芽继代与增殖的影响 (表 3)。

1.2.4 不同生长调节剂组合对短葶山麦冬试管苗壮苗及生根的影响 选择生长良好的分化麦冬试管苗转移到不同激素组合的壮苗生根培养基中, 30 d 后统计生根状况。

1.2.5 不同基质对短葶山麦冬试管苗成活的影响

选择生根良好的短葶山麦冬试管苗, 先在培养室开瓶炼苗 3 d, 移入室外 4 d 后, 清洗干净根中的培养基, 然后转入设计好的炼苗基质中。将经过出瓶处理的试管苗移入不同的基质中, 统计试管苗的成活率。

2 结果与分析

2.1 不同消毒组合对无菌苗建立的影响

为了确定短葶山麦冬茎尖无菌苗建立最佳的消毒方式和消毒时间, 设置了 8 种消毒组合。接种 20 d 后, 观察统计污染个数和受伤个数 (表 1)。采用 0.1% HgCl₂ 浸泡 6 min 污染率最高, 达到 70%, 而消毒时间达到 12 min, 污染率明显下降到 20%, 表明消毒时间过短不利于外植体表面灭菌。选用 NaClO 作为消毒剂时, 均表现出较高的污染率, 表明不适合茎尖初代培养物的建立。HgCl₂ 消毒后要多用无菌水冲洗几次, 避免有害离子 Hg²⁺ 的介入, 造成短葶山麦冬茎尖双重侵害。适当添加 1~2 滴吐温, 有利于表面消毒。

表 1 不同消毒组合对无菌苗建立的影响
Table 1 Effect of sterilization on explants

消毒组合	接种数 (个)	污染数 (个)	受伤数 (个)	污染率 (%)	存活率 (%)
0.1% HgCl ₂ 浸泡 6 min	40	28	1	70	27.5
0.1% HgCl ₂ 浸泡 10 min	40	12	2	30	65.0
0.1% HgCl ₂ 浸泡 12 min	40	8	4	20	70.0
0.1% HgCl ₂ 浸泡 2 min 后, 无菌水冲洗 3 次, 再用 0.1% HgCl ₂ 浸泡 8 min	40	18	1	45	52.5
0.1% HgCl ₂ 浸泡 5 min 后, 无菌水冲洗 3 次, 再用 0.1% HgCl ₂ 浸泡 5 min	40	24	1	60	37.5
0.1% HgCl ₂ 浸泡 8 min 后, 无菌水冲洗 3 次, 再用 0.1% HgCl ₂ 浸泡 2 min	40	16	2	40	55.0
10% NaClO 浸泡 10 min	40	26	0	65	35.0
10% NaClO 浸泡 20 min	40	24	0	60	40.0

注: 污染率=污染个数/接种总个数×100%; 存活率=(接种总个数-污染个数-受伤个数)/接种总个数×100%。

2.2 不同的生长调节剂组合对短葶山麦冬茎尖分化的影响

为了筛选更适合短葶山麦冬茎尖分化的生长调节剂, 设置 6-BA、IBA、KT 浓度为 0 mg·L⁻¹ 和 2.0 mg·L⁻¹, NAA 浓度分别为 0.2、0.5、1.0 mg·L⁻¹ 不同组合下的茎尖分化率, 每个组合接种 20 个, 30 d 后观察统计, 结果见表 2 和图 1、2。

采用 DPS v6.55 数据处理系统, 对样本进行单样本平均数检验, 结果表明, 均值差异显著性测验 $t=4.717\ 0$, 显著性水平 $P=0.000\ 6$, 差异极显

著。从表 2 中可以看出, 添加了 6-BA 的培养基, 其茎尖分化率明显高于未加 KT 和 IBA 的培养基, 其分化率分别达到 90%、80% 和 75%。而添加 KT、IBA 等其他生长调节剂的诱导分化率较低。可见 BA 适合于短葶山麦冬茎尖的诱导分化, 为下一步的增殖培养提供了依据。NAA 对短葶山麦冬茎尖分化的影响不很明显, 随着 NAA 浓度的增加, 茎尖分化出现微弱的下降。在诱导过程中, 有部分诱导出颗粒的团状物, 类似于原球茎结构。

2.3 外源激素 6-BA 对短葶山麦冬丛生芽增殖的影响

为了进一步探讨 6-BA 对茎尖增殖的影响,设计了表 3 的组合,每个组合接种 10 瓶,每瓶接种 5 个丛生芽,30d 后统计丛生芽的个数,统计增殖系数(图 3)。

表 2 不同的生长调节剂组合对短葶山麦冬茎尖分化的影响
Table 2 Effects of growth regulators on stem differentiation for *L. muscari* (Desne.) Bailey

编号	生长调节剂(mg · L ⁻¹)				接种数 (个)	分化数 (个)	分化率 (%)
	BA	IBA	KT	NAA			
1	2.0	0	0	0.2	20	18	90
2	0	2.0	0	0.2	20	4	20
3	0	0	2.0	0.2	20	3	15
4	2.0	2.0	0	0.2	20	16	80
5	2.0	0	2.0	0.2	20	15	75
6	0	2.0	2.0	0.2	20	5	25
7	2.0	0	0	0.5	20	14	70
8	2.0	0	0	1.0	20	10	50
9	0	2.0	0	0.5	20	4	20
10	0	2.0	0	1.0	20	3	15
11	0	0	2.0	0.5	20	4	20
12	0	0	2.0	1.0	20	2	10

注:分化率=分化个数/接种个数×100%

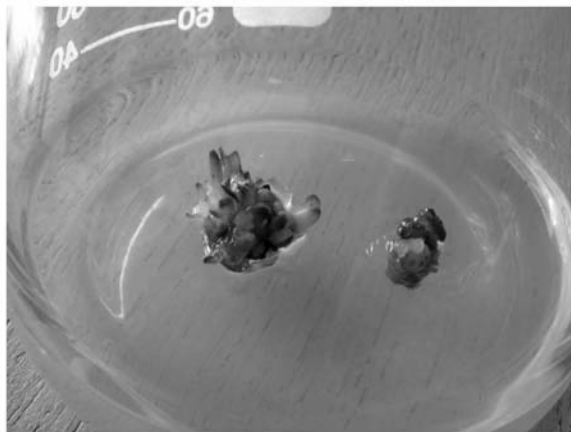


图 1 短葶山麦冬丛生芽诱导

Fig. 1 The stem induction for *Liriope muscari* (Desne.) Bailey

表 3 结果表明,6-BA 浓度在 0.5~5.0 mg·L⁻¹ 范围内,均能有较好诱导增殖,浓度低于 2.0 mg·L⁻¹时,增殖系数没有明显变化。随着 6-BA 浓度的提高,茎尖增殖系数随着增加,BA 浓度增至 4.0 mg·L⁻¹时,增殖系数最大,达 3.3。随着



图 2 短葶山麦冬丛生芽分化

Fig. 2 The stem differentiation for *Liriope muscari* (Desne.) Bailey



图 3 短葶山麦冬丛生芽增殖

Fig. 3 The stem propagation for *Liriope muscari* (Desne.) Bailey

BA 浓度继续增加,增殖系数有所下降。由此可见,一定范围高浓度的 6-BA 对短葶山麦冬茎尖丛生芽分化起着很重要的促进作用。

2.4 不同生长调节剂对短葶山麦冬诱导生根的影响

通过 DPS v6.55 数据处理系统,对样本进行单样本平均数检验,结果表明,均值差异显著性测验 $t=7.6229$,显著性水平 $P=0.0001$,差异极显著。短葶山麦冬生根率都是 100%。只添加 NAA 或 IBA 的情况下,生根率高于添加 6-BA 的培养基;0.1 mg·L⁻¹浓度的 IBA 对诱导试管苗生根作用不明显,IBA 浓度为 0.5 mg·L⁻¹和 1.0 mg·L⁻¹时能明显提高生根系数达 6.87。因此,短葶山麦冬试管苗生根培养选择 IBA 0.5 mg·L⁻¹,不添加 6-BA(图 4)。

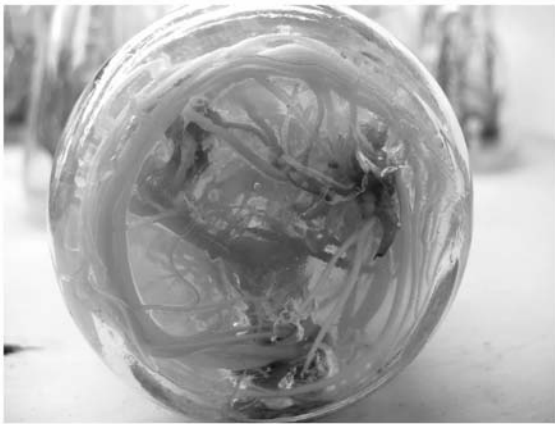


图 4 短葶山麦冬丛生芽生根

Fig. 4 The rooting of stem in *Liriope muscari* (Desne.) Bailey

表 3 BA 对短葶山麦冬丛生芽增殖系数的影响

Table 3 Effects of BA on shoot multiplication of *L. muscari* (Desne.) Bailey

编号	6-BA (mg · L ⁻¹)	接种时丛生芽数(个)	继代时丛生芽数(个)	增殖系数
1	0.5	50	94	1.88
2	1.0	50	110	2.20
3	2.0	50	104	2.08
4	3.0	50	115	2.30
5	4.0	50	165	3.30
6	5.0	50	125	2.50

注：增殖系数=继代时丛生芽个数/接种时丛生芽个数

表 4 不同生长调节剂组合对短葶山麦冬生根的影响

Table 4 Effect of hormone combinations on shoot rooting of *L. muscari* (Desne.) Bailey

编号	生长调节剂(mg · L ⁻¹)			接种数 (株)	生根数 (株)	生根率 (%)	生根数 (条)	生根系数
	NAA	IBA	6-BA					
1	0.1	0	0	48	48	100	288	6.00
2	0.5	0	0	45	45	100	161	3.58
3	1.0	0	0	65	65	100	268	4.12
4	0.1	0	0.1	56	56	100	270	4.82
5	0.5	0	0.1	40	40	100	133	3.33
6	1.0	0	0.1	51	51	100	122	2.39
7	0	0.1	0	65	65	100	120	2.15
8	0	0.5	0	83	83	100	570	6.87
9	0	1.0	0	43	43	100	269	6.26
10	0	0.1	0.1	77	77	100	94	1.22
11	0	0.5	0.1	80	80	100	189	2.36
12	0	1.0	0.1	60	60	100	241	4.02

注：生根系数=生根个数/接种个数

2.5 不同移栽基质对短葶山麦冬试管苗成活率的影响

选择生长健壮的试管苗置室外封瓶锻炼 7 d，洗净培养基，移入不同基质中。成活率统计结果(表 5)可以看出，添加泥炭土的基质利于试管苗移栽，成活率明显高于不含泥炭土的基质。移栽 7 d 左右，试管苗根系恢复生长能力，根尖生长旺盛；不含泥炭土的基质，其成活率很低，仅 10.0%~12.5%。可见含泥炭土的基质适于短葶山麦冬试管苗移栽(图 5)。

表 5 不同移栽基质对短葶山麦冬试管苗成活率的影响

Table 5 Effect of various media on surviving rate of *L. muscari*(Desne.) Bailey plantlets in test-tube

基 质	移栽数 (株)	成活个数 (株)	成活率 (%)
泥 炭 土	40	38	95.0
土：珍珠岩：沙=6：3：1	40	4	10.0
泥炭土：珍珠岩=6：4	40	36	90.0
田 园 土	40	3	12.5

注：成活率=成活株数/移栽株数×100%；泥炭土来源于花卉市场上专售的泥炭土。



图 5 短葶山麦冬丛生芽移栽

Fig. 5 The stem of *Liriope muscari* (Desne.) Bailey cultured in media

3 讨 论

3.1 无菌系的建立是快速繁殖的关键技术

组织培养中, 无菌苗的建立是后续培养的基础, 外植体的消毒成活率则是无菌培养体系建立的基础。本试验没有采取通常先用洗衣粉溶液浸泡或流水下冲洗的方法^[5-6], 而是采取 1 h 晾干后直接用无菌水洗茎尖, 再用 75% 乙醇消毒 30 s。因为短葶山麦冬茎尖包被于植株中, 用自来水冲洗可能会增加有害因素介入的机会, 反而不利于外植体的消毒。短葶山麦冬茎尖消毒效果以 HgCl_2 优于 NaClO , 消毒时间以 12 min 为佳, 能有效提高外植体的成活率达 70%。

3.2 茎尖诱导分化丛生芽

植物组织培养植物再生途径有体胚发生和器官发生两种, 具体通过哪种途径培养离体植株受外植体种类及培养基的影响。本研究在 MS 添加 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 和 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 培养基上诱导茎尖分化不定芽, 与林爱美等^[5]培养野生山麦冬嫩茎诱导次生芽再增殖所采用的培养基和培养途径一致, 与别运清等^[3]培养茎尖获得愈伤组织的培养基一致但培养途径则不同。研究过程中发现在初代培养物诱导初期出现了愈伤组织, 但 7 d 之后, 愈伤组织如果没有转移, 则在原培养基上很快分化转换成丛生芽, 也就是说在初代培养条件下, 短葶山麦冬丛生芽的发生居于主导地位。这种在同样培养基上却产生不同培养结果的原因是否与外植体大小有关, 有待进一步探讨。

3.3 生长调节剂对丛生芽增殖具有显著影响

一般情况下, 植物生长调节的种类、浓度及其

组合对芽的诱导和生长发育起着重要的作用。据 Flick 等统计 250 种植物器官发生再生植株中, 24% 的双子叶植物 (170 种中的 42 种)、17% 的单子叶植物 (62 种中的 11 种)、50% 的裸子植物 (18 种中的 9 种) 单独使用 6-BA 能够诱导无根苗的形成, 显然 6-BA 在不定芽诱导过程中起着重要的作用^[8,9]。本研究中结果也进一步验证了这个作用, 当 6-BA 浓度为 $4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 增殖系数最高, 可达 3.3。

影响短葶山麦冬丛生芽增殖的因素除了细胞分裂素 6-BA 的影响之外, 继代过程中, 及时转移继代也是一个影响丛生芽增殖的较大因素之一, 丛生芽的快速生长, 对有限的培养基提供的营养来说, 往往会跟不上丛生芽的增殖速度, 从而造成丛芽由于没有营养而萎缩甚至死亡。

3.4 炼苗成活率的影响

短葶山麦冬属于根系多的植物类型, 植株的生根有利于短葶山麦冬移栽炼苗成活, 增加其对外界环境的适应能力。选择保水能力强的泥炭土也是提高初步移栽成活的关键。大量水分的流失, 不利于短葶山麦冬试管苗的成活。

致谢: 浙江大学 2009 级博士研究生黄玉吉同学参与部分工作, 特此致谢。

参考文献:

- [1] 中国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典 [M]. 北京: 化学工业出版社, 1995, 19—131.
- [2] 龚旭, 龚江华. 对 2000 年《中国药典》所载中药稻芽、槲寄生、山麦冬的中文名称商榷 [J]. 基层中药杂志, 2002, 16 (1): 43.
- [3] 别运清, 丁芹. 湖北麦冬茎尖离体培养与植株再生研究 [J]. 河南农业科学, 2004, (9): 53—55.
- [4] 瞿宏杰, 别运清, 赵劲松, 等. 湖北麦冬脱毒苗的生长发育与产量效应研究 [J]. 湖北大学学报: 自然科学版, 2005, 27 (4): 389—391.
- [5] 林爱美, 程庆东. 山麦冬组织培养技术的研究 [J]. 中药材, 2004, 27 (12): 893—894.
- [6] 李勇慧, 化文平, 李向民. 山麦冬的组织培养与快速繁殖 [J]. 陕西农业科学, 2006, (5): 1—3.
- [7] 张治国, 赵立红, 刘骅, 等. 麦冬的组织培养 [J]. 浙江省医学科学院院报, 1988, 12 (40): 121.
- [8] 黄学林, 李筱菊. 高等植物组织离体培养的形态建成及其调控 [M]. 北京: 科学出版社, 1995.
- [9] 刘青林, 马伟, 郑玉梅. 花卉组织培养 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2003: 47.

(责任编辑: 柯文辉)