

山麦冬组织培养及无性系建立的研究

郑媛媛, 慈颖, 曲杨乐, 杨文新, 姜长阳
(辽宁师范大学生命科学学院, 辽宁大连 116029)

摘要: 研究了山麦冬嫩叶愈伤组织诱导和分化、不定芽的分化和生根、试管苗移栽和移植所需要的条件, 建立起山麦冬嫩叶的无性系技术。结果证明: $MS+6BA0.4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+NAA\ 1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+2,4-D\ 1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 是嫩叶愈伤组织诱导的理想培养基; $1/2MS+AgNO_3\ 1.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+BA0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+NAA0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 是诱导愈伤组织和不定芽分化的理想培养基; $1/2MS+IAA0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+NAA0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 是不定芽生根培养理想培养基; 移植的试管苗生长旺盛、根系发达, 其他生物性状保持不变。

关键词: 山麦冬; 愈伤组织; 无性系; 快速繁殖
中图分类号: S567.23⁺2 文献标识码: A 文章编号: 1002-2767(2009)05-0014-03

Establishment of Regeneration Clone and Rapid Propagation of *Liriope spicata*

ZHENG Yuan-yuan, CI Ying, QU Yang-le, YANG Wen-xin, JIANG Chang-Yang
(Life Science College of Liaoning Normal University, Dalian, Liaoning 116029)

Abstract: The conditions needed in callus induction, differentiation of axillary bud, cutting and transplantation *Liriope spicata* had been studied, its regenerative clone and rapid propagation line were established. The results showed that the best medium for callus induction was $MS+6BA0.4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+NAA\ 1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+2,4-D\ 1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. The best media for differentiation was $1/2MS+AgNO_3\ 1.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+BA0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+NAA0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $1/2MS+IAA0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+NAA0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ was suitable for rooting regeneration. With cinder used as seeding matrix. Field planting showed that the tube spout grew well with roots flourishing and kept all biological character.

Key words: *Liriope spicata*; callus; clone; rapid propagation

山麦冬(*Liriope spicata*)又叫紫穗麦冬、土麦冬、大麦冬、鱼子兰、麦门冬等, 属于百合科麦冬属多年生草本植物^[1], 生长于山坡、林下和草丛中^[2]; 在我国除了黑龙江、吉林、内蒙古、青海和西藏等地外, 其他各地均有分布^[3]。山麦冬的块根含甾体皂甙、β-谷甾醇、氨基酸和维生素等成分, 可供药用, 具有滋阴生津、润肺止咳、清心除烦等功效^[3-4], 能治热病伤津、心烦口渴、咽干肺热、咳嗽、肺结核等疾病; 近年来在辽宁南部地区也将其进行观赏栽培, 其观赏、绿化效果受到了人们的普遍欢迎。但是, 由于不论是野生的山麦冬, 还是栽培的山麦冬都只能形成很少的种子, 并且种子的发芽率低, 因此, 人工栽培难以通过种子繁殖的方法对其进行人工繁殖。于是, 有人试图挖取野生植株进行栽培。然而, 由于野生的山麦冬分布量很少(比如在大连地区只有长海县和凌水镇有少量分布), 采用挖取野生植株

的方法不仅不能满足人们的需要, 而且使分布本来就很少的野生资源又遭到了破坏。为了满足人工栽培对种苗的需要, 我们对山麦冬进行了组织培养及无性系建立的研究。虽然现在已有百合科麦冬属植物组织培养研究的报道^[5-11], 但迄今未见山麦冬嫩叶组织培养及无性系建立研究的报道。本研究以山麦冬的嫩叶为材料, 通过愈伤组织诱导的途径, 成功地建立起山麦冬的无性系。

1 材料与方法

1.1 材料及灭菌

于5~6月份将在林下生长非常旺盛的山麦冬嫩叶采回来, 用自来水洗涤冲净后, 置于0.001%的HgCl₂溶液中杀菌24 h, 然后放到250 mL的磨口广口瓶中, 用自来水冲洗30 min左右, 接着用0.05%安利洗涤液振荡洗涤20 min左右移至超净工作台上进行操作。将经上述处理的嫩叶用无菌水洗涤至无泡沫后加入70%~75%乙醇灭菌10 s左右, 迅速用无菌水洗涤2次, 再用0.05% HgCl₂溶液振荡灭菌10 min, 最后用无菌水洗涤6次, 即获得无菌材料。

收稿日期: 2009-03-20
第一作者简介: 郑媛媛(1990-), 女, 辽宁盘锦人, 学士, 从事植物组织培养研究。
通讯作者: 姜长阳(1953-), 男, 汉族, 辽宁大连人, 辽宁师范大学生命科学学院教授, 从事现代生物技术研究, E-mail: changyangjiang@126.com。

1.2 培养条件

以 MS、1/2MS、B₅、N₆、White 为基本培养基, 附加不同浓度的细胞分裂素和生长素。以 MS 为基本培养基时, 加蔗糖 30 g·L⁻¹; 以其他培养基为基本培养基时, 加蔗糖 15 g·L⁻¹。培养基胼力强度为 180 g·cm⁻²12], pH 为 5.8~6.0, 培养温度为 20~28℃, 光照 12 h·d⁻¹, 光照度 3 000 lx 左右。

2 结果与分析

2.1 不同培养基对愈伤组织诱导的影响

用解剖刀将无菌材料切成边长 0.2~0.4 cm 的嫩叶块, 接种到以 MS、1/2MS、B₅、N₆、White 5 种培养基为基本培养基, 附加 6-BA0.4 mg·L⁻¹+NAA 1.0 mg·L⁻¹+2,4-D 1.5 mg·L⁻¹的培养基上, 进行光照培养和暗培养。愈伤组织诱导试验进行了 3 次重复, 每次重复试验接种 200 个无菌嫩叶块。

观察表明, 接种后 10 d 左右, 在有的培养基上接种培养的休眠芽开始萌动生长。接种 50 d 时观察统计证明: 在光照培养的条件下, 培养材料难以生长形成愈伤组织; 在暗培养的条件下, 各种培养基都能不同程度地形成愈伤组织。其中以 MS 为基本培养基的培养材料不仅愈伤组织的诱导率最高(达到了 100%), 而且诱导的愈伤组织长势好。观察表明, 在这一培养基上最早形成的愈伤组织是从材料的切口开始生长的, 此时的愈伤组织为表面光滑无色半透明状, 随着培养时间的延长和愈伤组织的不断生长, 所培养的愈伤组织逐渐生长成为黄色的颗粒状。3 次重复试验的结果基本一致。上述试验说明, MS+6-BA0.4 mg·L⁻¹+NAA 1.0 mg·L⁻¹+2,4-D 1.5 mg·L⁻¹这一培养基是山麦冬嫩叶愈伤组织诱导的理想培养基。

2.2 不同浓度激素对愈伤组织分化培养的影响

将上述继代培养的愈伤组织用镊子分散成颗粒状后, 接种到附加不同浓度的 BA (0.0.5、1.0 mg·L⁻¹)、NAA (0.0.1 和 0.4 mg·L⁻¹)、IBA (0.0.1 和 0.4 mg·L⁻¹)和 2,4-D(0.0.1 和 0.4 mg·L⁻¹)的 1/2MS+AgNO₃ 1.2 mg·L⁻¹培养基上。每个处理接种 100 个愈伤组织颗粒。在光照条件下进行分化培养。60 d 时观察统计颗粒状愈伤组织的分化情况, 统计分化不定芽数量, 计算分化率。试验重复了 5 次。

由表 1 可见, 在不同浓度 BA、NAA、IBA 和 2,4-D 单独使用、不同浓度的 BA 与不同浓度的 IBA 和 2,4-D 配合使用的培养基上, 愈伤组织不能分化; 在不同浓度 BA 与不同浓度 NAA 配合使用的培养基上愈伤组织可以分化。从愈伤组织的分化率及分化不定芽的长势看, 在 BA 浓度为 0.5 mg·L⁻¹、NAA 浓度为 0.1 mg·L⁻¹的培养基上, 不仅培养的愈伤组织颗粒分化率达到了 96%, 平均每个愈伤组织颗粒的分化芽数达到 5.8 个,

并且分化不定芽长势好。观察表明, 在这一培养基上培养 10 d 左右, 愈伤组织颗粒开始分化, 随后, 伴随着分化不定芽数量的增加和已经分化不定芽的生长, 在 不定芽基部又会分化出数量不等的 不定芽。分化培养到 60 d 时, 分化的不定芽就会生长分化为绿色丛生状, 大部分不定芽的高在 0.5 cm 以上。把高 0.5 cm 以上的不定芽从基部剪下, 接种到相同的培养基上进行不定芽分化继代培养。每次重复试验分化继代培养 4 代。分化继代培养除了培养时间缩短为 50 d、每个不定芽一个培养周期平均可分化生长出 6.1 个不定芽外, 其继代培养分化生长不定芽的长势与愈伤组织颗粒诱导分化生长的不定芽基本一致。这说明 1/2MS+AgNO₃ 1.2 mg·L⁻¹+BA0.5 mg·L⁻¹+NAA0.1 mg·L⁻¹这一培养基是诱导山麦冬颗粒状愈伤组织和不定芽分化的理想培养基。

表 1 不同浓度激素对愈伤组织分化的影响

BA / mg·L ⁻¹	NAA / mg·L ⁻¹	IBA / mg·L ⁻¹	2,4-D / mg·L ⁻¹	分化数	分化率 / %	每块平均 分化芽数	分化苗 长势
0	0	0	0	0	0	0	-
0	0.1	0	0	0	0	0	-
0	0.4	0	0	0	0	0	-
0	0	0.1	0	0	0	0	-
0	0	0.4	0	0	0	0	-
0	0	0	0.1	0	0	0	-
0	0	0	0.4	0	0	0	-
0.5	0	0	0	0	0	0	-
0.5	0.1	0	0	96	96	5.8	++
0.5	0.4	0	0	79	79	3.5	++
0.5	0	0.1	0	0	0	0	-
0.5	0	0.4	0	0	0	0	-
0.5	0	0	0.1	0	0	0	-
0.5	0	0	0.4	0	0	0	-
1.0	0	0	0	0	0	0	-
1.0	0.1	0	0	65	55	3.9	+
1.0	0.4	0	0	33	33	2.4	+
1.0	0	0.1	0	0	0	0	-
1.0	0	0.4	0	0	0	0	-
1.0	0	0	0.1	0	0	0	-
1.0	0	0	0.4	0	0	0	-

注: - 为不生长; + 长势一般; ++ 长势好。

2.3 不同生长素对不定芽生根和生根继代培养的影响

将在 1/2MS+AgNO₃ 1.2 mg·L⁻¹+BA0.5 mg·L⁻¹+NAA0.1 mg·L⁻¹培养基上继代分化培养的不定芽从基部剪下, 接种到以 1/2MS+IAA0.2 mg·L⁻¹和 1/3MS+IAA0.2 mg·L⁻¹为基本培养基附加不同浓度 NAA 的生根培养基上进行生根培养, 生根培养进行了 4 次重复试验, 每种处理接种 100 个材料。

观察表明, 在有的生根培养基上, 接种后 10 d 左右

能形成可见根原基。接种后 30 d 观察统计。由表 2 可见,以 1/3MS+IAA0.2 mg·L⁻¹ 为基本培养基基本不能诱导不定芽生根,以 1/2MS+IAA0.2 mg·L⁻¹ 为基本培养基可诱导不定芽生根,并且在基本培养基中添加不同浓度 NAA 的生根效果好,尤其是在添加浓度为 0.1 mg·L⁻¹ 的 NAA 培养基上,不仅生根率为 97%、每株生根苗的平均生根数为 6.6 条,而且试管苗长势好。观察表明,在添加浓度为 0.1 mg·L⁻¹ 的 NAA 培养基上,接种后 10 d 大多数培养不定芽能形成可见根原基,随后,伴随着根系的不断生长,逐渐生长成为旺盛的试管苗。培养到 30 d 时,就会培养成为高 4~5 cm、具有 5~8 个叶片的旺盛试管苗。4 次重复生根重复试验结果基本一致。这说明 1/2MS+IAA0.2 mg·L⁻¹+NAA0.1 mg·L⁻¹ 这一培养基是山麦冬不定芽生根培养理想培养基。

表 2 不同生长素对生根的影响

基本培养基种类	NAA /mg·L ⁻¹	生根率 /%	平均根数 /条·株 ⁻¹	长势 /%
1/2MS+IAA0.2 mg·L ⁻¹	0	9	1.3	—
1/2MS+IAA0.2 mg·L ⁻¹	0.1	97	6.6	++
1/2MS+IAA0.2 mg·L ⁻¹	0.4	77	3.6	++
1/2MS+IAA0.2 mg·L ⁻¹	0.8	63	2.2	+
1/2MS+IAA0.2 mg·L ⁻¹	1.2	19	2.1	+
1/2MS+IAA0.2 mg·L ⁻¹	1.6	6	1.0	++
1/3MS+IAA0.2 mg·L ⁻¹	0	0	0	—
1/3MS+IAA0.2 mg·L ⁻¹	0.1	11	1.2	+
1/3MS+IAA0.2 mg·L ⁻¹	0.4	6	1.3	+
1/3MS+IAA0.2 mg·L ⁻¹	0.8	0	0	—
1/3MS+IAA0.2 mg·L ⁻¹	1.2	0	0	—
1/3MS+IAA0.2 mg·L ⁻¹	1.6	0	0	—

注:++为长势好, +为长势一般, -为不生长。

2.4 试管苗的移栽和移植

把培养着生根试管苗的培养瓶瓶塞打开,放到 5 000~6 000 lx 的温室光照下炼苗 4 d 后,用镊子将试管苗取出,在清水中将根部的培养基洗去,移栽到上面铺着一层 6~8 cm 厚颗粒炉灰渣的温室苗床上。移栽后的前 14 d 要保持没有直射光、温度 20℃以上、湿度 95%左右的环境条件,从第 15 天开始,按照温室内的正常环境进行管理。移栽试验进行了 4 次,移栽的株数分别为:300、300、400 和 600 株。移栽后 30 d 观察统计证明:移栽成活率为 95%,成活的试管苗生长旺盛。

把在温室中移栽成活的试管苗,于 5 月中上旬分 3 次移植到山坡林缘。观察统计证明:移植成活率近 100%;移植的试管苗翌年 7 月中旬开花,9 月中旬果实成熟;与野生植株相比,试管苗具有生长旺盛、整齐、根系发达的特点,其他生物学性状保持不变。

3 讨论

在过去的研究中以单子叶植物叶片为材料进行分化培养的报道很少,本研究以山麦冬的嫩叶为材料,通过诱导愈伤组织诱导建立起山麦冬的无性系。这个结果与杨乃博^[13]对沿阶草叶片愈伤组织的诱导和莫肖蓉等^[14]对金边麦冬叶片愈伤组织诱导的观察是一致的。这个结果还说明山麦冬嫩叶非分生组织细胞也具有全能性。

在 不定芽分化继代中,一个继代培养周期(50 d)平均能分化生长出 6.1 个不定芽。按照这个速度,一年能繁殖出 6.1^{7.3} 个不定芽,可培养出 30 多万株试管苗。这个繁殖速度不仅完全可满足观赏、药用生产对大量种苗的需要,而且也为了保护这种野生植物的种质提供了可能。

移植的试管苗出现了生长旺盛、整齐、根系发达的特点,与两个原因有关:一是本研究所用材料是选择生长非常旺盛的野生植株。材料的本身就具有生长旺盛的遗传性;二是在培养中使用多种生长素,生长素后效作用也促进了移植后的试管苗旺盛生长。

参考文献:

[1] 中国科学院植物志编辑委员会. 中国植物志(第 15 卷)[M]. 北京: 科学出版社, 1978: 128.

[2] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴(第五册)[M]. 北京: 科学出版社, 1978: 524.

[3] 李书心. 辽宁植物志(下册)[M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1991: 755.

[4] 韩全忠, 王正兴. 大连地区植物志(下册)[M]. 大连: 大连理工大学出版社, 1993: 964.

[5] 林美爱, 程庆东, 于志山. 等. 山麦冬组织培养技术研究[J]. 中药材, 2004, 27(12): 893-894.

[6] 何家涛, 赵劲松, 别云清. 等. 湖北麦冬离体培养技术研究[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(6): 938-939.

[7] 万学峰, 黄玉石, 陈青瑛. 等. 山麦冬研究进展[J]. 亚热带农业研究, 2008, 4(2): 97-100.

[8] 别云清, 丁芹, 瞿宏杰. 等. 麦冬组织培养与快速繁殖[J]. 农村经济与科技, 2001, 12(4): 23.

[9] 郑志仁, 娄玉霞, 钱宇. 等. 黑麦冬的组织培养[J]. 植物生理学通讯, 2008, 44(1): 119-120.

[10] 雷家容, 余今龙, 罗红蓉. 等. 麦冬的组织培养与快速繁殖技术研究[J]. 西南农业学报, 2005, 18(3): 368-369.

[11] 李勇慧, 化文平, 李向民. 山麦冬的组织培养和快速繁殖[J]. 陕西农业科学, 2006(5): 1-3.

[12] 姜长阳. 培养基琼脂用量的商榷[J]. 植物生理学通讯, 1990, 26(2): 54.

[13] 杨乃博. 沿阶草叶片愈伤组织的诱导及植株再生[J]. 植物生理学通讯, 1992, 28(5): 365.

[14] 莫肖蓉, 朱诚, 任晓米. 金边麦冬(Liriope platyphylla Wang et Tang var. variegata Hort.)的组织培养[J]. 植物资源与环境学报, 2000, 9(4): 27-29.