

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2014.06.025

付传明, 江海涛, 黄宁珍, 等. 桂黔吊石苣苔的组织培养与快速繁殖[J]. 广西植物, 2014, 34(6):874—878

Fu CM, Jiang HT, Huang NZ, et al. Tissue culture and rapid propagation of *Lysionotus aeschynanthoides*[J]. *Guihaia*, 2014, 34(6):874—878

桂黔吊石苣苔的组织培养与快速繁殖

付传明¹, 江海涛², 黄宁珍^{1*}, 唐凤鸾¹, 盘波¹, 洗康华¹, 赵志国¹

(1. 广西壮族自治区广西植物研究所, 广西桂林 541006; 2. 广西国有维都林场, 广西来宾 546100)

摘要: 以桂黔吊石苣苔的茎段和叶片为外植体材料, 对桂黔吊石苣苔进行离体培养与快速繁殖技术研究。结果表明: 桂黔吊石苣苔茎段腋芽可直接诱导萌发, 在 MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+IBA 0.1 mg·L⁻¹ 培养基上萌发率最高, 达 75%; 适宜的继代增殖及壮苗培养基为 1/2MS+NAA 0.2 mg·L⁻¹, 繁殖系数为 6.0/60 d, 继代培养中茎段外植体可以诱导出愈伤组织, 但诱导率较低, 未能进一步分化成苗; 最佳生根培养基为 1/2MS+6-BA 0.2 mg·L⁻¹+NAA 0.8 mg·L⁻¹+AC 0.1%+香蕉 5%, 生根率达 100%; 在大棚中模拟桂黔吊石苣苔自然生境对生根苗进行移栽, 成活率在 95% 以上。

关键词: 桂黔吊石苣苔; 组织培养; 快速繁殖

中图分类号: Q945.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2014)06-0874-05

Tissue culture and rapid propagation of *Lysionotus aeschynanthoides*

FU Chuan-Ming¹, JIANG Hai-Tao², HUANG Ning-Zhen^{1*},
TANG Feng-Luan¹, PAN Bo¹, XIAN Kang-Hua¹, ZHAO Zhi-Guo¹(1. *Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and the Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, China*; 2. *Guangxi Weidou Forest Centre, Laibin 546100, China*)

Abstract: Tissue culture and rapid propagation technique of *Lysionotus aeschynanthoides* were studied. The results showed that the axillary buds of *Lysionotus aeschynanthoides* could directly germinate in MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+IBA 0.1 mg·L⁻¹ and the germination rate was 75%. The primary culture medium for bud induction from stem segments was MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+IBA 0.1 mg·L⁻¹. The subculture medium for bud multiplication and seedlings growing was 1/2 MS+NAA 0.2 mg·L⁻¹, and proliferation coefficient was 6.0/60 d. Callus could be induced through the pedicels explants in subculture but could not develop further. The optimal rooting medium was 1/2 MS+BA 0.2 mg·L⁻¹+NAA 0.8 mg·L⁻¹+AC 0.1%+5% banana juice, and rooting rate was 100%. The rooting plantlets were transplanted in greenhouse that simulated the natural growing environment of *L. aeschynanthoides*, the survival rate was more than 95%.

Key words: *Lysionotus aeschynanthoides*; tissue culture; rapid propagation

桂黔吊石苣苔 (*Lysionotus aeschynanthoides*) 为苦苣苔科吊石苣苔属多年生小灌木或亚灌木植物, 茎高 1 m。分布于广西省西部(靖西、上林、河

池、田林)、云南省东南部(麻栗坡)和贵州省西南部(兴义)。生于海拔 600~1 200 m 的山地林中、灌丛中石上或溪边石上(李振宇等, 2004; 韦毅刚, 2010)。

收稿日期: 2013-10-14 修回日期: 2013-12-18

基金项目: 广西科技攻关项目(0992003B-31); 国家自然科学基金(31160055)。

作者简介: 付传明(1980-), 男, 湖北公安县人, 副研究员, 从事植物生物技术与保育研究, (E-mail)470196422@qq.com。

*通讯作者: 黄宁珍, 研究员, 从事植物生物技术与保育研究, (E-mail) huangnz@gxib.cn。

苦苣苔科植物含有黄酮类、苯乙醇类、醌类、萜类等多类化学活性物质,具有显著的抑菌、抗炎、抗病毒、止咳、祛痰、平喘及抗蛇毒等功效,多数种类为民间常用草药,是分离新的活性成分和寻求新型先导化合物的良好材料(郑晓珂等 2003)。桂黔吊石苣苔为吊石苣苔属植物,石吊兰素(nevadensin)是该属植物吊石苣苔(*L. pauciflorus*)中的主要成分之一,具有抗结核菌、止咳、祛痰、平喘、消炎、降压及清除自由基等作用(王绍云等,2007;冯卫生等,2007;盛卫国等,2009),是传统的中药。桂黔吊石苣苔、齿叶吊石苣苔(*L. serratus*)等同属植物常作为吊石苣苔的替代品入药。由于这些植物生境特殊,分布区域十分狭窄,加上目前仅有利用而无保育措施,资源已趋濒危(韦毅刚,2010)。因此,对该科植物进行组织培养与快速繁殖技术研究,获得大量的种苗和植物材料,是对该物种资源进行开发应用和保护的有效手段。

在我国 20 多种吊石苣苔属植物中,已进行组织培养研究的仅有两三种(刘伟等,2010;黄宁珍等,2010;Lu *et al.*,2006),桂黔吊石苣苔的组织培养和快速繁殖技术研究未见报道。因此,本研究以叶片和茎段为外植体,建立桂黔吊石苣苔组织培养及快速繁殖技术体系,为该物种的大规模繁殖、保护及可持续开发利用奠定实验和技术基础,同时也为同属其它物种的组织培养研究提供借鉴和参考。

1 材料与方 法

1.1 材料及外植体灭菌

供试材料桂黔吊石苣苔(*Lysionotus aeschynanthoides*)原生于广西大明山,引种于广西植物研究所华南苦苣苔科植物种质保存圃。实验以桂黔吊石苣苔茎段和叶片为外植体材料,用自来水将外植体材料清洗干净后,在超净工作台上用 70% 酒精浸泡 30~60 s,0.1% HgCl_2 消毒 3~5 min,无菌水漂洗 5 次,滤干表面水分后,将茎段剪成含 1 个腋芽、长 2 cm 左右的节段,叶片剪成大小 1 cm×1 cm 的小块。

1.2 初代诱导

将带有腋芽的茎段接入到初代培养基:(1)MS+6-BA 0.1 mg·L⁻¹+IBA 0.01 mg·L⁻¹;(2)MS+6-BA 0.5 mg·L⁻¹+IBA 0.05 mg·L⁻¹;(3)MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+IBA 0.1 mg·L⁻¹上。每种培养

基 30 管,每管接种一个外植体,定期进行观测,于培养 30~40 d 后,记录出芽率、愈伤诱导率及芽苗的生长情况,筛选出最佳初代诱导培养基。

1.3 继代增殖

将初代培养获得的无菌小芽切下,转接至不同的继代增殖培养基上,继代增殖培养基设定为 MS、6-BA(0.1、0.5、1.0、2.0 和 3.0) mg·L⁻¹ 和 IBA(0.01、0.05、0.1、0.2 和 0.3) mg·L⁻¹ 组合。每种培养基接种 10 瓶、每瓶 5 株,定期进行观测,培养 40~50 d 后,记录并统计芽苗高度、粗壮度、叶形态、愈伤诱导率及分化率、长根率、苗的繁殖系数(繁殖系数=1 株芽苗经过一次继代所获得的有效芽苗的数量)。最后根据繁殖系数和芽苗的粗壮度,筛选出最佳继代增殖培养基。

1.4 生根与移栽

当继代增殖的芽苗长出 2~3 片叶、高 2~4 cm 时,将芽苗剪下,转接在不同的生根培养基中,每种培养基接种 10 瓶、每瓶 3~4 株,每周观测 1 次。培养 50 d 后,统计苗高度、粗壮度、叶形态、愈伤产率、生根率、根的数量和形态。根据生根率和苗的粗壮度,筛选出壮苗和生根培养基。待植株生长健壮,根系发达后,参照桂黔吊石苣苔原生地的生态环境,在大棚中进行炼苗移栽,60 d 后统计成活率。

2 结果与分析

2.1 外植体的选择

桂黔吊石苣苔原生长在桂东南大山的沟谷中,喜荫蔽湿润的环境,引种栽培对气候条件要求较高。我们在对其他苦苣苔科植物进行组织培养时,通常以叶片或幼嫩茎段为外植体材料,本实验中,桂黔吊石苣苔叶片外植体在培养 2 周后,全部死亡;而以茎段为外植体,在初代培养基上,腋芽能逐渐萌发伸长,可继续用于下一步的培养。因此,选择茎段为外植体比较好。

2.2 初代培养

茎段外植体在不同初代培养基上的培养结果不同(表 1)。在 MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+IBA 0.1 mg·L⁻¹ 培养基上,培养 20 d 时腋芽开始萌动,40 d 时形成长 0.5~1.0 cm、具 2~3 片叶的芽苗,每个外植体形成 2.5 个芽,继续培养新长的叶片便从叶尖开始发黄,并逐渐凋落;在培养基 MS+6-BA 0.5 mg·L⁻¹+IBA 0.05 mg·L⁻¹ 和 MS+6-BA 0.1

表 1 不同培养基对桂黔吊石苣苔初代诱导的影响

Table 1 Effects of different media on primary buds inducing of *Lysionotus aeshynanthoides*

初代诱导培养基 (mg · L ⁻¹) Primary cultured medium	出芽所需的 培养时间 (d) Cultured time for budding	愈伤诱导率 (%) Callus induction rate	出芽率 (%) Budding rate	每块外植体出芽数 Induced bud number of each explant	培养情况 Cultivation situation
MS+6-BA 1.0+IBA 0.1	23	0	75	2.5	出芽快, 培养后期落叶 Budding quickly, but withering in later period of culture
MS+6-BA 0.5+IBA 0.05	45	0	34	2.0	腋芽萌动慢 Axillary bud sprouting slowly
MS+6-BA 0.1+IBA 0.01	52	0	27	2.0	腋芽萌动慢 Axillary bud sprouting slowly

mg · L⁻¹+IBA 0.01 mg · L⁻¹上, 培养 40 d 以上时才有部分腋芽开始萌动, 且生长较缓慢。多次优化试验发现, 桂黔吊石苣苔在培养基 MS+6-BA 1.0 mg · L⁻¹+IBA 0.1 mg · L⁻¹上培养 30 d 左右, 将新长出的芽苗及时转接到新的继代增殖培养基上, 可取得较好的培养效果。

2.3 继代增殖培养

桂黔吊石苣苔在不同培养基培养(表 2)结果表明, 当 6-BA 和 IBA 浓度分别为 0.1 和 0.01 mg · L⁻¹时, 形成丛生芽, 叶子中等偏小, 培养 60 d 时的繁殖系数约为 5.0, 总体生长情况相对最好; 当 6-BA 浓度大于 0.5 mg · L⁻¹时, 培养材料虽也形成丛生芽,

但繁殖系数小于 4.0, 叶退化变小, 而且退化程度随着 6-BA 浓度的增加而加重, 培养材料的整体生长较差。桂黔吊石苣苔离体茎段在不同培养基上的愈伤组织诱导率均较低, 且未见分化。此外, 我们还以 MS 为基本培养基, 分别以 KT (0.1、0.2、0.4、0.8 mg · L⁻¹) 和 ZT (0.1、0.2、0.4、0.8 mg · L⁻¹) 代替 6-BA 进行培养, 结果发现培养材料均不能正常生长。

2.4 壮苗与生根培养

壮苗和生根培养 60 d 时(表 3)结果发现, 植株明显长高, 叶子舒展变大、形态较好, 其中以 1/2 MS+NAA 0.2 mg · L⁻¹ 和 1/2MS+NAA 0.2 mg · L⁻¹+AC 0.1%+香蕉 5%培养基上的培养材料繁殖最

表 2 不同培养基对桂黔吊石苣苔继代增殖的影响

Table 2 Effects of different media on subculture proliferation of *Lysionotus aeshynanthoides*

继代增殖培养基 Subculture medium (mg · L ⁻¹)	丛生芽 Multiple bud	繁殖系数 Propagation coefficient	叶片情况 Leaf situation	愈伤诱导率 Callus induc- tion rate (%)	愈伤分化率 Callus differen- tiation rate (%)	生根率 Rooting rate (%)	总体情况 General observation
MS	不生长 No growing	1.0	落叶 Withering	0	0	0	极差 Very poor
MS+6-BA 0.1+IBA0.01	生长 Growing	5.0	中等偏小 Smaller than moderate	9.1	0	36.0	中等 Moderate
MS+6-BA 0.5+IBA 0.05	生长 Growing	4.0	叶小退化 Small and degenerating	20.3	0	0	差 Poor
MS+6-BA 1.0+IBA 0.1	生长 Growing	4.0	叶小退化 Small and degenerating	23.2	0	0	差 Poor
MS+6-BA 2.0+IBA 0.2	生长 Growing	3.7	叶小退化 Small and degenerating	30.1	0	0	差 Poor
MS+6-BA 3.0+IBA 0.3	生长 Growing	3.5	叶小退化 Small and degenerating	24.3	0	0	差 Poor

快, 培养 60 d 时繁殖系数为 6.0, 植株粗壮度中等, 可作为继代增殖和壮苗培养。在培养基 1/2 MS+NAA 0.8 mg · L⁻¹+AC 0.1%+香蕉 5%、1/2 MS+NAA 1.0 mg · L⁻¹+AC 0.1%+香蕉 5%、1/2 MS+IBA 1.0 mg · L⁻¹+AC 0.1%+香蕉 5%和 1/2MS+6-BA 0.2+NAA 0.8+AC 0.1%+香蕉 5%上, 植株生根率均达 100%, 植株高度和粗壮度较为

理想。综合比较, 选用 1/2MS+NAA 0.2 mg · L⁻¹ 为继代增殖和壮苗培养基、1/2MS+6-BA 0.2+NAA 0.8+AC 0.1%+香蕉 5%为生根培养基。

2.5 炼苗和移栽

当生根的试管苗长至 4~5 cm 高, 根系发达时, 打开瓶盖炼苗 2 d, 洗净根际培养基, 用 500 倍多菌灵溶液浸 1 min 后, 浅栽在下铺一层厚 3~4 cm 的

表 3 不同培养基对桂黔吊石苣苔壮苗与生根培养的影响
Table 3 Effects of different media on growing and rooting of *L. aeschynanthoides*

壮苗与生根培养基 (mg · L ⁻¹) Medium for strong seedling and rooting	繁殖系数 Propagation coefficient	株高 Plant height (cm)	粗壮度 Strong level	叶片形态 Leaf shape	生根率 Rooting rate (%)	根多少 How many roots	综合评价 Comprehensive assessment
1/2 MS+NAA 0.2	6.0	4.0	中等 Moderate	正常 Normal	50.0	少 Less	优 Excellent
1/2 MS+NAA 0.6	5.0	2.5	纤细 Slender	正常 Normal	70.0	少 Less	一般 Common
1/2 MS+NAA 0.2+AC 0.1%+香蕉 5%	6.0	4.0	中等 Moderate	正常 Normal	80.0	中等 Moderate	优 Excellent
1/2 MS+NAA 0.4+AC 0.1%+香蕉 5%	3.5	4.0	中等 Moderate	正常 Normal	100.0	多 Many	良 Fine
1/2 MS+NAA 0.6+AC 0.1%+香蕉 5%	4.5	4.0	中等 Moderate	正常 Normal	100.0	多 Many	良 Fine
1/2 MS+NAA 0.8+AC 0.1%+香蕉 5%	4.5	4.5	粗壮 Strong	正常 Normal	100.0	多 Many	优 Excellent
1/2 MS+NAA 1.0+AC 0.1%+香蕉 5%	4.5	4.0	粗壮 Strong	正常 Normal	100.0	多 Many	优 Excellent
1/2 MS+IBA0.2+AC 0.1%+香蕉 5%	3.5	3.0	中等 Moderate	正常 Normal	70.0	中等 Moderate	良 Fine
1/2 MS+IBA 0.4+AC 0.1%+香蕉 5%	3.5	4.0	中等 Moderate	正常 Normal	100.0	过多 Too many	良 Fine
1/2 MS+IBA 0.6+AC 0.1%+香蕉 5%	4.5	4.0	中等 Moderate	正常 Normal	100.0	多 Many	良 Fine
1/2 MS+IBA 0.8+AC 0.1%+香蕉 5%	3.5	4.5	粗壮 Strong	正常 Normal	100.0	过多 Too many	良 Fine
1/2 BMS+IBA 1.0+AC 0.1%+香蕉 5%	4.5	4.5	粗壮 Strong	正常 Normal	100.0	多 Many	优 Excellent
1/2 MS+6-BA 0.2+NAA 0.8+AC 0.1%+香蕉 5%	5.5	4.0	粗壮 Strong	正常 Normal	100.0	多 Many	优 Excellent

石灰岩碎石、上盖一层厚 2cm 的腐质土的苗床上, 根据天气情况定期浇水, 保持苗床湿度, 一年四季均可移栽, 移栽 60 d 后统计, 成活率在 95% 以上。

3 讨论

植物组织培养是植物种苗快速繁育的有效技术手段, 在继代增殖过程中增殖系数高低是决定种苗数量和整个技术能否成功产业化应用的关键。而植物生长调节剂特别是细胞分裂素的合理使用是继代增殖过程中有效提高种苗数量和质量的关键因素, 不同植物对细胞分裂素的需求和耐受能力不同。我们对桂黔吊石苣苔同属植物多齿吊石苣苔 (*L. denticulosus*) 进行组织培养时发现, 其继代增殖所用的细胞分裂素为 6-BA 1.0 mg · L⁻¹ (黄宁珍等, 2010)。对于同属另一植物吊石苣苔, 刘伟等 (2010) 所筛选出的最佳继代增殖培养基为 MS+6-BA 3.0 mg · L⁻¹+NAA 0.1 mg · L⁻¹; 与多齿吊石苣苔和吊石苣苔不同, 本研究中, 在继代增殖阶段, 桂黔吊石苣苔

更适合在不含细胞分裂素的培养基中生长, 当加入 0.5 mg · L⁻¹ 的 6-BA 时, 其叶子退化变小, 茎节缩短不能长高, 出现典型的玻璃化症状; 当 6-BA 浓度小于 0.5 mg · L⁻¹, 培养效果也不够理想; 用其它细胞分裂素代替 6-BA, 培养效果更差。只有将材料接种在不含细胞分裂素、只含生长素 (NAA) 的培养基中, 才获得比较理想的结果。可见, 不同的物种, 即使是亲缘关系比较接近的同属种, 其组织培养和快速繁殖技术都可能存在比较大的差异。

在开展广西地不容 (*Stephanie kwangsiensis*) (黄宁珍等, 2007)、续随子 (*Euphorbia lathyris*) (付传明等, 2012) 等的组培快繁研究中发现, 多次的继代培养会造成激素 (特别是细胞分裂素) 在培养材料中累积, 易导致培养材料的玻璃化和体细胞变异, 使得继代增殖培养效果不佳, 与本研究有相似之处。因此, 针对那些组培快繁中激素累积效应明显的物种, 须调整不同培养阶段的激素质量浓度, 可采取逐代降低甚至不添加激素的办法, 尽可能避免激素累积造成的负面影响, 获得理想的结果。本研究结果

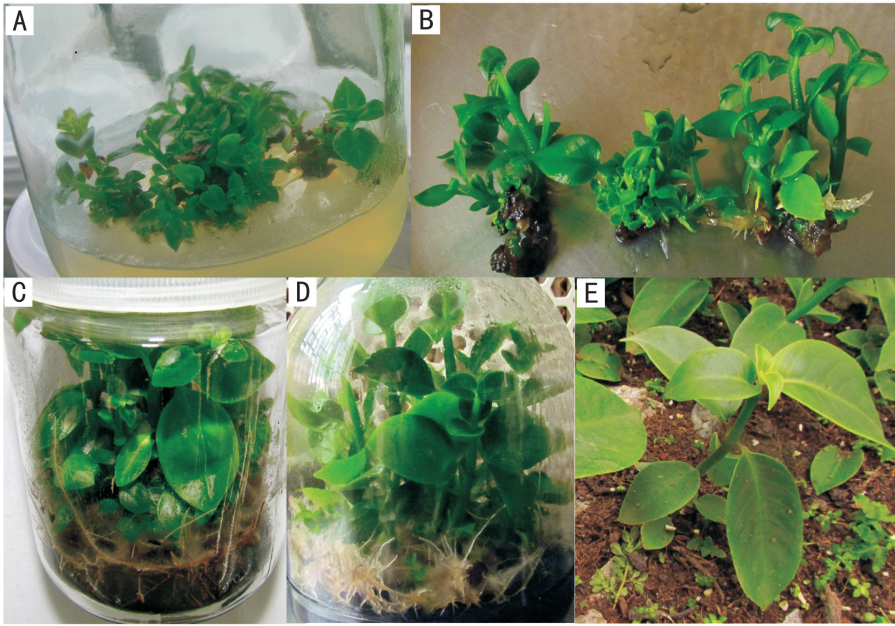


图 1 桂黔吊石苣苔组培快繁的主要过程 A. 继代; B. 丛生芽; C、D. 壮苗和生根; E. 移栽。

Fig. 1 Main process of tissue culture and rapid proliferation of *L. aeschynanthoides* A. Subculture; B. Cluster buds; C、D. Seedling growing and rooting; E. Transplanted plantlets.

可为桂黔吊石苣苔的保护和开发利用提供基础和技术支撑。

参考文献:

- Feng WS(冯卫生), Li Q(李倩), Zheng XK(郑晓珂). 2007. Studies on chemical constituents of *Lysionotus pauciflorus* (吊石苣苔的化学成分研究)[J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), **42**(5):337-338
- Fu CM(付传明), Jiang HT(江海涛), Huang NZ(黄宁珍), et al. 2012. Tissue culture and rapid propagation of *Euphorbia lathyris* L. (续随子的组织培养与快速繁殖)[J]. *Plant Physiol J* (植物生理学报), **48**(8):784-788
- Huang NZ(黄宁珍), Tang FL(唐凤鸾), Fu CM(付传明), et al. 2007. Tissue culture and rapid proliferation of *Stephania kwangsiensis* (广西地不容组培快繁研究)[J]. *Chin Trad & Herb Drug* (中草药), **38**(3):445-449
- Huang NZ(黄宁珍), Zhao ZG(赵志国), Shi YP(石云平), et al. 2010. Tissue culture and rapid propagation of *Lysionotus denticulosus* W. T. Wang (多齿吊石苣苔的组织培养与快速繁殖)[J]. *Plant Physiol Comm* (植物生理学通讯), **46**(9):965-966
- Liu W(刘伟), Huang Y(黄勇). 2010. Tissue culture and rapid Propagation of *Lysionotus pauciflorus* Maxim. (吊石苣苔的组织培养与快速繁殖)[J]. *Plant Physiol Comm* (植物生理学通讯), **46**(2):159-160
- Li ZY(李振宇), Wang YZ(王印政). 2004. Chinese Gesneriaceae Plant(中国苦苣苔科植物)[M]. Zhengzhou(郑州): Henan Science and Technology Press(河南科技出版社):384-385, 627-644
- Sheng WG(盛卫国), XY(熊阳), Xu LY(徐莲英). 2009. Determination of Nevadensin in *Lysionotus pauciflorus* Maxim. by RP-HPLC 高效液相色谱法测定石吊兰中石吊兰素的含量[J]. *Chin Trad Patent Med* (中成药), **31**(2):321-322
- Wang SY(王绍云), Tang WH(唐文华), Cao H(曹晖). 2007. Determination of Nevadensin in *Lysionotus pauciflorus* in various collecting periods(不同采收期吊石苣苔中石吊兰素含量的动态研究)[J]. *J Kaili Univ* (凯里学院学报), **25**(6):46-47
- Wei YG(韦毅刚). 2010. Gesneriaceae Plant in South China(华南苦苣苔科植物)[M]. Nanning(南宁): Guangxi Science and Technology Press(广西科学技术出版社):706
- Zheng XK(郑晓珂), Li J(李军), Feng WS(冯卫生), et al. 2003. Advances in study of Gesneriaceae(苦苣苔科植物研究进展)[J]. *Chin J New Drug* (中国新药杂志), **12**(4):261-263