

湖北双蝴蝶的组织培养研究

龙 华, 黄衡宇*

(湖南吉首大学生态研究所, 湖南吉首 416000)

摘 要: 以湖北双蝴蝶带芽茎段、不带芽茎段及叶片为外植体, 以 MS 为基本培养基, 通过添加不同的植物生长物质种类和浓度配比, 建立湖北双蝴蝶组培快繁体系。结果如下: 在所有实验方案中, 带芽茎段的出愈率最高, 是理想的离体快繁材料。较适宜的初代培养基为 MS+BA2.0 mg/L+蔗糖 3.0%, 增殖培养基为 MS+BA2.0 mg/L+NAA0.1 mg/L+蔗糖 3.0%, 而根的诱导则在 1/2MS+NAA0.5 mg/L+蔗糖 1.5% 的培养基上进行较为适宜。同时对组织培养过程中湖北双蝴蝶植株再生的方式进行了讨论。

关键词: 湖北双蝴蝶; 组织培养; 快速繁殖

中图分类号: Q943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2009)01-0078-05

Tissue culture of *Tripterospermum discoideum*

LONG Hua, HUANG Heng-Yu*

(Institute of Ecology, Jishou University, Jishou 416000, China)

Abstract: The tissue culture and rapid proliferation techniques of *Tripterospermum discoideum* were studied by using stems with buds, stems without buds and leaves as explants. The explants were cultivated in different MS media with different types and concentrations of plant growth regulators. The main results can be concluded as follows: the stems with buds were the best material in speeding propagation among the three explants. The shoot differentiation was MS+BA2.0 mg/L+ saccharose 3.0%, the optimum medium for proliferation was MS+BA2.0 mg/L+NAA0.1 mg/L+saccharose 3.0%, and best medium for rooting was 1/2MS+NAA0.5 mg/L+saccharose 1.5%. At the same time, the mode of plant regeneration of *T. discoideum* in tissue culture has been discussed.

Key words: *Tripterospermum discoideum*; tissue culture; rapid propagation

湖北双蝴蝶(*Tripterospermum discoideum*)为龙胆科(Gentianaceae)双蝴蝶属(*Tripterospermum*)多年生缠绕草本,主产湖北、陕西及湖南等省份,其中湖南西部是主要产地之一(何廷农等,1988)。在我国湖南、湖北、陕西及贵州等中、西部省份湖北双蝴蝶在民间被广泛用来治疗疔疮疖肿、乳腺炎、外伤出血及刀伤、骨折等(中国科学院植物研究所,1994;杨维霞等,2003)。近年来,由于湖北双蝴蝶的药用价值不断被发现,东部地区的一些药厂在其产地大量收购,导致采挖过度,加之其生境已受破坏,现野生居群已不多见。湖南省湘西地区不少单位(怀化师范学院及湘西保靖农科所等)曾尝试对湖北双蝴蝶进行人工引种栽培,但由于其种子自然萌发率低,同时缺乏有关该

种生活史、有性生殖及无性繁殖等方面的资料,往往以失败而告终。本试验旨在研究湖北双蝴蝶的组培快繁技术,以期利用组织培养方法在较短时间内获得大量的优质苗,满足工业化生产的需要。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试材料采自湖南湘西土家族苗族自治州古丈县高望界林场(110°04.402' E, 28°38.695' N, Alt: 792 m),采集的野生植株(凭证标本:龙华 189,存于吉首大学生物资源与环境科学学院标本室;标本鉴定人:云南大学生命科学学院马绍宾教授),带土移

收稿日期: 2007-08-20 修回日期: 2008-08-29

基金项目: 国家自然科学基金(30160073)[Supported by the National Natural Science Foundation of China(30160073)]

作者简介: 龙华(1972-),男,湖南凤凰人,硕士研究生,研究方向为植物生态学,(E-mail)jsulongh@163.com.

* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: hhyhy96@163.com)

栽于吉首大学生态研究所试验地,在其生长期(2005年9月)选取生长健壮、无病虫害个体,剪取带芽茎段、不带芽茎段及叶片作为外植体。

1.2 试验方法

晴天取3种不同的外植体,按下列程序进行消毒:取材→自来水粗洗→5%洗衣粉水溶液漂洗5 min→自来水冲洗30 min→70%乙醇擦洗表面→0.1%升汞溶液中消毒6 min→无菌水冲洗8~10次,在无菌工作台中将茎段切成0.5~1.0 cm长的小段,叶片切成大小0.5×0.5 cm²的小片,然后接种于初代培养基上,将培养出的侧芽及愈伤组织切成小段和小块,接种于增殖培养基上;最后将形成的不定芽转移至生根培养基上,培养出完整的小植株。

1.3 培养基

基本培养基为MS,附加不同浓度的2,4-D(2,4-二氯苯氧乙酸)、BA(6-苄基腺嘌呤)、和NAA(萘乙酸),其浓度组合见下文。蔗糖3%(生根培养基1.5%),卡拉胶0.7%,用0.1 mol/L NaOH和0.1 mol/L HCl调节pH值为5.8~6.0,高压灭菌锅中121℃灭菌20 min。

1.4 培养条件及统计方法

培养室温度控制在(22±1)℃,光照度27~36 μmol·m⁻²·s⁻¹,光照时间12 h/d。每隔10 d记录不同处理的生长状况。出愈率=产生增殖芽的外植体数/外植体总数×100%;不定芽的分化率=分化不定芽的外植体数/接种外植体总数×100%;根的分化率=分化不定根的材料数/接种材料总数×100%。

2 结果与分析

2.1 外植体及诱导培养基选择

将湖北双蝴蝶不同的外植体接种到附加不同浓度BA、NAA及2,4-D的诱导培养基上,培养结果有较大差异。不带芽茎段基本不产生增殖效应,但在其基部有少量的愈伤组织产生;而带芽茎段则基本不产生愈伤组织,但由于侧芽的生长而有较高的增殖系数;叶片培养出的愈伤组织最低,虽经改变多种植物生长物质组合来调节叶片愈伤组织的出愈率,仍只有少数植物生长物质组合诱导愈伤组织。不带芽茎段或叶片诱导出的愈伤组织量少质差,基本不能分化出不定芽。而带芽茎段由于侧芽的生长而有较高的增殖系数,这样看来,在湖北双蝴蝶的离体快繁中,带芽茎段是较适合的外植体材料。将湖北双

蝴蝶带芽茎段接种在含有不同植物生长物质及浓度的培养基上,45 d后均能诱导增殖芽,但增殖芽的诱导率和生长量却有较大差异(表1)。

表1 不同植物生长物质及浓度对带芽茎段培养的影响¹⁾
Table 1 Effect of different plant growth regulators and their concentrations on the culture of stems with buds

植物生长物质 Plant growth regulators	浓度 Concentration (mg/L)	培养数 No.	发生分化数 No. of differentiation	出愈率 Inductivity (%)	生长量 ²⁾ Growth amount
空白试验 CK	—	16	0	0	—
NAA	0.5	12	2	16.67	+
	1.0	17	4	23.53	+
	1.5	15	3	20.00	+
	2.0	16	0	0.00	—
2,4-D	0.1	13	4	30.78	+
	0.5	14	4	28.56	+
	1.0	13	2	15.38	+
	1.5	16	0	0	—
BA	0.5	12	7	58.33	+
	1.0	15	9	60.00	+
	1.5	18	15	83.33	++
	2.0	16	16	100.00	++
	3.0	14	10	71.43	+

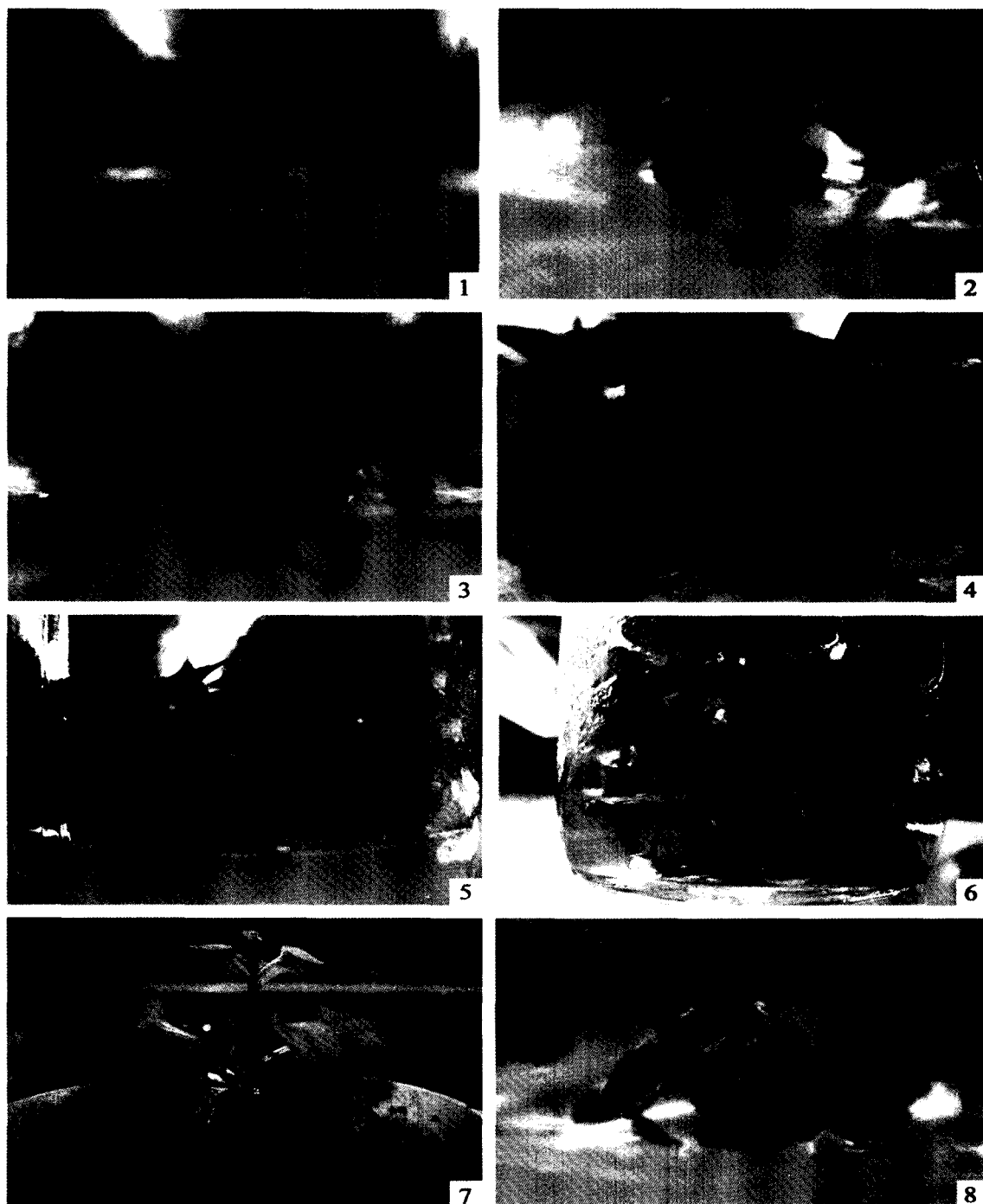
注: ¹⁾污染数除外; ²⁾— 无; + 生长量小,生长势不明显; ++ 生长量较大,生长势明显。下同。

Note: ¹⁾ Excepting the numbers of pollution; ²⁾ — Nonexistence; + A few and growth potential is not obvious; ++ Many and growth potential is obvious. The same below.

从表1可看出,在不添加任何植物生长物质的MS基本培养基上(空白对照),外植体(带芽茎段)培养45 d后基本没有变化,培养时间延长至60 d仍无生长迹象,以后逐渐死亡;在MS培养基中添加不同浓度NAA、2,4-D及BA培养后发现,附加NAA或2,4-D对诱导增殖芽的效果均不理想;而附加BA的培养效果则十分理想,其中浓度为2.0 mg/L效果最好,在此培养基上培养20 d后茎节部位即有大量芽点萌发(图版I:1),30 d后诱导出的不定芽(或称为增殖芽)生长量和生长势均较好(图版I:2),45 d后不定芽继续生长,叶片展开,显示出良好的生长势(图版I:3)。此外,在对湖北双蝴蝶带芽茎段诱导培养前期,发现有少量茎段逐渐变黄死亡,但不同培养基上的死亡数相差不大,说明培养基中植物生长物质浓度的差异对外植体死亡率的影响不大。

2.2 不定芽的增殖

待诱导培养基中的不定芽长至2~3 cm时,将其切下接种于不同植物生长物质配比的MS培养基上,置于(22±1)℃散射光下培养,30 d后统计不定



图版 I 1. 带芽茎段培养 20 d 后的情况; 2. 带芽茎段培养 30 d 后诱导出的增殖芽; 3. 培养 45 d 后, 增殖芽的生长情况; 4. 增殖培养中由单芽形成的多芽体; 5. 增殖培养 30 d 后的生长情况; 6. 生根苗的生长情况; 7. 过渡苗; 8. 由愈伤组织分化出的不定芽。

Plate I 1. The growth of stem with buds after 20 d; 2. The proliferous buds deriving from stem with buds after 30 d; 3. The growth of proliferous buds after 45 d; 4. The multibud deriving from single-bud in proliferative culture; 5. The growth of proliferative culture after 30 d; 6. The growth of rooting shoots; 7. The transition shoot; 8. The adventitious buds differentiated from calli.

芽及不定根的诱导率。

从表 2 可看出, 不同植物生长物质浓度配比对不定芽增殖的影响较大。在仅附加 BA 的增殖培养上, 不定芽的增殖系数低, 表明仅有 BA 对湖北双蝴蝶不定芽的增殖培养是不利的; 在 BA 和 NAA 各种浓度

组合中, 当 BA 浓度一定时, 不定芽的分化率随着 NAA 浓度的升高而降低, 当 NAA 浓度超过 0.5 mg/L 时, 不定根的分化就比较明显; 当 NAA 浓度较低时 (0.1 mg/L), 在一定范围内, 不定芽的分化率随着 BA 浓度的升高而升高, 但其浓度超过 2.0 mg/L 时, 反而

抑制了不定芽的分化与生长。对湖北双蝴蝶不定芽的增殖来说,较适宜的植物生长物质组合为 BA2.0 mg/L+NAA0.1 mg/L。将诱导培养基中诱导出的不定芽接种在此组合的培养基上培养,15 d 后即可形成多芽体(图版 I:4),30 d 后可以看见多芽体生长量和增殖率均较大,而几乎不产生不定根(图版 I:5),这时将多芽体切分成单芽后继续培养,可使试管苗在短期内快速增殖,从而获得大量的湖北双蝴蝶组培苗。

表 2 不同植物生长物质浓度对不定芽增殖的影响

Table 2 Effect of different concentrations of plant growth regulators on the adventitious bud proliferation

植物生长物质组合 (mg/L) Composition of plant growth regulators		不定芽的分化率 Differentiation rate of adventitious buds (%)	不定根的分化率 Differentiation rate of rooting (%)
BA	NAA		
2.0	0.0	66.6	0.0
	0.1	96.5	0.0
	0.5	81.6	5.4
	1.0	68.9	20.8
	2.0	20.3	20.6
0.5	0.1	50.6	10.5
1.0		70.8	4.7
2.0		95.6	0.0
3.0		60.3	0.0

2.3 生根培养和移栽

从表 3 看出,湖北双蝴蝶的生根培养较为容易,在不添加植物生长物质的 MS 或 1/2MS 培养基均可较好地诱导生根。通过本实验得出较适宜的生根培养基配方为 1/2MS+NAA0.5 mg/L+蔗糖 1.5%,生根率可达 95%以上,且生长量最大(图版 I:6)。

表 3 不同 NAA 浓度对根系分化的影响

Table 3 Effect of different NAA compositions on the differentiation of rooting

基本培养基 Basic medium	NAA 浓度 (mg/L) The concentration of NAA	培养数 Number	根系分化 Differentiation of rooting	出愈率 (%) Inductivity	生长量 Growth amount
MS	0	29	22	75.86	++
1/2MS	0	30	24	80.00	++
	0.1	28	25	89.29	++
	0.5	29	28	96.55	+++
	1.0	30	26	86.67	+++
	1.5	27	21	77.78	++
	2.0	28	18	64.29	+

注: +少量,生长缓慢; ++较多,生长迅速; +++大量,生长旺盛。
Note: + a few, slow growing; ++ many, rapid growing; +++ most, vigorous growing.

当多芽体培养数量足够时,将长到 2~4 cm 的

单芽从多芽体中切下转入生根培养基中。25~30 d 后,待苗壮根粗时,将瓶盖打开加入一定量的蒸馏水,置于自然光下,5 d 后取出生根苗,小心洗净残余培养基后移栽到经 0.1% 甲醛消毒的粗河沙中,保温保湿培养 25 d(温度 20~25 °C,湿度 70%左右),再移入沙土中培养,待小苗长出 6~7 片新叶(图版 I:7)便可移栽至大田。

3 讨论

对于任何植物的组培快繁来说,增殖率是一个主要的实验指标。一般说来,通过组织培养达到外植体增殖有 3 种方式,即通过愈伤组织形成不定芽、产生胚状体和促进腋芽萌发(谭文澄等,2001)。湖北双蝴蝶组培快繁中植株再生方式属第三种,在附加 BA2.0 mg/L 的 MS 培养基中,可使其带芽茎段休眠的侧芽生长,形成一微型的多枝多芽的小灌木丛状结构(多芽体),将单芽切割,可在短期内重复这一过程,这样可以不断产生出大量的小植株,这与桉叶唐棣(杜保国等,2005)等一些木本植物的组培快繁方式相同,而与白花假龙胆、川东獐牙菜及青叶胆(霍丽云等,2002;黄衡宇等,2002;黄衡宇,2005)等同科其他草本植物组培快繁方式有较大差异。

在不带芽茎段、带芽茎段及叶片 3 种供试外植体中,叶片的诱导能力最差。少数不带芽茎段外植体在诱导培养中能够产生少量质地紧密的愈伤组织,而无侧芽的萌发,这样的愈伤组织在进一步的增殖培养中能够产生不定芽(图版 I:8),但其发生频率较低且产生的不定芽数量较少,因此也不是理想的外植体材料。而带芽茎段外植体在大多数附加植物生长物质的培养基中均有侧芽萌发,是最适宜的外植体材料。根据植物细胞全能性,来自不同部位的外植体都应该具有植株再生能力,在本试验中,3 种供试外植体在附加外源植物生长物质为 NAA、2,4-D 及 BA 的培养基中,启动侧芽萌发、诱导愈伤组织的难易程度却不同,生长势也有明显差异,这与怀地黄、地黄等植物类似(吴美芬等,1986;李明军等,1996;王小菁等,2002;陈敏艳等,2004)。在对带芽茎段的启动培养中,单独使用生长素类物质诱导启动效果不明显,其中单独使用 NAA 或 2,4-D 的最佳诱导率仅有 23.53% 或 30.78%,但较低浓度的 2,4-D 能诱导部分外植体基部产生一定量的愈伤组织。单独使用细胞分裂素的效果最好,在一定范围

内(0.0~2.0 mg/L)外植体出愈率随着 BA 浓度的升高而升高,2.0 mg/L 时的出愈率达 100%。这表明在湖北双蝴蝶带芽茎段的启动培养中,细胞分裂素是不可缺少的。本试验也采用了同时附加不同浓度细胞分裂素和细胞生长素的培养基,但效果均不如单独使用细胞分裂素,推测与所采用的外植体材料含有较多的内源生长素而对外源生长素不敏感。

在增殖培养过程中,材料的内源生长素由于在启动培养时受到一定量的消耗,因而在增殖培养中需要补充一定量的外源生长素,故单独使用 BA 不如与 NAA 配合使用的效果好。通过试验得到较适合的植物生长物质浓度配比:BA 2.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L,在此组合中,生长量和增殖量均大,而几乎不产生不定根,这十分有利于增殖培养,这与丹参及活血丹快速繁殖中丛生芽的诱导十分相似(冯玲玲等,2004;陈光登等,2007)。

湖北双蝴蝶的生根培养较为容易,推测与其所含内源植物生长物质的种类与浓度有关。通过实验得出较适宜的生根培养基配方为 1/2MS+NAA 0.5 mg/L+蔗糖 1.5%。

由于培养时瓶苗长期处于高营养、高湿度等条件下,移栽后不能立即适应瓶外自然环境,因此成活率很低。在实验中发现,如果在炼苗前打开瓶盖并加入一薄层蒸馏水,1 d 后再移栽,成活率明显提高,放置 5 d 后,成活率能达 95%以上。

本研究中,由于其他因素的影响,导致培养基出现部分不凝现象。综合诸多因素,可能是凝固剂(卡拉胶)的质量问题,因此笔者在配制培养基时,适当加入少量的 KCl,以起到助凝作用。通过观察,并未发现添加 KCl 会对培养物的培养产生不良影响。

本研究为湖北双蝴蝶的无性繁殖提供了一种方法,可在短期内提供大量的试管苗,通过人工栽培扩大资源,确保湖北双蝴蝶资源的保持和可持续利用。

参考文献:

何廷农,刘尚武,吴庆如. 1988. 中国植物志(62卷)[M]. 北京:科学出版社,261—262

- 谭文澄,戴策刚. 2001. 观赏植物组织培养技术[M]. 北京:中国林业出版社,88—99
- 王小菁,李玲. 2002. 植物生长调节剂在植物组织培养中的应用[M]. 北京:化学工业出版社,47
- 中国科学院植物研究所. 1994. 中国高等植物图鉴(第3册)[M]. 北京:科学出版社,384
- Chen MY(陈敏艳),Liang ZS(梁宗锁),Wang ZZ(王喆之),*et al.* 2004. Tissue culture and plantlet regeneration of *Rehmannia glutinosa*(地黄组织培养及植株再生的研究)[J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*(西北植物学报),24(6):1 083—1 087
- Chen GD(陈光登),Li YX(黎云祥),Han SJ(韩素菊),*et al.* 2007. Studies on tissue culture and rapid propagation techniques of *Glechoma longituba*(活血丹组织培养与快速繁殖技术研究)[J]. *Guihaia*(广西植物),27(2):265—271
- Du BG(杜保国),Yang TX(杨途熙),Wei AZ(魏安智),*et al.* 2005. Tissue Culture of *Amelanchier alni folia*(桤叶唐棣组织培养研究)[J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*(西北植物学报),25(2):400—404
- Feng LL(冯玲玲),Guo SJ(郭胜娟),Zhou SY(周诗毅),*et al.* 2004. Research on propagative technique of *Salvia miltiorrhiza in vitro*(丹参离体微繁殖技术研究)[J]. *J Wuhan Bot Res*(武汉植物学研究),22(5):463—468
- Huo LY(霍丽云),Zheng XJ(郑晓建). 2002. Studies on tissue culture of *Gentianella albi flora*(高寒藏药白花假龙胆的组织培养研究)[J]. *Chin Pharm J*(中国药学杂志),37(6):415—418
- Huang HY(黄衡宇),Chen YG(陈义光). 2002. Tissue culture of medical plant *Swertia davidii*(药用植物川东獐芽菜的组织培养). [J]. *Guihaia*(广西植物),22(5):433—436
- Huang HY(黄衡宇). 2005. Tissue culture of medical plant *Swertia mileensis*(药用植物青叶胆的组织培养)[J]. *Chin Trad Herb Drugs*(中草药),36(2):261—265
- Li MJ(李明军),Zhang JB(张嘉宝),Liu P(刘萍). 1996. *In vitro* culture of *Rehmannia glutinosa* and formation and growth regulation of regenerated plantlet(怀地黄离体培养再生植株及其生长调控)[J]. *J Henan Normal Univ*(河南师范大学学报),24(4):60—63
- Wu MF(吴美芬),Chen WD(陈伟东). 1986. Tissue culture of tubers and stems of *Rehmannia glutinosa*(怀地黄块根、茎的组织培养及植株再生)[J]. *Plant Physiol Commun*(植物生理通讯),2(2):41
- Yang WX(杨维霞),Zhou L(周乐),Geng HL(耿会玲),*et al.* 2003. A survey of study of chemical components of medicinal plants of Gentianaceae(龙胆科药用植物化学成分的研究现状)[J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*(西北植物学报),23(12):2 235—2 240