

· 中药农业 ·

多花黄精组培苗快速繁殖体系建立研究[△]莫勇生¹, 卢拓方^{1*}, 邱展鸿², 张红岩¹, 孙文波¹

(1. 广西科学院生物研究所, 广西 南宁 530007; 2. 广西华泰生物科技有限公司, 广西 昭平 546800)

[摘要] 目的: 目前多花黄精种植种苗紧缺, 为了满足多花黄精大面积种植的种苗需求, 利用植物组织培养技术建立多花黄精组培苗规模化生产体系。方法: 以多花黄精成熟种子为启动材料进行组培快繁, 研究不同阶段, 各种因素对多花黄精组培生长的影响, 优选出最佳方案。结果: 多花黄精组培过程中, 启动、继代增殖、和生根壮苗阶段的最宜培养基分别为: MS + 6-BA 1.5 mg·L⁻¹ + NAA 0.2 mg·L⁻¹ + GA₃ 0.5 mg·L⁻¹; MS + 6-BA 2.0 mg·L⁻¹ + NAA 0.2 mg·L⁻¹; 1/2MS + IBA 1.0 mg·L⁻¹ + 0.1 NAA mg·L⁻¹。继代增殖系数 2.5, 植株生长健壮。

[关键词] 多花黄精; 无菌外植体; 组培快繁; 规模化生产

Study on the Tissue Culture and Rapid Propagation System of *Polygonatum cyrtoneura* HuaMO Yong-sheng¹, LU Tuo-fang¹, QIU Zhan-hong², ZHANG Hong-yan¹, SUN Wen-bo¹

(1. Institute of Biology of Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530007, China;

2. Guangxi Huatai Biological Technology Co., Ltd, Shaoping 546800, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a large-scale production system of *Polygonatum cyrtoneura* Hua seedlings by plant tissue culture. **Methods:** *Polygonatum cyrtoneura* mature seeds were used as explants for established the tissue culture system, and optimum medium including the type and proportion of plant hormone in tissue culture were screened at different culture stages. **Results:** The current study showed that the best culture mediums for inducing, proliferation, were MS basic medium plus 6-BA 1.5 mg·L⁻¹, NAA 0.2 mg·L⁻¹, GA 30.5 mg·L⁻¹, and 6-BA 2.0 mg·L⁻¹, NAA 0.2 mg·L⁻¹, respectively; rooting and seedling stage medium was 1/2 MS basic medium plus IBA 1.0 mg·L⁻¹, and 0.1 NAA mg·L⁻¹. The subculture proliferation coefficient was 2.5 and seedling growth healthy.

[Keywords] *Polygonatum cyrtoneura* Hua; explant; Tissue culture and rapid propagation; Large-scale production

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20171213004

多花黄精 *Polygonatum cyrtoneura* Hua 为百合科黄精属多年生草本植物, 野生资源主要分布于广西贺州境内昭平、八步县区, 根茎形状呈姜型。其生长环境多处于山坡背阴面小灌木丛中, 植株高约 30~40 cm, 叶片呈长弧形。

成熟后的多花黄精其干燥根茎入药。据传统医药经典记载, 黄精属于名贵中药, 具有宽中益气、益肾填精、滋阴润肺, 生津补脾之功效^[1-2]。对治疗心血管疾病、结核病、慢性肝炎以及在抗菌、解毒、抗疲劳、抗衰老、降血糖、

降血脂抗肿瘤等方面均有较好作用。黄精既可入药, 又可作为保健食品的原料。随着市场对黄精

药材需求量的增加和野生资源的急剧减少, 采集野生黄精不但不能满足市场需求, 反而可能破坏生态环境和多花黄精野生资源。由此人们逐渐开始对多花黄精的野生变家种栽培技术、高产栽培技术等加以实践。目前多花黄精的人工种植主要依靠根茎繁殖和种子繁殖, 但根茎繁殖方法繁殖系数低, 种根茎用量大, 既不经济, 又限制了多花黄精的产量潜力, 不便栽植管理推广。多花黄精种子繁殖的繁殖系数比较高, 但用时比较久, 一般种子繁殖移栽苗需要 3 年时间。因此说, 目前多花黄精种苗问题成为制约黄精人工大规模种植的瓶颈^[3]。利用植物组织培养技术建立起多花黄精组培苗规模化生产体系

[△] [基金项目] 广西科学院基金项目(15YJ22SWS18); 贺州市科技攻关项目(贺科攻 1707030)

* [通信作者] 卢拓方, 中级工程师, 研究方向: 植物组培及食用菌的研究; Tel: (0771) 3212553, E-mail: mys56342026@163.com

是生产优质多花黄精种苗有效的途径。

多花黄精为多年生植物,地下根茎常附着太多土壤微生物,若用根茎作为外植体进行组织培养,在消毒灭菌环节很难把控。本试验曾多次用根茎作为外植体,污染率高,很难获得无菌培养组织,所以最终采取用成熟种子来萌发获得无菌外植体材料。本研究对黄精的繁殖从种子到组培种苗过程进行研究,为多花黄精种苗规模化生产提供科学依据,以达到短期内生产出大量优质种苗的目标,可以应用到黄精的人工种植产业。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 黄精种子 多花黄精生长于贺州市昭平县广西华泰生物科技有限公司生产基地,种子植株花白色,花期 5~6 月,果期 8~10 月,地下根茎呈姜状。成熟的多花黄精种子采收于 2016 年 10 月,清洗并浸水 30 min 后用纱袋包裹放置于 26℃ 恒温干燥培养箱催芽待用。

1.1.2 培养基 MS 培养基为基本培养基^[3,4],建立多花黄精组织培养的三种培养基配方:

诱导培养基:

配方	培养基种类	激素浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$		
		6-BA	NAA	GA3
A1	MS	1.0	0.2	0.0
A2	MS	1.0	0.2	0.5
A3	MS	1.5	0.2	0.0
A4	MS	1.5	0.2	0.5
A5	MS	2.0	0.2	0.0
A6	MS	2.0	0.2	0.5

增殖培养基:

配方	培养基种类	激素浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	
		6-BA	NAA
B1	MS	0.5	0.2
B2	MS	1.0	0.2
B3	MS	1.5	0.2
B4	MS	2.0	0.2
B5	MS	2.5	0.2
B6	MS	3.0	0.2

生根培养基:

配方	培养基种类	激素浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	
		IBA	NAA
C1	1/2MS	0.2	0.02
C2	1/2MS	0.5	0.05
C3	1/2MS	0.8	0.08
C4	1/2MS	1.0	0.10
C5	1/2MS	1.2	0.12
C6	1/2MS	1.5	0.15

以上培养基均为添加蔗糖 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,琼脂粉 $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,PH 值为 5.8~6.0。

1.2 方法

黄精组织培养过程均在超净工作台内进行无菌操作。培养房环境温度为 $(26 \pm 2)^\circ\text{C}$,光照强度为 2000 Lx ,时间 $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

1.2.1 种子消毒与萌芽 将培养箱中催芽待用的种子,浸水去掉漂浮的种子用自来水漂洗三次。在超净工作台内进行消毒处理:将种子放入玻璃瓶内,用无菌水冲洗 3 次用 75% 酒精漂洗 30 s,倒掉酒精,用 0.13% 的氯化汞溶液表面灭菌 4~6 min 后,再用无菌水冲洗 4~5 次,取出种子用无菌纱布沥干。将种子接至诱导培养基上,每瓶接 3 颗种子,每个配方接 20 瓶,放在培养室培养。启动诱导前阶段(5~10 d),种子萌发形成小球茎,继续培养 5~10 d,小球茎组织形成生长点而萌发出芽,接种 25 d 后,观察各个配方的萌芽情况。

$$\text{萌芽率} = \frac{\text{萌芽数}}{\text{接种数}} \times 100\%$$

1.2.2 继代增殖培养 萌芽的小球茎继续培养,球茎基部继续膨大,长到 1 cm 左右大小时,将球茎切成 0.2~0.3 cm 的小块接种至继代增殖培养基中。每瓶只接入 5 个点,每个配方接种 20 瓶。放置培养房内培养 25 d,小球茎继续萌发出芽,观察和统计各自增殖情况,重复三次试验。

$$\text{增殖系数} = \frac{\text{萌发芽数}}{\text{接种芽数}}$$

1.2.3 生根壮苗 在继代增殖培养过程中,选取株型较好,植株粗壮的继代苗,接种于生根培养基中。每瓶接入 4 株苗,每个配方接种 20 瓶。放置培养室先暗培养 20 d 转光照培养 20 d,观察和统计各自生根情况。

$$\text{生根率} = \frac{\text{生根株数}}{\text{接种株数}} \times 100\%$$

1.2.4 室外炼苗移栽 生根培养 40 d 后, 搬出培养房, 放置自然环境 7 d, 选取有 3 条以上正常根系的生根苗, 清洗掉根系附着的培养基, 栽植于(沙子:泥炭土=1:1)的炼苗基质中, 每 10 d 喷施 1 次营养液, 30 d 后统计成活率。

$$\text{成活率} = \frac{\text{成活株数}}{\text{移栽株数}} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 无菌外植体的获得

种子处理接种培养第 10 d, 观察发现有的种子开始萌发芽(图 1), 25 d 后观察发现萌芽基部膨大分化成球茎(图 2)。



图 1 接种的种子



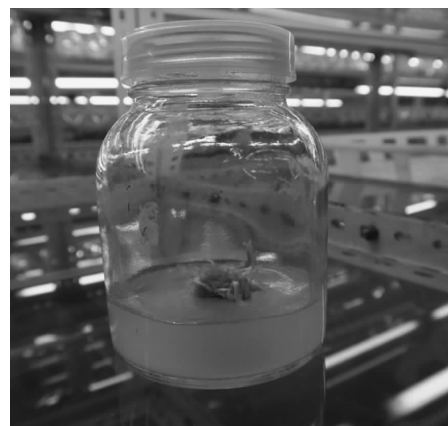
图 2 发芽的种子

试验过程中记录和统计数据得出表 1。由表 1 可以看出, 启动培养基配方当中, BA 浓度升高, 其萌芽率也随之提高。在试验过程中观察发现当 BA 浓度提高到 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (A5、A6) 浓度时, 其萌芽率虽然较高, 可是基部出现较多愈伤组织(图 3), 这可能是由于激素浓度过高造成的。因此启动培养诱导芽阶段 BA 浓度不宜超过 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在实验过程中还发现, 添加 GA_3 的 A2、A4、A6 配方均在培养

表 1 不同激素配方组合对诱导萌芽的影响

配方	接种数 (颗)	萌芽数 (颗)	萌芽率 (%)	初次萌芽/ d	停止记录 /d
A1	60	23	38	17	25
A2	60	24	40	11	25
A3	60	43	72	16	25
A4	60	44	73	10	25
A5	60	46	77	15	25
A6	60	47	78	10	25

10 d 左右就开始萌芽, 没有添加 GA_3 的 A1、A3、A5 均在 15 d 后才开始萌发, 结合试验统计数据还看出在相同 BA 浓度基础上, GA_3 对萌芽率影响不大, 但是对萌发速度有明显加快(10 d 左右萌发)。



注: 上: 形成愈伤组织; 下: 正常萌发

图 3 在培养基上萌发的种子

2.2 不同激素浓度对黄精的继代增殖影响

在继代增殖过程中, 主要考虑细胞分裂素(6-BA)对芽增殖影响, 生长素 NAA 固定浓度 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 配合使用。在启动获得无菌外植体成功后, 将带有萌芽的球茎切成 0.2 cm 左右大小接种于设计的 6 组继代增殖培养基中, 25 d 后均可以产生丛生芽以达到增殖目的(图 4)。



图 4 多花黄精继代苗

根据实验过程的观察和记录,此培养过程中做的三次重复试验,每次接种芽数均为 100 个,(三次试验新芽数 B1: 133、128、135; B2: 159、163、156; B3: 202、205、198; B4: 251、255、246; B5: 256、261、266; B6: 303、309、300;) 每组激素浓度配方的三次新芽数相差均在 ± 10 个以内,可以看出各组激素浓度对增殖影响的相对稳定性,由此综合统计得出表 2。

表 2 不同激素浓度对继代增殖的影响

配方	激素浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$		接种芽数 (个)	新芽数 (个)	增殖系数
	BA	NAA			
B1	0.5	0.2	300	396	1.3
B2	1.0	0.2	300	478	1.6
B3	1.5	0.2	300	605	2.0
B4	2.0	0.2	300	752	2.5
B5	2.5	0.2	300	783	2.6
B6	3.0	0.2	300	912	3.0

由表 2 可以看出,在黄精继代增殖过程中,6-BA 浓度相对提高,其增殖系数也相应提高,当浓度超过 2.0 时,表 2 中 B5 和 B6 配方增殖系数分别为 2.6 和 3.0,均比 B4(增殖系数为 2.5)高,但在继代过程中观察发现 B5 和 B6 组别继代苗长势弱小明显,不利于后面的生根壮苗培养,达不到优质种苗要求。

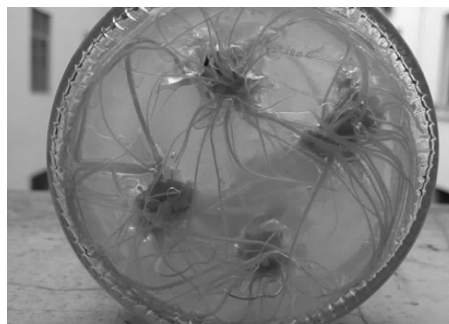
2.3 不同激素浓度对生根影响

在生根壮苗过程中,为更好促进壮苗生根,培养基采用 1/2MS,激素调节主要考虑生长素对生根的影响,IBA 和 NAA 均属于生长素,对生根有促进作用,本次试验中,设计 IBA/NAA 比值为 10:1 的 6 个不同梯度的生根壮苗配方(C1-C6)。接种培养 40 d,根据试验过程观察和记录数据,结果见表 3。

表 3 不同浓度激素对生根影响

配方	激素浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$		接种株数	生根株数	生根率 (%)	备注
	IBA	NAA				
C1	0.2	0.02	80	47	58.7	3~4 条根,根系好
C2	0.5	0.05	80	51	63.7	3~4 条根,根系好
C3	0.8	0.08	80	57	71.2	5~6 条根,根系好
C4	1.0	0.10	80	68	85.0	7~8 条根,根系好
C5	1.2	0.12	80	70	87.5	9~10 条根,根系弱
C6	1.5	0.15	80	70	87.5	10 条根以上,根系弱

由表 3 可以看出,IBA 浓度低于 1.0,生根状态良好,但是生根率较低。IBA 浓度在 1.0 时,其生根率和生根状态处于一个较佳状态(图 5),当超出 1.0 浓度时候,生根率虽然略有提高,但每株根数太多,根须细小(图 5),炼苗时候根须太多且过长不方便移栽,根须弱导致吸附营养能力不强,不利于提高室外炼苗的成活率。



注:上.正常生根苗;下.根须多细长

图 5 生根培养的组培苗

2.4 组培苗室外炼苗

在清洗好的生根苗(图 6),选取 3~8 条根一组移栽 100 株,9 条根以上一组移栽 100 株,移栽到炼苗杯中(沙子:泥炭土=1:1),每 10 d 喷施 1 次营养液,30 d 后生长稳定(图 6),通过观察和统计数据得出表 4。



注：上：生根苗；下：炼苗

图 6 黄精组培苗的炼苗移栽

表 4 根数对炼苗成活率对照表

根须数	移栽株数	成活株数	成活率
4~8	100	95	95
9 条以上	100	71	71

由表 4 看出，根数太多，不但在移栽过程中不方便操作，且其移栽成活率相对较低，为 2.3 中最佳生根配方选择提供了佐证。

3 结论

在利用多花黄精根茎进行离体组织培养过程中，其无菌体系建立存在困难，主要原因是地下根茎中微生物多，根茎本身也存在内生菌^[4]。因此，如何建立无菌培养体系是多花黄精快速繁殖系统首先要解决的难题。在研究中，成功的利用多花黄精种子

作为外植体，通过种子表面灭菌，在提供几种植物生长激素的情况下，建立了多花黄精的增殖诱导、快速扩增及生根培养和炼苗移栽体系。

在继代增殖和生根过程中，添加的外源激素浓度与多花黄精组培快繁之间存在一定的关系，选择合适的外源植物生长激素的配比是关键。这与许多植物组培相关文章中提到的激素浓度对植物组培生产影响相一致^[5-6]。本文试验中，得出多花黄精组培过程中，无菌培养诱导和继代增殖的最佳培养基分别为：MS 基本培养基附加 6-BA ($1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)，NAA ($0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)，GA₃ ($0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 MS 基本培养基附加 6-BA ($2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)，NAA ($0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)；生根壮苗阶段的最佳培养基为 1/2 MS 基本培养基附加 IBA ($1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)，NAA ($0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。多花黄精组培瓶苗不能直接下地移栽种植，必须先经过瓶外炼苗阶段，用炼苗基质进行装杯进行炼苗 30 d 后才可以大田种植，本文试验中炼苗成活率达 95% 以上。本试验结果直接应用于组培企业生产，可为规模化生产优质多花黄精种苗提供依据。

参考文献

- [1] 郑云峰,李松涛.黄精的应用与栽培[J].特种经济动植物,2002(5):25.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].北京:化工工业出版社.2005.1:232.
- [3] 周建金,罗晓峰,叶炜,等.多花黄精组织培养技术.三明农业科技.2012(3):124.
- [4] 万学锋,陈菁瑛.多花黄精组培技术初探.中国现代中药,2013,15(10):850.
- [5] 徐红梅,赵东利.植物生长调节剂对多花黄精芽体外发生过程中性状的影响[J].中草药,2003(9):855-858.
- [6] 徐忠传,何俊蓉,周静亚,等.6-BA 浓度对多花黄精不定芽增殖的影响[J].安徽农业大学学报,2006,33(1):105-107.

(收稿日期 2017-12-13)