

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201512029

李育川, 房海灵, 王定康, 等. 黑蒴定芽诱发增殖的初步研究 [J]. 广西植物, 2016, 36(12):1432-1438

LI YC, FANG HL, WANG DK, et al. Adventitious bud induction and multiplication of *Melasma arvense* [J]. Guihaia, 2016, 36(12):1432-1438

## 黑蒴定芽诱发增殖的初步研究

李育川<sup>1</sup>, 房海灵<sup>2</sup>, 王定康<sup>1</sup>, 向晓东<sup>3</sup>, 靳松<sup>1</sup>, 耿开友<sup>1\*</sup>

(1. 昆明学院, 昆明 650214; 2. 江苏省中国科学院植物研究所, 南京 210014; 3. 大理农林职业技术学院, 云南 大理 671003)

**摘要:** 黑蒴 (*Melasma arvense*) 为云南省民族民间珍稀药材, 现已成为云南天然药物开发的热点药材种类。但目前云南已濒临灭绝, 急需对其进行资源保护和人工繁育。该研究在筛选黑蒴不同器官培养的基础上, 以茎枝为外植体, 依次考察了不同基本培养基、不同种类细胞分裂素和质量浓度、不同天然有机添加物对定芽 (顶芽和侧芽) 萌发增殖及生长的影响。结果表明: 以黑蒴带节茎枝为外植体, 将其剪成 2~3 cm 带节嫩茎枝, 经严格的外植物体消毒程序处理后, 接种到  $1/2MS+6-BA 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{Pt} 50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + \text{Bn} 80 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + 25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  蔗糖+7 g · L<sup>-1</sup> 琼脂, pH 值 5.8 的培养基上, 接种后放置在光照强度 1 500~2 000 lx, 光照 10 h · d<sup>-1</sup>, 温度 22 °C 下培养, 接种后 8~10 d 开始萌发, 40 d 单茎平均增殖数达 8.1, 主茎 40 d 生长长度 74.2 mm, 显示出极好的诱发增殖生长效果。该研究结果初步建立了黑蒴嫩茎枝诱发定芽及增殖培养体系, 为云南珍稀民族药黑蒴的资源保护、人工栽培和可持续利用提供了科学依据。

**关键词:** 黑蒴, 定芽诱发, 组织培养, 基本培养基, 细胞分裂素, 天然有机添加物

**中图分类号:** Q943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2016)12-1432-07

## Adventitious bud induction and multiplication of *Melasma arvense*

LI Yu-Chuan<sup>1</sup>, FANG Hai-Ling<sup>2</sup>, WANG Ding-Kang<sup>1</sup>, XIANG Xiao-Dong<sup>3</sup>,  
JIN Song<sup>1</sup>, GENG Kai-You<sup>1\*</sup>

(1. Kunming University, kunming 650214, China; 2. Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China; 3. Dali Polytechnic College of Agriculture and Forestry, Dali 671003, Yunnan, China)

**Abstract:** *Melasma arvense* is known as one of the precious herbs in Yunnan Province, and has the effects on leukemia, cancer, dispersing blood stasis and hemolysis. It has become a hot spot for the development of natural drugs in Yunnan. At present, because of its peculiar habitat, seed dispersal difficulty, reproductive barriers, seed germination and establishment difficulty and over-harvesting, wild plants are becoming extinctive recent years in Yunnan Province. Therefore, in order to realize resource protection and restoration, it is necessary to carry out resource conservation and artificial breeding. In order to primary establish the adventitious bud induction and multiplication system that present excellent properties of growth and multiplication, used stem shoots as tissue culture inoculation materials studied the effects of different medium type, different concentrations of cytokinin and different natural organic additives on bud multiplication and growth based on the prophase research of provenance collection, artificial propagation and screening of different organ culture of *M. arvense*. The results indicated that about 2-3 cm long stem with buds cultured on cultural

收稿日期: 2015-12-29 修回日期: 2016-02-11

基金项目: 云南省高校优势特色重点学科建设项目(生态学); 昆明学院人才引进项目(YJL11027) [Supported by Key Disciplines Project of Yunnan Education Department (Ecology); Kunming University of Talent Introduction Project(YJL11027)].

作者简介: 李育川(1972-), 男(彝族), 云南永仁人, 教授, 博士, 主要从事药用植物资源利用与评价, (E-mail) lychuan72@163.com。

\*通讯作者: 耿开友, 副教授, 主要从事植物组织培养教学和研究, (E-mail) Lyc99326@126.com。

conditions(1/2 MS with 6-BA 0.5 mg · L<sup>-1</sup> + Pt 50 g · L<sup>-1</sup> + Bn 80 g · L<sup>-1</sup> + 25 g · L<sup>-1</sup> sugar + 7 g · L<sup>-1</sup> agar with pH = 5.8, a temperature of 22 °C, light 10 h · d<sup>-1</sup>) for 8–10 d, they produced numerous adventitious buds. Each explant produced 8.1 shoots and the grow length of main stem was 74.2 mm in 40 d. The experiment primarily established the adventitious bud induction and multiplication system that present excellent properties of growth and multiplication. This study provides a scientific basis for the artificial cultivation and sustainable use.

**Key words:** *Melasma arvense*, induction of adventitious bud, tissue culture, basic medium, cytokinin, natural organic additives

黑蒴 (*Melasma arvense*) 为玄参科黑蒴属植物的全草, 别名化血胆、红根草、小化血草等, 为名贵苗药“嘎扎”(丘华兴, 1996)。其性凉, 微苦, 具有祛湿, 平肝, 清热利湿; 散瘀活血等功效, 主要用于治疗白血病、心血管病、肿瘤、黄疸型肝炎、肝肿大、跌打伤瘀肿、痛经等(国家医药管理局中药草情报站, 1986; 中华本草编委会, 1999)。现代药理研究表明, 黑蒴具有泻下、抗肿瘤作用。从黑蒴根水溶性部分分离的桃叶珊瑚甙对小鼠有泻下作用, 服后 6 h 起效, 其 ED<sub>50</sub> 为 0.39 g · kg<sup>-1</sup>, 并能促进尿酸排泄(杨仁洲和周俊, 1981, 1987; 杨仁洲等, 1983); 从黑蒴根中提取得到的黑蒴甙有抗肿瘤作用, 200 mg · kg<sup>-1</sup> 腹腔注射, 对小鼠肉瘤白血病 L759 的抑制率为 59.38% (杨仁洲和周俊, 1981, 1987; 杨仁洲等, 1983; 苏成业等, 1995)。黑蒴主要分布于云南省南部地区, 为云南省苗族、彝族、拉祜族等民族民间珍稀名贵药材, 被誉为“云南最贵草药”(云南思茅地区革委会文卫组, 1971)。云南昆明多家肿瘤医院用其治疗早期白血病和各类肿瘤; 云南省红河州人民医院曾用于治疗妇女功能性子宫出血、更年期综合症、产后流血过多和腹部包块等症; 民族民间医生用其泡水、泡酒已达到降血压、降血脂、溶血栓、杀菌、防肿瘤等目的。

黑蒴是云南传统珍稀名贵药材, 2011 年项目组成员到文山西街、屏边、普洱、瑞丽等地的野生药材交易早市进行黑蒴民间用药、资源特点等调查和搜寻发现, 该植物属我省极小名贵珍稀物种, 具有可开发为治疗早期白血病、各类肿瘤和化血、溶血(死血、淤血、血栓)特效药的巨大潜力; 现濒临灭绝, 偶然见到单株卖价超过 200 元, 鲜品全草每公斤已超过 8 000 元, 目前处于极度珍稀、濒临灭绝; 产品属于有价无货的状态, 急需对其进行资源保护和人工规模化种植。目前除本人申请黑蒴组培、炼苗及种子引发的专利外, 国内外还未见到任何有关人工种植的相关报道(李育川等, 2012a, b, c)。本研究在

考察黑蒴不同器官为外植体, 开展接种诱发定芽(顶芽和侧芽)的基础上, 以嫩茎枝为接种材料, 系统研究黑蒴嫩茎枝诱发定芽的培养基配方, 初步建立起黑蒴茎枝诱发定芽增殖的方法。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

供试野生全株及种子于 2011 年采自云南河口县莲花滩, 经昆明学院李育川教授鉴定为黑蒴 (*Melasma arvense*) 的植株及种子。

### 1.2 培养基制备及灭菌

制备的培养基分别添加琼脂 6.5 g · L<sup>-1</sup> 和蔗糖 25 g · L<sup>-1</sup>, pH 5.8, 经 121 °C 高温灭菌 20 min, 培养温度为(22±2) °C, 光照强度为 2 000 lx, 光照时间为 10 h · d<sup>-1</sup>。

### 1.3 接种材料的预处理

将野外采集回来的带土全株, 移植到温室内培养, 移植成活后分别剪取根茎、叶片和休眠芽, 用毛笔在流水下轻轻刷洗干净, 再经饱和洗衣粉溶液清洗 3 次, 流水冲洗 2 h 后, 移至超净工作台上进行外植体的消毒处理。

将采集所得种子用滤纸包扎, 先放入水中浸泡 5 h, 然后转入 0.03% 的高锰酸钾溶液浸种 2 h, 流水冲洗 2 h 后, 移至超净工作台上进行外植体的消毒处理。

### 1.4 嫩茎枝的获得

将采集的黑蒴种子用纱布包好, 放入 0.03% 的高锰酸钾溶液浸种 2 h, 参照本人特殊种子引发处理后(李育川等, 2013), 用无菌水漂洗 2 次后, 拌细砂后播于经消毒后的基质中, 将播种后的花盆置于恒温光照培养箱中进行培养(培养温度 22 °C, 光照强度 2 000 lx, 光照时间 10 h · d<sup>-1</sup>), 定期查看水分情况和幼苗生长情况, 培养 9 个月后, 待幼苗长 3~4 cm 后苗剪取生长旺盛的嫩茎枝为接种材料备用。

### 1.5 外植体的消毒处理

将各种材料用饱和洗衣粉溶液清洗 3 次,剪除叶片,保留完整茎芽,再经饱和洗衣粉溶液清洗 3 次,流水冲洗 2 h。移至超净工作台,采取用 75%乙醇浸泡 5~8 s,快速取出后用无菌水清洗 2 次,再放入 2%次氯酸钠溶液(含数滴聚山梨酯-80)中浸泡 20 min,无菌水冲洗 4~5 次,吸干水分,接入待接培养基中培养观察。

### 1.6 嫩茎芽外植体直接诱发侧芽和顶芽

剪取黑蒴幼苗生长旺盛的嫩茎枝,将其进行严格的清洗和一系列外植体消毒处理后,将其剪成带 1~2 个节的带芽茎段进行接种培养。每处理接种 10 瓶,每瓶接种 3 个 2~3 cm 带 2 个节的带芽茎段,每处理接种 30 个外植体,均重复 3 次。外植体接种后,观察定芽诱导情况(萌芽时间,生长情况),接种 3 个月后将接种茎段从培养瓶中取出,洗净培养基后,统计萌芽数(芽长 0.5 cm 以下不计入)并测量芽的长度。

### 1.7 数据统计

所得数据用 Excel 和方差分析软件处理。萌芽数=接种后成活的外植体出平均诱导出芽的数量(芽长 0.5 cm 以下不计入);芽萌发率=萌发芽的外植体总数/接种成活的外植体总数;40 d 单茎平均增殖数=40 d 形成的定芽总数/接种的成活外植体总数。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同接种器官对定芽(顶芽和侧芽)诱发

分别采用黑蒴的叶片、休眠芽、根、带节嫩茎枝、果实未开裂的成熟种子、未成熟种子为外植体。各种外植体采取用 75%乙醇浸泡 5~8 s,快速取出后先用无菌水清洗 2 次,再放入 2%次氯酸钠溶液中浸泡 8~20 min,取出后用无菌水清洗 3 次,然后接种于 MS+6-BA 1.0 mg · L<sup>-1</sup>+ Pt 130 g · L<sup>-1</sup>+25 g · L<sup>-1</sup>蔗糖+6 g · L<sup>-1</sup>琼脂,pH 值 5.8 的培养基上;每处理接种 10 瓶,叶、芽、根和茎枝每瓶接种 3 个,种子每瓶按 100 粒;接种后的材料在光照强度 1 500~2 000 lx、光照 8 h · d<sup>-1</sup>、温度 22 °C 下培养,观察比较各处理的芽萌发时间,40 d 时取出萌发芽头,测量萌发情况和主芽长度。

各接种材料经严格的外植体消毒程序处理后进行接种,培养 10 d 以后,陆续可见到接种材料萌发

或逐渐死亡。其中,嫩茎枝培养 10 d 后切口基部开始膨大形成少量红黄色愈伤组织,芽开始萌发并分枝和生长;休眠芽则未形成愈伤组织,接种材料基本没变化,30 d 后芽(顶芽和侧芽)开始萌动生长,但生长非常缓慢,芽稍变褐逐渐坏死;无菌播种的种子污染率极高,开裂成熟的种子接种成功率极低,接种 20 d 以后陆续开始萌发,但只能见到 2 片黄绿色的小子叶,小子叶出现后基本不生长,也不会长根,40 d 以后逐渐死亡;肉质根接种 20 d 后前期出现少量红黄色愈伤组织,后期愈伤组织变褐死亡;叶片和未成熟种子接种后,未见萌发和愈伤组织生长,材料 20 d 以后逐渐坏死,未能诱导成功。

由表 1 可知,处理 4 以黑蒴嫩茎芽作为外植体培养效果最好,表现为萌发时间最短,萌发数量最多,萌发率达 87.56%;40 d 萌发的主芽长达 20.4 mm;休眠芽和成熟种子虽然能萌发,但表现为萌发速度较慢、萌发率较低、萌发后芽的生长速度较慢,芽稍逐渐变褐后坏死亡;叶片、根和未成熟种子均未萌发;各处理有显著差异。这表明黑蒴嫩茎枝可作为外植体接种的理想材料。

表 1 不同器官培养对定芽诱发的影响

Table 1 Influence of different organ cultures on adventitious bud induction

处理组 Treatment group	外植体 Explant	定芽萌发 时间 Bud germination time (d)	定芽 萌发率 Bud germination rate (%)	主茎生长 长度 Growing length of main stem (mm · 40 d <sup>-1</sup> )
1	叶片 Blade	死亡	0.0c	0.0d
2	休眠芽 Dormant bud	31 ± 2	14.34%b	1.4b
3	根 Root	死亡	0.0c	0.0d
4	嫩茎枝 Young shoots	10 ± 2	87.56%a	20.4a
5	成熟种子 Mature seed	20 ± 3	0.02%c	0.2c
6	未成熟种子 Immature seed	死亡	0.0c	0.0d

注:小写字母表示处理间在 0.05 水平上差异显著。下同。

Note: Lowercase letters mean significant differences at 0.05 level among treatments. The same below.

### 2.2 基本培养基对定芽的诱发增殖

以黑蒴 2~3 cm 带 2 个节嫩茎枝为外植体,经严格的处植物体消毒程序后接种,选择不同基本培

培养基 (MS、1/2MS、B5) 和不同 6-BA 质量浓度 ( $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 组合培养基进行培养。在各处理中都添加相同的 Pt  $130 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + 25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  蔗糖 +  $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  琼脂, 培养基 pH 值为 5.8; 每处理接种 10 瓶, 每瓶接种 3 个 2~3 cm 带芽嫩茎枝, 每处理接种 30 个外植体, 均重复 3 次。接种后的材料在光照强度  $1\,500 \sim 2\,000 \text{ lx}$ , 光照  $10 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ , 温度  $22 \text{ }^\circ\text{C}$  下培养, 观察比较各处理的萌发时间, 40 d 时取出丛生芽, 测量萌发情况和主茎长度。

由表 2 可见, 各处理差异显著; 处理 3 结果最佳, 表现为接种后 7 d 后开始萌发, 同时萌发后的茎枝节上

腋芽开始萌动侧枝, 40 d 单茎平均增殖数为 4.2 个, 接种 40 d 后主枝平均长达 36.5 mm, 诱发和增殖生长明显; 其次为处理 1 和处理 5, 虽然能萌发, 但与处理 3 相比, 其 40 d 单茎增殖数和主茎生长长度显著低于处理 3, 表现为萌发时间延迟, 同时萌发芽数量较少, 新芽生长速度慢, 增殖不明显; 处理 4 表现为前期快速萌发, 芽分化数量爆发, 芽生长缓慢不能生长成有效芽, 后期萌芽稍逐渐变褐并枯死; 处理 2 和处理 6 则未能萌发, 接种后的茎枝叶逐渐萎缩卷曲脱落, 芽稍变褐枯死。研究结果表明 1/2MS 可作为黑蒴嫩茎枝诱发增殖定芽培养较理想的基本培养基。

表 2 不同基本培养基对定芽诱发的影响

Table 2 Influence of different basic media on adventitious bud induction

处理组 Treatment	基本培养 Basic medium	6-BA 浓度 6-BA Concentration ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	接种数	芽萌发时间 Bud germination time (d)	40 d 单茎平均增殖数 Each explant produced	主茎生长长度 Grow length of main stem ( $\text{mm} \cdot 40 \text{ d}^{-1}$ )
1	MS	1.0	28	$10 \pm 2$	2.8b	8.4b
2	MS	2.0	26	未萌发 Not germinated	0.0d	0.0e
3	1/2MS	1.0	27	$10 \pm 3$	4.2a	36.5a
4	1/2MS	2.0	28	$7 \pm 4$	1.3c	1.4d
5	B5	1.0	26	$14 \pm 2$	2.3b	6.2c
6	B5	2.0	28	未萌发 Not germinated	0.0d	0.0e

表 3 不同细胞分裂素对定芽增殖的影响

Table 3 Influence of different kinds of cytokinin on cluster shoot multiplication

处理组 Treatment	细胞分裂素种类 Kind of cytokinin	浓度 Concentration ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	芽萌发时间 Bud germination time (d)	40 d 单茎平均增殖数 Each explant produced	主茎生长长度 Growing length of main stem ( $\text{mm} \cdot 40 \text{ d}^{-1}$ )
1	6-BA	0.5	$10 \pm 2$	6.3a	68.2a
2	6-BA	1.0	$10 \pm 2$	4.5b	36.6b
3	6-BA	1.5	$11 \pm 2$	1.7d	12.3c
4	KT	0.5	$13 \pm 2$	4.4b	30.4b
5	KT	1.0	$14 \pm 2$	2.3c	14.2c
6	KT	1.5	$20 \pm 2$	1.9d	4.5d
7	ZT	0.5	$12 \pm 2$	3.8b	34.3b
8	ZT	1.0	$13 \pm 2$	2.6c	15.2c
9	ZT	1.5	$14 \pm 2$	1.4d	4.6d

### 2.3 定芽增殖

以黑蒴 2~3 cm 带节嫩茎枝为外植体, 经严格的处植物体消毒程序后接种, 以 1/2MS 为基本培养

基, 选择 3 种不同的细胞分裂素种类 (6-BA、KT、ZT), 3 种不同浓度 ( $1.5$ 、 $1.0$ 、 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 进行培养。在各处理中, 都添加相同的 Pt  $130 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + 25$

表 4 不同天然有机添加物对定芽诱发增殖的影响

Table 4 Influence of different natural organic additives on cluster shoot multiplication

处理组 Treatment	天然有机物种类 Kind of natural organic additives	添加量 Addition amount ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	芽萌发时间 Bud germination time (d)	40 d 单茎平均增殖数 Each explant produced	主茎生长长度 Grow length of main stem ( $\text{mm} \cdot 40 \text{d}^{-1}$ )
1	椰子 Coconut	130	9±3	8.3a	75.0a
2	香蕉 Banana	130	11±3	6.3b	66.4b
3	马铃薯 Potato	130	12±3	4.0c	50.3c
4	香蕉+马铃薯 Banana and potato	80+50	10±2	8.1a	74.2a
5	苹果 Apple	130	13±2	2.6d	37.5d

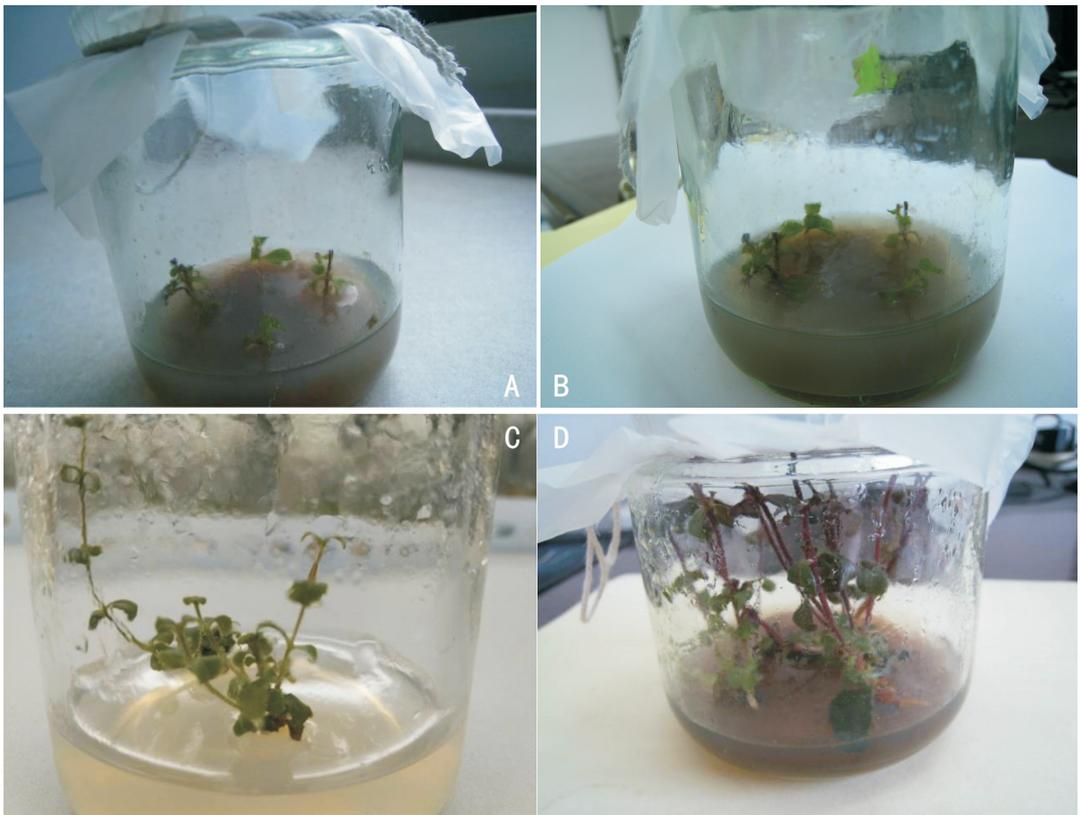


图 1 黑蒴定芽诱发增殖 A. 接种 10 d 后定芽萌发; B. 接种 20 d 后定芽生长; C. 接种 30 d 后定芽增殖; D. 黑蒴生根苗。

Fig. 1 Adventitious bud induction and multiplication of *Melasma arvense* A. Bud germination after inoculation with 10 d; B. Growth of adventitious buds after inoculation with 20 d; C. Proliferation of adventitious buds after inoculation with 30 d; D. *Melasma arvense* rooting seedlings.

$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖 +  $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂,培养基 pH 值为 5.8;每处理接种 10 瓶,每瓶接种 3 个 2~3 cm 带节嫩茎段,每处理接种 30 个外植体,均重复 3 次。接种后的材料在光照强度 1 500~2 000 lx、光照  $10 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 、温度  $22 \text{ }^\circ\text{C}$  下培养,观察比较各处理的萌发时间,40 d 时取出丛生芽,测量萌发情况和主茎生长长度。

通过比较发现各处理差异著;处理 1 萌发增殖效果最佳,表现为接种后 8~10 d 开始萌发,同时萌发后的茎枝节上腋芽开始萌动侧枝,接种 40 d 单茎萌发数可达 6.3 个,接种 40 d 主茎平均生长长度达 68.2 mm,增殖和主茎生长显著高于其它处理,表现出较好的增殖和生长效果;其次为处理 2、处理 4 和处理 7,

也表现出较好萌发增殖和主茎生长效果,但与处理 1 相比,同时平均萌发数量减少,新芽生长速度减慢;其余各处理萌发增殖效果较差。研究结果表明黑蒴带节嫩茎枝诱导增殖培养基配方中最佳的细胞分裂素种类为 6-BA,其较适宜的浓度为  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

#### 2.4 天然有机物添加物对定芽增殖的影响

以 2~3 cm 带节嫩茎枝为接种材料,选择 5 种不同天然有机添加物种类(椰子汁、香蕉泥、马铃薯汁、苹果汁、香蕉泥马铃薯汁混合)进行培养,每种有机添加物的量为  $130 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在各处理中都添加相同的  $1/2 \text{ MS} + 6\text{-BA } 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + 25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  蔗糖 +  $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  琼脂, pH 值为 5.8;每处理接种 5 瓶,每瓶接种 6 个材料;接种后的材料在光照强度  $1\ 500 \sim 2\ 000 \text{ lx}$ ,光照  $10 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ ,温度  $22 \text{ }^\circ\text{C}$  下培养,观察比较各处理的萌发时间,40 d 时取出丛生芽,测量萌发情况和主茎长度。

通过比较发现,处理 1 和 4 萌发增殖效果最佳,表现为接种 8 d 后就开始萌发,接种单茎萌发数分别为 8.3 个和 8.1 个,接种 20 d 主枝平均长度达 75.0 mm、74.2 mm,侧枝增殖非常明显,叶色浓绿,生长旺盛,二者无显著差异;其次为处理 2,也表现出较好萌发增殖效果,但与处理 1、处理 4 相比,萌发芽和主枝生长显著低于处理 1 和处理 4,萌芽数量减少,侧枝萌发也不明显,新芽生长速度减慢;再次为处理 3,虽然也表现出一定的萌发增殖效果,但萌发数量和新芽生长速度都减慢,显著低于处理 2;所有处理中,处理 5 效果最差,说明带节嫩茎枝诱导增殖培养中添加苹果,效果不明显。这表明椰子汁和香蕉+马铃薯作为黑蒴嫩茎枝诱导增殖培养的理想天然有机物添加物,但综合考虑材料来源、价格、成本等因素,选择香蕉和马铃薯混合添加效果最佳。

### 3 讨论与结论

黑蒴根、叶、种子(成熟、未成熟)、休眠带芽茎段、嫩茎枝等器官,经严格的外植体消毒程序(不同材料稍有变化)处理后进行接种培养。培养 10 d 后,陆续见到接种材料萌发或逐渐死亡,其中嫩茎枝培养 10 d 后切口基部开始膨大形成少量红黄色愈伤组织,嫩茎芽开始萌发并开始分枝和生长,而其它器官则未培养成功,这可能是本实验室中设计的培养基配方和培养条件较适宜生长旺盛的茎芽培养,而不适宜其它器官的培养。同一种植物不同器官的

培养效果,会因接种材料本身的性质(老嫩程度、休眠与萌动等)、培养基配方(基本培养基种类、植物生长调节剂的种类和浓度、有机添加物等)、培养条件(光照时间、光照强度、培养温度等)等综合作用,产生不同的培养效果响应(李育川等,2012a,b,c),因此,黑蒴根、叶、种子(成熟、未成熟)、休眠带芽茎段等其它器官的组织培养方法有待深入研究。如利用果实未开裂的新鲜种子(成熟、未成熟)进行无菌培养,有可能植株分化容易、无菌操作方便、繁殖系数高等优点(王蒂和陈劲枫,2013),是实现大量生产黑蒴试管苗的好材料;在实验中发现,利用肉质根或茎段培养诱导出大量的愈伤组织,且愈伤组织呈红色,民族医生判断黑蒴的药效好坏,就主要看根红不红,其愈伤组织中可能含有大量桃叶珊瑚甙、黑蒴甙等活性物质。从愈伤组织培养物中寻找活性成分已有报道(刘群等,2015;李琰等,2015)。通过深入研究黑蒴愈伤组织诱导增殖及活性成分的产生问题,将其愈伤组织直接入药或从中提取分离桃叶珊瑚甙、黑蒴甙等主要活性物质也具有巨大应用前景。

以黑蒴 2~3 cm 带节嫩茎枝为外植体,选择不同基本培养基(MS、 $1/2\text{MS}$ 、B5)和不同 6-BA 浓度( $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )组合培养基进行培养,结果发现采用  $1/2 \text{ MS} + 6\text{-BA } 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的组合最好;采用 MS(B5) + 6-BA  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的组合也能生长但生长效果较差,表现为前期芽爆发,后期芽稍逐渐变褐并枯死; $1/2 \text{ MS} + 6\text{-BA } 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  表现为前期快速萌发,表现为前期芽分化数量爆发,但不会生长成有效芽,后期芽稍逐渐变褐并枯死;MS(B5) + 6-BA  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  则完全不能萌发,接种后的茎枝叶逐渐萎缩卷曲脱落,芽稍变褐枯死。出现以上结果可能是黑蒴对培养基中的无机盐和离子浓度要求均较低且对细胞分裂素类物质也比较敏感,其培养基可能要求较低无机盐和离子浓度,当无机盐和离子浓度较高时会抑制丛生芽的生长甚至会产生毒害作用(李育川等,2012a,b,c)。因此,黑蒴嫩茎枝诱导丛生芽的培养基可能应用  $1/2\text{MS}$  或 White 培养基等含无机盐和离子浓度较低的基本培养基生长较为理想,具体情况还有待进一步研究。

以黑蒴嫩茎枝为外植体,接种到  $1/2\text{MS}$  基本培养基上,选择 3 种不同的细胞分裂素种类(6-BA、KT、ZT)和 3 种不同质量浓度( $1.5$ 、 $1.0$ 、 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )进行培养。结果发现,同一种细胞分裂素间,增殖和生长效果  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} > 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} > 1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,

显示出当添加的细胞分裂素  $0.5 \sim 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 较低浓度的增殖生长效果好于较高浓度, 说明黑蒴嫩茎枝定芽诱发培养对细胞分裂素类物质比较敏感, 其培养基添加较低浓度细胞分裂素 (小于  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 有利用其增殖和生长, 当细胞分裂素的浓度较高时会抑制丛生芽的生长, 这与朱丽芳等老鸦瓣芽茎诱导丛生芽的报道具有相似性 (朱丽芳等, 2014); 在实验培养基中添加  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA 的处理, 其诱发增殖和生长效果显著高于其它处理, 这说明不同的细胞分裂素种类和浓度对黑蒴嫩茎枝增殖生长的响应不同, 对于各种细胞分裂素的应用效果及合理添加浓度, 还有待于进一步缩小各类细胞分裂素的浓度梯度设置的实验。

以黑蒴嫩茎枝为接种材料, 选择添加 5 种不同天然有机添加物 (椰子汁、香蕉泥、马铃薯汁、苹果汁、香蕉泥马铃薯汁混合) 进行培养, 结果显示不同的天然有机添加物对黑蒴嫩茎枝的定芽诱发增殖和生长响应不同, 其结果是添加椰子汁和香蕉+马铃薯混合液的增殖和生长效果显著优于其它添加物, 这可能是因不同的有机添加物所含营养成分 (促进或抑制生长物质) 种类和浓度不相同, 同时添加的天然有机物质还会对培养基中的无机盐、离子浓度、胶体稳定性、溶液缓冲性等多因素造成影响 (王蒂和陈劲枫, 2013), 从而对黑蒴嫩茎枝定芽的诱发、增殖生长影响不同, 具体影响机理还有待研究。

本研究以黑蒴带节嫩茎枝为外植体, 将其剪成  $2 \sim 3 \text{ cm}$  带 2 个节嫩茎枝, 经饱和洗衣粉溶液清洗 3 次, 流水冲洗 2 h, 移至超净工作台, 采取用 75% 乙醇浸泡  $5 \sim 8 \text{ s}$ , 快速取出后用无菌水清洗 2 次, 再放入 2% 次氯酸钠溶液 (含数滴聚山梨酯-80) 中浸泡 20 min, 无菌水冲洗  $4 \sim 5$  次, 用无菌纸吸干水分后, 接种到  $1/2 \text{ MS} + 6\text{-BA } 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{Pt } 50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + \text{Bn } 80 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + 25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  蔗糖 +  $7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  琼脂, pH 值 5.8 的培养基上, 接种后的放置在光照强度  $1500 \sim 2000 \text{ lx}$ , 光照  $10 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ , 温度  $22 \text{ }^\circ\text{C}$  下培养, 接种后  $8 \sim 10 \text{ d}$  就开始萌发, 主茎快速生长, 同时侧枝大量萌发, 生长旺盛, 叶色浓绿, 单茎 40 d 平均增殖数超过 8 个以上, 主茎 40 d 生长长度超过  $7.5 \text{ cm}$ , 显示出很好的增殖效果。

## 参考文献:

CHINESE HERBAL MEDICINE INFORMATION STATION OF THE STATE ADMINISTRATION OF MEDICINE, 1996. Handbook of effective components of plant medicine [M]. Bei-

jing: People's Medical Publishing House: 102-103. [国家医药管理局中药草情报站, 1986. 植物药有效成分手册 [M]. 北京: 人民卫生出版社: 102-103.]

- CHINESE MATERIA MEDICA EDITORIAL BOARD, 1999. Chinese materia medica; 7, Vol. 20 [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press: 353-354. [中华本草编委会, 1999, 中华本草 (第 7 部, 第 20 卷) [M]. 上海科学技术出版社: 353-354.]
- LI Y, CUI L, YAN YQ, et al, 2015. Establishment of adventitious root culture system and scale-up fermentation of *Tripterygium wilfordii* [J]. Chin Mat Med J, 40(1): 53-58. [李琰, 崔蕾, 杨钰琪, 等雷公藤不定根培养体系的建立及中试放大研究 [J]. 中国中药杂志, 40(1): 53-58.]
- LI YC, WANG DK, GENG KY, et al, 2012a. Initiation method for promoting evolution of seed germination of *Melasma arvense* [P]. Chinese patent; ZL201210566130.2. [李育川, 王定康, 耿开友, 等, 2012a. 一种促进化血胆种子萌发的引发方法 [P]. 中国专利: ZL10566130.2.]
- LI YC, WANG DK, SONG ZC, et al, 2012b. Method for rapidly refining seedling of tissue culture seedling of *Melasma arvense* [P]. Chinese patent; ZL10566118. 1. [李育川, 王定康, 宋知春, 等, 2012b. 一种化血胆组培苗快速炼苗的方法 [P]. 中国专利: ZL10566118. 1.]
- LI YC, YI YJ, DU JY, et al, 2012c. Method for rapid propagation of tissue culture of *Melasma arvense* [P]. Chinese patent; ZL10566129.X. [李育川, 矣雅娟, 杜加艳, 等, 2012c. 一种化血胆组织培养快速繁殖的方法 [P]. 中国专利: ZL10566129.X.]
- LIU Q, XIAO B, LI TX, et al, 2015. Callus induction and determination of totalalkaloid content from *Fritillaria ebeiensis* var. *pupurea* [J]. Chin Trad & Herb Drug, 46(12): 1836-1839. [刘群, 肖波, 李天祥, 等, 2015. 紫花鄂北贝母愈伤组织诱导及总生物碱的测定 [J]. 中草药, 46(12): 1836-1839.]
- QIU HX, 1996. Chinese flora Vol. 67, No. 2 [M]. Beijing: Science Press; 350. [丘华兴, 1996. 中国植物志 (第 67 卷第 2 分册) [M]. 北京: 科学出版社: 350.]
- WANG D, CHEN JF, 2013. Plant tissue culture [M]. Beijing: China Agriculture Press: 23-31. [王蒂, 陈劲枫, 2013. 植物组织培养 [M]. 北京: 中国农业出版社: 23-31.]
- YANG RZ, ZHOU J, 1987. The monoterpenoid glucosides from *Melasma arvense* [J]. Acta Bot Yunnan, 9(1): 103-107. [杨仁洲, 周俊. 1987. 黑蒴中的单萜甙类化合物分析 [J]. 云南植物研究, 9(1): 103-107.]
- YANG RZ, ZHOU J, ZHENG QT, et al, 1983. Melasmoside-A novel monoterpenoid glucoside from *Melasma arvense* [J]. Acta Bot Yunnan, 5(2): 215-215. [杨仁洲, 周俊, 郑启泰, J. 克拉弟. 1983, 一个新奇单萜甙—黑蒴甙分析 [J]. 云南植物研究, 5(2): 215-215.]
- YANG RZ, ZHOU J, 1981. The iridoid glucosides from *Melasma arvense* [J]. Acta Bot Yunnan, 3(3): 332, 358. [杨仁洲, 周俊. 1981, 黑蒴中的环烯醚萜甙类化合物 [J]. 云南植物研究, 3(3): 332, 358.]
- ZHU LF, SHI J, ZHU ZB, et al, 2014. Bud stem tissue culture of *Tulipa edulis* [J]. Chin Trad Herb Drug, 45(4): 563-568. [朱丽芳, 史俊, 朱再标, 等. 老鸦瓣芽茎组织培养初步研究 [J]. 中草药, 45(4): 563-568.]
- ZHU LF, XU C, ZHU ZB, et al, 2014. Impact of TDZ and NAA on adventitious bud induction and cluster bud multiplication in *Tulipa edulis* [J]. Chin Mat Med J, 16(8): 3030-3035. [朱丽芳, 徐超, 朱再标, 等, 2014. TDZ 和 NAA 对老鸦瓣不定芽诱导和丛生芽增殖的影响 [J]. 中国中药杂志, 16(8): 3030-3035.]