

优化体系下岩黄连组培苗与实生苗解剖结构比较研究

李翠,郭晓云,陈晓英,李林轩,韦莹,韦坤华,张占江*

(广西壮族自治区药用植物园/广西药用资源保护与遗传改良重点实验室,广西南宁 530023)

摘要 目的:采用石蜡切片法对优化体系下岩黄连组培苗和实生苗营养器官进行解剖结构研究,为岩黄连组培苗质量评价提供依据,为节约型工业化生产岩黄连奠定基础。方法:以岩黄连无菌苗叶片为外植体,以B5为基本培养基,采用正交设计研究植物生长调节剂多因素组合(6-BA、IAA、2,4-D、IBA、AC)对岩黄连愈伤组织和不定芽诱导及壮苗生根的影响;并对培养30 d岩黄连组培苗和50 d实生苗营养器官进行比较解剖学研究。结果:愈伤组织不定芽最佳诱导培养基为B5+6-BA 1.0 mg/L+IAA 0.2 mg/L+2,4-D 0.2 mg/L,外植体经20 d诱导培养可分化成簇状不定芽;1/2MS+6-BA 0.6 mg/L+IBA 0.2 mg/L+IAA 0.2 mg/L+AC 0.5 g/L培养基最利于不定芽壮苗生根获得再生植株,生根率100%。解剖结构对比研究表明实生苗叶片的栅栏组织较厚且排列规则,海绵组织疏松,组培苗叶片栅栏组织和海绵组织疏松;实生苗茎较组培苗茎基本组织比例增加,木质化程度高;根部结构差别较大,根的次生结构由周皮和次生维管组成,实生苗的韧皮部和木质部分化较好。结论:组培快繁优化体系下生根培养30 d的岩黄连组培苗和50 d实生苗的叶片解剖结构差异不大,根、茎不及实生苗发达,此优化体系下岩黄连繁殖速度快、再生率高,可在短时间提供大量的岩黄连种苗。

关键词 岩黄连;优化体系;实生苗;解剖结构

中图分类号:R282.2 **文献标识码**:A **文章编号**:1001-4454(2018)07-1546-04

DOI:10.13863/j.issn1001-4454.2018.07.007

岩黄连系罂粟科紫堇属植物石生黄堇 *Corydalis saxicola* Bunting 的全草及肥大的根茎部,有近似黄连的功效,且生长于岩缝中或岩石旁,故得此名。可主治疮疖肿毒、肝炎、肝硬化、肝癌等症^[1]。岩黄连是著名的壮瑶民族药^[2,3],主要分布在贵州、广西、云南等地的石灰岩地区阴湿的岩洞口,资源蕴藏量十分有限,随着大量采挖和收购导致野生资源濒临枯竭,被列入《中国南部石灰岩稀有濒危植物名录》^[4],由于生境条件恶劣,其自然繁殖率很低,种群发展困难。人工育苗种子繁殖周期长,岩黄连种子仅在收获后3个月内有活力,且种子萌发率低,只有15%~30%^[5,6],上述条件对其大面积的人工栽培产生了一定限制^[7]。

本研究结合现代生物技术组织培养手段和植物生理解剖技术,在前期完成岩黄连组培快繁体系基础上^[8],开展岩黄连两步成苗体系优化研究,将岩黄连组培快繁缩减至2个步骤,提高了岩黄连种苗生产效率,并以岩黄连组培苗和实生苗营养器官为材料开展解剖结构对比研究,为规模化生产岩黄连组培苗提供技术支撑,为岩黄连药材质量标准制定奠定基础,从而更好的保护、开发和利用岩黄连种质资源。

1 材料与方法

1.1 供试材料 岩黄连 *Corydalis saxicola* Bunting

实生苗所用种子来自于广西东兰县,经广西壮族自治区药用植物园凌征柱研究员鉴定为岩黄连种子,健壮无菌苗来源于广西壮族自治区药用植物园离体保存库。

1.2 方法

1.2.1 愈伤组织和不定芽诱导培养:选用健壮无菌苗叶片作为实验材料展开愈伤组织和不定芽诱导,在超净工作台内剪取大小基本一致的岩黄连无菌叶片,按平行方向接种于不同诱导培养基上,在平均光照强度2 200 Lx,光照时间10 h/d,温度(24±2)℃,培养室湿度(36±4)%的条件下进行培养。实验以B5为基本培养基,考察2,4-D(0.2、0.5 mg/L)、6-BA(0.5、1.0、1.5 mg/L)及IAA 0.2 mg/L等不同组合对岩黄连愈伤组织和不定芽诱导的优化效果,每个处理10瓶,每瓶3个外植体,30 d后记录外植体的诱导情况,比较不同组合诱导愈伤组织和不定芽能力的差异,以愈伤组织诱导率和不定芽诱导率为主要考察指标来优化诱导培养基。愈伤组织诱导率=愈伤组织数/接种总数×100%;不定芽诱导率=不定芽数量/接种总数×100%。

1.2.2 不定芽壮苗生根培养:在1/2MS为基本培养基添加6-BA(0.3、0.6、1.0 mg/L)、IAA(0.1、0.2、0.5 mg/L)、IBA(0.2、0.5、1.0 mg/L)的正交试验对岩黄连的不定芽壮苗生根进行优化,每个处理

收稿日期:2017-07-31

基金项目:广西自然科学基金青年科学基金项目(2015GXNSFBA139104);国家自然科学基金青年科学基金项目(81603392,31200305)

作者简介:李翠(1982-),女,助理研究员,研究方向:药用植物保护与开发利用;Tel:13557611106。

*通讯作者:张占江,E-mail:zzj1811@163.com。

10 瓶,每瓶 8 个单芽,在平均光照强度 2 200 Lx,光照时间 10 h/d,温度 (24±2)℃,培养室湿度 (36±4)% 的条件下进行培养。30 d 后测试管苗生根状况和生长情况,以无菌苗平均高度、平均生根率和平均生根数为主要考察指标来优化丛生芽壮苗生根培养基。生根率=生根根数/接种总数×100%;生根数=总生根数/接种总数×100%。

1.2.3 组培苗和实生苗营养器官解剖结构比较研究:本实验以壮苗生根培养 30 d 的岩黄连无菌苗和培养 50 d 的种子实生苗的根、茎、叶为材料,叶片剪取中部含主脉 1.0 cm×0.5 cm 的长方形,根、茎剪取长 0.5 cm 放入 70% FAA 固定液中固定 24 h。固定的材料经过梯度乙醇脱水、TO 透明剂透明、浸蜡、包埋、切片、封片。Leica RM2255 切片机制片,切片厚度为 10 μm,番红-固绿双重染色,并用加拿大中性

树脂封片,每个处理重复 3 次,Leica DM2000 显微镜观察并拍照。

2 结果

2.1 愈伤组织和不定芽的诱导 用岩黄连无菌苗叶片为外植体接入愈伤组织和不定芽诱导培养基,在前期不定芽诱导效果良好的 6-BA 和 IAA 组合基础上添加愈伤组织诱导效果好的 2,4-D。7 d 左右长方形叶片四周切口处开始增大疏松,颜色逐渐变乳白色疏松的愈伤组织,14 d 左右在愈伤组织上长出翠绿色不定芽,且 20 d 时不定芽成簇生长,呈翠绿色。试验表明:添加生长素有利于不定芽诱导和生长,其中 2,4-D 和 IAA 之间协同作用,结合愈伤组织诱导率和不定芽诱导率,最佳的诱导培养基为 B5+6-BA 1.0 mg/L+IAA 0.2 mg/L+2,4-D 0.2 mg/L 的培养基。见表 1 和图 1。

表 1 岩黄连愈伤组织和不定芽的诱导

序号	6-BA/(mg/L)	IAA/(mg/L)	2,4-D/(mg/L)	愈伤诱导率/%	不定芽诱导率/%
1	0.5	0.2	0.2	74	63
2	0.5	0.2	0.5	82	61
3	1.0	0.2	0.2	89	78
4	1.0	0.2	0.5	71	72
5	1.5	0.2	0.2	66	74
6	1.5	0.2	0.5	66	69

2.2 丛生芽壮苗生根试验 将长到 2~3 cm 的不定芽切下接种到正交设计的壮苗生根培养基上,30 d 后统计生根率及平均生根数(表 2),统计参考曹磊等方法^[9]。为了筛选获得最佳的生根培养基,在添加 AC(0.5 g/L)的 1/2MS 培养基中,考察 6-BA、IBA、IAA 正交实验设计对岩黄连壮苗生根的影响,结果 IBA 和 IAA 的浓度对试管苗的生根率具有显

著的相关性,IAA 发挥着重要的作用,低浓度的 IAA 可以促进丛芽发芽生根,但 IAA 浓度过高会影响丛生芽进一步生根。研究结果发现岩黄连组培苗壮苗生根的最佳培养基是 1/2MS+6-BA 0.6 mg/L+IBA 0.2 mg/L+IAA 0.2 mg/L+AC 0.5 g/L,平均生根数约为 15.4 条,生根率达到 100%。见表 2、表 3 和图 1。

表 2 岩黄连丛生芽生根诱导正交试验 L₉(3⁴) 结果

组合	IBA/(mg/L)	IAA/(mg/L)	6-BA/(mg/L)	D(空白)	生根率/%	平均生根数/条
1	0.2	0.1	0.3	1	90	13.7
2	0.2	0.2	0.6	2	100	15.4
3	0.2	0.5	1.0	3	92	12.6
4	0.5	0.1	0.3	3	94	11.7
5	0.5	0.2	0.6	1	97	14.5
6	0.5	0.5	1.0	2	90	14.1
7	1.0	0.1	0.3	2	87	12.2
8	1.0	0.2	0.6	3	82	12.9
9	1.0	0.5	1.0	1	79	11.7
K ₁	2.82	2.71	2.62	2.66		
K ₂	2.81	2.79	2.73	2.77		
K ₃	2.48	2.61	2.76	2.68		
R	0.11	0.06	0.05	0.04		

表 3 生根率的方差分析

方差来源	离均差平方和	自由度	方差	F 值	P 值	
IBA	0.025	2	0.012	10.90	0.05 < P < 0.1	有显著影响
IAA	0.054	2	0.003	2.37	0.05 < P < 0.1	有显著影响
6-BA	0.036	2	0.002	1.58	P > 0.1	影响不显著
D(误差)	0.002	2	0.002	1		

注: $F_{1-0.01}(2,2) = 99.0$, $F_{1-0.05}(2,2) = 19.0$, $F_{1-0.1}(2,2) = 9.0$

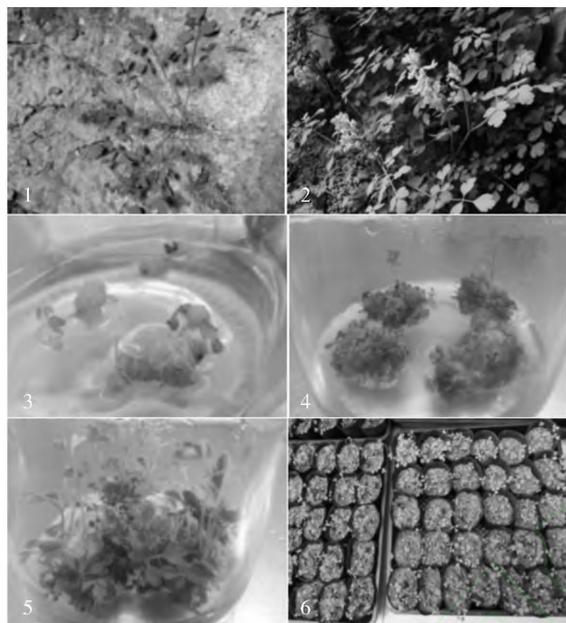


图 1 岩黄连组培苗与实生苗

1. 野生岩黄连 2. 岩黄连花 3. 岩黄连愈伤组织 4. 愈伤组织诱导出芽 5. 岩黄连组培苗 6. 岩黄连实生苗

2.3 岩黄连组培苗和实生苗营养器官解剖结构比较 以壮苗生根培养 30 d 的岩黄连无菌苗和培养 50 d 的种子实生苗根、茎、叶为材料,经切片拍照观察,组培苗和实生苗叶片解剖结构差别不大,叶片类型一致,均属于异面叶;但是并没有分化明显的栅栏组织和海绵组织。岩黄连茎表皮较薄,初生结构的表皮、皮层、维管柱分化不明显,木质化程度低,无髓射线,导管等均不发达。实生苗茎较组培苗茎基本组织比例增加,木质化稍显发达。根是植物长期适应陆地生活而在进化过程中逐渐形成的器官,岩黄连属于直根系植物,主根发达,入土较深。解剖结果显示岩黄连根由表皮、皮层、维管柱组成,组培苗和实生苗根际结构差别较大,根的次生结构由周皮和次生维管组成,实生苗的木质化程度较发达,韧皮部和木质部分化较好。见图 2。

3 讨论

本实验发现,岩黄连叶片诱导愈伤组织和不定芽的效果最佳,在 MS+6-BA 1.0 mg/L+IAA 0.2 mg/L+2,4-D 0.2 mg/L 培养基上,外植体经 20 d 诱导培

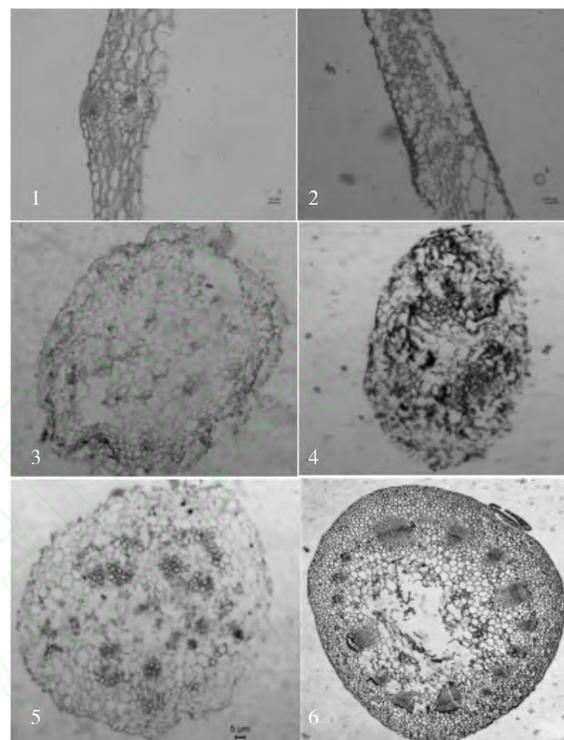


图 2 岩黄连组培苗与实生苗营养器官解剖结构比较

注:1,3,5 分别是岩黄连组培苗的叶片、茎、根横切面;2,4,6 分别是岩黄连实生苗的叶片、茎、根横切面

养可分化成簇状不定芽,在 1/2 MS+6-BA 0.6mg/L+IBA 0.2 mg/L+IAA 0.2 mg/L+AC 0.5 g/L 培养基上最利于不定芽壮苗生根获得再生植株,生根率 100%。

岩黄连叶片属于异面叶,上叶面主要受光,而下叶面主要背光,其叶肉细胞呈紧密垂直状排列,但是并没有分化明显的栅栏组织和海绵组织,叶色浅绿,光合作用效率水平一般,这与岩黄连长期生长的自然环境有关,岩黄连主要生长在石灰岩地区阴湿的岩洞口和演示峭壁上,光照条件有限,与韦记青等^[10]报道的光合指标测定显示岩黄连对光照要求不高,属于阴生植物结果一致。组培苗和实生苗叶片解剖结构差别不大。岩黄连茎表皮较薄,初生结构的表皮、皮层、维管柱分化不明显,木质化程度低,无髓射线,导管等均不发达,可能与所在环境光照强度低紫外线弱相关,植物不需抵御外界伤害。实生苗茎较组培苗茎基本组织比例增加,木质化稍显发

达。岩黄连属于直根系植物,主根发达,入土较深。解剖结果显示岩黄连根由表皮、皮层、维管柱组成,组培苗和实生苗根际结构差别较大,根的次生结构由周皮和次生维管组成,实生苗的木质化程度较发达,韧皮部和木质部分化较好。

本实验进行了岩黄连组培快繁体系优化研究,并在此基础上开展组培苗和实生苗营养器官解剖结构的对比研究,旨在为后期研究岩黄连碱化学定位,及大规模生产提供初步技术支撑。研究发现岩黄连叶片栅栏组织和海绵组织分化不明显,光合作用较弱,根和茎维管组织不够发达,运输和代谢能力差,由此推测岩黄连植物同化产物的积累较慢,正是岩黄连属于多年生药材的根本原因,岩黄连组培苗苗龄替代实生苗用药需要进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] 陆瑞群,庞雅琴,庞广福. 岩黄连的药理作用及临床应用研究进展[J].中国医药导报,2014,11(5):159-161.
- [2] 梁启成,钟鸣. 中国壮药学[M].南宁:广西民族出版社,2005:107.
- [3] 戴斌. 中国现代瑶药[M].南宁:广西科学技术出版社,2009:500-501.
- [4] 文和群,许兆然,J. Villa-Lobos. 中国南部石灰岩稀有濒危植物名录[J].广西植物,1993,13(2):110-127.
- [5] 蒋运生,朱鸿杰,蒋水元,等. 岩黄连种子繁殖研究[J].广西科学,2006,13(4):324-327.
- [6] 郭晓云,李莹,李翠,等. 一种提高岩黄连种子萌发的方法[P].CN:201410391340.1,2014.12.10.
- [7] 韦忠福,王冬梅,杨得坡,等. 濒危野生药材岩黄连人工栽培技术[J].时珍国医国药,2006,17(12):2404-2405.
- [8] 韦范,李翠,韦坤华,等. 岩黄连的高频再生体系建立与优化[J].江苏农业科学,2014,42(11):68-71.
- [9] 曹磊,钱子刚,黄衡宇,等. 金铁锁体外高效再生体系的建立[J].中药材,2017,40(1):12-17.
- [10] 韦记青,蒋水元,唐辉. 岩黄连光合与蒸腾特性及其对光照强度和CO₂浓度的响应[J].广西植物,2006,26(3):317-320.