

# 林荫银莲花组培苗生根培养基的优化\*

王 俊 朱端卫 杨特武 辛 龙 耿明建\*\*

华中农业大学植物营养与生态环境研究室/华中农业大学微量元素研究中心/  
农业部亚热带农业资源与环境重点开放实验室, 武汉 430070

**摘要** 以药用植物林荫银莲花不定芽组培苗为试验材料, 研究培养基添加不同植物激素、不同质量浓度蔗糖和活性炭对组培苗生根的影响。结果表明: 以 1/2 MS 为基本培养基, 添加 0.5 mg/L NAA+0.5 mg/L IBA, 30 g/L 蔗糖作为碳源, 另加入 1.0 g/L 活性炭, 培养 55 d 后, 林荫银莲花组培苗的生根率为 93.9%, 平均根条数为 10.5, 根长最长达 1.73 cm, 根较粗且褐化轻微。

**关键词** 林荫银莲花; 组培苗; 生根培养基; 植物激素; 蔗糖; 活性炭

**中图分类号** Q 943.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)04-0508-05

林荫银莲花 (*Anemone flaccida* Fr. Schmidt) 系毛茛科 (Ranunculaceae) 银莲花属 (*Anemone*) 多年生草本植物, 其干燥根茎又名地乌, 可入药, 性温、味辛微苦<sup>[1]</sup>, 《贵州民间药物》、《浙江天目山药植志》等书均有记载, 用于风湿疼痛、跌打损伤, 在鄂西南地区特别是宜昌、恩施等地民间应用广泛。研究表明, 地乌提取物具有良好的抗炎免疫、镇痛镇静等作用, 对人体的毒副作用小<sup>[2]</sup>, 是具有开发前景的抗风湿性关节炎新药, 于 2004 年获得新药临床批件, 目前已经进入 III 期临床试验阶段。临床研究表明, 地乌提取物具有高效、低毒的优势, 应用前景广泛。

为解决林荫银莲花野生资源有限、生长繁殖缓慢, 以及由此产生的影响中成药开发等问题, 笔者所在课题组对其组培快繁技术进行了多年的探索<sup>[3]</sup>, 大幅地提高了组培苗的增殖系数和芽苗质量。笔者通过在培养基中添加植物激素、蔗糖、活性炭, 探讨如何提高林荫银莲花组培苗生根的数量和质量, 以进一步提高其组培快繁效率。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料为产于湖北省长阳土家族自治县麻池铜鼓包海拔 1 800 m 山区的林荫银莲花, 组培苗由根状茎芽诱导而成。试验选用增殖培养 3 代 (90 d)

后的不定芽组培苗为材料, 将其分切为约 1 cm 的小块, 去除叶片, 基部接种到培养基上。

### 1.2 试验方法

1) 激素组合试验。以 1/2 MS 为基本培养基, 选用萘乙酸 (NAA) 和 3-吲哚丁酸 (IBA) 2 种植物激素。NAA 设 4 个水平, 即 0、0.2、0.5、1.0 mg/L, IBA 设 2 个水平, 即 0、0.5 mg/L, 对 2 个因素进行完全组合, 共 8 个处理。接种 55 d 后取出统计根生长状况, 筛选出适宜林荫银莲花生根培养的激素组合。

2) 碳源质量浓度筛选。以 1/2 MS 培养基添加 1.2 1) 中筛选出的最适激素质量浓度为基本培养基, 再分别加入 10、20、30、40 g/L 的蔗糖组成试验培养基, 接种 20 d 后, 每隔 15 d 记录 1 次材料的生根率和生长状况, 55 d 后取出, 统计根生长状况, 筛选出适宜林荫银莲花生根的蔗糖质量浓度。

3) 活性炭质量浓度筛选。采用本文 1.2 1) 和 1.2 2) 中筛选出的最佳激素和碳源质量浓度做基本培养基, 分别加入活性炭 (activated carbon, AC) 0、0.5、1.0、1.5 g/L。接种 20 d 后, 每隔 15 d 记录 1 次材料的生根率和生长状况, 55 d 后取出, 统计根生长状况, 筛选最适林荫银莲花生根的 AC 质量浓度。

4) 培养条件。培养基经 121 °C 灭菌 15 min, pH

收稿日期: 2010-04-29; 修回日期: 2010-06-12

\* 广东省一教育部产学研结合项目 (2006D90204009) 和华中农业大学硕士研究生创新研究项目基金资助

\*\* 通讯作者。E-mail: mjgeng@mail.hzau.edu.cn

王 俊, 女, 1985 年生, 硕士研究生。研究方向: 药用植物资源。E-mail: wangjun19850921@webmail.hzau.edu.cn

值为 5.8~6.0,蔗糖质量浓度 30 g/L(除特别说明外),琼脂 0.75%,(4±2) °C 暗培养。

5)统计方法。培养 55 d 后,取出外植体,冲洗干净;统计生根率、平均根条数、平均根长、根的粗细及外植体褐化情况。

生根率/% = (生根的外植体/接种的外植体)×100;

平均根条数 = 生根条数/生根的外植体数;

平均根长/cm = 总根长/根数。

百分数经反正弦( $y = \arcsin x^{1/2}$ )转换后,再进行统计分析。运用 SAS 软件 Anova 程序对数据进行处理间差异显著性测验,LSD 法作多重比较分析。

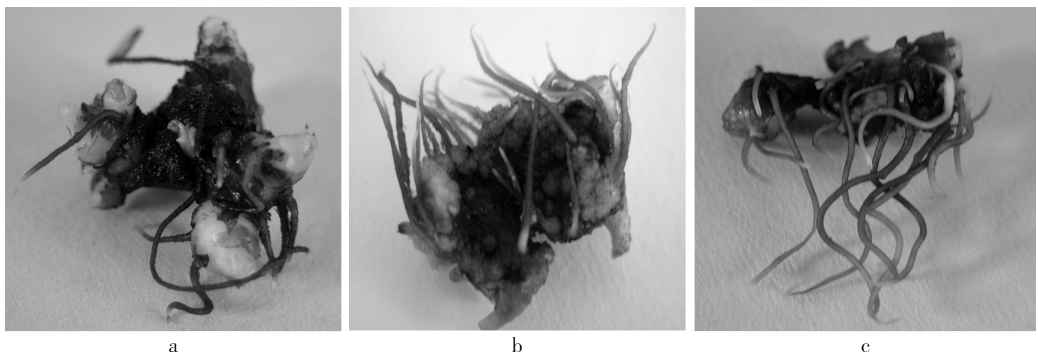
## 2 结果分析

### 2.1 植物激素对林荫银莲花组培苗生根的影响

从表 1 可以看出,外源植物激素 NAA、IBA 对林荫银莲花再生根诱导起促进作用,无论是 NAA、IBA 单独添加还是 NAA 和 IBA 组合添加,

对根的诱导率均高于 84.0%;不添加植物激素处理,对根的诱导率显著低于其他处理,仅为 58.8%,且根的生长状况较差,再生根和外植体均严重褐化(图 1 a)。

不同植物激素质量浓度和种类对组培苗根诱导影响不同。单独添加 NAA,在质量浓度为 0.2 mg/L 时,生根率最高,达 100%,根生长状况较好;随着 NAA 质量浓度的进一步增加,生根率和根数逐渐降低,根长和根粗细先增加后降低;当 NAA 达到 1.0 mg/L 时,发现根茎基部有愈伤组织发育,生根率为 84.2%,比添加激素处理平均生根率低 11%,且诱导的根短而细(图 1 b);说明低质量浓度的 NAA 更有利于林荫银莲花组培苗生根,高质量浓度则会抑制根的生长发育。单独添加 0.5 mg/L 的 IBA 与单独添加相同质量浓度的 NAA 相比较,生根率的差异不显著,但前者根的生长状况稍好,根数较多,且根长达到最大值 1.56 cm;试验还发现 IBA 诱导出的根较粗壮,而 NAA 诱导出的根偏细。



a. 1/2 MS; b. 1/2 MS+NAA 1.0 mg/L; c. 1/2 MS+NAA 0.5 mg/L+IBA 0.5 mg/L.

图 1 植物激素对林荫银莲花组培苗生根的影响(培养 55 d)

Fig. 1 Effects of plant hormones on rooting of regenerated shoots of *A. flaccida* culture for 55 days

表 1 NAA 和 IBA 对林荫银莲花组培苗生根的影响<sup>1)</sup>

Table 1 Effects of NAA and IBA on rooting of regenerated shoots of *A. flaccida*

| 植物激素质量浓度/(mg/L)<br>Hormone concentration |     | 外植体数<br>Explant quantity | 生根率/%<br>Rooting rate | 根数<br>Root number | 根长/cm<br>Root length | 根粗细<br>Root thickness | 褐化状况<br>Browning condition |
|--|-----|--------------------------|-----------------------|-------------------|----------------------|-----------------------|----------------------------|
| NAA                                      | IBA |                          |                       |                   |                      |                       |                            |
| 0.0                                      | 0.0 | 17                       | 58.8±4.9 c            | 4.41±0.13 e       | 0.77±0.06 c          | 偏细 Thinness           | 严重 Serious                 |
| 0.0                                      | 0.5 | 18                       | 94.4±7.1 ab           | 8.53±0.11 b       | 1.56±0.33 a          | 中等 Medium             | 中等 Medium                  |
| 0.2                                      | 0.0 | 22                       | 100.0±0.0 a           | 9.18±0.42 ab      | 1.01±0.15 bc         | 偏细 Thinness           | 中等 Medium                  |
| 0.2                                      | 0.5 | 19                       | 94.7±7.1 ab           | 7.00±0.28 cd      | 1.26±0.22 ab         | 较粗 Thickness          | 中等 Medium                  |
| 0.5                                      | 0.0 | 17                       | 94.1±7.8 ab           | 7.50±0.71 c       | 1.09±0.02 bc         | 中等 Medium             | 严重 Serious                 |
| 0.5                                      | 0.5 | 17                       | 100.0±0.0 a           | 9.59±0.54 a       | 1.21±0.08 ab         | 较粗 Thickness          | 轻微 Slight                  |
| 1.0                                      | 0.0 | 19                       | 84.2±8.6 b            | 6.19±0.28 d       | 0.96±0.06 bc         | 偏细 Thinness           | 中等 Medium                  |
| 1.0                                      | 0.5 | 18                       | 100.0±0.0 a           | 6.56±0.57 cd      | 1.17±0.19 ab         | 偏细 Thinness           | 中等 Medium                  |

1)不同小写字母表示差异显著(P<0.05),下同。Different small letters mean significance at P<0.05,the same as below.

不同质量浓度的 NAA 与 IBA 的组合对林荫银莲花组培苗生根的诱导影响也不相同。IBA 质量浓度为 0.5 mg/L 时,随着 NAA 质量浓度的增加,生根率增大,根数呈先增加后降低的趋势;NAA 质量浓度 0.5 mg/L 时,两者组合的效果最好,生根率为 100%,根较粗且长度适中,诱导的根数最多为 9.59 (图 1 c)。因此,选择 NAA 0.5 mg/L 与 IBA 0.5 mg/L 作为林荫银莲花组培苗生根培养的最适植物激素质量浓度。

## 2.2 蔗糖对林荫银莲花组培苗生根的影响

图 2 可知,随着培养时间的延长,不同质量浓度蔗糖处理的组培苗生根率均呈上升趋势,但培养前期生根速率较高,50 d 以后生根速率变慢。蔗糖质量浓度在 10~40 g/L 范围内,林荫银莲花组培苗的生根率随蔗糖质量浓度的增加呈先增加后降低的趋势,其中,30 g/L 处理时,不同时间段林荫银莲花组培苗生根率均最高,其次是 20 g/L 处理,再次是 40 g/L 处理,10 g/L 处理最低。蔗糖质量浓度为 10 g/L 时,发根时间较其他处理晚,培养 20 d 后生根率为 0,发育缓慢,培养 55 d 后生根率仅为 60%,可能由于该培养基中蔗糖质量浓度较低,提供给生根所需的能量不足。蔗糖质量浓度为 30 g/L 时,不定根的发育最早,培养 35 d 后达到 82.4%,培养 50 d 后生根率达到最高值 97.1%。蔗糖质量浓度为 40 g/L 时,培养 50 d 后根的发育停止,诱导率达到最大值,为 82.8%,可能由于蔗糖质量浓度过高时,高渗溶液会引起植物细胞失水,对细胞产生伤害,从而

表 2 蔗糖对林荫银莲花组培苗生根的影响

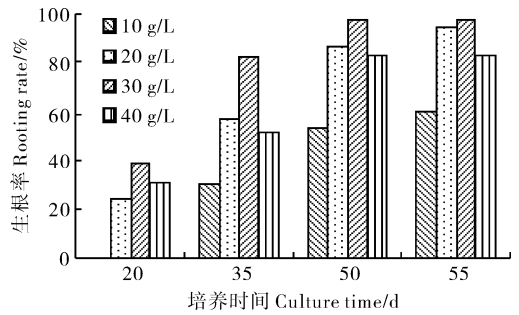
Table 2 Effects of sucrose on rooting of regenerated shoots of *A. flaccida*

| 蔗糖质量浓度/(g/L)<br>Concentration of sucrose | 外植体数<br>Explant quantity | 生根率/%<br>Rooting rate | 根数<br>Root number | 根长/cm<br>Root length | 根粗细<br>Root thickness | 褐化状况<br>Browning condition |
|--|--------------------------|-----------------------|-------------------|----------------------|-----------------------|----------------------------|
| 10                                       | 30                       | 60.0±10.0 b           | 5.60±0.22 d       | 0.55±0.11 b          | 偏细 Thinness           | 较重 Serious                 |
| 20                                       | 37                       | 95.0±8.25 a           | 8.31±0.85 c       | 1.22±0.19 a          | 中等 Medium             | 中等 Medium                  |
| 30                                       | 34                       | 97.2±4.8 a            | 12.58±0.10 a      | 1.52±0.10 a          | 中等 Medium             | 中等 Medium                  |
| 40                                       | 29                       | 83.0±6.6 ab           | 10.37±0.93 b      | 1.31±0.30 a          | 中等 Medium             | 较重 Serious                 |

## 2.3 活性炭对林荫银莲花组培苗生根的影响

从表 3 可以看出,培养 55 d 后,生根率随着活性炭质量浓度的增加呈先增加后降低的趋势,总体差异不显著;但不同质量浓度活性炭处理对组培苗的根数、根长、根粗细及褐化情况等生根质量状况有明显影响。

添加活性炭质量浓度为 0.0 g/L 处理时,根较长且根数多,根较细且外植体和根的褐化较明显(图



蔗糖质量浓度为 10 g/L,培养 20 d 时的生根率为 0。Rooting rate of sucrose 10 g/L is 0 after culture 20 d.

图 2 不同蔗糖质量浓度条件下林荫银莲花组培苗生根动态

Fig. 2 Effects of sucrose concentration on rooting development of regenerated shoots of *A. flaccida*

抑制根的发育<sup>[4]</sup>。

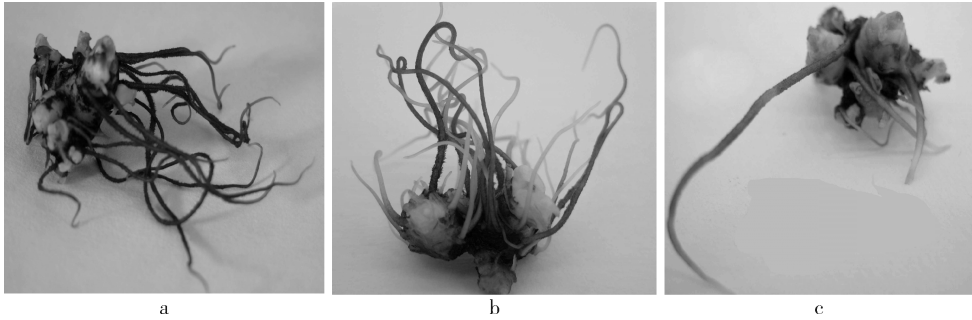
蔗糖质量浓度不仅影响林荫银莲花组培苗根诱导速率,同时影响再生根的数量及质量(表 2)。蔗糖质量浓度为 10 g/L 时,林荫银莲花组培苗的生根率、根数和根长均显著低于其他 3 个处理,且根偏细;蔗糖质量浓度在 20~40 g/L 内变化时,对林荫银莲花生根率和根长的影响均不显著,而蔗糖质量浓度为 30 g/L 处理时,组培苗的根数显著高于其他处理,生根率和平均根长也均为最高,分别达 97.2% 和 1.52 cm。因此,选择 30 g/L 作为林荫银莲花组培苗生根培养基的蔗糖质量浓度,该处理发根早、生长快,且根的质量最佳,但外植体和根有褐化现象。

3 a);添加活性炭质量浓度为 0.5 g/L 时,组培苗的生根率最高,但根数少且根细又短;添加活性炭质量浓度为 1.0 g/L 时,再生根的质量最优,根数和根长显著高于其他处理,根较粗且褐化轻微(图 3 b);当添加活性炭质量浓度达到 1.5 g/L 时,组培苗的生根率明显下降,较活性炭质量浓度为 0.5 g/L 处理降低了 15.3%,虽褐化轻微但诱导出的根数最少(图 3 c)。

表3 活性炭对林荫银莲花组培苗生根的影响

Table 3 Effects of active carbon on rooting of regenerated shoots of *A. flaccida*

| 活性炭质量浓度/(g/L)               | 外植体数             | 生根率/%        | 根数           | 根长/cm        | 根粗             | 褐化状况               |
|-----------------------------|------------------|--------------|--------------|--------------|----------------|--------------------|
| Active carbon concentration | Explant quantity | Rooting rate | Root number  | Root length  | Root thickness | Browning condition |
| 0.0                         | 29               | 93.2±5.9 a   | 10.25±0.42 a | 1.47±0.04 b  | 偏细 Thinness    | 中等 Medium          |
| 0.5                         | 34               | 96.7±5.8 a   | 8.71±0.15 b  | 1.21±0.20 c  | 偏细 Thinness    | 中等 Medium          |
| 1.0                         | 30               | 93.9±10.5 a  | 10.46±0.31 a | 1.73±0.12 a  | 较粗 Thickness   | 轻微 Slight          |
| 1.5                         | 26               | 81.4±16.0 a  | 6.61±0.11 c  | 1.32±0.03 bc | 较粗 Thickness   | 轻微 Slight          |



a. 1/2 MS+AC 0.0 g/L; b. 1/2 MS+AC 1.0 g/L; c. 1/2 MS+AC 1.5 g/L.

图3 活性炭对林荫银莲花组培苗生根的影响(培养55 d)

Fig. 3 Effects of active carbon concentration on rooting of regenerated shoots of *A. flaccida* culture for 55 days

### 3 讨论

植物激素是促进生根的生长调节物质,但不同植物根的诱导对激素种类和浓度的需要各不相同。如0.1 mg/L IBA能有效促进霍山石斛的根生长且根系发达<sup>[5]</sup>,添加0.5 mg/L IAA安祖花的生根率达100%<sup>[6]</sup>,也有研究发现激素的不同组合可产生较好的生根结果<sup>[7-8]</sup>,本试验也表明,0.5 mg/L IBA与0.5 mg/L NAA的组合对林荫银莲花组培苗根的诱导更有利,解决了单因子NAA诱导的根偏细的问题。

多数生根培养基选用蔗糖作为碳源,不仅提供碳源,也起调节培养基渗透势的作用,在使用中,碳源的最适浓度则依植物的种类而异,过低或过高会引起无根苗的饥饿或渗透压处于亚最适水平或超最适水平<sup>[9]</sup>。如华南忍冬生根培养需蔗糖质量浓度为15 g/L<sup>[10]</sup>,长柄扁桃诱导生根所需蔗糖质量浓度为40 g/L<sup>[11]</sup>。本试验结果表明,添加蔗糖30 g/L诱导出林荫银莲花根饱满、健壮。

活性炭在植物生根壮苗培养中使用广泛,如在药用植物刺山柑生根培养中添加100 mg/L活性炭,根和幼苗的质量较高<sup>[12]</sup>,其加入后可营造根系生长所需的黑暗环境,另外,它吸附色素和酚类等有害物质,减轻外植体的褐化<sup>[13]</sup>。在本试验中,活性

炭的上述作用表现明显(图3),尽管它也会通过吸附培养基中的生长物质不利于外植体生长<sup>[14]</sup>,但组培苗根较长且粗,说明适当用量的活性炭对林荫银莲花组培苗生根的促进作用大于抑制作用。

笔者以药用植物林荫银莲花不定芽组培苗为材料,探讨培养基的不同植物激素、不同质量浓度蔗糖和活性炭对组培苗生根的影响。结果表明,在优化后的条件下,林荫银莲花组培苗的生根率为93.9%,平均根条数为10.5,根长最长达1.73 cm,根较粗且褐化轻微;优化后的方法提高了再生根数量及质量,为组培苗移栽高成活率打下基础。

### 参 考 文 献

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1975:802.
- [2] 高燕妮. 地乌皂苷类化学成分的研究[D]. 武汉:湖北中医学院图书馆,2004.
- [3] 朱端卫,张忠池,杨特武,等. 离体快速繁殖地乌的方法:中国, 101390496[P]. 2009-03-25.
- [4] JIANG Q, DONG L, NING Z Y, et al. Establishment of somatic cell clones in *Thesium chinense Turcz* and its invitro rooting technique[J]. Agricultural Science & Technology, 2008, 9(5): 47-49.
- [5] 石玮,罗建平,黄秀彦. 生长调节物质对霍山石斛试管苗生根的影响[J]. 中草药, 2003, 34(10): 954-957.



- [6] 刘国锋,赵庆庆,包满珠.盆栽安祖花叶片愈伤组织诱导及植株再生的影响因素[J].华中农业大学学报,2009,28(3):356-360.
- [7] 吴月燕,刘秀莲,汪财生.乐昌含笑组织培养过程中根的诱导[J].园艺学报,2007,34(4):991-994.
- [8] 浦艳吉,李国怀,姚延兴,等.李茎尖离体培养与植株再生[J].华中农业大学学报,2009,28(2):214-217.
- [9] BERUTO M, LANTERI L, PORTOGALLO C. Micropropagation of tree peony (*Paeonia suffruticosa*) [J]. Plant cell, Tissue and Organ culture, 2004, 79: 249-255.
- [10] 陈良坚. 华南忍冬 (*Lonicera confusa*) 离体快繁体系的建立 [D]. 广州: 广州中医药大学图书馆, 2009.
- [11] 孙占育. 珍稀濒危植物长柄扁桃茎尖组织培养技术研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学图书馆, 2009.
- [12] 栗茂腾, 王艳婷, 甘露, 等. 药用植物刺山柑快繁再生体系的建立 [J]. 华中农业大学学报, 2007, 26(1): 25-29.
- [13] 付影, 荣俊冬, 陈礼光, 等. 植物组织培养中褐变问题研究进展 [J]. 亚热带农业研究, 2007, 8(3): 190-194.
- [14] 池源. 药用植物山乌龟的组织培养研究 [D]. 重庆: 西南大学图书馆, 2009.

## Optimization of Rooting Medium for Regenerated Shoots of *Anemone flaccida*

WANG Jun ZHU Duan-wei YANG Te-wu XIN Long GENG Ming-jian

Laboratory of Plant Nutrition and Ecological Environment Research of Huazhong Agricultural University/Microelement Research Center of Huazhong Agricultural University/Key Laboratory of Subtropic Agricultural Resource and Environment, MOA, Wuhan 430070, China

**Abstract** Effects of plant hormones, sucrose and active carbon contained in the culture medium on rooting of regenerated shoots were studied using regenerated shoots of *Anemone flaccida* as explants. The results showed that 1/2 MS supplemented with NAA 0.5 mg/L and IBA 0.5 mg/L, 30.0 g/L sucrose as carbon source and added with active carbon 1.0 g/L was suitable for rooting of *A. flaccida*. Under this medium the rate of rooting can reach up to 93.9%, number of root was 10.5 per explant and length of root was 1.73 cm (the longest). After culturing for 55 d root was more thick and less brown. Rooting system of *A. flaccida* can be optimized by increasing quantity and quality of regenerated root, thus increasing survival rate of transplanting.

**Key words** *Anemone flaccida* Fr.; regenerated shoots; rooting medium; plant hormones; sucrose; active carbon

(责任编辑:陆文昌)