

## 黄花倒水莲的组织培养和快速繁殖

杨国<sup>1</sup>, 罗洁<sup>3</sup>, 莫亿伟<sup>1</sup>, 陈红锋<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>绍兴文理学院生命科学院, 浙江绍兴312000; <sup>2</sup>中国科学院华南植物园, 广州510650; <sup>3</sup>绍兴文理学院元培学院, 浙江绍兴312000

**摘要:**以黄花倒水莲无菌实生苗的胚轴、茎段和叶片为外植体, 研究了不同植物生长调节剂对不同外植体的不定芽诱导的影响, 以及光照、有机添加物对不定芽增殖和生长的影响。结果表明: 培养基MS+BAP 2.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA 0.2  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 最利于茎段和胚轴诱导不定芽发生; 叶片在MS+2,4-D 4.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 培养基上培养30 d可诱导出愈伤组织, 转入MS+BAP 2.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA 0.2  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 培养基中培养20 d能分化成不定芽。当培养光照达到100  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 时, 最利于黄花倒水莲芽苗生长, 培养基中分别添加1 g $\cdot\text{L}^{-1}$ 蛋白胨、50 g $\cdot\text{L}^{-1}$ 椰汁和50 g $\cdot\text{L}^{-1}$ 香蕉, 均有壮苗的效果; 最佳的生根培养基是MS+2,4-D 0.5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 生根率达95.3%, 且根系生长良好; 移栽到混合基质(蚯蚓粪:黄泥土=2:1)中, 生长良好, 成活率达95%。

**关键词:** 黄花倒水莲; 药用植物; 离体快繁; 组织培养

黄花倒水莲(*Polygala fallax*)是远志科远志属灌木或小乔木, 分布于湖南、福建、广西、江西、广东和云南。黄花倒水莲属于珍贵中药材, 有土党参、黄花参等美称, 其根能滋补、强壮、祛风湿和舒经络, 治病后体虚、腰肌劳损、风湿关节痛、跌打损伤、急慢性肝炎、子宫下垂和月经不调(谢万宗等1996)。其根含有皂苷类、糖脂类、酮类、有机酸类等物质, 具有抗氧化、抗衰老、抗炎活血、调节血脂、抗病毒等作用(黄锋等2006; 李浩等2007)。黄花倒水莲夏季开花, 大而长的黄色总状花序异常美丽, 具有较高的观赏价值。据世界健康组织统计, 发展中国家80%人口的基本医疗保障都依赖于草药(Shinwari和Gilani 2003), 黄花倒水莲药用价值高, 更因早被民间所认知, 市场需求量大, 黄花倒水莲资源来源均依靠野生, 但野生资源有限, 过度的采集导致了黄花倒水莲资源严重短缺, 已被《中国的珍稀植物》评为近危种(邢福武2005)。因此, 人工繁育成为该植物资源合理保护、持续开发利用的必要途径。徐宏江等(2003)在广西调查发现黄花倒水莲在平地田间栽培不易成活, 而在与野生环境相似的山坡生境中较易栽培成活; 饶卫芳等(2015)利用IBA处理使黄花倒水莲扦插生根率达到95%以上。因此, 利用组织培养离体快繁技术短时间内生产出大量优质的种苗, 才能缓解野生黄花倒水莲资源不足, 为黄花倒水莲的开发利用与保护都提供可靠的保障。前人以黄花倒水莲含腋芽的茎段为外植体进行组织培养和快繁技术研究已取得成功(刘秀芳等2012)。本文以黄花倒水莲胚轴、茎段和叶片3种

不同外植体进行组织培养离体快繁技术的研究, 其中利用胚轴诱导丛生芽和利用叶片诱导愈伤组织进行不定芽分化均是第一次报道, 从多方面、多途径建立了黄花倒水莲的离体快繁再生体系, 解决了黄花倒水莲繁育问题。

## 材料与方法

### 1 试验材料及培养条件

本试验以黄花倒水莲(*Polygala fallax* Hemsl)成熟种子为材料, 种子于2012年采自广东省龙门南昆山省级自然保护区(113°90'E, 23°61'N), 将成熟和未成熟的种子用自来水洗净, 用纸擦干, 70%酒精擦拭30 s, 然后放入0.1%升汞溶液中消毒8 min, 无菌水冲洗5遍后用无菌滤纸吸干水分, 在无菌操作台上用小刀将种子外种皮去掉, 接入MS+BAP 1.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (单位下同)培养基中, 置于12 h $\cdot\text{d}^{-1}$ 光周期、光照50  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、温度25℃的培养室中培养。7 d左右, 种子开始萌发, 到20 d左右时, 取幼苗的胚轴为外植体, 30 d左右, 取幼苗茎段、嫩叶为外植体。

培养基主要成分: MS无机盐、维生素、3% (W/V)蔗糖和0.6%琼脂, 将pH调节到6.0。

### 2 试验方法

#### 2.1 黄花倒水莲胚轴外植体诱导不定芽发生

以20 d大的幼苗胚轴为外植体, 分别接入表1

收稿 2015-12-25 修定 2016-01-31  
资助 广东省林业科技创新项目(2015KJ CX037)和绍兴文理学院校级项目。

\* 通讯作者(E-mail: h.f.chen@scbg.ac.cn)。

表1 黄花倒水莲胚轴外植体诱导不定芽发生

Table 1 Effect of PGRs on shoot organogenesis from hypocotyl explants of *P. fallax*

| 植物生长调节剂/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | 不定芽诱导率/%                      | 平均不定芽数                       | 芽苗生长状况        |
|--------------------------------------------|-------------------------------|------------------------------|---------------|
| BAP 2.0                                    | 95.3 $\pm$ 4.14 <sup>ab</sup> | 7.5 $\pm$ 0.60 <sup>b</sup>  | 芽的生长状况良好      |
| TDZ 2.0                                    | 85.2 $\pm$ 5.01 <sup>ab</sup> | 4.6 $\pm$ 1.74 <sup>c</sup>  | 芽瘦小, 生长状况不佳   |
| BAP 2.0+NAA 0.2                            | 100 <sup>a</sup>              | 12.2 $\pm$ 0.80 <sup>a</sup> | 少量愈伤, 芽苗生长良好  |
| TDZ 2.0+NAA 0.2                            | 80.2 $\pm$ 9.40 <sup>bc</sup> | 6.2 $\pm$ 1.04 <sup>bc</sup> | 大量白色愈伤, 芽生长不佳 |
| BAP 5.0+NAA 0.2                            | 94.6 $\pm$ 4.99 <sup>ab</sup> | 4.1 $\pm$ 1.60 <sup>c</sup>  | 有部分玻璃化苗产生     |

不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ ), 下表同。

中的5种含不同浓度及组合激素的MS培养基中。培养30 d后观察结果, 记录不定芽诱导率(诱导出了不定芽的外植体数/外植体总数), 平均不定芽数, 以及不定芽生长状况。

2.2 黄花倒水莲茎段外植体诱导不定芽发生

以1个月大的黄花倒水莲无菌试管苗茎段为

外植体, 将它们切成1.5~2.0 cm大小的茎段, 依次接入表2中的12种含不同浓度及组合植物生长调节剂的MS培养基中。每个处理20个外植体, 共4瓶(12 cm $\times$ 8 cm), 每个处理重复3次, 30 d后观察结果, 记录不定芽诱导率, 繁殖系数, 以及不定芽生长状况。

表2 黄花倒水莲茎段诱导不定芽发生

Table 2 Effect of PGRs on shoot organogenesis from stem segment explants of *P. fallax*

| 植物生长调节剂/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | 不定芽诱导率/%                        | 繁殖系数                         | 芽苗生长状况         |
|--------------------------------------------|---------------------------------|------------------------------|----------------|
| BAP 2.0                                    | 95.3 $\pm$ 4.75 <sup>ab</sup>   | 3.8 $\pm$ 1.14 <sup>bc</sup> | 生长状况良好         |
| TDZ 2.0                                    | 75.3 $\pm$ 13.19 <sup>bc</sup>  | 2.8 $\pm$ 1.35 <sup>c</sup>  | 基部愈伤化, 芽长势较差   |
| KT 2.0                                     | 91.8 $\pm$ 7.45 <sup>abc</sup>  | 3.8 $\pm$ 1.51 <sup>bc</sup> | 生长状况良好         |
| ZT 2.0                                     | 70.1 $\pm$ 7.37 <sup>c</sup>    | 1.7 $\pm$ 0.26 <sup>c</sup>  | 芽瘦弱, 基部有愈伤     |
| BAP 2.0+NAA 0.2                            | 97.2 $\pm$ 2.55 <sup>a</sup>    | 8.0 $\pm$ 0.84 <sup>a</sup>  | 芽苗深绿色、健壮, 生长良好 |
| TDZ 2.0+NAA 0.2                            | 77.4 $\pm$ 11.73 <sup>abc</sup> | 3.1 $\pm$ 0.76 <sup>c</sup>  | 长势不佳, 有愈伤化     |
| BAP 5.0+NAA 0.2                            | 90.2 $\pm$ 6.41 <sup>abc</sup>  | 3.1 $\pm$ 0.76 <sup>c</sup>  | 叶片、茎干透明, 部分玻璃化 |
| TDZ 5.0+NAA 0.2                            | 72.9 $\pm$ 3.55 <sup>c</sup>    | 1.8 $\pm$ 0.35 <sup>c</sup>  | 叶片、茎干透明, 苗玻璃化  |
| KT 2.0+NAA 0.2                             | 97.9 $\pm$ 3.64 <sup>a</sup>    | 7.8 $\pm$ 1.19 <sup>a</sup>  | 芽苗深绿色、纤细, 生长良好 |
| ZT 2.0+NAA 0.2                             | 77.1 $\pm$ 4.45 <sup>abc</sup>  | 2.5 $\pm$ 0.50 <sup>c</sup>  | 芽苗瘦弱, 生长状况不佳   |
| BAP 2.0+IBA 0.2                            | 91.3 $\pm$ 3.63 <sup>abc</sup>  | 5.9 $\pm$ 1.28 <sup>ab</sup> | 芽苗深绿色、健壮, 生长良好 |
| TDZ 2.0+IBA 0.2                            | 74.8 $\pm$ 12.38 <sup>bc</sup>  | 2.4 $\pm$ 1.06 <sup>c</sup>  | 芽苗瘦弱, 生长状况不佳   |

2.3 黄花倒水莲叶片外植体诱导愈伤组织形成

将种苗的叶片分别接入表3中12种含不同浓度和不同组合激素的MS培养基中。每个处理20个外植体, 每个处理重复3次, 培养30 d后记录愈伤诱导率(诱导出了愈伤的外植体数/外植体总数), 将质量好的愈伤转接至培养基MS+BAP 2.0+NAA 0.2中, 诱导不定芽发生。

2.4 不同光照强度和有机添加物对黄花倒水莲茎段增殖和生长的影响

以MS+BAP 2.0+NAA 0.2为基本培养基, 黄花倒水莲茎段(3 cm)为外植体。将茎段分别放入光照为0、30、70、100、130  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的培养室

中培养; 设置MS对照、分别添加蛋白胨1 g $\cdot\text{L}^{-1}$ 、香蕉50 g $\cdot\text{L}^{-1}$ 、椰子汁50 g $\cdot\text{L}^{-1}$ 为壮苗培养基, 每个处理20个外植体, 每个处理重复3次, 培养30 d后观察结果, 统计茎段的增殖系数、每个外植体的鲜重和茎段平均长度。

2.5 黄花倒水莲试管苗的生根和移栽

以MS为基本培养基, 将3~4 cm高的茎段转接到IBA 5.0、NAA 5.0、IAA 5.0、2,4-D 5.0、2,4-D 1.0、2,4-D 0.5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的生根培养基中。30 d后统计生根率及根系生长状况, 将生根小苗基部清理干净, 移栽至遮阴温室的混合基质1(河沙:蛭石:腐殖质=1:1:2)和混合基质2(蚯蚓粪:黄泥土=2:1)中, 各

表3 黄花倒水莲叶片诱导愈伤  
Table 3 Effect of PGRs on induction of callus from leaf explants of *P. fallax*

| 植物生长调节剂/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | 愈伤诱导率/%                 | 愈伤生长状况          |
|--------------------------------------------|-------------------------|-----------------|
| BAP 2.0                                    | 0 <sup>e</sup>          | 无               |
| TDZ 2.0                                    | 13.5±2.7 <sup>cd</sup>  | 绿色, 较硬          |
| ZT 2.0                                     | 13.7±4.0 <sup>cd</sup>  | 绿色, 较硬          |
| 2,4-D 2.0                                  | 39.8±4.7 <sup>b</sup>   | 嫩黄色、疏松          |
| 2,4-D 4.0                                  | 54.4±6.5 <sup>a</sup>   | 黄绿色, 较紧密, 少许不定根 |
| BAP 2.0+NAA 0.2                            | 0 <sup>e</sup>          | 无               |
| TDZ 2.0+NAA 0.2                            | 14.3±3.3 <sup>cd</sup>  | 绿色, 较硬          |
| ZT 2.0+NAA 0.2                             | 17.8±2.8 <sup>cd</sup>  | 白色, 疏松          |
| TDZ 5.0+NAA 0.2                            | 20.7±3.3 <sup>c</sup>   | 白色, 疏松          |
| BAP 5.0+NAA 0.2                            | 7.1±6.3 <sup>de</sup>   | 白色, 疏松          |
| TDZ 2.0+2,4-D 0.2                          | 45.3±9.8 <sup>ab</sup>  | 绿色, 较紧密         |
| BAP 2.0+2,4-D 0.2                          | 11.8±2.7 <sup>cde</sup> | 绿色, 较少          |

100株, 30 d后统计各处理的组培苗移栽成活率。

2.6 数据分析

数据分析和数据处理采用Excel和SPSS16.0软件, 同列数据后小写英文字母不同者表示经LSD法检验差异显著( $P<0.05$ ), 百分数的差异显著性分析经过反正弦转换。

实验结果

1 胚轴外植体诱导不定芽发生

由表1可知, 当以胚轴为外植体时, 放入含BAP的MS培养基中, 15 d左右, 外植体开始膨大, 随后形成较多凸起(图1-A); 培养基MS+BAP 2.0+NAA 0.2 (单位 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )最利于胚轴诱导不定芽发生, 诱导率为100%, 平均不定芽数量达12.2个(图1-B)。BAP浓度增加到5.0时, 不定芽的诱导率有所下降, 不定芽数量大幅度减少, 而且不定芽分化出较多无用的愈伤, 芽苗的长势较差, 有部分芽苗透明水渍状。胚轴在含TDZ 2.0的MS培养基里诱导产生的不定芽生长状况不佳, 基部白色疏松愈伤较多。

2 茎段外植体诱导丛芽的发生

由表2可知, 在培养基中单独使用BAP、TDZ、KT和ZT时, 茎段都能够诱导出不定芽(图1-C), 其中诱导率最高的是BAP 2.0, 诱导率达到了95.3%, 繁殖系数为3.8; 当这些植物生长调节剂分别和NAA 0.2结合使用时, 不定芽的诱导率和繁殖系数均高于单独使用, 其中以MS+KT 2.0+NAA 0.2和MS+BAP 2.0+NAA 0.2这两种培养基的诱导效果

最好, 不定芽诱导率均达97%以上, 后者增殖系数为8.0, 芽苗深绿色, 生长状况较好(图1-D); 当培养基中BAP的浓度升高时, 不定芽的诱导率和繁殖系数则明显下降, 茎段基部容易形成白色、疏松、水渍状的愈伤, 新形成的芽苗也部分出现玻璃化, 长势较差; TDZ和NAA结合使用时, 芽苗长势差, 诱导效果不理想。

3 叶片外植体诱导愈伤形成

由表3可知, 叶片在2,4-D 2.0的MS培养基培养15 d, 叶片表面形成大量凸起, 培养30 d, 叶片形成嫩黄色的愈伤, 较疏松; 将培养基2,4-D浓度升高到 $4.0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 培养叶片形成黄绿色紧密的愈伤组织(图1-E), 诱导率达到54.4%。当BAP、TDZ、ZT与NAA结合使用, 叶片愈伤的诱导率都比较低, 诱导得到的愈伤质量较差, 无法进一步分化, 若将诱导出的愈伤转接到MS+BAP 2.0+NAA 0.2培养基上培养30 d, 发现只有2,4-D诱导出的愈伤组织可以分化成不定芽(图1-F), 其他的均不能形成不定芽。

4 不同光照和有机添加物的壮苗效果

在黑暗条件下培养30 d, 茎段的增殖系数非常低, 芽苗生长缓慢, 80%的芽苗都发生黄化; 当提高光照到30、70、100或 $130\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 时, 它们的增殖系数并无显著差异, 说明在有光条件下, 光照强弱对不定芽诱导并无影响, 但它们芽苗的生长状况却存在一定差异, 在 $30\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光照培养30 d时, 芽苗比瘦小且叶片发黄, 当光照增强到 $70\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 时, 芽苗生长状况有所好转; 光照为100



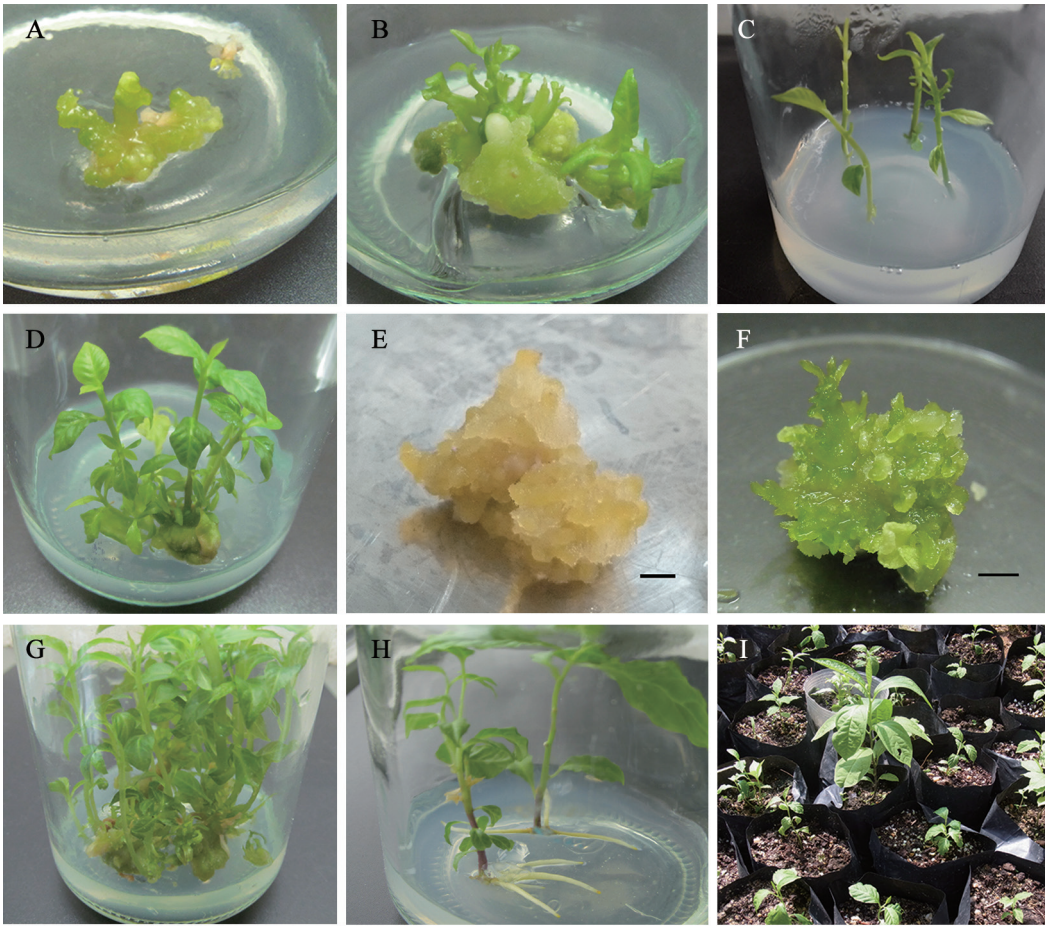


图1 黄花倒水莲不同外植体的离体快繁

Fig.1 Rapid propagation *in vitro* via different explants of *P. fallax*

A: 黄花倒水莲胚轴外植体在MS+BAP 2.0培养基上培养15 d左右; B: 胚轴在MS+BAP 2.0+NAA 0.2培养基上培养30 d后的不定芽丛; C: 茎段外植体; D: 茎段外植体在MS+BAP 2.0+NAA 0.2培养基上培养30 d后的芽丛; E: 叶片外植体在MS+2,4-D 4.0培养基上培养30 d后的愈伤; F: 叶片愈伤组织转接到MS+BAP 2.0+NAA 0.2培养基上继续培养20 d, 形成的不定芽; G: 茎段在MS+BAP 2.0+NAA 0.2培养基上增殖; H: 茎段在MS+2,4-D 0.5培养基上培养30 d左右, 根系形成; I: 黄花倒水莲幼苗移栽到混合基质(蚯蚓粪:黄泥土=2:1)中, 1个月后长大的植株。图中标尺=2 mm。

表4 不同光照强度对茎段增殖和生长的影响

Table 4 Effect of light intensity on shoot proliferation and growth of *P. fallax*

| 光照强度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ | 茎段增殖系数         | 外植体鲜重/g        | 平均茎段长度/cm      |
|-----------------------------------------------------------|----------------|----------------|----------------|
| 0                                                         | $1.9\pm0.36^b$ | $0.4\pm0.06^d$ | $1.2\pm0.21^c$ |
| 30                                                        | $7.4\pm0.36^a$ | $1.0\pm0.15^c$ | $1.6\pm0.15^b$ |
| 70                                                        | $7.7\pm0.44^a$ | $1.5\pm0.15^b$ | $2.6\pm0.17^a$ |
| 100                                                       | $8.1\pm0.78^a$ | $2.1\pm0.13^a$ | $3.0\pm0.30^a$ |
| 130                                                       | $7.7\pm0.32^a$ | $1.9\pm0.16^a$ | $2.9\pm0.21^a$ |

$\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 时, 芽苗生长状况最好, 茎段的增殖系数达8.1, 平均每个外植体的总生物量鲜重为2.1 g, 芽苗平均高达3.0 cm (表4, 图1-G)。

由表5可知, 培养基中添加适量的有机物对茎

段的增殖系数并无影响, 但这三种有机添加物对不定芽的生长有较大影响, 均能够增加茎段的长度和鲜重, 其中壮苗效果最好的是50 g·L<sup>-1</sup>椰子汁, 平均每个外植体的鲜重和芽苗长度最大。

表5 不同有机添加物对茎段增殖和生长的影响  
Table 5 Effect of organic additions on shoot proliferation and growth of *P. fallax*

| 有机添加物                   | 茎段增殖系数                | 外植体鲜重/g                | 平均茎段长度/cm             |
|-------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|
| MS对照                    | 7.4±0.56 <sup>a</sup> | 1.43±0.15 <sup>c</sup> | 1.8±0.26 <sup>c</sup> |
| 蛋白胨1 g·L <sup>-1</sup>  | 8.0±0.71 <sup>a</sup> | 1.87±0.12 <sup>b</sup> | 2.6±0.40 <sup>b</sup> |
| 香蕉50 g·L <sup>-1</sup>  | 8.0±0.85 <sup>a</sup> | 1.80±0.20 <sup>b</sup> | 2.4±0.35 <sup>b</sup> |
| 椰子汁50 g·L <sup>-1</sup> | 8.3±0.96 <sup>a</sup> | 2.40±0.17 <sup>a</sup> | 3.3±0.15 <sup>a</sup> |

5 黄花倒水莲生根和移栽

将4 cm左右的芽苗接入各类生根培养基中, 研究发现, NAA、IBA、IAA、2,4-D这几种生长素都能够诱导黄花倒水莲生根, 其中2,4-D的生根效果较好(表6), 当使用2,4-D 0.5时, 生根率达95.3%, 平均生根数量为4.5 (图1-H), 2,4-D浓度高于0.5 μmol·L<sup>-1</sup>时, 芽苗基部容易形成愈伤, 不易生根。

表6 黄花倒水莲的生根培养  
Table 6 Rooting of *P. fallax*

| 植物生长调节剂/μmol·L <sup>-1</sup> | 生根率/%                   | 平均生根数量                 |
|------------------------------|-------------------------|------------------------|
| NAA 5.0                      | 40.5±8.15 <sup>c</sup>  | 1.6±0.60 <sup>c</sup>  |
| IBA 5.0                      | 36.6±4.74 <sup>c</sup>  | 2.0±0.56 <sup>bc</sup> |
| IAA 5.0                      | 37.6±11.19 <sup>c</sup> | 1.3±0.20 <sup>c</sup>  |
| 2,4-D 5.0                    | 76.8±6.53 <sup>b</sup>  | 2.8±0.66 <sup>b</sup>  |
| 2,4-D 1.0                    | 90.9±4.72 <sup>a</sup>  | 3.9±0.40 <sup>a</sup>  |
| 2,4-D 0.5                    | 95.3±5.91 <sup>a</sup>  | 4.5±0.51 <sup>a</sup>  |

选取生长良好的生根幼苗, 用自来水将生根的黄花倒水莲幼苗基部清理干净, 再将小苗移栽至遮阴温室的混合基质1 (河沙:蛭石:腐殖质=1:1:2)和混合基质2 (蚯蚓粪:黄泥土=2:1)中, 30 d后。结果发现, 混合基质1的幼苗成活率达85.0%, 混合基质2的幼苗成活率达95.0% (图1-I)。

讨 论

本试验以黄花倒水莲的胚轴、茎段、叶片三种材料作为外植体, 通过两种途径构建了黄花倒水莲的植物再生体系, 第一种是从生芽的诱导, 第二种是通过愈伤组织诱导器官发生。本研究发

现, Thomas和Shankar (2009)研究发现培养基MS+BAP 4.0+NAA 1.0最利于药用植物*Sarcostemma brevistigma*丛生芽的诱导, 同样, BAP对美国红叶紫薇、楝树、穿心莲等丛生芽的诱导作用明显(陈怡佳等2015; Husain和Anis 2009; Purkayastha等2008)。本研究发现2,4-D有利于黄花倒水莲叶片外植体愈伤的诱导, 而2,4-D也大量应用于其他植物的愈伤诱导中, Gueye等(2009)发现2,4-D对枣椰树叶片愈伤的诱导有着较佳的效果, 甘蔗茎尖在2,4-D培养基上能诱导出黄色、紧密、节状的愈伤组织(Tahir等2011)。通过植物愈伤组织培养获取次生代谢产物的技术已得到了广泛的应用(Robles-Martínez等2016), Cetin (2014)研究发现紫外线处理能显著地提升了葡萄的愈伤组织次生代谢产物的积累; 同样, 愈伤组织的培养也是获得转基因植株的关键因素之一(Lai等2014)。添加适量的有机添加物能够促进黄花倒水莲芽苗的生长, 有壮苗的效果。在兰科植物的组培中, 有机添加剂经常用于促进原球茎和不定芽的生长, 添加适量的有机添加物能有效的改善万代兰原球茎的增殖(Gnasekaran等2012)。

随着人类对药用植物的需求增加, 野生的药用植物资源已经无法满足市场的需求, 特别是一些珍稀的药用植物, 受到人类无节制的采集, 其种群数量和生境面积已日益减少。组织培养离体快繁技术已成为保护和利用这些珍稀药用植物资源必不可少的技术手段, 大量的珍稀药用植物已经通过组培离体快繁技术实现了资源的保存, 并解决了市场的需求(Amoo等2009; 马英姿等2015; Guo等2007)。本文从多角度研究了黄花倒水莲组织培养和离体快繁技术, 解决了这种珍稀药用植物繁育问题, 能够短时间内生产出大量优质的种苗, 缓解了黄花倒水莲野生资源的压力, 为黄花倒水莲的开发利用与保护提供了可靠的保障, 黄花

倒水莲愈伤组织的成功诱导也为日后次生代谢产物的提取以及转基因育种方面的研究奠定了实验基础。

### 参考文献

- Amoo SO, Finnie JF, Staden JV (2009). *In vitro* propagation of *Huerania hystrix*: an endangered medicinal and ornamental succulent. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 96 (3): 273–278
- Cetin ES (2014). Induction of secondary metabolite production by UV-C radiation in *Vitis vinifera* L. *Öküzgözü* callus cultures. *Biol Res*, 47 (1): 37
- Chen YJ, Cui YY, Zhang XM, Deng XM (2015). Tissue culture and rapid micropropagation of *Lagerstroemia indica* 'Pink Velour'. *Plant Physiol J*, 51 (6): 882–886 (in Chinese with English abstract) [陈怡佳, 崔媛媛, 张晓明, 邓小梅(2015). 美国红叶紫薇的组织培养与快速繁殖. *植物生理学报*, 51 (6): 882–886]
- Gnasekaran P, Poobathy R, Mahmood M, Samian MR, Subramaniam S (2012). Effects of complex organic additives on improving the growth of PLBs of *Vanda Kasem's* delight. *Aust J Crop Sci*, 6 (8): 1245–1248
- Gueye B, Morcillo F, Collin M, Gargani D, Overvoorde P, Aberlenc-Bertossi F, Tranbarger TJ, Sane D, Tregear JW (2009). Acquisition of callogenic capacity in date palm leaf tissues in response to 2,4-D treatment. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 99: 35–45
- Guo B, Gao M, Liu CZ (2007). *In vitro* propagation of an endangered medicinal plant *Saussurea involucre* Kar. et Kir. *Plant Cell Rep*, 26 (1): 261–265
- Huang F, Lin LL, Hu JJ, Liu AL, Xiao PG, Du GH (2006). Antioxidant effect of *Polygala fallax* Hemsl. *Chin J Nat Med*, 4 (4): 291–294 (in Chinese with English abstract) [黄锋, 林黎琳, 胡娟娟, 刘艾林, 肖培根, 杜冠华(2006). 黄花倒水莲抗氧化活性研究. *中国天然药物*, 4 (4): 291–294]
- Husain MK, Anis M (2009). Rapid *in vitro* multiplication of *Melia azedarach* L. (a multipurpose woody tree). *Acta Physiol Plant*, 31 (4): 765–772
- Lai SJ, Lai MC, Lee RJ, Chen YH, Yen HE (2014). Transgenic *Arabidopsis* expressing osmolyte glycine betaine synthesizing enzymes from halophilic methanogen promote tolerance to drought and salt stress. *Plant Mol Biol*, 85: 429–441
- Li H, Wang QJ, Yuan L, Zhu DN (2007). The lipid regulating effects of *Polygala* total saponin in hyperlipidemia quails. *Chin J Nat Med*, 5 (4): 289–292 (in Chinese with English abstract) [李浩, 王秋娟, 袁林, 朱丹妮(2007). 黄花倒水莲总皂苷对鹌鹑高脂血症模型的调脂作用. *中国天然药物*, 5 (4): 289–292]
- Liu XF, Lin WG, Su MH, Chen SH, Wu MH (2012). Study on tissue culture techniques for *Polygala fallax* Hemsl. *Seed*, 31 (2): 57–59 (in Chinese with English abstract) [刘秀芳, 林文革, 苏明华, 陈绍煌, 吴美华(2012). 黄花倒水莲(*Polygala fallax* Hemsl.) 组培快繁技术研究. *种子*, 31 (2): 57–59]
- Ma YZ, Liu JH, Xu H, Liu F (2015). *In vitro* culture of *Huperzia serrate*. *Plant Physiol J*, 51 (4): 465–470 (in Chinese with English abstract) [马英姿, 刘江海, 许欢, 刘芬(2015). 蛇足石杉的离体培养. *植物生理学报*, 51 (4): 465–470]
- Purkayastha L, Sugla T, Paul T, Solleti S, Sahoo L (2008). Rapid *in vitro* multiplication and plant regeneration from nodal explants of *Andrographis paniculata*: a valuable medicinal plant. *In Vitro Cell Dev-Pl*, 44: 442–447
- Rao WF, Cai ML, Chen C, Li QL, Ding WN, Zhang DS, Zeng W (2015). Effects of different growth regulators and substrates on the rooting of *Polygala fallax* cuttings. *Guangdong For Sci Technol*, 31 (3): 62–64 (in Chinese with English abstract) [饶卫芳, 蔡梅玲, 陈聪, 李秋兰, 丁文恩, 张冬生, 曾伟(2015). 不同生长调节剂及基质对黄花倒水莲扦插生根的影响. *广东林业科技*, 31 (3): 62–64]
- Robles-Martínez M, de la Rosa APB, Guéraud F, Negre-Salvayre A, Rossignol M, Santos-Díaz MS (2016). Establishment of callus and cell suspensions of wild and domesticated *Opuntia* species: study on their potential as a source of metabolite production. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 124: 181–189
- Shinwari ZK, Gilani SS (2003). Sustainable harvest of medicinal plants at Bulashbar Nullah, Astore (Northern Pakistan). *J Ethnopharmacol*, 84: 289–298
- Tahir SM, Victor K, Abdulkadir S (2011). The effect of 2, 4-dichlorophenoxy acetic acid (2, 4-D) concentration on callus induction in Sugarcane (*Saccharum officinarum*). *Niger J Basic Appl Sci*, 19 (2): 213–217
- Thomas TD, Shankar S (2009). Multiple shoot induction and callus regeneration in *Sarcostemma brevistigma* Wight & Arnott, a rare medicinal plant. *Plant Biotechnol Rep*, 3 (1): 67–74
- Xie WZ, Fan CS, Zhu BY (1996). *Chinese Herbal Medicine* (Vol. 1). Beijing: People's Medical Publishing House, 791–792 (in Chinese) [谢万宗, 范崔生, 朱北仪(1996). *全国中草药汇编*(上册). 北京: 人民卫生出版社, 791–792]
- Xing FW (2005). *Rare Plants of China*. Changsha: Hunan Education Press, 92–221 (in Chinese) [邢福武(2005). *中国的珍稀植物*. 长沙: 湖南教育出版社, 92–221]
- Xu HJ, Xu ZL, Zhu DN (2003). Resources investigation and determination of total saponin content in *Polygala fallax* from Guangxi. *J Plant Res Environ*, 12 (1): 47–49 (in Chinese with English abstract) [徐宏江, 徐增莱, 朱丹妮(2003). 广西黄花倒水莲资源调查及总皂苷含量比较. *植物资源与环境学报*, 12 (1): 47–49]



## Tissue culture and rapid propagation *in vitro* of *Polygala fallax*

YANG Guo<sup>1</sup>, LUO Jie<sup>3</sup>, MO Yi-Wei<sup>1</sup>, CHEN Hong-Feng<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Shaoxing University, Academy of Life Science, Shaoxing, Zhejiang 312000, China; <sup>2</sup>South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China; <sup>3</sup>Shaoxing University, Academy of Yuanpei, Shaoxing, Zhejiang 312000, China

**Abstract:** The regeneration system of tissue culture of *Polygala fallax* was established by utilizing its *in vitro*-derived hypocotyl, stem and leaf as explants. We analyzed the differentiations characteristics of different explants, and discussed affecting factors of tissue culture of hormone, light and additional nutrient. The results showed that MS+BAP 2.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA 0.2  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  was most suitable for adventitious buds induction from stem and hypocotyl explants, the callus were induced on MS+2,4-D 4.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  from the leaf explants, and achieved 54.4% induction rate after 30 days, adventitious buds appeared from the surface of callus induced on MS+BAP 2.0  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA 0.2  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  after 20 days. The plantlets grew well when the light was 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 1  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  peptone, 50  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  coconut juice and 50  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  banana were good for cultivating strong seedling. The best rooting medium was MS+2,4-D 0.5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , the rooting rate has reached 95.3%, Plantlets were transplanted to a potting mixture (2:1, wormcast: yellow mud) in trays with about 95% survival percentage.

**Key words:** *Polygala fallax*; medicinal plant; tissue culture; rapid propagation *in vitro*

---

Received 2015-12-25 Accepted 2016-01-31

This work was supported by Forestry Scientific Innovation Project of Guangdong (Grant No. 2015KJCX037) and Project of Shaoxing University.

\*Corresponding author (E-mail: h.f.chen@scbg.ac.cn).