

四川大叶黄精组培快繁技术*

陆静 张赤红** 吴瑜**

中国科学院成都生物研究所 成都 610041

摘要 黄精市场需求量不断增加, 较低的自然繁殖速度难以满足人们的需求. 通过组织培养技术, 建立黄精快速繁殖技术体系, 可以高效获得大量优质种苗在生产上应用. 首次以四川主栽品种大叶黄精地下根茎芽为外植体进行组培快繁体系的初步研究. 结果显示: 外植体消毒先用0.5 g/L的多菌灵溶液预处理12 h, 再用0.2% HgCl₂灭菌6 min + 6 min, 污染率可得到有效控制; 四川大叶黄精根茎芽最适宜的初代培养基为MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.5 mg/L, 萌发率达35%, 长势健壮; 不定芽分化培养基为MS + 6-BA 3.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L, 平均不定芽诱导个数为4.33个; 壮苗培养基为MS + 6-BA 1.5 mg/L + 2,4-D 0.5 mg/L + GA₃ 0.5 mg/L; 生根培养基为1/2 MS + NAA 1.0 mg/L + IBA 0.2 mg/L + AC 0.2 g/L, 生根率达89%. 本研究表明以大叶黄精的地下根茎芽为外植体可快速获得大量组培苗, 其中细胞分裂素6-BA在大叶黄精生长过程中起着重要作用, 结果可为四川提供便捷优质大叶黄精供苗途径. (表5 参26 附图4)

关键词 大叶黄精; 根茎芽; 组织培养; 快繁体系
CLC Q813.12

Investigating tissue culture technique of a *Polygonatum kingianum* variety distributed in Sichuan*

LU Jing, ZHANG Chihong** & WU Yu**

Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China

Abstract Current methods to propagate *Polygonatum sibiricum* are struggling to meet the rapidly increasing demand for *Polygonatum*. In order to provide high quality *P. kingianum* Coll. et Hemsl. var. *grandifolium* D. M. Liu et W. Z. Zeng, predominant cultivars of *P. sibiricum* in Sichuan, we developed a rapid micropropagation system using rhizome buds as explants. The results show that the contamination rate can be effectively controlled when the explants were pretreated with 0.5 g/L carbendazim solution for 12 h, before being sterilized with 0.2% HgCl₂ for 6 min + 6 min. The optimal medium for primary culture was MS (Murashige and Skoog) + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.5 mg/L; the induction rate for this medium was 35.0%. The optimal medium for adventitious bud induction was MS + 6-BA 3.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L; the optimal medium for cultivating strong seeding was MS + 6-BA 1.5 mg/L + 2,4-D 0.5 mg/L + GA₃ 0.5 mg/L; the medium 1/2 MS + NAA 1 mg/L + IBA 0.2 mg/L + AC 0.2 g/L was suitable for the rooting and the rooting rate was 89%. A large number of tissue culture plantlets can be obtained quickly using the rhizome buds of *P. sibiricum* as explants. The cytokinin 6-BA plays an important role in the growth of *P. sibiricum*.

Keywords *Polygonatum kingianum* var. *grandifolium*; root bud; tissue culture; micro propagation system

黄精 (*Polygonatum sibiricum*), 为百合科黄精族黄精属 (*Polygonatum* Mill) 多年生草本药食两用植物, 其根状茎含多糖、黄酮及皂苷及等多种对人体有益的化学成分和活性物质, 具有补气养阴、健脾、润肺、益肾等功效^[1], 在制药和开发保健品方面具有广阔前景.

黄精属植物正处于野生变家种阶段, 品种较多, 迄今发现全球约有57个种, 其中我国分布有32种^[2], 《中国药

典》2015年版收录的滇黄精 (*Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl.)、黄精 (*Polygonatum sibiricum* Red.) 和多花黄精 (*Polygonatum cyrtoneura* Hua., 按形状不同, 习称大花黄精、鸡头黄精和姜形黄精) 为其原生药^[1]. 四川的主栽黄精品种——大叶黄精 (*P. kingianum* Coll. et Hemsl. var. *grandifolium* D. M. Liu et W. Z. Zeng, var. nov.) 被认为是滇黄精的变种^[3], 含有丰富的对人体有益的化学成分^[4].

黄精的自然繁殖方式有有性繁殖 (种子繁殖) 和无性繁殖 (根茎芽繁殖) 两种, 种子存在休眠期, 繁殖周期较长, 而根茎芽繁殖系数较低. 因此, 建立黄精组培快繁技术体系, 利用组织培养方式进行黄精快速育苗, 可以为黄精大面积生产提供优质苗, 满足市场需求. 黄精组培所用外植体以根茎

收稿日期 Received: 2018-11-26 接受日期 Accepted: 2019-02-26

*四川省科技计划项目 (2017NFP0053) 资助 Supported by the Sichuan Science and Technology Plan Project (2017NFP0053)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: 13269513488@163.com; wuyugood@126.com)

芽为优,由于土壤中各种有害生物的长期侵染,使得外植体灭菌成为组培中一大困难。此外,关于黄精组培中培养基的配制,研究者们进行了大量实验,探索了各种激素,如6-BA、NAA、2,4-D、GA₃、TDZ^[5]及KT^[6]等不同浓度配比,虽然结果大不相同,但几乎一致都认为细胞分裂素6-BA对黄精组培苗生长具有显著影响,然而6-BA的最佳浓度在不同报道中差距很大,比如就多花黄精的增值培养基而言,刘芳源等认为6-BA最佳浓度为1.0 mg/L^[7],莫勇生等认为是2.0 mg/L^[8],而刘红美等认为是4.0 mg/L,6-BA浓度范围从1.0-4.0 mg/L相差3 mg/L^[9]。关于6-BA与哪一种生长素配比更有利于黄精组培苗生长的讨论也有分歧,刘红美等认为6-BA与2,4-D配比有利于多花黄精组培苗的增值^[9],而周建金等认为6-BA与NAA配比更优^[10]。

四川是我国黄精主产区之一,大叶黄精是四川主栽品种,至今还未见组培方面的报道。本研究在前人研究的基础上,摸索出一套能够高效为根茎芽外植体消毒和适合大叶黄精组培苗各个阶段生长的最适培养基,建立了大叶黄精的组织培养体系,旨在为四川提供便捷优质大叶黄精供苗途径。

1 材料与方法

1.1 材料

大叶黄精根茎芽取自四川省乐山市马边彝族自治县山区。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体消毒 预处理 将黄精根茎上的泥土清洗干净,洗洁精浸泡30 min,清洗干净后,流水冲洗30 min,切成1 cm × 1 cm的带芽根茎。将这些带芽根茎分成4份,分别进行4个处理:加入0.2 g/L多菌灵处理24 h;0.5 g/L多菌灵处理12 h;1.0 g/L多菌灵处理12 h;清水浸泡做对照。

接种前表皮消毒 在无菌超净台中进行如下操作:75%的乙醇30 s→无菌水冲洗3遍→0.2%的HgCl₂ 6 min→无菌水冲洗3遍→0.2%的HgCl₂ 6 min→无菌水冲洗5遍→取出用无菌滤纸吸干水分,将与HgCl₂接触的切面部分切掉,余下边长约为0.5-1.0 cm的带芽根茎,接种到MS培养基上进行培养,每个处理接种100个,每瓶接种3个,每个处理3次重复,30 d后观察统计污染率和坏死率。

1.2.2 根茎芽的初代培养 将消毒实验中没有污染的根茎芽转接到初代培养基中,每个处理接种40个,每瓶接种3个,3次重复,45 d后观察并统计萌发率以及生长情况,筛选出适合黄精根茎芽的最佳初代培养基。

1.2.3 不定芽的诱导培养 将萌发的健壮根茎芽转接到诱导培养基中,每个处理接种30个,每瓶接种3个,3次重复,45 d后观察并统计不定芽的分化数、分化率以及生长情况,筛选出适合黄精不定芽分化的最佳培养基。

1.2.4 不定芽的壮苗培养 将分化出的不定芽切成单芽,转接到壮苗培养基上,每个处理接种30个,每瓶接种3个,3次重复,45 d后观察并统计壮苗情况,筛选出最佳的壮苗培养基。

1.2.5 生根培养 将粗壮无根苗接入生根培养基中培养,每个处理接种30株,45 d后统计生根数和生根率,选出大叶

黄精最佳生根培养基及处理。

以上培养基均附加30 g/L的蔗糖(生根培养基附加15 g/L蔗糖)、5.0 g/L琼脂、pH 5.8-6.0,在121 ℃下灭菌20 min。培养条件除生根暗处理外均是(25 ± 2) ℃,1 600 lx,连续光照16 h/d条件下培养。

1.2.6 炼苗与移栽 选取根数达3-4条,根长大于1 cm且长势良好的黄精组培苗100株进行炼苗。敞口炼苗3-5 d,取出用自来水洗净根部培养基,移栽到珍珠岩:蛭石 = 2:1的基质中,用0.1%的多菌灵溶液提前喷洒基质进行消毒,于温室中培养,每隔2 d浇水一次,7 d浇一次营养液,空气湿度保持在70%以上,观察其生长状况,45 d后统计成活率。

1.3 统计方法及数据处理

1.3.1 统计方法 污染率 = 污染个数/接种个数;坏死率 = 坏死数/接种个数;萌发率 = 萌发个数/接种个数;不定芽平均个数 = 诱导出的所有不定芽数/接种个数;生根率 = 生根苗数/接种苗数。

1.3.2 数据处理 方差分析是用Excel和SPSS软件完成。

2 结果与分析

2.1 多菌灵预处理对外植体消毒的影响

用不同浓度的多菌灵溶液对大叶黄精根茎芽外植体消毒预处理实验结果见表1,结果显示多菌灵低浓度长时间(0.2 g/L处理24 h)处理不但杀菌效果不好(污染率40.0%),而且坏死率还高(26.0%);中等浓度(0.5 g/L)多菌灵同样处理12 h后污染率显著($P < 0.05$)比高浓度(1.0 g/L)处理12 h低(附图1),中等浓度杀菌效果较好。所以大叶黄精根茎芽外植体最适合的预处理方法是用0.5 g/L多菌灵溶液处理12 h。

表1 多菌灵对外植体的预处理及结果

Table 1 Pretreatment and results of carbendazim on explants

处理 Treatment	多菌灵 Carbendazim ($\mu\text{g L}^{-1}$)	处理时间 Time (t/h)	污染率 Pollution rate (r/%)	坏死率 Necrosis rate (r/%)
1	0.2	24	40.0 ± 3.46 (a)	26.0 ± 4.35 (a)
2	1.0	12	32.0 ± 4.00 (ab)	15.0 ± 3.46 (b)
3	0.5	12	22.0 ± 3.00 (b)	13.0 ± 4.58 (b)
4	0	0	53.0 ± 6.24 (c)	14.0 ± 4.00 (b)

不同小写字母表示在0.05水平差异显著。

Small letters in brackets show significant difference at 0.05 level.

2.2 初代培养

为了检测大叶黄精组培最适合的基本培养基以及同浓度的生长素NAA和2,4-D中哪一种与细胞分裂素6-BA搭配更适合大叶黄精根茎芽的初代培养,设计了表2中5-10号培养基作为初代培养基,将长势基本一致的无菌大叶黄精带芽根茎接种到初代培养基上,45 d后统计结果见表2。结果显示6种培养基都可使根茎芽萌发,但是WPM培养基上的幼芽长势比MS培养基上的矮小,B5培养基上的苗长势正常,但不如MS上的健壮;6-BA与同浓度NAA配比要比与同浓度的2,4-D配比更适合芽的启动萌发。其中5,6,8与9号培养基差异显著;而其他各培养基间差异均不显著(附图2)。因此5号培养基MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.5 mg/L更适合大叶黄精根茎

芽的启动萌发。

2.3 不定芽诱导

为了探究6-BA与NAA、2,4-D哪个配合更适合大叶黄精不定芽的诱导,设计了11-25号共15个不定芽诱导培养基(表3)。萌发的健壮根茎芽转接到诱导培养基中45 d后统计结果见表3。结果显示6-BA的浓度对不定芽分化具有显著影响,6-BA浓度为2.0 mg/L的11-16号培养基与6-BA浓度为3.0 mg/L的17-22号培养基中平均不定芽个数基本上均有显著差异(附图3)。17-22号培养基中组培苗颜色暗绿,长势健壮,11-16号培养基中组培苗叶片翠绿,长势不如17-22号培养基。23-25号培养基虽然长势也健壮,分化出的芽数也较多,但是根茎上容易长出类似愈伤状的畸形块,分化出的苗部分也呈不规则形态,因此综合分析6-BA浓度为3.0 mg/L比较合适。细胞分裂素6-BA与生长素配合对芽分化的促进作用优于单独使用细胞分裂素,但是本实验中两种生长素与6-BA的配合效果差距不明显,0.2和0.4 mg/L两个浓度差距也不大,规律不明显。

本研究结果显示大叶黄精根茎不定芽诱导最佳培养基为18号培养基MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.2 g/L。

2.4 壮苗培养

组培苗健壮与否直接影响生根效率,因此在生根前必须对组培苗进行壮苗培养。将分化出的不定芽切下转接到不同的壮苗培养基中进行培养,45 d后观察结果见表4,28和31号培养基中组培苗的长势显然优于26、27、29和30号培养基,这说明培养基中加入0.5 mg/L的GA₃有助于壮苗培养。此外,26、27、29和30号培养基中组培苗的长势区别不明显,28号培养基中组培苗的长势稍好于31号培养基,说明6-BA与2,4-D搭配要比6-BA与NAA搭配有利于壮苗。所以6-BA与2,4-D、GA₃搭配有利于大叶黄精组培苗的壮苗。

2.5 生根培养

将前人研究的适合不同黄精品种的生根培养基作为待选生根培养基(32-37号培养基),在此基础上,本研究改良了3种培养基(38-40号)共同作为待选生根培养基。将壮苗培养

表2 不同培养基对根茎芽萌发的影响

Table 2 Effects of different media on the initiation of rhizome buds

处理 Treatment	基本培养基 Basic medium	6-BA ($\rho/\text{mg L}^{-1}$)	NAA ($\rho/\text{mg L}^{-1}$)	2,4-D ($\rho/\text{mg L}^{-1}$)	萌发率 Germination rate ($r/\%$)	生长情况 Growing situation
5	MS	0.5	0.5	0	35.0 ± 5.29	健壮, 绿色 Robust, green
6	MS	0.5	0	0.5	38.0 ± 8.71	正常, 绿色 Normal, green
7	B5	0.5	0.5	0	27.5 ± 5.89	正常, 绿色 Normal, green
8	B5	0.5	0	0.5	32.3 ± 4.97	正常, 绿色 Normal, green
9	WPM	0.5	0.5	0	15.0 ± 4.00	矮小, 绿色 Stunted, green
10	WPM	0.5	0	0.5	22.5 ± 5.07	矮小, 黄绿 Stunted, kelly

表3 不同培养基对不定芽分化的影响

Table 3 Effects of different media on adventitious bud differentiation

处理 Treatment	6-BA ($\rho/\text{mg L}^{-1}$)	NAA ($\rho/\text{mg L}^{-1}$)	2,4-D ($\rho/\text{mg L}^{-1}$)	接种数(个) No. of vaccinations (N)	平均不定芽个数(个) Average number of adventitious bud (N)
11	2.0	0	0	30	2.23 ± 0.54
12	2.0	0.2	0	30	2.63 ± 0.27
13	2.0	0.4	0	30	2.76 ± 0.23
14	2.0	0	0	30	2.30 ± 0.55
15	2.0	0	0.2	30	2.63 ± 0.64
16	2.0	0	0.4	30	3.23 ± 0.74
17	3.0	0	0	30	3.66 ± 0.33
18	3.0	0.2	0	30	4.33 ± 0.68
19	3.0	0.4	0	30	4.03 ± 0.54
20	3.0	0	0	30	3.27 ± 0.23
21	3.0	0	0.2	30	4.23 ± 0.38
22	3.0	0	0.4	30	3.77 ± 0.28
23	4.0	0	0	30	3.57 ± 0.34
24	4.0	0	0.2	30	3.67 ± 0.28
25	4.0	0	0.4	30	3.80 ± 0.38

表4 不同激素组合对壮苗的影响

Table 4 Effects of different hormone combinations on strong seedlings

处理 Treatment	6-BA ($\rho/\text{mg L}^{-1}$)	2,4-D ($\rho/\text{mg L}^{-1}$)	NAA ($\rho/\text{mg L}^{-1}$)	GA ₃ ($\rho/\text{mg L}^{-1}$)	长势 Growing situation
26	1.5	0.5	0	0.3	+++
27	1.5	0.5	0	0.4	++++
28	1.5	0.5	0	0.5	+++++
29	1.5	0	0.5	0.3	+++
30	1.5	0	0.5	0.4	++++
31	1.5	0	0.5	0.5	+++++

“+”号表示腋芽的生长趋势;“+”号越多表示其生长势越好。
“+” shows growth status of buds; the more “+”, the better growth potential.

基中的健壮无根苗接入待选生根培养基,生根情况见表5。虽然6种培养基中大叶黄精生根率没有显著差异(附图4),但38号改良培养基对大叶黄精无根组培苗生根效果最好。

本研究以38号培养基为基础,探索了加入马铃薯汁(100 g/L)、不同浓度的AC(0.2、0.5和1.0 g/L)、转接后暗培养一周、液体培养基以及接种前用100、150和200 mg/L IBA溶液浸蘸3 s对生根的影响,结果显示加入马铃薯汁、暗培养一周、液体培养基这三种方法都对生根不利。而培养基中加入0.2 g/L AC可使根变得更加粗壮,苗的长势也更加健壮。接种前用150 mg/L IBA溶液浸蘸能促进生根。

综合比较得出黄精最佳生根培养基为1/2 MS + NAA 1.0 mg/L + IBA 0.2 mg/L + AC 0.2 g/L,最佳处理是150 mg/L IBA浸蘸3 s。

2.6 炼苗与移栽

由于瓶内和瓶外环境差异很大,所以炼苗要逐步进行,一步跨越的环境差距不可太大,如首先将瓶盖拧开但不揭开,第2天揭开小口,第3天揭开半个盖子,第4天把瓶盖全部揭开,并适当洒一些水,让苗逐渐适应外界。炼苗5 d后洗去根部培养基,移栽到珍珠岩与蛭石比为2:1的基质中,先在温室中培养一段时间,再移到田间树荫下,45 d后统计成活率,达到85%以上。

3 讨论与结论

本研究表明在本实验条件下四川大叶黄精外植体最适消毒方式为先用0.5 g/L的多菌灵溶液预处理12 h,再用0.2% HgCl₂灭菌6 min + 6 min,污染率和坏死率分别低至22%和13%;外植体消毒和培养基的组配即是组培工作的两大重点也是两大难点。由于黄精根茎长期生长在土壤中,土壤中各种有害生物的侵染导致外植体灭菌工作格外难,灭的力度不够不能很好地去掉黄精根茎中的有害生物,灭的力度太大,又会对外植体的活力造成伤害甚至枯死,如果在常规杀菌

前,用内吸式杀菌剂对黄精根茎芽进行较长时间的预处理,污染率会大幅度降低。多菌灵是一种高效、低毒、低残留、广谱、内吸性且化学性质稳定的长效杀菌剂,可防治的病害种类约高达89种^[14]。赵双双等通过测定农用真菌抑菌剂百菌清、多菌灵和代森锰锌对白芨组培中常见污染真菌的抑菌活性,认为多菌灵0.05%浓度可完全抑制真菌生长,添加0.05%浓度的多菌灵可使白芨种子母瓶污染率从30%降低至2%,抑菌效果明显且不影响种子萌发^[15]。王斯彤研究显示用0.2 g/L多菌灵浸泡真菌污染的小叶朴外植体60 min能有效地控制污染,且具有较高的萌发率^[16]。在培养基中添加200 mg/L多菌灵也能抑制真菌污染,且效果优于多菌灵浸泡处理。

植物激素是调节植物生长发育的物质,既可以刺激植物生长,又可以抑制植物的生长,植物能够再生缺失的组织和器官,通过激素诱导可加快再生进程^[17],因此植物激素是影响组培苗生长发育的一个关键因素。植物组织培养中常用的激素主要有细胞分裂素和生长素两大类,少数培养基中还添加赤霉素GA₃等,其中细胞分裂素影响细胞的分裂、生长和分化,而生长素诱导刺激细胞分裂和根的分化,二者以不同浓度的配合使用,可以达到诱导分生苗增殖、促进组培苗生长以及诱导根的形成的目的^[18]。植物所需激素的种类和浓度在不同培养阶段是不同的,二者以适宜浓度配比使用有利于组培苗的生长发育,但是浓度过高或过低都会对组培苗长势造成一定的影响,比如,高浓度的细胞分裂素6-BA会抑制草莓苗鲜重的增加,导致株高降低,长势弱,并伴有黄化苗出现,而生长素NAA浓度显著影响草莓组培苗的生根情况^[19]。本研究通过比较细胞分裂素6-BA和生长素NAA及2,4-D不同浓度配比对大叶黄精组培苗不同生长阶段的影响,得出培养基MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.5 mg/L为四川大叶黄精根茎芽在本实验条件下的最适宜的初代培养基;培养基MS + 6-BA 3.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L为最适不定芽分化培养基,平均不定芽诱导个数为4.33个;壮苗最适培养基

表5 不同培养基对生根的影响

Table 5 Effects of different media on rooting

处理 Treatment	接种数 No. of vaccinations	基本培养基 Basic medium	NAA (μ g/mg L ⁻¹)	IBA (μ g/mg L ⁻¹)	培养基出处 Method source	品种 Variety	原文献中生根率 Rooting rate in the original literature (r/%)	本实验中生根率 Rooting rate in this experiment (r/%)
32	30	MS	0	0.7	李莺 ^[11] Li Y	黄精 <i>Polygonatum sibiricum</i>	90.40	78 ± 8.88
33	30	MS	1.0	0.2	周建金 ^[10] Zhou JJ	多花黄精 <i>Polygonatum cyrtonema</i>	93.52	75 ± 4.58
34	30	1/2 MS	0	0.7	刘红美 ^[9] Liu MH	多花黄精 <i>P. cyrtonema</i>	95.00	83 ± 14.41
35	30	1/2 MS	0.5	0.5	黄登艳 ^[12] Huang CY	黄精 <i>P. sibiricum</i>	88.89	86 ± 11.52
36	30	1/2 MS	1.0	0	周新华 ^[6] Zhou XH	多花黄精 <i>P. cyrtonema</i>	98.20	82 ± 7.93
37	30	1/3 MS	0.6	0	尹宏 ^[13] Yin H	黄精 <i>P. sibiricum</i>	98.00	80 ± 9.84
38	30	1/2 MS	1.0	0.2	本实验 This experiment	大叶黄精 <i>P. kingianum</i> var.	/	89 ± 7.21
39	30	1/3 MS	0.6	0.2	本实验 This experiment	大叶黄精 <i>P. kingianum</i> var.	/	85 ± 6.24
40	30	1/3 MS	0	0.7	本实验 This experiment	大叶黄精 <i>P. kingianum</i> var.	/	84 ± 6.24

为MS + 6-BA 1.5 mg/L + 2,4-D 0.5 mg/L + GA₃ 0.5 g/L, 加入GA₃的培养基长势健壮。

大叶黄精在本实验条件下的最适生根培养基为1/2 MS + NAA 1.0 mg/L + IBA 0.2 mg/L + AC 0.2 g/L, 最佳处理方式为接种前用150 mg/L IBA溶液浸蘸处理, 生根率达89%。影响组培苗生根的因素有很多, 激素种类和浓度、培养基类型、蔗糖浓度、光照、浸蘸浓度以及一些附加物, 如活性炭(AC)等的浓度都对组培苗生根有一定影响, 其中激素种类和浓度以及培养基类型影响最大^[20]。生长素对不定根的形成具有诱导作用, 不同种类的生长素诱导效果在不同的植物中表现不同^[21]。生长素IBA和NAA对不定根的诱导比生长素IAA要稳定^[22], 研究证明在多种植物中IBA对不定根的诱导作用效果较好^[23-25]。高浓度无机盐会使组培苗根少, 粗又短, 且为黄色, 不利于组培苗生根^[26], 因此一般不用完全MS诱导生根, 而是将大量元素适当减少, 其他如微量、有机元素保持不变。

大叶黄精是目前四川的主栽品种, 以其块头大、味道甘甜在市场上闻名, 但目前国内外对大叶黄精的研究报道极少, 尤其是在规范化快速繁殖栽培技术的相关研究。但关于不同激素配比上的组合实验, 以及不同生长阶段的组合实验上有待得出一个更好的更加经济的优化配方。

参考文献 [References]

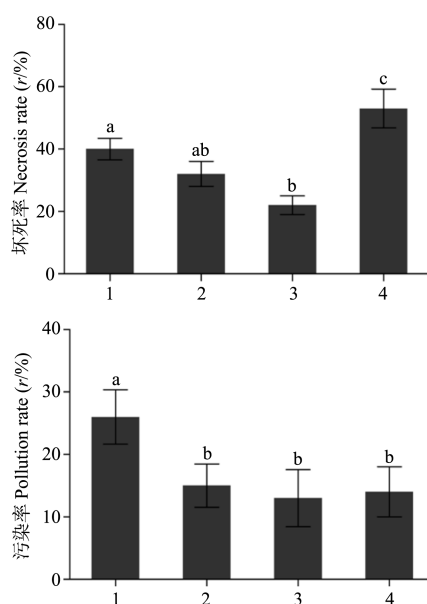
- 1 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015 [National Pharmacopoeia Commission. Chinese Pharmacopoeia [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2015]
- 2 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社. 2004 [Chinese Flora Editorial Board of the Chinese Academy of Sciences. Chinese Flora [M]. Beijing: Science Press. 2004]
- 3 四川植物志编委会. 四川植物志[M]. 成都: 四川人民出版社, 1981 [Sichuan Flora Editorial Board. Sichuan Flora [M]. Chengdu: Sichuan People's Publishing House, 1981]
- 4 Luo CP, Li W, Chuna Z, Wu Y. Discriminating five *Polygonatum* medical materials and monitoring their chemical changes associated with traditional process by FT-IR spectroscopy coupled with multivariate analysis [J]. *Vibr Spectr*, 2018, **99**: 104-112
- 5 程强强, 罗嗣义, 刘相凤, 肖复明. 多花黄精不定芽诱导及植株再生[J]. 南方林业科学, 2018, **46** (6): 47-50 [Cheng QQ, Luo SY, Liu XF, Xiao FM. The adventitious buds induction and plant regeneration of *Polygonatum cyrtoneura* [J]. *S Chin For Sci*, 2018, **46** (6): 47-50]
- 6 周新华, 厉月桥, 王丽云, 肖智勇, 钟文斌, 陈传松, 邓煌蔚, 黄维荣. 多花黄精根茎芽高效组培增殖和生根体系研究[J]. 经济林研究, 2016, **34** (1): 51-56 [Zhou XH, Li YQ, Wang LY, Xiao ZY, Zhong WB, Chen CS, Deng HW, Huang WR. An efficient proliferation and inducing roots system of tissue culture in *Polygonatum cyrtoneura* [J]. *Non-wood For Res*, 2016, **34** (1): 51-56]
- 7 刘芳源, 王钰, 开桂青, 谢枫. 多花黄精组培体系建立及薯蓣皂苷等含量测定[J]. 生物学杂志, 2017, **34** (6): 93-96 [Liu FY, Wang Y, Kai GQ, Xie F. Establishment of tissue culture system and determination of yam saponins and diosgenin in *Polygonatum sibiricum* Hua [J]. *J Biol*, 2017, **34** (6): 93-96]
- 8 莫勇生, 卢拓方, 邱展鸿, 张红岩, 孙文波. 多花黄精组培苗快速繁殖体系建立研究[J]. 中国现代中药, 2018, **20** (4): 445-449 [Mo YS, Lu TF, Qiu ZH, Zhang HY, Sun WB. Study on the tissue culture and rapid propagation system of *Polygonatum cyrtoneura* Hua [J]. *Mod Chin Med*, 2018, **20** (4): 445-449]
- 9 刘红美, 方小波, 夏开德, 杨苏文. 多花黄精组织培养快繁技术的研究[J]. 种子, 2010, **29** (12): 13-17 [Liu HM, Fang XB, Xia KD, Yang SW. Study on rapid micro propagation technology by tissue culture of *P. cyrtoneura* Hua [J]. *Seed*, 2010, **29** (12): 13-17]
- 10 周建金, 罗晓峰, 叶炜, 江金兰. 多花黄精组培快繁技术研究[J]. 福建农业科技, 2012, **9**: 59-61 [Zhou JJ, Luo XF, Ye W, Jiang JL. Tissue culture technique with rapid propagation for *Polygonatum cyrtoneura* Hua [J]. *Fujian Agric Sci Technol*, 2012, **9**: 59-61]
- 11 李莺, 王虹, 王晓臣, 赵兵, 杨婷. 鸡头黄精的组织培养与快速繁殖[J]. 陕西农业科学, 2011 (5): 104-108 [Li Y, Wang H, Wang XC, Zhao B, Yang T. Tissue culture and rapid micro propagation of *Polygonatum sibiricum* Red. [J]. *Shaanxi J Agric Sci*, 2011 (5): 104-108]
- 12 黄登艳, 陈泽雄. 黄精根茎高效离体再生体系的建立[J]. 湖北农业科学, 2014, **53** (5): 1182-1184+1188 [Huang DY, Chen ZX. Establishing efficient regeneration system *in vitro* for rhizomes of *Polygonatum sibiricum* Delar. ex Redoute [J]. *Hubei Agric Sci*, 2014, **53** (5): 1182-1184+1188]
- 13 尹宏, 韩娇, 袁新普, 邹翠霞, 姜长阳. 黄精无性系建立的研究[J]. 西南农业学报, 2009, **22** (4): 1065-1068 [Yin H, Han J, Yuan XP, Zou CX, Jiang CY. Establishment of asexual line of *Polygonatum sibiricum* Redoute [J]. *Southwest Chin J Agric Sci*, 2009, **22** (4): 1065-1068]
- 14 魏中华, 徐娟, 郭明霞, 石爱民, 孙继攻. 国内多菌灵的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2015, **43** (3): 125-127+141 [Wei ZH, Xu J, Guo MX, Shi AM, Su JG. Research progress of carbendazim in China [J]. *J Anhui Agric Sci* 2015, **43** (3): 125-127+141]
- 15 赵双双, 潘洁莉, 刘巧, 蒋福升, 陈开, 丁志山, 李美芽. 农用真菌抑菌剂对白及种子萌发及小苗生长分化的影响[J]. 浙江农业科学, 2017, **58** (4): 638-641 [Zhao SS, Pan JL, Liu Q, Jiang FS, Chen K, Ding ZS, Li MY. Effects of agricultural fungal inhibitors on seed germination and seedling growth and differentiation of *Bletilla striata* [J]. *Zhejiang Agric Sci*, 2017, **58** (4): 638-641]
- 16 王斯彤. 小叶朴组织培养无菌体系的建立[J]. 安徽农业科学, 2016, **44** (31): 153-155 [Wang ST. The establishment of tissue culture sterile system of *Celtis bungenana* [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2016, **44** (31): 153-155]
- 17 Ikeuchi M, Ogawa Y, Iwase A, Sugimoto K. Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms [J]. *Development*, 2016, **143** (9): 1442-1451
- 18 钱子刚. 药用植物组织培养[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 30-31 [Qian ZG. Tissue Culture of Medicinal Plants [M]. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 2007: 30-31]
- 19 吕娟, 龙秋梅, 普建春. 不同植物生长调节剂对草莓组培苗快繁的影响[J]. 现代农业科技, 2017, **21**: 121+125 [Lü J, Long QM, Pu JC. Effect of different growth regulators on tissue culture and rapid propagation of strawberry [J]. *Mod Agric Sci Technol*, 2017, **21**: 121+125]
- 20 赵展平, 何芳, 唐军荣, 罗旭璐, 赵平, 黄荐, 丁勇. 樟叶越桔组培苗生根和移栽技术研究[J]. 广西植物, <http://kns.cnki.net/kcms/detail/45.1134.q.20181208.0956.002.html> [Zhao ZP, He F, Tang JR, Luo XL, Zhao P, Huang J, Ding Y. Rooting and transplanting techniques of tissue culture plantlets of *Vaccinium dunalianum* [J]. *Guihaia*, <http://>

kns.cnki.net/kcms/detail/45.1134.q.20181208.0956.002.html]

- 21 Abdulaziz M, Bahrany AI. Effect of phytohormones on *in vitro* shoot multiplication and rooting of lime *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing [J]. *Sci Hort-Amsterdam*, 2002, **95** (4): 285-295
- 22 Al-Juboory KH, Skirvin RM, Williams DJ. Callus induction and adventitious shoot regeneration of gardenia (*Gardenia jasminoides* Ellis) leaf explants [J]. *Sci Hort-Amsterdam*, 1998, **72** (3-4): 171-178
- 23 Fracro F, Echeverrigaray S. Micropagation of *Cunila galioides*, a popular medicinal plant of South Brazil [J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2001, **64** (1): 1-4
- 24 张琳娜, 何俊, 张翔, 孟静. 弥勒芭苔组培苗生根及移栽基质的筛选

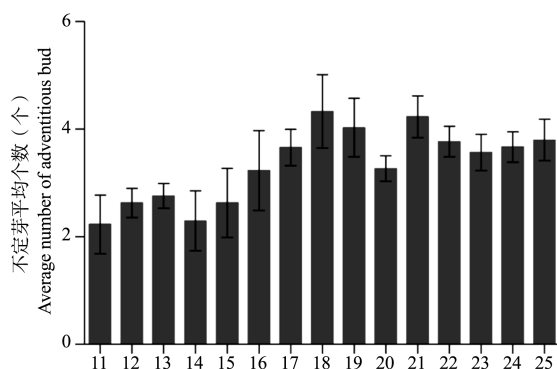
[J]. 西部林业科学, 2018, **47** (4): 69-73 [Zhang LN, He J, Zhang X, Meng J. Root induction and matrix optimization of *Paraisometrum mileense* tissue culture seedling [J]. *J W Chin For Sci*, 2018, **47** (4): 69-73]

- 25 徐航, 赵英, 韩晓燕, 牛建新. 沙棘组培苗瓶外生根技术研究[J]. 经济林研究, 2018, **36** (3): 182-186 [Xu H, Zhao Y, Han XY, Niu JX. Research of *Hippophae rhamnoides* plantlets *ex vitro* rooting technique [J]. *Non-wood For Res*, 2018, **36** (3): 182-186]
- 26 董林娜, 路群, 周根余. 北美红杉无性快繁技术的研究[J]. 上海农业学报, 2005, **21** (4): 67-70 [Dong LN, Lu Q, Zhou GY. Study on technique of rapid asexual propagation of *Sequoia sempervirens* Lindl [J]. *Acta Agric Shanghai*, 2005, **21** (4): 67-70]



附图1 大叶黄精块茎经不同浓度多菌灵处理不同时间后污染率和坏死率。不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. S1 Contamination rate and necrosis rate of *Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl. var. *grandifolium* D. M. Liu et W. Z. Zeng, var. nov. tubers treated with different concentrations of carbendazim at different times. Different letters show significant difference ($P < 0.05$).

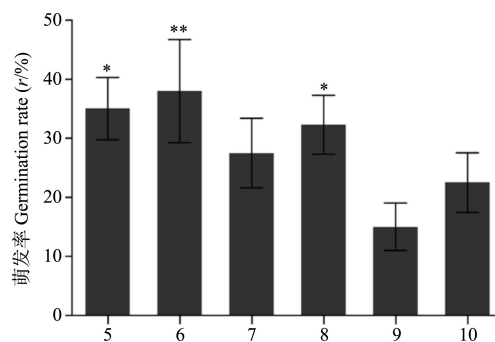


附图3 不同培养基中大叶黄精诱导出的不定芽平均个数。

Fig. S3 Average number of adventitious buds induced by *Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl. var. *grandifolium* D. M. Liu et W. Z. Zeng, var. nov. in different media.

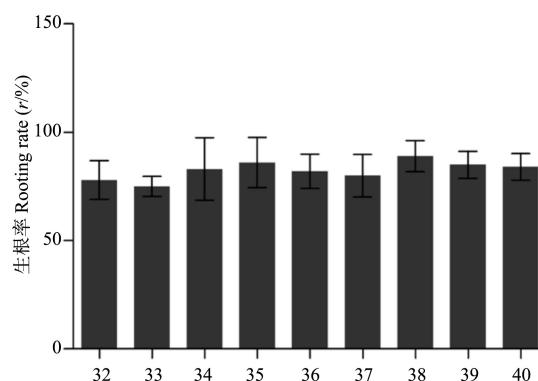
* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

11-17*, 11-18***, 11-19**, 11-21***, 11-22*, 11-24*, 11-25*, 12-18**, 12-19*, 12-21*, 13-18*, 13-21*, 14-18***, 14-19**, 14-21**, 14-22*, 14-25*, 15-18**, 15-19*, 15-21*.



附图2 不同培养基中大叶黄精根茎芽萌发率。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

Fig. S2 Germination rate of rhizome of *Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl. var. *grandifolium* D. M. Liu et W. Z. Zeng, var. nov. in different media. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.



附图4 不同培养基中大叶黄精生根率。

Fig. S4 Rooting rate of *Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl. var. *grandifolium* D. M. Liu et W. Z. Zeng, var. nov. in different media.