

肉穗草组织培养与扩繁研究

张绪璋,周以飞,潘大仁

(福建农林大学作物学院,福州 350002)

摘要:肉穗草是一种清凉解毒,用于防治肝炎的青草药,在福建闽南一带销量较大,目前野生资源日趋枯竭。肉穗草自然繁殖系数低,人工栽培采用分株或扦插繁殖成活率不高。采用植物组织培养技术,可以大量繁育种苗,供生产使用。以顶芽和茎段为材料,培养无菌苗,研究不同配比的激素对肉穗草生育的影响,结果表明:在附加 0.5mg/L BA 和 0.2mg/L NAA 的 MS 培养基上诱导丛生芽,成活率达到 41.67%;在附加 2.0mg/L BA+0.2mg/L NAA 的 MS 培养基上增殖效果最好,增殖率达到 7.47 倍;在 MS+0.1mg/L NAA+0.1mg/L IBA+活性炭 0.2%培养基上生根率达 100%。

关键词:肉穗草;组织培养;快速繁育

中图分类号:S567 **文献标识码:**A

Tissue Culture and Rapid Propagation of *Sarcopyramis bodinieri*

Zhang Xuzhang, Zhou Yifei, Pan Da' ren

(Crop College of Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002)

Abstract: *Sarcopyramis bodinieri* has the effect of cool antidote, and is widely used to treat hepatitis as a chinese herbal medicine. In southern area of Fujian has larger sales. But now, depletion of wildlife resources is increasing. Due to its low coefficient of natural reproduction and low survival rate of artificial cultivation division or cutting propagation, plant tissue culture is used for seed breeding for production use. In this paper the terminal buds and stems of *Sarcopyramis bodinieri* were used to breed no vaccine and study the effect of different hormones on growth and development. The survival rate of cluster shoots was 41.67% on MS medium supplemented with 0.5 mg/L BA and 0.2 mg/L NAA. When cultured on media supplemented with 2.0 mg/L BA and 0.2 mg/L NAA, the coefficient of multiplication was the best, about 7.47 times. Rooting of shoots was developed in MS medium supplemented with 0.1 mg/L NAA, 0.1 mg/L IBA and 0.2% activated charcoal. Its rooting rate could reach 100%.

Key words: *Sarcopyramis bodinieri*, tissue culture, rapid multiplication

肉穗草 (*Sarcopyramis bodinieri* Lé vl. etvan.), 又名褚头红, 凤柜斗草, 属牡丹科肉穗草属植物^[1], 草本。全株带紫红色, 茎脆弱, 有 4 棱。叶对生, 椭圆形, 边缘有细锯齿, 叶面粗糙, 疏生短毛, 花数朵簇生枝顶或叶腋, 夏季开花。蒴果倒圆锥形^[2]。生长于深山林下、沟边等阴湿处。分布于中国东南、西南及中南地区。肉穗草性平、味甘, 清热利湿, 消肿解毒, 可用于治疗急性黄疸肝炎、肺热咳嗽、风湿关节痛、无名肿毒等^[3]。肉穗草提取物具有清除羟自由基、清除超氧离子自由基、抗小鼠

肝脂质过氧化和抗小鼠肝损伤及抑菌作用^[4]。肉穗草在民间用于防病治病, 销量较大, 对野生肉穗草的大量采收已造成自然资源的严重破坏, 并且也无法满足市场需要。因此, 对肉穗草进行人工栽培是十分必要的。已有少量研究报道。陈得水进行了肉穗草林下栽培试验, 据其测算每公顷净收益可达 2.7 万~4.2 万元^[5]。但是, 肉穗草的栽培采用野生种苗分株繁殖和扦插繁殖难度较大, 幼苗成活率不高, 繁殖速度慢。采用组织培养方法可望获得大量种苗^[6], 以供快速繁育栽培, 因此

基金项目:省教育厅项目“福建野生肉穗草组织培苗生产技术研究”(JB05137)。

第一作者简介:张绪璋,男,1956 年出生,从事专业:作物遗传育种。通信地址:350002 福建省福州市仓山区建新镇金山 福建农林大学作物科学学院。Tel:0591-83778961, E-mail: zxz0508@163.com。

收稿日期:2008-04-03。修回日期:2008-05-08。

具有重要的现实意义。笔者在前期试验的基础上,进一步深入研究肉穗草组织培养,为今后的规模化和商品化生产开发,提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验时间、地点

试验于 2005~2006 年在福建农林大学作物科学学院遗传育种实验室进行。

1.2 试验材料

野外采集肉穗草植株,取其顶芽和带节的嫩茎段。

1.3 试验方法

1.3.1 外植体的获得 从野生肉穗草植株切下带顶芽的嫩茎段和带节的嫩茎段,用流水冲洗干净材料,用 75% 的酒精消毒 10s,再用 0.1% 的升汞溶液浸泡 8~12min,最后用无菌水冲洗 5~6 次。切下 0.5cm~1.0cm 带顶芽或带节的嫩茎段,分别接种到诱导培养基上。

1.3.2 培养基 供试的基本培养基为 MS 培养基。

(1)芽诱导培养基:①MS+0.5 mg/L BA+0.1 mg/L NAA。

(2)芽增殖培养基:②MS+1.0 mg/L BA+0.1 mg/L NAA;③MS+2.0 mg/L BA+0.2 mg/L NAA;④MS+3.0

mg/L BA+0.3 mg/L NAA。

(3)壮苗培养基:⑤MS+0.5 mg/L BA+0.1 mg/L NAA;⑥MS+0.5 mg/L BA +0.5mg/L NAA;⑦MS + 0.5mg/L BA+1.0 mg/L NAA。

(4)生根培养基:⑧MS+0.1mg/L NAA+0.1 mg/L I-BA+ 活性碳 0.2%;⑨1/2MS+0.1mg/L NAA + 活性碳 0.2%;

1.3.3 培养条件 诱导培养采用 50ml 的三角瓶,其余培养过程都采用 200ml 组培瓶。所有培养基均含白糖 30 g/L,琼脂 0.7%,pH5.6。培养温度为(25±2)℃,光照强度 1200~1500lx,光照 12h/d。

1.4 统计与分析

从生芽的诱导培养,取已消毒处理过的顶芽和茎段分别接种于诱导培养基上,每个处理 30 瓶,每瓶 2 个芽或 2 个茎段,记录接外植体的成活率、污染率和死亡率。

统计不同外植体在不同培养基的芽萌动速度、芽诱导率、从生芽增殖倍率、生根状况和移栽成活率。分析各个培养阶段的最佳培养基。芽的萌动速度以能见到芽生长的天数来表示;从生芽的增殖倍率以 1 个芽继代 1 次形成的新芽的数量来表示。生根状况以每株试管苗的生根数来表示。

表 1 不同部位和不同消毒时间的外植成活率

外植体	消毒时间/min	接种数量/个	成活率/%	消毒死亡率/%	污染率/%
顶芽	8	60	46.67	36.67	16.67
顶芽	12	60	30.00	70.00	0.00
茎段	8	60	40.00	33.33	26.67
茎段	12	60	50.00	43.33	6.67
平均值	10	60	41.67	45.83	12.50

2 结果与分析

2.1 外植体接种的成活率

从野生肉穗草植株切下顶芽和茎段各 60 个,经 0.1% 升汞消毒 8min 和 12min,二个处理后在 MS+0.5mg/L BA+0.1mg/L NAA 培养基上进行初代培养,结果见表 1。由表 1 可以看出,平均外植体总的接种成活率为 41.67%,平均外植体消毒死亡率为 45.83%,平均污染率为 12.5%。造成污染的大部份为细菌,少数是真菌污染。同一个部位的外植体不同消毒时间,其成活率、消毒死亡率和污染率差异很大,顶芽消毒时间 8 min 成活率 46.67% > 消毒死亡率 36.67 > 污染率 16.67;顶芽消毒时间 12min 消毒死亡率 70% > 成活率 30% > 污染率 0%;茎段消毒时间 8min 和 12min 都是成活率 > 消毒死亡率 > 污染率。不同部位的外植体用同一消毒时间效果不一样,消毒时间为 8min,顶芽成活率 46.67% > 茎段成活率 40%;消毒时间为 12min,

茎段成活率 50% > 顶芽成活率 30%。因此,用 0.1% 升汞消毒,肉穗草茎段消毒时间为 12min,顶芽消毒时间为 8min 较为理想。肉穗草诱导培养丛芽(图 1)。

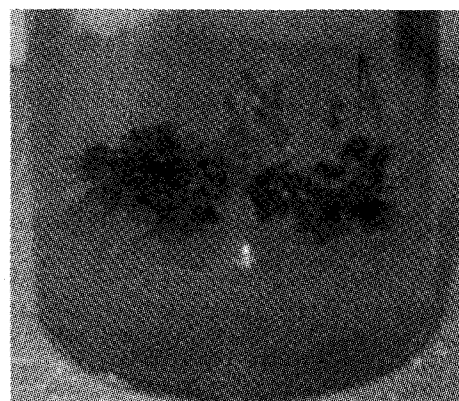


图 1 肉穗草丛芽

2.2 丛生芽的增殖

将经初代培养 30d 的无菌芽接种到增殖培养基②

表 2 培养基对肉穗草继代增殖的影响

编号	培养基 (MS) +		接种数/瓶	平均增殖倍数				显著水平
	BA/(mg·L ⁻¹)	NAA/(mg·L ⁻¹)		I	II	III	$\bar{x}$	
②	1.0	0.1	30	4.8	5.2	5.2	5.07	b
③	2.0	0.2	30	7.8	7.4	7.2	7.47	a
④	3.0	0.3	30	5.4	5	5.4	5.27	b

注:5%显著水平,相同字母没有差异,不同字母差异显著,下同。

~④中进行继代培养,每种培养基接 30 瓶,每瓶基数 3~6 株不等,30d 时进行统计,结果见表 2。

由表 2 可知,肉穗草在培养基③的丛生芽增殖效果最好,平均增殖倍数为 7.47,与培养基②、④相比达到显著水平,培养基④增殖倍数为 5.27 与②增殖倍数

5.07 相比,增殖倍数差异不显著。故,肉穗草丛生芽的增殖培养基 MS+2.0mg/L BA+0.2mg/L NAA 较适宜,采用③号培养基不加琼脂,用三角瓶接种苗后液体振荡培养,振幅 60r/min,种苗扩繁迅速,生长密集,30d 增殖倍数为 8.5。见图 2,图 3。

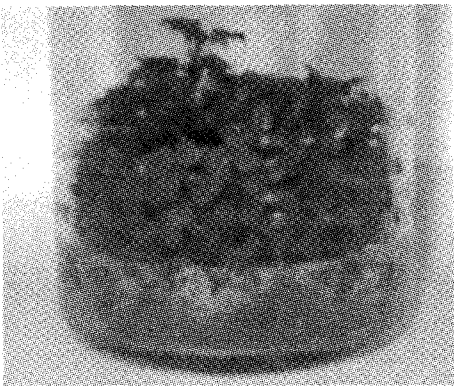


图 2 固体培养基增殖苗

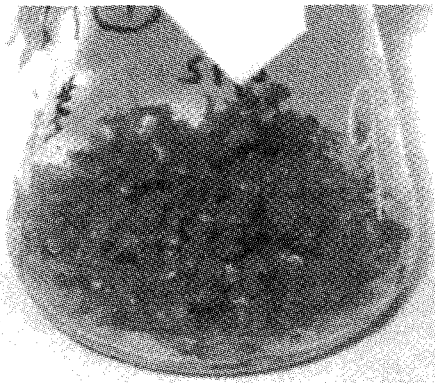


图 3 液体培养基增殖苗

表 3 不同培养基的成苗培养效果

编号	培养基 (MS) +		接种数/瓶	平均增长高度/cm				显著水平
	BA/(mg·L ⁻¹)	NAA/(mg·L ⁻¹)		I	II	III	$\bar{x}$	
⑤	0.5	0.1	30	1.6	1.62	1.63	1.62	b
⑥	0.5	0.5	30	2.08	2.1	2.1	2.09	a
⑦	0.5	1.0	30	2.62	2.6	2.63	2.62	a

2.3 壮苗培养

将从生芽切成小丛,2~3 株为 1 丛,接到壮苗培养基中进行继代培养。每瓶接 1 丛,30d 后,这些小丛苗生长旺盛、健壮,一般均出现 3 个以上的节位。从表 3 看出,⑦号培养基对促使丛芽茎节生长,成苗效果最好,平均增长高度 2.62cm,单株苗均长到 2~3 个茎节,4~7 片叶。经方差分析,⑥和⑦培养基的苗平均增长高度差异不显著;但与⑤号培养基相比差异达到显著水平。说明壮苗培养适宜的激素用量为 0.5mg/L BA+0.5~1.0mg/L NAA。

2.4 不同培养基对生根效果的影响

将继代过程中株高 3~4cm 的肉穗草从芽切割成单株后接种到⑧、⑨生根培养基上,在控温培养室中,15 d 开始有少数根生成,25 d 形成完整根系。组培苗不仅生长出根,而且单株苗继续长高长壮,这阶段是组培



图 4 生根苗

苗单株生长的旺盛阶段。见图 4。从表 4 可看出,培养基⑧MS+0.1mg/L NAA+0.1mg/LIBA+ 活性碳 0.2%和⑨ 1/2MS+0.1mg/L NAA + 活性碳 0.2%相比较,平均

表 4 不同培养基的生根效果

编号	培养基	生根率/%	试管苗 /株	平均根数 /(条·株 ⁻¹)	5%显著 水平	平均长度 /cm	5%显著 水平
⑧	MS+0.1 mg/LNAA+0.1 mg/L IBA +活性炭0.2%	100	30	4.8	a	2.45	a
⑨	1/2MS+0.1mg/L NAA +活性炭0.2%	100	30	3.4	b	1.62	b

单株根数和根长度⑧号培养基分别为 4.8 条和 2.45cm,⑨号培养基分别为 3.4条和 1.62cm。⑧号培养基的根长势效果明显比⑨号培养基效果好。统计分析结果差异达到显著水平。

2.5 炼苗与移栽

生根培养 25d 后,90%以上的小苗长出 3~6 个白

色细根,根长 1.0~3.0cm。这时可以打开瓶盖,在常温下炼苗 3d,然后将瓶苗取出,洗净附着在根部的培养基,用 0.1%的多菌灵消毒液浸泡 5min,种植到已消毒的疏松保湿的土壤中,放置在阴凉处培养。1 个月后,成活率达 70%以上。成活的小苗生长旺盛,整齐一致。见图 5。

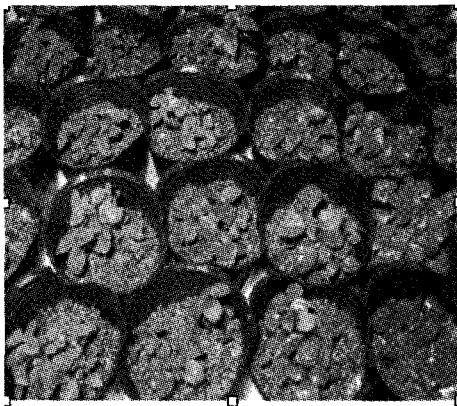


图 5 移栽苗

3 小结

试验结果表明,青草药肉穗草的组织培养芽诱导培养基为 MS+0.5mg/L BA+0.1mg/L NAA,诱导率可达 41.67%。外植体采用 0.1%的升汞溶液消毒,顶芽消毒 8 min,茎段消毒 12min 为宜。适宜的芽增殖培养基为 MS+2mg/L BA+0.2mg/L NAA,可采用固体或液体培养,增殖率达到 7.47 倍。适宜的生根培养基为 MS+0.5mg/L NAA+0.5mg/LIBA。生根率达 100%,生长良好。快速繁育技术已获得成功,将对野生资源的保护和有关药剂的开发提供一定的技术参考。

参考文献

[1] 林来官.福建植物志(第四卷)[M].福州:福建科学技术出版社,1989:

122-124.
[2] 赵秀贞.袖珍青草药彩色图谱 [M]. 福州: 福建科学技术出版社, 2001:632-633.
[3] 福建省医药研究所编.福建药物志(第一册)[M].福州:福建人民出版社,1977:339.
[4] 李清禄,陈强,何海斌.楮头红提取物的生物活性研究[J].中国药学杂志.2007,42(17):1292-1295.
[5] 周以飞,潘大仁,张绪璋,等.肉穗草的组织培养与快速繁殖[J].植物生理学通讯.2005,41(3):346.
[6] 陈得水.东方肉穗草林下栽培技术[J].《林业科技开发》.2004,18(6): 76.