

药用植物刺山柑快繁再生体系的建立*

栗茂腾 王艳婷 甘露 李红 付春华 余龙江**

(华中科技大学生命科学与技术学院, 武汉 430074)

摘要 以药用植物刺山柑种子为材料,探讨了不同生长调节剂对种子萌发、芽诱导增殖和生根的影响。结果表明:利于种子萌发的启动培养基为MS附加1.0 mg/L 6-BA和2%蔗糖。从无菌苗上切取下胚轴进行不定芽诱导,其最适芽诱导增殖培养基为:MS+0.10 mg/L 6-BA+0.02 mg/L NAA,在该培养基上其增殖率可达5~6倍。利于生根的培养基为MS附加1.00mg/L IBA和100 mg/L活性炭。本研究初步建立了刺山柑组织培养及植株再生体系。

关键词 刺山柑; 无菌苗; 下胚轴; 组织培养; 植株再生

中图分类号 Q 813.1⁺²; S 567.23⁺⁹ **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2007)01-0025-05

刺山柑为白花菜科山柑属植物,主要分布于西班牙、地中海湾地区,在我国新疆、甘肃、西藏等地也广有分布^[1]。刺山柑具有发达的根系和木质部,能够高效利用地下水资源,被认为是典型的荒漠植物之一^[1,2]。刺山柑含有挥发油、生物碱类、类黄酮类、萜类以及芥子油甙等物质^[3~5],其叶、果、根皮均可入药,在抗菌、抗炎、抗氧化、抗高血压、降血糖血脂、利尿、治疗痛风 and 风湿等方面均有一定的功效^[6~8]。野外调查发现,由刺山柑为建群种所形成的荒漠植物群落多呈小面积零星分布,群落的层次结构极其简化,群落的种类组成也十分贫乏^[1]。刺山柑现有种群数量稀少以及种子萌发相对困难等特点导致了该资源的匮乏。采用组织培养方法可以快速繁殖刺山柑种苗,对生态保护和资源利用等方面都具有重要的意义。目前,通过组织培养的方式对药用植物刺山柑进行快速繁殖的研究还未见报道。本试验对刺山柑种子萌发、芽的诱导、继代增殖、培养苗生根进行了初步研究,期望为深入研究刺山柑组织培养技术、建立和完善刺山柑的快繁体系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料刺山柑(*Capparis spinosa* L.)种子取

自新疆喀什。

1.2 无菌苗获得

萌发预试验显示,刺山柑种子在自然条件下,萌发率极低且萌发过程受种皮阻碍的影响较大,故在接种前将种子去除种皮。去皮种子首先以70%的酒精浸泡30 s,然后用0.1%氯化汞消毒12 min,无菌水冲洗3~4次后接种于启动培养基中。启动基本培养基为MS培养基附加不同浓度的蔗糖以及不同浓度的6-BA或GA₃。播种30 d后考察材料的萌发以及成苗情况,统计标准参照张风娟等方法^[10]。

萌发率=萌发的种子数/接入的种子数×100%

平均萌发天数=各种子萌发的总时间/萌发的种子数

成苗率=成苗的种子数/接入的种子数×100%

1.3 诱导及继代增殖培养

无菌条件下切取试管苗的下胚轴成1~2 cm的小苗转接到增殖培养基上。将再生的高于1 cm的芽苗分割成单芽,接种在生根培养基上。在1/2MS基本培养基上,添加了IBA与活性炭的组合,设计二因子三水平的完全试验,每处理接种40个芽苗,30 d后统计生根情况。在诱导试验的基础上,进一步设计了6-BA、NAA的浓度配比以分析激素对芽苗增殖的影响。每处理接种30~40个下胚轴小段,2次重复。培养30 d后,统计平均芽数、芽生长系数,统计方法参照赖家业等报道^[11],统计数据为2次试验结果的平均值。

收稿日期:2006-12-06

* 国家自然科学基金中国西部环境与生态重大研究计划(90202016)资助和岩溶动力学重点实验室开放基金资助

** 通讯作者。E-mail: yulongjiang@hust.edu.cn

栗茂腾,男,1972年生,博士,副教授。工作单位:华中科技大学生命科学与技术学院,武汉 430074

平均芽数=增殖后有效芽数/接种芽数

芽生长系数=高于 2 cm 芽数/接种芽数

1.4 生根培养

试验选取生长健壮的芽苗,切成 2 cm 左右的小苗,接于生根培养基中。生根培养 30 d 后统计生根率和平均生根数^[12]。

生根率=(生根的芽苗数/接种芽苗数)×100%

平均生根数=生根条数/生根的芽苗数

2 结果与分析

2.1 刺山柑种子无菌培养过程中的萌发、生长情况

培养约 5 d 后,种胚开始萌动,胚体积明显增大。培养 2 周后,部分胚变绿,随后伸展出 2 片子叶,也有部分胚先伸展出根,根前端附生大量白色根毛。随着培养时间的延长,下胚轴不断伸长,根部有紫色分泌物,并发出黄褐色根。

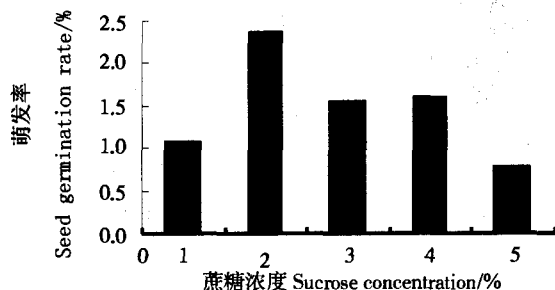


图 1 不同浓度的蔗糖对刺山柑萌发的影响

Fig. 1 The influence of different concentration of sucrose on the germination of *Capparis spinosa* L.

研究表明,刺山柑种子在离体培养过程中,较低浓度的蔗糖有助于提高种子的萌发效率(图 1,图 2-a)。自然情况下刺山柑种子具有一定程度的休眠,为打破休眠,本试验加入了系列浓度梯度的 6-BA 或 GA₃。

方差分析表明,6-BA 或 GA₃ 对解除刺山柑种子休眠、促进萌发以及成苗都有极显著作用(表 1)。从表 1 可以看出,6-BA 在 0~2.0 mg/L 的浓度范围内,对刺山柑种子萌发率和成苗率都有显著作用,萌发率随浓度的提高而提高,但有效苗率(成苗率/萌发率)却呈下降的趋势,在无激素诱导情况下,萌发率很低,但有效苗率高(表 1)。权衡萌发率、平均萌发天数以及成苗率等因素,当 6-BA 浓度为 1.0 mg/L 时,既能保证较高的萌发率,又能使有效芽苗保持较高的比例。添加一定浓度的 GA₃ 对萌发和成苗也有不同程度的促进作用,但效果没有 6-BA 明显(表 1)。因此,添加的外源激素应维持在一定

浓度范围内,若浓度太高,易出现下胚轴徒长以及无芽苗(图 2-b)等问题。

表 1 不同激素种类及浓度对刺山柑种子萌发的影响¹⁾

Table 1 The influence of different hormones on the seed germination of *Capparis spinosa* L.

激素 Hormone	浓度/(mg·L ⁻¹) Concentration	萌发率/% Germination rate	平均萌发 天数/d Aver. days	成苗率/% Seedling rate
6-BA	0	9.7 c	12.9 a	8.3 d
	0.5	23.1 b	13.0 a	18.2 c
	1.0	34.8 a	12.3 a	26.8 a
	2.0	36.2 a	13.8 a	23.0 b
GA ₃	0	8.4 c	13.0 ab	7.2 c
	1.0	21.1 b	14.9 a	15.3 a
	2.0	26.3 a	12.2 a	12.1 a
	5.0	23.4 ab	11.4 b	14.5 a

1) LSD 多重比较,同列中不同小写字母表示 5% 水平上差异显著,下同 Different capital and small letters in each line indicate significant difference at 5% with LSD

2.2 下胚轴诱导培养

取萌发后的无菌苗下胚轴,切段后接于芽诱导培养基。我们在 MS + NAA (0.01 mg/L) 的基础上,通过添加不同浓度的 6-BA 来研究其对诱导产生丛生芽的影响。不添加 6-BA 无法诱导丛生芽的产生,当 6-BA 浓度维持在 0.05~0.50 mg/L 时,丛生芽的增殖量较大,且芽苗生长情况较佳(表 3,图 2-c);随着 6-BA 浓度的增大,产生的丛生芽数量虽居多,但大量呈簇聚集生长,形态矮小、细弱。

表 2 不同激素组合对下胚轴诱导产生丛生芽的影响¹⁾

Table 2 The influence of different hormone combinations on hypocotyls regeneration

编号 No.	激素/(mg·L ⁻¹) Hormone		增殖系数 Propagating coefficient	芽生长系数 Bud growth coefficient	芽苗生长情况 Growth situation of bud
	6-BA	NAA			
1	0.00	0.01	0	0	+
2	0.02	0.01	2.4	0.5	++
3	0.05	0.01	4.7	2.3	+++
4	0.10	0.01	5.3	2.6	+++
5	0.50	0.01	4.3	2.4	++
6	1.00	0.01	4.1	1.7	+
7	2.00	0.01	4.1	1.4	+
8	3.00	0.01	4.2	1.4	+

1) +++ 苗粗壮浓绿; ++ 苗纤细淡绿; + 苗纤弱; 下同 +++ , ++ and + represent the seedlings were with erromenus and thick green, tenellous and pea green and weaker characteristics; the same as follows

方差分析显示,6-BA 的使用对诱导丛生芽增殖有极显著的促进作用($P < 0.01$)。

2.3 丛生芽增殖培养

研究表明,6-BA 与 NAA 配合使用对诱导丛生芽增殖有极显著的促进作用(图 2-d),且在选定的 6-BA 浓度范围内,NAA 对增殖的影响也极其显著($P < 0.01$)。当 6-BA 浓度在 0.05 mg/L 时,随着 NAA 浓度的增大,丛芽的增殖情况下降;6-BA 浓度在 0.10~0.50 mg/L 范围内,不管 NAA 任何变动,

丛芽均能维持一定的增殖水平(表 4)。因此,6-BA 与 NAA 的比例须高于一定水平才能有效促进芽的增殖,在 6-BA 浓度为 0.05 或 0.10 mg/L 时,当其浓度与 NAA 的比例控制在 5:1 左右使芽苗的增殖情况较理想。当 6-BA 达到 0.50 mg/L,虽增殖系数较高,但丛芽密生,有效苗数减少。综合来看,MS+6-BA 0.10 mg/L+NAA 0.02 mg/L 的激素组合既有利于高增殖率的形成,又能保证芽苗的正常生长。

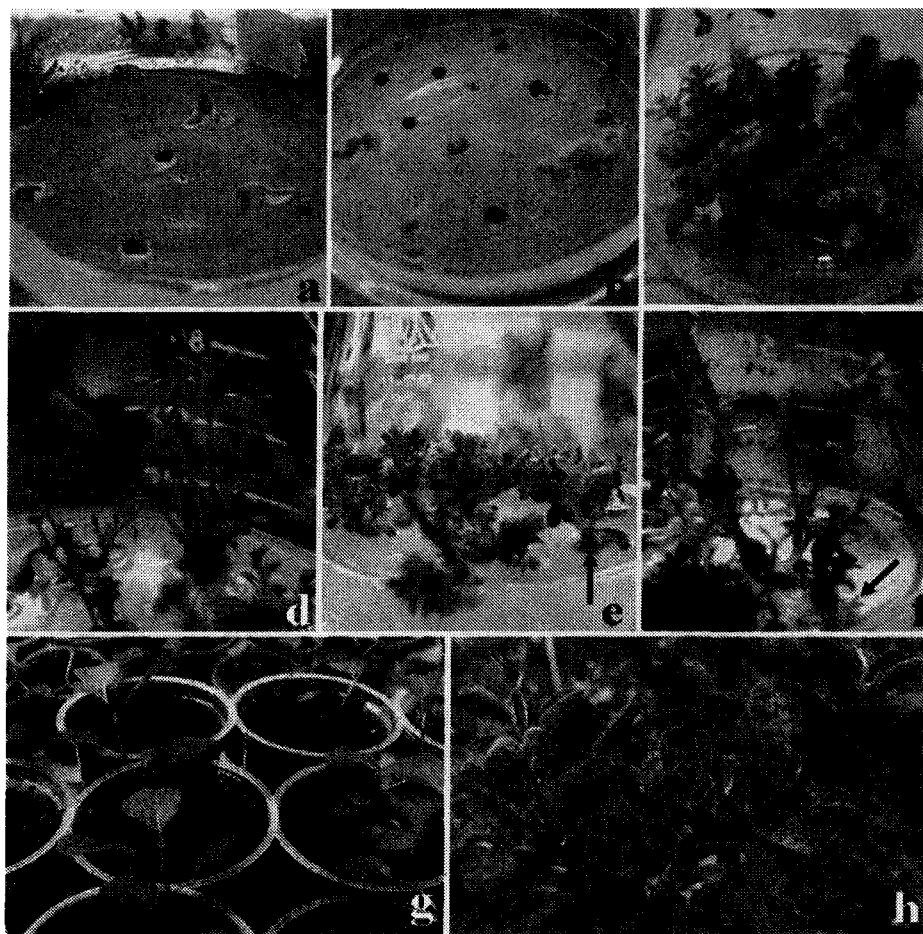


图 2 刺山柑下胚轴再生与田间移栽情况图示

Fig. 2 The hypocotyl regeneration and field transplanting of *Capparis spinosa* L.

- a. 启动培养基上种子正常萌发 Seeds germinate normally on the initial medium;
- b. NAA 偏高时,种胚大量生根且出现无芽苗(箭头所示) Lots of roots germinated and in some cases the plant without shoot when the seeds on the medium with a high concentration of NAA (arrow shows);
- c. 诱导培养基上的下胚轴分化出丛生芽 Bushy shoots germinated from hypocotyl on induction medium;;
- d. 增殖培养基上丛芽倍增现象 Bushy shoots on multiplication medium;
- e. 叶沿及芽苗基部有紫色物质产生(箭头所示)The purple substance appeared in the leaf tip and the basal of seedling (arrow shows);
- f. 芽在生根培养基上生根(箭头所示)The seedlings with roots (arrow shows);
- g 和 h. 移栽到塑料杯和试验田的材料生长良好 The transplanted plants in plastic cup and experimental field are grow well

表3 不同增殖培养基对芽苗增殖的影响

Table 3 The influence of shoot propagation on various propagation medium

编号 No.	激素/(mg·L ⁻¹)		增殖系数 Propagating coefficient	芽生长系数 Bud growth coefficient	芽苗生长情况 Growth situation of bud
	Hormone				
	6-BA	NAA			
1	0.05	0.01	4.9	2.6	+++
2	0.05	0.02	3.0	1.9	+
3	0.05	0.04	2.3	1.0	+
4	0.10	0.01	4.9	2.1	+++
5	0.10	0.02	5.7	3.3	+++
6	0.10	0.04	5.2	3.3	++
7	0.50	0.01	4.2	2.4	++
8	0.50	0.02	4.0	2.1	+
9	0.50	0.04	3.7	2.8	+

2.4 生根培养

观察发现在生根诱导培养1周后,部分芽苗在与培养基接触的部位膨大,并有紫色物质产生(图2-e)。3周后,这些芽苗出现棕黄色的根,苗株茎秆增粗,叶片变肥厚,颜色浓绿(图2-f)。另外也有部分芽苗生出蛛网状的白色气生根,不生根的芽苗在切口处形成块状物,并逐渐变黑。研究表明:IBA与活性炭的选取对生根率的提高均有显著作用($P < 0.01$),其中活性炭的作用极其显著,且二者的配合使用对生根也有极显著作用(表4),在IBA试验的3个浓度中,当选取2.00 mg/L时,生根率明显低于其他2个。本研究中也验证了在未添加活性炭

表4 不同生根培养基对生根的影响

Table 4 The influence of various rooting

编号 No.	添加物/(mg·L ⁻¹)		生根率/% Rooting rate	平均生根数 Average root number
	Additive			
	IBA	活性炭 Active carbon		
1	0.50	0	29	2.3
2	0.50	100	38	2.5
3	0.50	300	35	3.0
4	1.00	0	37	2.8
5	1.00	100	41	3.2
6	1.00	300	22	3.4
7	2.00	0	12	2.3
8	2.00	100	15	3.4
9	2.00	300	20	3.0

的试验组分里,生根情况不及添加组。而在活性炭为100 mg/L时,生根情况较佳。综合来看,1.00 mg/L的IBA与100 mg/L活性炭配合使用效果较好。为了研究生根植株的生长情况,我们首先将生根植株移栽到塑料杯中,观察发现,85%的移栽植株可以正常生长(图2-g),此外,部分生长正常的植株移栽到试验田中的植株也生长良好(图2-h)。

3 讨论

利用组织培养方法对珍稀植物进行快繁研究,不仅可以克服种子繁殖中存在的诸多问题,而且可以克服常规繁殖速度慢、繁殖率低的缺点。马森等^[13]成功地实现了沙生植物罗布麻的快繁工作,计巧灵等^[14]获得了新疆紫草再生植株,从而实现了紫草的人工栽培。目前,在刺山柑资源比较缺乏的条件下,开采野生资源是不现实的,大面积种植是解决该问题的主要途径之一,在种子萌发难以得到足够数量种苗的情况下,通过组织培养的方式对种苗进行快繁是解决该问题的主要途径。在植物组织培养中,常利用6-BA来解除种子休眠,如耿星河等^[15]就是利用6-BA与低浓度的NAA的配合使用,改善其种子的萌发情况。本研究采用的浓度为1.0 mg/L的6-BA,并选取2%的蔗糖添加量能够很好促进种子的萌发,使萌发率由原先不足10%的情况,提高了3倍多。采用低水平的激素浓度组合(6-BA 0.10 mg/L + NAA 0.02 mg/L)获得的芽数量多,增殖系数高达到5~6倍,且芽苗发育正常。由生根试验结果来看,IBA、活性炭的配合使用对生根情况有交互促进作用。本研究建立的刺山柑组织培养再生体系,为今后深入研究刺山柑的组织培养工作提供了良好的借鉴,对刺山柑的保护和利用亦具有一定的现实意义和理论价值。

参 考 文 献

- [1] 张立运,杨春. 保护风蚀地的刺山柑[J]. 植物杂志, 2004, 34(1): 3-4.
- [2] LEVIZON E, DRILLAS P, KYPARISSIS A. Exceptional photosynthetic performance of *Capparis spinosa* L. under adverse conditions of mediterranean summer [J]. Photosynthetica, 2004, 42 (2): 229-235.
- [3] KHANAFAR M A, SABRI S S, ZARGA M H. The chemical constituents of *Capparis spinosa* of Jordanian origin [J]. Nat Prod Res, 2003, 17(1): 9-14.

- [4] AL-SAID M S, ABDELSATTAR E A, KHALIFA S I, et al. Isolation and identification of an anti-inflammatory principle from *Capparis spinosa* [J]. Pharmazie, 1988, 43: 640-641.
- [5] BERTRAND M, MUSA Ö. Glucosinolate Composition of young shoots and flower buds of capers (*Capparis* species) growing wild in Turkey [J]. J Agric Food Chem, 2002, 50: 7323-7325.
- [6] JOUAD H, HALOUI M, RHIOUANI H, et al. Ethnopharmacological survey of medicinal plants used or the treatment of diabetes, cardiac and renal diseases in the north centre region of Morocco (Fez-Boulemane) [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2001, 77: 175-182.
- [7] ALI M, RAMACHANDRAM R, RAFIULLAH M R M, et al. Prevention of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity by the ethanol extract of *Capparis moonii* fruits in rats [J]. Pharmaceutical Biology, 2004, 42: 286-288.
- [8] EDDOUKS M, LEMHADRI A, MICHEL J B. Hypolipidemic activity of aqueous extract of *Capparis spinosa* L. in normal and diabetic rats [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2005, 98: 345-350.
- [9] 张凤娟, 徐兴友, 孟宪东, 等. 皂荚种子休眠解除及促进萌发 [J]. 福建林学院学报, 2004, 24(2): 175-178.
- [10] 赖家业, 兰健, 曹毅, 等. 蒜头果组织培养再生系统的初步研究 [J]. 四川大学学报(自然科学版), 2005, 42(4): 839-843.
- [11] 吕秀立, 施季森. 欧洲七叶树的离体培养及快速繁殖 [J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2004, 28(3): 41-44.
- [12] 马森, 陆嘉惠, 周玲玲, 等. 资源植物罗布麻的茎段组织培养与植株再生 [J]. 中草药, 2001, 32(9): 841-843.
- [13] 计巧灵, 王卫国. 新疆紫草的无性繁殖及其再生植株的遗传稳定性初探 [J]. 植物生理学通讯, 2001, 37(6): 499-502.
- [14] 耿星河, 卢萍, 贺玲. *Alyssum maritimum* (L.) Lam. 的组织培养研究 [J]. 内蒙古师范大学学报(自然科学版), 2005, 34(4): 482-484.

Establishment of Hypocotyl Regeneration System of *Capparis spinosa* L.

LI Mao-teng WANG Yan-ting GAN Lu LI Hong FU Chun-hua YU Long-jiang
(College of Life Science and Technology,
Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract In this paper the seeds of *Capparis spinosa* L. were taken as materials. The effects of different plant growth regulators on germination, induction, multiplication and rooting of explants were discussed. The results showed that the best medium for seed germination was MS+1.0 mg/L6-BA + 2% sucrose, the MS medium combined with 0.10 mg/L6-BA and 0.02 mg/L NAA was suitable for shoot multiplication, and the multiplication rate was about 5~6 times. The MS medium supplemented with 1.00 mg/L 6-BA and 100 mg/L activated charcoal was the best for rooting. The regeneration system of *Capparis spinosa* L. has been preliminarily established.

Key words *Capparis spinosa* L.; sterile seedling; hypocotyl; tissue culture; plant regeneration

(责任编辑:张志钰)