

# 铜锤玉带草的组织培养与植株再生

臧 薇<sup>1</sup>, 刘 帆<sup>2</sup>

(1. 四川农业大学 园艺学院, 四川 雅安 625014; 2. 四川农业大学 农学院, 四川 雅安 625014)

**摘 要:**以 MS 作为基础培养基, 对铜锤玉带草的叶片、芽和茎段 3 种不同外植体进行了愈伤组织诱导、丛生芽和根分化的研究。结果表明:以芽作为外植体诱导愈伤组织和丛生芽的效果最好, 茎段次之, 叶片最低。激素配比以 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L 诱导愈伤组织的效果最好; MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L 诱导丛生芽的效果最好; MS+IBA 0.5 mg/L 为诱导生根的效果最佳。

**关键词:**铜锤玉带草; 激素配比; 组织培养; 植株再生

**中图分类号:**S 688.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)08-0164-03

铜锤玉带草(*Pratia begonii folia*)为桔梗科铜锤玉带属多年古草本植物, 又名小铜锤、地扣子、玉带草。其叶片圆形或心状卵圆形, 长 1~2 cm, 花单生叶腋, 萼钟形, 花冠淡紫色, 果实为小铜锤状直径 1.5 cm 左右, 初为黄绿色, 成熟后为蓝紫色, 外观美丽。对土壤适应性比较强, 耐旱、耐寒、抗病等特点是一种可同时观赏花、果、叶的优良园林地被植物<sup>[1]</sup>。其还是民间传统的一种中草药, 云南民间全草药用, 具有祛风除湿、活血、解毒之功效。用于治疗风湿疼痛、跌打损伤、乳痈、无名肿痛<sup>[2]</sup>, 云南开始尝试用小铜锤清凉油合剂治疗疤痕疙瘩<sup>[3]</sup>, 并取得一定的效果。此外, 铜锤玉带草也可作为野生蔬菜食用具有一定的保健效果<sup>[4]</sup>。目前对桔梗科植物组织培养及快速繁殖的研究主要有桔梗、半边莲、山梗菜等为主。铜锤玉带草的研究主要集中在食用价值开发、人工栽培技术<sup>[5]</sup>、生药学鉴定和化学成分分析<sup>[6]</sup>等研究上, 而对其进行组织培养和再生体系建立的研究在国内还未见报道。该试验旨在利用组织培养方法筛选出对铜锤玉带草最佳的培养方案, 建立和完善铜锤玉带草快速繁殖体系, 为利用生物技术实施新品系的繁育、有效成分及种苗的工厂化生产奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

铜锤玉带草采自四川农业大学药用植物园(经四川农业大学田孟良副教授鉴定)于上午 9:00 摘取叶片、顶

芽、茎段为外植体, 经低浓度洗衣粉漂洗后, 流水冲洗 1~2 h 后备用。

### 1.2 试验方法

将冲洗过的材料用 75%酒精消毒 10 s, 无菌水冲洗 3 次, 0.1%升汞灭菌 8 min, 无菌水冲洗 5 次。将叶片切成 0.5 cm<sup>2</sup>的小块, 芽和茎段切成 0.3 cm 的小段。接种于愈伤诱导的培养基中。每种激素配比接种 21 支。每支试管接 1 块外植体, 设 3 次重复。待愈伤组织诱导后, 继代增殖 1 次切成 0.5 cm<sup>2</sup>的小块, 接入分化培养基中。每种激素配比接种 21 支。每支试管接 1 块愈伤组织, 设 3 次重复。进行分化和增殖培养, 待幼苗长到 4~5 cm 时, 再进行根的诱导。诱导生根时每种激素配比 21 瓶, 每瓶 1 株幼苗, 设 3 次重复。以 MS 作为基本培养基, 附加不同浓度的萘乙酸(NAA)、6-苄氨基腺嘌呤(6-BA)、吲哚丁酸(IBA), 蔗糖浓度为 3%, 琼脂粉 0.48%, pH 5.8, 光照时间 12 h/d, 光照强度 1 500 lx, 温度(22±1)℃。诱导愈伤组织 30 d 后, 统计其诱导率; 诱导丛生芽 30 d 后, 统计诱导率和生长情况; 生根诱导 25 d 后统计生根率与生长情况。试管苗移植到混合基质中练苗后, 移入室外栽培统计其成活率。

**1.2.1 诱导愈伤组织的培养基** A: MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L; B: MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L; C: MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L; D: MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L; E: MS+6-BA 4.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L; F: MS+6-BA 4.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L。

**1.2.2 诱导丛生芽的培养基** G: MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L; H: MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.10 mg/L; I: MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L; J: MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L; K: MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.10 mg/L; L: MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.50 mg/L。

**第一作者简介:**臧薇(1988-), 女, 本科在读, 现从事植物组织培养研究。E-mail: zangwei\_love@126.com。

**通讯作者:**刘帆(1967-), 男, 高级实验师, 现主要从事植物组织培养教学科研工作。E-mail: liufan12006@163.com。

**基金项目:**四川农业大学青年科技创新基金资助项目(20061314)。

**收稿日期:**2009-10-20

1.2.3 诱导生根的培养基 M: MS+NAA 0.5 mg/L; N: MS+NAA 1.0 mg/L; O: MS+IBA 0.5 mg/L; P: MS+IBA 1.0 mg/L。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的诱导

外植体接种 15 d 后发现, 从切块边缘逐渐有淡黄色、黄绿色、白色愈伤组织形成。30 d 后统计不同激素配比对愈伤组织产生情况(表 1)。其中芽诱导愈伤的诱导效果最好, 其次为茎段, 叶片的诱导效果最差 且诱导出的愈伤组织为黄白色颗粒状, 质地较为松散且表面干燥 长到 20 d 时逐渐有死亡的情况。茎段所产生的愈伤组织为浅黄绿色粒状凸起, 质地较为疏松, 生长速度较芽慢。芽的愈伤组织产生效果最好呈黄绿色瘤状凸起, 质地较为致密表面湿润, 诱导率为 100%, 生长状况也最好。因此, 诱导愈伤组织最佳的外植体类型为芽, 最佳的激素配比为 D 组, 与其它组比较差异显著(见图 1)。

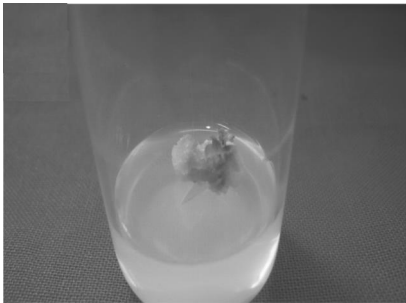


图 1 愈伤生长情况

表 1 不同浓度激素组合对不同外植体愈伤组织诱导率的影响

培养基 编号	愈伤组织数/块			诱导率/%		
	叶片	芽	茎段	叶片	芽	茎段
A	0	7	4	0.00c	33.3c	19.0c
B	0	6	5	0.00c	28.5c	23.8c
C	2	18	15	9.50b	85.7b	71.4b
D	7	21	17	33.3a	100a	80.9a
E	5	16	13	23.8a	76.1b	61.9b
F	3	15	12	14.2b	71.4b	57.1b

注: 表中小写字母表示诱导率在 5% 显著水平上的差异显著性。

2.2 丛生芽的诱导增殖

将 D 组生长良好的愈伤组织转入不同激素配比的丛生芽诱导培养基中诱导丛生芽, 培养 10 d 后, 从愈伤组织表面陆续分化出丛生芽, 30 d 后调查丛芽分化情况

表 2 不同激素对比对不同外植体丛生芽诱导的影响

培养基 编号	接种愈伤组织			丛生芽诱导率/%		
	叶片	芽	茎段	叶片	芽	茎段
G	21	21	21	20.5c	45.7d	43.2d
H	21	21	21	23.5c	65.3c	57.5c
I	21	21	21	53.3a	96.3a	91.5a
J	21	21	21	45.5b	87.5b	75.4b
K	21	21	21	21.5c	86.2b	71.5b
L	21	21	21	13.5d	74.5c	71.4b

表 3 不同激素组合诱导的丛生芽的生长情况

序号	丛生芽状况	生长情况
G	分化较少, 黄绿色, 纤细	+
H	分化较少, 黄绿色, 较纤细	++
I	分化多, 深绿色, 健壮	++++
J	分化较多, 深绿色, 较健壮	+++
K	分化较多, 绿色, 较健壮	+++
L	分化较多, 黄绿色, 较纤细	++

注: + 为差; ++ 为一般; +++ 为较好; ++++ 为好。

和芽诱导率。由表 2、3 可知, 芽、茎段、叶片均能诱导出丛生芽。其中芽的诱导效果最好, 不同激素配比的处理诱导愈伤组织分化出丛生芽的效果差异显著, 芽诱导率为 45.7%~96.3%, 芽诱导率最高的激素配比是 I 组, 诱导产生的丛生芽生长速度快且健壮(见图 2)。



图 2 诱导的丛生芽

2.3 丛生芽诱导生根

选取生长健壮 4~5 cm 的丛生芽切去基部愈伤组织, 分成单芽进行根的诱导。由表 4 可知, O 组的生根诱导率为 100% 且根的生长情况良好, 为诱导生根的最佳激素配比。其次为 N 组, 根的生诱导率为 96%, 但根的生长情况较 O 组略差。A 组的生根诱导率最低为 85%, 根的生长情况也最差。即 IBA 0.5 mg/L 诱导生根的效果最佳(见图 3)。

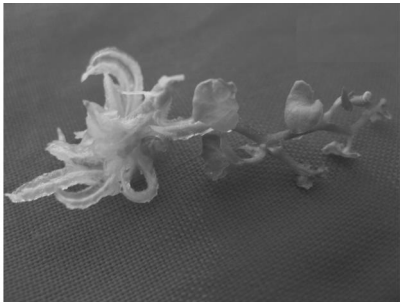


图 3 根生长情况

表 4 不同激素组合对生根诱导的影响

序号	平均根数/条	诱导率/%	根的生长状况	生长情况
M	3.4	85	根量较少, 较细弱	+
N	6.2	96	根量较多, 较粗壮	+++
O	6.5	100	根量多, 粗壮发达	++++
P	5.3	90	根量较多, 粗壮	++

2.4 试管苗的移栽

将根系生长良好的壮苗置于室温条件下练苗 3 d

后, 揭开封口膜再练苗 3 d。取出试管苗, 用清水洗去根部的培养基, 栽植于腐殖质: 蛭石=2:1 的基质中, 喷水 3 次/d。15 d 后移植于室外试管苗成活率可达 95% 以上, 小苗生长正常(见图 4)。



图 4 移栽后生长良好的组培苗

### 3 结论与讨论

#### 3.1 不同激素对比对愈伤组织的影响

在组织培养中激素对比对植株的生长和生理状态的影响及对愈伤组织的诱导和分化方面的报道较多<sup>[7]</sup>。试验通过对铜锤玉带草顶芽、茎段以及叶片愈伤组织的诱导, 3 种不同外植体的愈伤生长情况差异较显著。不同激素配比诱导出来的愈伤组织质地不同, 主要表现在愈伤组织的颜色和致密度上, 质地比较紧密的呈淡绿色、瘤状愈伤组织且有芽点产生, 比较容易分化出小苗, 如用(D 组)6-BA 2.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L 的诱导芽外植体的愈伤组织质地紧密, 色淡绿, 在后期对于丛生芽的诱导试验中分化出的小苗最多, 这与舒雯<sup>[8]</sup>等在研究桔梗体细胞培养中发现愈伤组织培养基的组成会影响植株的分化中的结果基本一致。

#### 3.2 不同的激素对比对丛生芽的影响

试验中以芽作为外植体的材料, 在丛生芽分化试验中产生的丛生芽数量最多, 通过对丛芽数目的统计得出(I 组)培养基即 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L 时, 丛芽的数目最多、平均数达 9.4 个、出芽率为 96.3% 且生长健壮。这与张凤生<sup>[9]</sup>等在桔梗的组织培养及快速繁殖研究结果不一致。这主要是在 6-BA 与 NAA 的

激素组合中, 对不同的外植体丛生芽诱导的难易程度却不同, 生长速度也有明显的差异。这是因为芽和茎段中所含的内源激素水平不同而对外源激素种类及浓度的需求不一致<sup>[10]</sup>, 从而导致细胞分裂、分化、伸长生长等一系列生理上的发生速度不同, 当 6-BA 浓度较高时, 部分丛生芽生长过纤细, 6-BA 浓度较低时, 丛生芽生长良好。当 NAA 浓度较低时有利于丛生芽的诱导及生长, 随着 NAA 浓度的增高反而抑制了丛生芽的诱导及生长, 这与植物生长调节剂对植物生长所起的双重作用有关。

#### 3.3 不同激素对比对生根的影响

试验中(O 组)MS+IBA 0.5 mg/L 培养基诱导铜锤玉带草平均生根率为 100%, 平均生根数为 6.5 条, 根系粗壮发达接近于自然根。试验中生长素的浓度过低或过高都不利于根的分化和生长, 这与王广军等<sup>[11]</sup>在半边莲组织培养和快速繁殖的研究结果不一致。结果表明 IBA 和 NAA 对根的分化都起作用, 但从诱导率及根长方面比较, IBA 诱导效果优于 NAA。

#### 参考文献

- [1] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴(第四册)[M]. 北京: 科学出版社, 1975: 398.
- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1995: 2165.
- [3] 鲍晓华. 铜锤玉带草食用开发研究[J]. 中国林副特产, 2008(3): 32-33.
- [4] 冯云. 小铜锤清凉油合剂对治疗疤痕疮 43 例[J]. 中国民族医药杂志, 1999, 12(5): 101.
- [5] 陈文英. 铜锤玉带草人工栽培技术[J]. 上海蔬菜, 2008(2): 27.
- [6] 辛宁, 廖月英, 成晓静. 铜锤玉带草的生药学研究[J]. 广西中医药, 2003, 26(3): 54-55.
- [7] 胡含. 植物体细胞遗传与作物改良[M]. 北京: 北京大学出版社, 1988: 27-35.
- [8] 舒雯, 高山林. 桔梗的组织培养[J]. 植物资源与环境学报, 2001, 10(3): 63-64.
- [9] 张凤生, 蒋森, 李建红. 桔梗的组织培养及快速繁殖[J]. 北方园艺, 2007(1): 165.
- [10] 王小菁. 植物生长调节剂在植物组织培养中的应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 47.
- [11] 王广军, 张彦妮. 半边莲组织培养和快速繁殖[J]. 北方园艺, 2008(5): 209-210.

## Tissue Culture and Plant Regeneration of *Pratia begoniifolia*

ZANG Wei<sup>1</sup>, LIU Fan<sup>2</sup>

(1. College of Horticulture, Sichuan Agricultural University, Yaan, Sichuan 625014; 2 College of Agriculture, Sichuan Agricultural University, Yaan, Sichuan 625014)

**Abstract:** In this paper young leaves, buds and footstalks were taken as explants to induce callus in the MS medium adding different hormone combinations and the effects on callus induction and growth of hormone combination were studied. The results showed that the bud was the best explant for the induction of callus and buds. The suitable medium for callus induction was MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L. The suitable medium for buds induction was MS+6-BA 1.0mg/L+NAA 0.5 mg/L. And MS+IBA 0.5 mg/L was best for root induction.

**Key words:** *Pratia begoniifolia*; hormone combination; tissue culture; plant regeneration