

优良地被植物石路的组培快繁技术研究

祝志勇¹, 缪宇明¹, 胡仲义¹

(1. 宁波城市职业技术学院, 浙江 宁波 315502 2. 宁波绿城园林工程公司 浙江 宁波 315000)

摘要:以石路叶片为外植体, 研究无菌体系的建立以及不同外源激素配比对石路不定芽诱导和增殖的影响。结果表明: 以 0.1% 质量浓度的升汞为灭菌试剂, 灭菌处理时间为 10 min 时最利于无菌体系的建立, 污染率为 21.67%, 成活率为 48.33%; 最佳的不定芽诱导培养基为 MS+KT 0.5 mg/L+NAA 1.0 mg/L, 其愈伤组织诱导率为 82.46%, 愈伤组织分化率为 40.43%; 在 MS+BA 1.5mg/L+NAA 0.2 mg/L 培养基上得到最佳增殖效果, 其增殖倍数达到 3.27。

关键词: 石路; 叶片外植体; 组织培养; 诱导

中图分类号: S 688.404⁺.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)08-0140-03

石路 (*Farfugium japonica* cv. aureo-maculatum) 是菊科 (Compositae) 大吴风草属 (*Farfugium*) 多年生草本植物, 又名黄斑大吴风草。其耐阴, 耐寒, 对土壤适应性强, 少病虫害, 根系发达, 叶呈心形, 叶面富有光泽, 叶色翠绿, 间带嫩黄色斑点, 在江浙地区四季常绿, 是优良的庭园种植和背阴高架公路下的绿化材料, 具有广阔的市场前景。石路根内含有千里光酸 (二甲基丙烯酸), 主治咳嗽、咯血、便血、跌打损伤、乳腺炎, 具有一定的药用价值^[1-3]。但目前主要的繁殖方法是分株繁殖, 很难满足市场的巨大需求。因此, 采用组培快繁技术进行大规模繁殖非常必要。周根余^[4]曾以花叶如意 (*Farfugium japonica* var. *auseomaculata*) 茎尖为外植体成功获得组培苗, 为该试验提供了方法上的借鉴。现以盆栽的石路叶片作外植体, 进行无菌体系建立、芽诱导分化及增殖培养的研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2008 年 8 月, 从宁波绿城园林工程公司选取大小较为均一的 2 a 生盆栽石路为试验材料。试验于 2008 年 9 月 22 日开始。取石路的新生嫩叶, 并将其分割成 1.0 cm×1.0 cm 作为供试材料。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体灭菌方法 将石路幼嫩叶片从植株上小心剪下, 用洗洁精浸泡 15 min, 后用流水冲洗 4~5 次。分装好后移至超净工作台采用不同的灭菌方法进行处

理, 以获得最佳的灭菌方法 (见表 1)。将不同灭菌方法处理的石路叶片, 接入培养基 M1 中, 每天观察外植体的污染状况作好记录。接种 10 d 以后, 外植体的污染状况基本稳定, 此时进行观察。

表 1 不同灭菌方法中灭菌剂种类及处理时间

编号	灭菌剂种类及处理时间			
	75%酒精	处理时间/s	0.1%升汞	处理时间/min
S ₁	✓	5	✓	7
S ₂	✓	10	✓	7
S ₃	✓	15	✓	7
S ₄	—	—	✓	7
S ₅	—	—	✓	10
S ₆	—	—	✓	13

注: “✓”已选灭菌剂, “—”未选灭菌剂。

1.2.2 诱导培养基外源激素配比筛选 以 MS 为基本培养基, 分别添加不同质量浓度的 BA、KT 和 NAA 3 种植物生长调节剂。愈伤组织诱导培养基设计如表 2 所示。自接种后, 每隔 5 d 观察并记录外植体的生长状况、愈伤组织的诱导及芽的分化, 统计不同外源激素配比下的愈伤组织数量及分化芽的数量。

表 2 不定芽诱导培养基中外源激素的配比方法

编号	外源激素的质量浓度/mg·L ⁻¹		
	6 BA	KT	NAA
M0	0	0	0
M1	1.0	0	0.5
M2	2.0	0	0.5
M3	3.0	0	0.5
M4	0	0.5	1.0
M5	0	1.0	1.0
M6	0	1.5	1.0

1.2.3 增殖培养 将诱导获得石路嫩芽转入含有不同外源激素配比的增殖培养基中进行增殖培养, 激素配比见表 3 每 5 d 观察并记录嫩芽的生长状况。

第一作者简介: 祝志勇 (1968), 男, 浙江淳安人, 硕士, 副教授, 研究方向为植物资源研究利用。E-mail: zhuzhiyong01@163.com。
基金项目: 浙江省教育厅高校科研计划资助项目 (Y200803329); 宁波市科技局农业与社会发展科技攻关资助项目 (2009C10019)。
收稿日期: 2009-12-21

表 3 增殖培养基中外源激素的配比方法

编号	外源激素的质量浓度/ mg · L ⁻¹		
	6-BA	KT	NAA
P ₀	0	0	0
P ₁	0.5	0	0.2
P ₂	1.0	0	0.2
P ₃	1.5	0	0.2
P ₄	0	0.1	0.2
P ₅	0	0.2	0.2
P ₆	0	0.3	0.2

1.2.4 培养条件 培养室内控制恒温 24℃, 光照强度为1 000 lx, 光照时间 12 h/d。

2 结果与分析

2.1 不同灭菌方法对石路叶片的影响

石路叶片上下表面密被绒毛, 且细胞排列疏松, 透水性强, 对其无菌体系的建立构成一定难度。接种 10 d 以后, 外植体的污染状况基本稳定。从表 4 可看出, 不同灭菌方法对石路消毒效果有明显不同。其中, 方法 S₅ 的消毒效果最好, 污染率为 21.67%, 成活率为 48.33%。而混合使用 75%酒精和 0.1%升汞进行灭菌

表 4 不同灭菌方法对石路叶片的影响

灭菌方法	接种总数/ 块	污染数/ 块	污染率/ %	成活数/ 块	成活率/ %
S ₁	60	27	45	8	13.33
S ₂	60	28	46.67	7	11.67
S ₃	60	28	46.67	5	8.33
S ₄	60	25	41.67	10	16.67
S ₅	60	13	21.67	29	48.33
S ₆	60	10	16.67	17	28.33

污染率均较高, 其中 S₃ 的污染率最高, 为 46.67%, 且外植体成活率最低仅为 8.33%。分析原因, 酒精较强的渗



图版说明

1. 诱导芽; 2、3. 增殖状况。

方差结果表明, 6-BA 浓度与石路愈伤组织的诱导率之间差异极显著, P 值为 0.000。KT 浓度与石路愈伤组织的诱导率之间差异极显著, P 值为 0.000 见表 6。回归分析结果, 6-BA 与愈伤组织的诱导率存在二次函数关系, 回归方程为: $y = -1.748x^2 + 25.024x - 4.839$ 。其中相关系数 $r = 0.766$, $F = 14.752$, $P = 0.001$ 。KT 与愈伤组织诱导率之间存在二次函数关系, 回归方程为: $y = -92.843x^2 + 153.023x + 5.231$, 其中相关系数 $r = 0.785$, $F = 16.413$, $P = 0.001$ 。

透性可以通过叶片上分布密集的气孔及疏松的表皮细胞进入外植体内部, 从而使组织坏死。

2.2 不同外源激素对比对愈伤组织诱导及分化的影响

接种 60 d 以后, 愈伤组织的诱导和分化基本稳定。从表 5 可见, 不同外源激素对比对石路叶片愈伤组织的诱导及分化均有不同影响。随着激素浓度的增加, 外植体褐化现象也增多, 这与粉绣线菊茎尖外植体诱导愈伤组织的研究结果相一致^[9]。除对照 M₀ 外, 试验中其余的 6 组培养基, M₁ 的愈伤组织诱导率最低为 0, M₁、M₆ 的愈伤组织分化率最低为 0。M₁、M₂、M₃ 3 种培养基中愈伤组织的分化芽数量均较少, 且 M₁ 和 M₂ 的分化速度较 M₃ 缓慢。M₄、M₅、M₆ 3 种培养基中愈伤组织的芽分化数量较多。其中培养基 M₄: MS+KT 0.5 mg/L+NAA 1.0 mg/L 中, 愈伤分化速度快, 不定芽排列紧密, 叶片绿色, 小苗生长健壮, 其愈伤组织诱导率最高为 82.46%, 且愈伤组织分化率也最高为 40.43%, 是石路叶片诱导的最佳培养基。

表 5 不同外源激素对比对愈伤组织诱导及分化的影响

培养基	接种外植体/ 块	出愈伤时间/ d	产生愈伤组织数/ 块	愈伤组织诱导率/ %	分化的愈伤组织数/ 块	愈伤组织分化率/ %
M ₀	69	/	0	0.00	0	0
M ₁	52	/	2	3.85	0	0
M ₂	69	17	37	53.62	9	24.32
M ₃	63	13	31	49.21	3	9.68
M ₄	57	10	42	73.68	19	45.24
M ₅	67	15	33	49.25	4	12.12
M ₆	55	7	17	30.91	0	0

表 6 同外源激素与愈伤诱导率之间的方差分析

指标	自由度	平方和	均方	F	Sig
6-BA	3	7 311.412	2 437.137	49.154	0.000
KT	3	8 816.839	2 938.946	72.354	0.000

2.3 不同外源激素对比对芽增殖的影响

接种 20 d 后, 石路增殖基本稳定, 增殖倍数及植株生长状况见表 7。试验结果显示, 石路在 P₃ 培养基 MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L 中增殖速度快, 增殖倍数为 3.27, 且植株生长健壮, 是石路的最佳增殖培养基。增殖倍数最低的为 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA

0.2 mg/L 培养基, 增殖倍数为 1.17。P₄ 培养基 MS+KT 0.1 mg/L+NAA 0.2 mg/L 的增殖倍数最大为 4.60。

表 7 不同外源激素配比对芽增殖的影响

代号	接种芽 数量/个	分化后芽 总数/个	增殖 倍数	小植株生长状况
P ₀	30	35	1.17	叶片绿色 叶形较小, 增殖速度缓慢
P ₁	30	47	1.57	叶片绿色 叶形较小, 增殖速度缓慢
P ₂	30	71	2.37	叶片嫩绿 叶形较大, 植株健壮, 增殖速 度较快
P ₃	30	98	3.27	叶片深绿 叶形较大, 植株健壮, 排列紧 密, 增殖速度快
P ₄	30	138	4.60	叶片黄绿色, 叶形较小, 排列紧密, 增殖 速度快
P ₅	30	53	1.77	叶片黄绿色, 叶形较小, 增殖速度缓慢
P ₆	30	43	1.43	叶形很小 增殖速度极缓慢

方差结果表明, 6-BA 不同浓度处理对石路诱导芽的增殖倍数影响差异极显著。KT 浓度梯度处理对石路诱导芽的增殖倍数差异极显著。P 值均为 0.000, 结果见表 8。回归分析结果显示, 6-BA 与增殖倍数之间存在线性关系, 回归方程为: $y=1.42x+1.027$, 其中相关系数 $r=0.965$, $F=133.203$; $P=0.000$ 。KT 与增殖倍数之间存在二次函数关系, 回归方程为: $y=-94.167x^2+26.217x+1.605$, 其中相关系数 $r=0.696$, $F=4.234$, $P=0.051$ 。

表 8 不同外源激素对增殖倍数影响的方差分析

指标	自由度	平方和	均方	F	Sig
6-BA	3	7.7625	2.5875	56.454545	0.000
KT	3	22.789167	7.5963889	138.11616	0.000

3 结论

该试验中, 以石路叶片为外植体进行组织培养, 成功诱导芽的发生, 且增殖系数大。石路叶片上的黄色斑点是由真菌 *Phoma* spp 引起的 (Furukawa & Kish, 2004), 通过该试验方法获得的新植株仍带有黄色斑点,

保持了原有植物的观赏性, 为下一步的品种改良提供了丰富的试验材料。而在其它的相关研究中, 采用的外植体为花苞或芽, 不仅受季节或数量的限制, 而且不利于种源的保护。

试验获得最佳灭菌方法为: 0.1% 升汞灭菌 10 min, 叶片切割面积为 1.0 cm×1.0 cm。污染率为 21.67%, 成活率为 48.33%。

最佳愈伤诱导培养基为: MS+KT 0.5 mg/L+NAA 1.0 mg/L, 诱导率达 82.46%, 芽的分化率为 40.43%。最佳增殖培养基为: MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L, 增殖倍数达到 3.27。

参考文献

[1] 周国宁, 孙晓萍. 大吴风草的引种栽培及应用[J]. 植物杂志, 2000 (1): 22-23.

[2] Masahiro Usukura, Ryoko Imaichi, Masahiro Kato. Leaf morphology of a facultative rheophyte, *Farfugium japonicum* var. *luchuense* (Compositae) [J]. Journal of Plant Research 1999 107: 263-267.

[3] Naofumi Nomura, Hiroaki Setoguchi, Tokushiro Takaso. Functional consequences of stenophylly for leaf productivity: comparison of the anatomy and physiology of a rheophyte *Farfugium japonicum* var. *luchuense* and a related non-rheophyte *F. japonicum* (Asteraceae) [J]. Journal of Plant Research, 2006, 119: 645-656.

[4] 周根余, 杨永刚. 花叶如意的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2003, 39(3): 224-224.

[5] 胡益明, 甘烦远, 彭丽萍, 等. 药用植物花粉绣线菊的组织培养的建立与快速繁殖研究[J]. 中草药, 2001, 32(11): 1030-1033.

[6] 杜娟, 杨柏明. 蹄叶橐吾的组织培养及植株再生[J]. 植物生理学通讯, 2006, 42(4): 687.

[7] 吴迪瑶, 黄亮. 橐吾化学成分研究及蹄叶大头橐吾组织培养方法研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2006.

[8] 王小青, 李玲. 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: 42-51.

[9] 刘守金, 戚欢阳. 中国西北地区橐吾属植物的种类及药用资源[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(1): 793-796.

Study On Tissue Culture Propagation Technique of
Farfugium japonica cv. *aureo-maculatum*

ZHU Zhi-yong¹, MIAO Yu-ming², HU Zhong-yi¹

(1. Ningbo City College of Ocational Technology, Ningbo, Zhejiang 315502; 2. Ningbo Lvcheng Gardens Construction and Virescence Project Limited Company, Ningbo, Zhejiang 315000)

Abstract: To study the establishment of germfree system, the effection of different extrogenous phytohormone concentration on the induction and proliferation, the leaves of *Farfugium japonica* cv. *aureo-maculatum* were taken as explants in this experiment. Results indicated that the explants disinfested in 0.1% HgCl₂ for 10 minutes was the best for establishment of germfree system and its pollution rate was 1.67% and survival rate wais 48.33%; the highest callusing rate (82.46%) and induction rate (40.43%) were obtained on the medium of MS+KT 0.5 mg/L+NAA 1.0 mg/L and MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L was most ideal proliferated medium, its proliferation multiple was 3.27.

Key words: *Farfugium japonica* cv. *aureo-maculatum*; leaf explants; tissue culture; induction