石海椒组织培养研究

古　玉，李　龙，许　强

（四川农业大学 生命理学院，四川 雅安 625014）

摘　要：以石海椒愈伤组织为试材，研究不同培养基和激素配比对不定芽分化和不定根诱导的影响，以建立石海椒快繁体系。结果表明：石海椒愈伤组织不定芽分化最佳配方为 MS＋1.5 mg/L 6-BA＋0.3 mg/L NAA，不定根诱导最佳培养条件为 1/2MS＋1.5 mg/L NAA＋0.5 mg/L VB_1。

关键词：石海椒；不定芽分化；不定根诱导

中图分类号：S 567.79　**文献标识码**：A　**文章编号**：1001－0009(2012)05－0130－03

石海椒[*Reinwardtia trigyna*(Roxb.) Planch.]为亚麻科石海椒属多年生常绿半灌木，别名金雀梅、黄亚麻、迎春柳，在《全国中草药汇编》中亦名过山青，产于中国四川、云南、贵州、湖北等地。喜生于石灰岩形成的土壤，常见于路旁、山坡、岩石或沟边。因其叶片四季常青，花数多、花期长，花色金黄典雅，香气淡雅、观赏性极高，目前在热带亚热带园林中广为种植，也作为盆景栽培。始载《四川中药志》，其嫩枝、茎和叶供药用，性寒味甘，能清小肠湿热、利尿。用于黄疸型肝炎、肾炎、小便不利、鼻衄[1]。据初步研究，其含有强心苷、酚类、三萜皂苷等，可作为药用植物进一步研究。石海椒以扦插和分株繁殖，大面积和产业化栽培受到限制。目前国内外关于石海椒的报道很少，仅在观赏价值、栽培方法和生物学特性[2]等方面有报道，而对其组织培养仅古玉等[3]进行了愈伤组织诱导和增殖研究。该试验旨在前期试验基础上，研究建立和完善石海椒快速繁育体系的条件，为利用生物技术实施品种繁育、种苗工厂化生产及有效成分获取奠定基础。

1　材料与方法

1.1　试验材料

石海椒幼嫩叶片，于 6 月中旬采至四川雅安老板山(海拔约 500 m)。

1.2　试验方法

1.2.1　愈伤组织诱导及增殖　按照试验前期筛选出的最优愈伤组织培养及增殖条件[3]对幼嫩叶片进行培养，获得生长良好的愈伤组织。

1.2.2　不定芽的分化　将生长良好的愈伤组织以 MS 为基本培养基，附加不同浓度细胞分裂素 6-BA(1.0、1.5、2.0 mg/L)和生长素 NAA(0.3、0.6、0.9 mg/L)，采用随机区组试验设计。共 9 个处理，5 次重复，每重复 20 个材料。每天观察芽开始分化的时间，20 d 时统计分化成芽的数量，观察芽增殖情况。计算芽分化率。用 Spss 软件进行方差分析。采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)的 LSD 多重比较法(Multiple Comparisons)分析筛选最优配方培养基。芽分化率(%)＝成芽个数/接种愈伤组织数×100。

1.2.3　生根培养　当无菌苗生长到 2 cm 左右时，将其转入生根培养基中诱导生根。以 1/2MS 为基本培养基，添加不同浓度生长素 NAA(1.0、1.5、2.0 mg/L)或 IAA(2.0、3.0、4.0 mg/L)，附加 VB_1 0.5 mg/L，于 25℃进行生根培养。共 6 个处理，3 次重复，每重复 10 个材料。5 d后开始观察根分化的时间，15 d 时统计生根的数量及生长情况。计算生根率。用 Spss 软件进行方差分析。采用单因素方差分析的 LSD 多重比较法进行差异显著性分析，以筛选最优配方培养基。生根率(%)＝生根无菌苗数/接种无菌苗数×100。

1.2.4　练苗与移栽　当大部分根长达 4 cm 以上时，将培养瓶置于温棚中练苗 1 周，取出生根苗，洗净根部附着的培养基，移入花卉土中。保持温度 25℃左右、空气湿度 85%以上和光照强度为 70～110 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$。

2　结果与分析

2.1　不定芽的分化

接种后的 4 d 内，愈伤组织变绿，增大；第 8 天左右有小突起，持续到第 14 天左右出现小芽孢，第 16 天左右长出微透明的绿色幼芽，幼芽生长缓慢，8 d 左右生长到约 2 cm(图 1)。由表 1 可知，在 6-BA 1.5 mg/L，NAA 0.3 mg/L，即 6-BA∶NAA＝5∶1 时芽的分化率最高，达 92%，极显著高于其它处理组。NAA 为 0.3 mg/L 低浓度时，6-BA 在 1.5 mg/L 达到最高分化率，浓度过高、低

第一作者简介：古玉(1981-)，女，四川成都人，硕士，实验师，现主要从事药用植物资源的开发利用研究工作。E-mail：guyu632@qq.com。

基金项目：四川农业大学教学质量推进计划资助项目。

收稿日期：2011－12－14

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

浓度时都会降低分化率。NAA 为 0.6 和 0.9 mg/L 中高浓度时,随着 6-BA 浓度增加,分化率升高。根据 6-BA∶NAA 的比值,随着比值减小,不定芽分化率呈现先升高后降低的趋势;故细胞分裂素与生长素的比例过大或过小都会影响芽的分化。总体来看,6-BA 的浓度对芽分化的影响较 NAA 大。

表 1 各处理组间芽分化率差异显著性分析

处理组合	6-BA /mg·L^{-1}	NAA /mg·L^{-1}	6-BA∶NAA	平均芽分化率/%	方差齐性检验	差异显著性 95%	差异显著性 99%
1	1.0	0.3	10∶3	78.00	Sig.=0.064	b	B
2	1.5	0.3	5∶1	92.00	Sig.>0.05,	a	A
3	2.0	0.3	20∶3	78.00	差异不显著	b	B
4	1.0	0.6	5∶3	29.00		e	E
5	1.5	0.6	5∶2	64.00		c	C
6	2.0	0.6	10∶3	79.00		ab	B
7	1.0	0.9	10∶9	9.00		f	F
8	1.5	0.9	5∶3	30.00		e	E
9	2.0	0.9	20∶9	56.00		cd	D

2.2 生根诱导

在接种后 6 d 诱导出透明嫩白色的根,9 d 时根长入培养基,此时根长约 1.5 cm,根数较多(图 2),15 d 左右根长能达到 4 cm。石海椒在 NAA 中生根较快,不定芽生长健壮,在 IAA 中生根相对较慢,且植株生长瘦弱。由表 2 可知,NAA 对石海椒生根诱导效果极显著优于 IAA。由表 3 可知,NAA 为 1.5 mg/L 时生根率为 95%,极显著高于其它各处理。NAA 浓度过高和过低都不利于生根。IAA 在 2.0～4.0 mg/L 浓度间,浓度与生根率呈正相关,在 4.0 mg/L 时达到 63.33%。

表 2 激素类型对生根的影响

激素	平均生根率/%	方差齐性检验	差异显著性
NAA	73.89	Sig.=0.587>0.05,	Sig.=0.006<0.01,
IAA	41.11	差异不显著	差异极显著

表 3 各处理组间生根率差异显著性分析

处理	激素	浓度 /mg·L^{-1}	平均生根率/%	方差齐性检验	差异显著性 95%	差异显著性 99%
1	NAA	1.0	45.00	Sig.=0.674,	d	D
2	NAA	1.5	95.00	Sig.>0.05,	a	A
3	NAA	2.0	81.67	差异不显著	b	B
4	IAA	2.0	16.67		e	E
5	IAA	3.0	43.33		d	D
6	IAA	4.0	63.33		c	C

2.3 无菌苗的驯化与移栽

试管苗移栽到基质中,经历绿色、稍微变黄、再变绿的过程,到 12 d 左右长出新叶(图 3、4),生根的石海椒组培苗经过练苗移栽后,1 周内不浇水,成活率可达 81%。移栽 2 周后可进行正常的水、肥、药等人工管理。

图 1 愈伤组织分化出芽

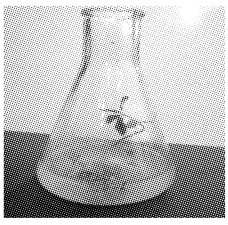

图 2 诱导生根

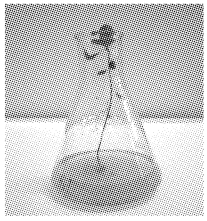

图 3 练苗

图 4 组培小苗移栽成活

3 讨论与结论

石海椒为西南地区分布广泛的药用植物,观赏性极高,全国多有栽培。但对其的研究和开发利用程度不足,组织快繁的研究为其药理、毒理、栽培的深入研究提供条件。初次分割愈伤组织时,在无菌滤纸上进行,发现滤纸吸收大量愈伤组织水分,导致材料接种到培养基中后极易枯萎。后改用在无菌报纸上分割材料,吸收水分大大降低,材料未出现枯萎现象,且报纸价格低廉易得、硬度较大,更好分割材料。不定芽的诱导过程中,有些未用来做不定根诱导的材料长期生长在不定芽诱导培养基中,较长一段时间后也长出了根,可能是因为在芽诱导培养基中细胞分裂素大量被消耗,而生长素消耗较慢,以至一段时间后生长素的浓度适合诱导出根。也可能是石海椒幼芽产生的次生代谢产物能诱导生根。

该试验采用幼叶为外植体诱导出愈伤组织,然后分化出芽、根的方法,此法好处是培养量大,能长期获得材料,可大大降低生产成本,故工厂化生产时,可考虑用此法[4]。试管苗要顺利完成从试管内到外界的适应过程,移栽前的练苗非常重要[5]。练苗能提高试管苗对外界环境的抵抗力,使其从一个完全封闭的无菌环境中进入完全开放的环境中间过渡,适宜的练苗过程,能增强植株的抵抗力,对移栽后的成活至关重要。该试验在移栽前将封口膜打开 2～3 d 后才将其移栽到灭菌的花卉土中,以让其慢慢适应外界环境条件。移栽的前 2 周尽量保持较高的空气湿度。

根据试验结果石海椒愈伤组织的不定芽诱导最佳培养条件为 MS+1.5 mg/L 6-BA+0.3 mg/L NAA,无菌苗不定根诱导的最佳培养条件为 1/2MS+1.5 mg/L NAA+0.5 mg/L VB_1,所有的培养基均附加 1.0%的琼脂,3%的蔗糖,pH 6.2。培养室温度为(25±2)℃,光照强度为 70～110 μmol·m^{-2}·s^{-1},光照时间 8 h/d。

参考文献

[1] 全国中草药汇编编写组.全国中草药汇编(下册)[M].北京:人民卫生出版社,1996:230.

[2] 彭世逞.野生花卉石海椒的生物学特性观察和栽培[J].西昌学院学报(自然科学版),2008,22(2):1-3.

[3] 古玉,许强,李龙.石海椒愈伤组织诱导与增殖研究[J].北方园艺,2011(9):130-134.

[4] 陈耀峰.植物组织与细胞培养[M].北京:中国农业出版社,2007:58-64.

[5] 张敏,张曙光,孙红绪.重瓣矮牵牛的组织培养和快速繁殖[J].植物生理学通讯,2003,39(2):144.

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

铁皮石斛幼苗壮苗培养的研究

余丽莹[1]，周雅琴[1]，韦　莹[1]，余海霞[1]，谭小明[1,2]

(1.广西药用植物园，广西 南宁 530023；2.中国医学科学院-北京协和医学院 药用植物研究所药用植物菌根研究室，北京 100094)

摘　要：以铁皮石斛无菌幼苗为外植体，研究不同基本培养基、生长激素、天然添加物、蔗糖浓度和活性炭浓度对幼苗壮苗的影响。结果表明：苗龄4个月的铁皮石斛幼苗最佳的壮苗培养基为：1/2MS＋1.0 mg/L NAA＋30%椰汁＋30 g/L蔗糖＋2 g/L活性炭＋8 g/L琼脂，pH 5.8。

关键词：铁皮石斛幼苗；壮苗培养基；椰汁；NAA

中图分类号：S 682.31　**文献标识码**：B　**文章编号**：1001－0009(2012)05－0132－03

铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimura et Migo)属兰科(Orchidaceae)石斛属(*Dendrobium*)多年生附生草本。常生长在海拔达1 600 m的山坡半阴湿的岩石上，在我国主要分布云南东南部(石屏、文山、麻栗坡、西畴)、广西西北部(天峨)和浙江东部(天台、仙居)等地[1]；是《中国药典》2010版收录的铁皮石斛药材的原植物，是石斛药材中最珍贵的品种，具有滋阴清热、益胃生津的功效，用于热病津伤、口干烦渴、胃阴不足、食少干呕、病后虚热不退、阴虚火旺、骨蒸劳热、目暗不明、筋骨痿软[2]。近年来化学和药理研究表明铁皮石斛中含有丰富的多糖类成分[3]，这种多糖成分具有增强人体免疫力、防癌抗癌、恢复嗓音等功效[4-5]。加工后的铁皮石斛俗称为“铁皮枫斗”[2]，市场价格昂贵，是一种医用价值和经济价值都很高的名贵中药[6-7]。近年来由于过度采挖、原始森林生态环境破坏等原因，铁皮石斛野生资源逐年减少，而其对生境要求苛刻、自身繁殖率低等生理因素，导致了铁皮石斛濒临灭绝[8]，现已被列入《中国植物红皮书》[9]。为了保护这一濒危的名贵中药，国内的学者开展了铁皮石斛的组培快繁、种子萌发及菌根方面的研究[10-13]，取得了一定的进展。但在铁皮石斛幼苗壮苗培养方面研究得还不够细致，目前铁皮石斛试管苗弱、移栽成活率低、壮苗周期长还是铁皮石斛大规模生产的障碍。为此，该试验探讨了基本培养基、生长激素、天然添加物和蔗糖及活性炭等对铁皮石斛幼苗壮苗的影响。

第一作者简介：余丽莹(1974-)，女，硕士，副研究员，现主要从事药用植物资源学研究和药用植物保育工作。

基金项目：广西药用植物园青年基金资助项目(桂药基200810)；广西自然科学基金资助项目(桂科自0447040)。

收稿日期：2011－12－05

1　材料与方法

1.1　试验材料

铁皮石斛(*D. officinale*)蒴果，采自云南西双版纳(图1左)。将铁皮石斛蒴果用70%的乙醇消毒1 min，2.5%次氯酸钠消毒10 min，无菌水冲洗3次。然后，用无菌的手术刀切开果皮取出种子，播种在N6培养基上。然后在25℃光暗交替培养4个月，即可获得该研究所需的无菌幼苗(图1右)，幼苗有1～2条根，真叶2～3片。

1.2　试验方法

1.2.1　基本培养基对幼苗生长的影响　研究1/2MS(大量元素减半)、MS、B_5、KC、WT等5种不同基本培养基对幼苗生长的影响。分别添加NAA 1.0 mg/L、30%椰汁和30 g/L蔗糖。

Study on Tissue Culture of *Reinwardtia trigyna* (Roxb.) Planch.

GU Yu, LI Long, XU Qiang

(College of Biology and Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014)

Abstract: With *R. trigyna* as material, influence of adventious bud differentiation and adventitious root induced that effect by different medium and auxin ratio were studied, to establish *Reinwardtia trigyna* (Roxb.) Planch. rapid propagation system. The results showed that the best condition for *R. trigyna* adventitious bud differentiation was MS＋1.5 mg/L 6-BA＋0.3 mg/L NAA, and the best culture conditions for adventitious roots induced was 1/2MS＋1.5 mg/L NAA＋0.5 mg/L VB_1.

Key words: *Reinwardtia trigyna* (Roxb.) Planch.; adventitious bud differentiation; adventitious roots induced

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn