

## 濒危药材红芽大戟组培快繁影响因素研究\*

# Influencing Factors on Rapid Propagation of *Knoxia corymbosa* Willd

莫勇生, 孙文波, 张红岩

MO Yong-sheng, SUN Wen-bo, ZHANG Hong-yan

(广西科学院生物研究所, 广西南宁 530007)

(Institute of Biology of Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China)

**摘要:**【目的】研究濒危药材红芽大戟(*Knoxia corymbosa* Willd)最适宜的组培快繁方法,为规模化生产红芽大戟提供依据。【方法】选取红芽大戟不同组织器官为外植体,采用不同配方的培养基培养,研究影响外植体诱导分化、增殖和生根的因素,筛选获得最佳培养基。【结果】外植体采用茎尖优于叶轴、叶片,茎尖接种于MS+1.5mg/L 6-BA+0.15mg/L NAA,萌芽率为100%,MS+3.0mg/L 6-BA+0.30mg/L NAA最适用于继代增殖培养,1/2MS+2.0mg/L IBA+0.2mg/L NAA最合适合生根培养。【结论】选取合适的外植体,采用适宜的培养条件和培养基,可以有效地进行红芽大戟的组培快繁。

**关键词:**红芽大戟 外植体 组织培养 影响因素

**中图分类号:**S567.239 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-7378(2014)03-0181-04

**Abstract:**【Objective】To establish tissue culture and rapid propagation of *Knoxia corymbosa* Willd, and provide advices for industrial production of *Knoxia corymbosa* Willd. 【Methods】Different tissue or organs of *Knoxia corymbosa* Willd as explants are cultured in different growth media for the selection of the optimum experimental scheme. The factors affecting explants induction, differentiation, proliferation and rooting culture medium are studied for screening the best culture medium. 【Results】Using meristems of young plants as explants cultured in MS+6-BA 1.5mg/L+NAA 0.15mg/L medium is the best way for inducing meristems and germination rate is 100%. MS+6-BA 3.0mg/L+NAA 0.3mg/L is suitable for the subculture value-added culture, 1/2MS+IBA 2.0mg/L+NAA 0.2mg/L is suitable for rooting culture. 【Conclusion】Given the appropriate culture conditions and the suitable medium can successfully achieve the tissue culture of *Knoxia valerianoides*.

**Key words:** *Knoxia corymbosa* Willd, explants, tissue culture, influencing factors

【研究意义】红芽大戟(*Knoxia corymbosa* Willd)系茜草科红芽大戟属,多年生、直立草本植物。国内主要分布于台湾、广东、香港、海南、广西等省区,生长于低海拔旷野草丛中。红芽大戟主要以地下块根入药,其主要成分为蒽醌类化合物,主治

胸腹积水,痰饮喘满,水肿腹胀,二便不利,痈肿疮毒等,具有泻水、解毒、散结、抗菌的功效,特别是对金黄色葡萄球菌和绿脓杆菌有较强的抑制作用<sup>[1]</sup>。我国红芽大戟年需求量几十万公斤,但其年产量不足两万公斤,而且原产地云南,广东,广西等省野生资源历经几十载大肆采挖,濒临枯竭,种质资源受到严重的破坏。为了保护我国这味珍稀天然野生药材不遭受人类采挖灭绝之灾,国家医药管理局列其为一级保护野生中药材,并且对产区封禁<sup>[2,3]</sup>。因此开展红芽大戟的基础研究,具有十分重要的意义。红

收稿日期:2014-06-03

修回日期:2014-07-07

作者简介:莫勇生(1984-),男,助理研究员,主要从事植物组织培养和食用菌方面的研究。

\* 广西自然科学基金项目(2010GXNSFB01302)资助。

芽大戟种子繁殖非常缓慢,自然繁殖的种子发芽率不到1%,用常规方法储藏一年以上的种子基本丧失活力,几乎不能出苗<sup>[4,5]</sup>。因此,利用组织培养技术对红芽大戟进行快繁,在较短时间内生产出大量的优质种苗,减少野生资源的过度采挖,为人工种植提供种苗,扩大人工栽培面积,满足药商生产企业对红芽大戟原材料的需求,稳定红芽大戟药材市场,为我国红芽大戟制药行业的健康可持续发展提供坚强后盾。【前人研究进展】目前红芽大戟的组培研究开展不多,虽都能够诱导出芽和生根,但组培产生的苗较弱,生根率低且根系不发达导致后期下地炼苗成活率不高,制约了人工栽培红芽大戟的发展。【本研究切入点】选取幼苗不同部位作为外植体,采用MS基本培养基加入不同浓度的激素,分析研究诱导分化、继代增殖、生根培养情况。【拟解决的关键问题】筛选获得最佳的组培快繁外植体以及最适宜培养基配方,达到组培过程中生根前的壮苗培养及生根率高且根系发达的目的,快速为人工种植提供优质的组培苗。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

2010年冬季采挖于广西上林县白圩镇覃排村马山坡的野生块茎,埋土种植于广西南宁市大岭路98号广西科学院生物研究所种苗圃,2011年6月为实生半年幼苗。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 培养基的配制

不同浓度的诱导分化培养基配制:以MS为基本培养基,加入4个浓度水平的6-BA和NAA:(1)1.0mg/L 6-BA、0.10mg/L NAA,(2)1.5mg/L 6-BA、0.15mg/L NAA,(3)2.0mg/L 6-BA、0.20mg/L NAA,(4)2.5mg/L 6-BA、0.25mg/L NAA,2%蔗糖,0.4%琼脂。

不同浓度的继代增殖培养基配制:以MS为基本培养基,加入4个浓度水平的6-BA和NAA:(1)2.0mg/L 6-BA、0.20mg/L NAA,(2)2.5mg/L 6-BA、0.25mg/L NAA,(3)3.0mg/L 6-BA、0.30mg/L NAA,(4)3.5mg/L 6-BA、0.35mg/L NAA,2%蔗糖,0.4%琼脂。

不同浓度的生根培养基配制:以1/2MS为基本培养基,加入4个浓度水平的IBA和NAA:(1)1.0mg/L IBA、0.1mg/L NAA,(2)2.0mg/L IBA、0.2mg/L NAA,(3)3.0mg/L IBA、0.3mg/L

NAA,(4)4.0mg/L IBA、0.4mg/L NAA,1%蔗糖,0.4%琼脂。

pH值均为5.8。

#### 1.2.2 外植体的处理

外植体的选择:选高为20~30cm的健壮苗株,取茎尖、叶轴、叶片3个部位作为外植体各40段(张)带回实验室进行处理。

外植体的消毒:将3个部位的外植体置于不同烧杯中,流水冲洗4min,茎尖、叶轴切成3~4cm小段,叶片切成约1.5cm×1.5cm的片状分别放入玻璃瓶中<sup>[6]</sup>,在超净工作台上,把预处理好的外植体分类放入带盖容器当中,先用次氯酸钠溶液浸泡消毒3~4min,用蒸馏水洗3~4次,倒入浓度0.12%的升汞溶液浸泡,时间分别为茎尖3~4min,叶轴5min,叶片6min,浸泡后用蒸馏水洗4~5次,最后将外植体取出放置于无菌滤纸上,吸干水分,放入接种碟中待用。

外植体的接种:切去外植体两端及周围褪色坏死的组织,切成约2~3cm的小段或1.0cm×1.0cm的小块,按其生长极性插入诱导分化培养基中,叶片平放在培养基面上。各部位的外植体在不同浓度的诱导分化培养基中各接20瓶,1瓶放1个外植体,共接种240瓶。

#### 1.2.3 外植体的培养

接种的外植体,置于光照培养室中,光照强度2000~2200Lx,光照时间12h/d,培养温度25~28℃。培养6d后,观察污染率。将获得的无菌外植体进行芽诱导培养,3个部位的无菌外植体每瓶放5个接种于不同浓度的诱导分化培养基中。当外植体诱导出新芽长至约2~3cm时,去掉底部的愈伤组织接种于不同浓度的继代增殖培养基中进行增殖培养。几次增殖培养后,选取健壮的继代苗切成单节接种于不同浓度的生根培养基中进行生根培养。

污染率=污染个数/接种个数;增殖系数=一个周期内形成的有效苗数/接种苗数。

## 2 结果与分析

### 2.1 无菌外植体的筛选

3个部位作为外植体培养6d后,统计污染率,结果得出叶片、叶轴、茎尖污染率分别为37.5%,25%,10%,茎尖的消毒时间比前两者短,但污染率却低于它们。可能的原因是由于茎尖相对于叶轴和叶片生长时间短,接触外界环境的时间也短,外界杂菌附着较少,容易彻底消毒。因此,选择红芽大戟植

株的茎尖作为外植体是获取无菌外植体较为科学和理想的方式。

## 2.2 无菌外植体的培养

3个部位的无菌外植体培养4~5d后均分化白色的愈伤组织,10~12d后茎尖萌发浅绿新芽并生长(图1),叶轴和叶片未能出芽;20d后茎尖的萌芽率达70%~100%。继代增殖培养8~10d后产生丛生芽(图2),10~12d后底部开始出现须根,20~30d后可以分化出较多的淡黄色小根(图3)。结果看出在4种不同浓度的诱导分化培养基中,茎尖均能较好地诱导出芽,而叶轴和叶片只能分化出愈伤组织,未能出芽,原因应该与茎尖上的顶芽有关,顶芽是植物生长过程中的一种初级状态,在培养基和培养条件均适合它生长时,就会萌发,且顶芽不经过愈伤组织分化诱导出芽,直接诱导产生丛芽。因此,在红芽大戟的组培快繁中,选择茎尖作为外植体明显优于叶轴和叶片。

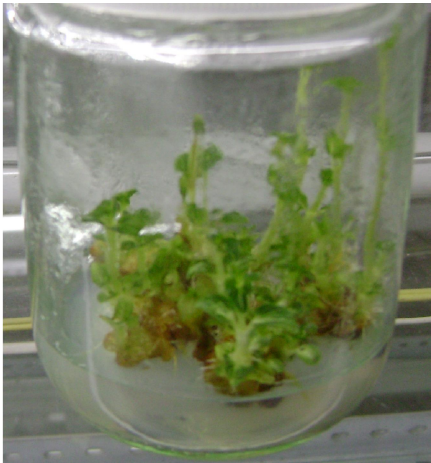


图1 诱导培养效果

Fig. 1 Culture effect of induction culture

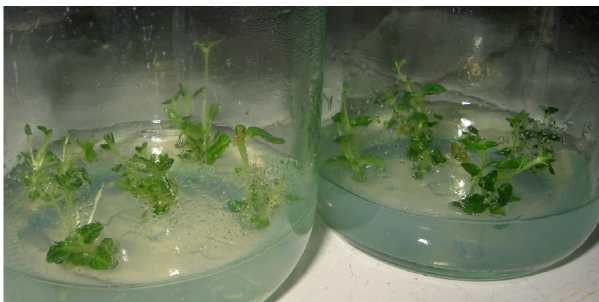


图2 增殖培养效果

Fig. 2 Culture effect of value-added culture

## 2.3 不同浓度的培养基对红芽大戟茎尖组织培养各阶段的影响

### 2.3.1 诱导分化阶段

表1结果显示,在4种不同浓度的培养基中,茎尖均能顺利诱导出芽,但是处于中低浓度的6-BA

(1.5mg/L)更有利于茎尖的萌芽(100%),原因可能与茎尖上自带的激素水平有关,低激素浓度不足以打破其休眠,高浓度则导致其内部激素失衡反而抑制其芽的萌发。



图3 生根培养效果

Fig. 3 Culture effect of rooting culture

表1 不同激素浓度对茎尖诱导出芽的影响

Table 1 Effects of different hormone concentrations on induction of shoot tip sprouting

激素水平 Hormone levels(mg · L <sup>-1</sup> )		无菌外植体数 Number of sterile explants	萌芽数 Bud number	诱芽率 Budding rate(%)	芽的颜色 Bud color
6-BA	NAA				
1.0	0.10	20	12	60	淡绿色 Light green
1.5	0.15	17	17	100	绿色 Green
2.0	0.20	18	14	77.8	绿色 Green
2.5	0.25	15	10	66.7	淡绿色 Light green

### 2.3.2 继代增殖阶段

表2结果显示,由于诱导分化阶段培养基中的激素进入体内积累,在继代繁殖中,中等浓度的6-BA(3mg/L)反而更好的促进丛生芽的产生。随着继代数增加,6-BA的积累导致组织中细胞分裂素浓度的增加,从而加速苗细胞分裂速度,增殖率得以提高。增殖率随着继代数增加而相应增加的现象是6-BA浓度与苗幼态化两个因素共同作用的结果,与文献[7]的结论类似。

表2 不同浓度激素对茎尖继代增殖的影响

Table 2 Effects of different hormone concentrations on shoot tip subculture proliferation

激素水平 Hormone levels(mg · L <sup>-1</sup> )		原种苗数 Seed number	诱出苗数 Number of Plantlets	增殖系数 Multiplication coefficient
6-BA	NAA			
2.0	0.20	25	35	1.4
2.5	0.25	25	40	1.6
3.0	0.30	25	60	2.4
3.5	0.35	25	30	1.2

### 2.3.3 生根阶段

表3结果显示,IBA浓度为2.0mg/L的生根率为70%,其他浓度根系较少且气生根较多。原因可能是IBA与6-BA均属于生长素,生长素在植物体内要处于一个适宜的浓度水平才能对植物生长起到积极作用,太高或太低均制约植物的正常生长,这也与芽诱导,继代增殖阶段情况相似。

表3 不同IBA浓度对茎尖诱导生根的影响

Table 3 Effects of different IBA concentrations on shoot tip root induction

激素水平 Hormone levels (mg·L <sup>-1</sup> )		接种株数 Inoculation of plants	生根株数 Rooting plants	生根率 Rooting rate(%)	每株根数 Number of roots per plant
IBA	NAA				
1.0	0.1	40	8	20	4~5
2.0	0.2	40	28	70	8~10
3.0	0.3	40	4	10	3~4
4.0	0.4	40	0	0	0

## 3 结论

红芽大戟组培快繁的最佳外植体是茎尖,其在污染率控制和诱导芽时间方面都优于叶轴和叶片。诱导分化、继代、生根培养基最佳配方分别为MS+6-BA 1.5mg/L+NAA 0.15mg/L+2%蔗糖+0.4%琼脂,MS+6-BA 3.0mg/L+NAA 0.30mg/L+2%蔗糖+0.4%琼脂,1/2MS+IBA 2.0mg/L+NAA 0.2mg/L+1%蔗糖+0.4%琼脂。在2000~2200Lx的光照强度培养下,红芽大戟试管苗植株普遍出现失绿的现象,大部分叶子呈淡黄绿色,叶子也不厚泽,这可能是由于红芽大戟为喜光植物<sup>[8]</sup>,光照强度影响试管苗的光合作用及其形态建成,相关培养条件试验有待进一步研究。在生根培养阶段,出现较多的气生根,影响了瓶内空间和后期炼苗质量,相关优化的生根培养基配方需要进一步深入研究和探讨,完善和建成红芽大戟组培快繁技术体系。

### 参考文献:

[1] 韦莹,余丽莹,黄浩,等.红芽大戟愈伤组织诱导及分化研究[J].广西植物,2009,29(6):817-821.

Wei Y, Yu L Y, Huang H, et al. Studies on induction

and differentiation of callus of *Knoxia valerianoides* [J]. Guihaia, 2009, 29(6): 817-821.

[2] 唐云永.发展红大戟大有前途[J].市场营销,2004(12):60.

Tang Y Y. It is very promising to develop *Knoxia valerianoides* [J]. Marketing, 2004(12): 60.

[3] 张弘,侯丽丽,高帅,等.红芽大戟的组培快繁技术研究[J].热带林业,2013,41(3):39-40.

Zhang H, Hou L L, Gao S, et al. Study on tissue culture and rapid propagation of *Knoxia valerianoides* [J]. Tropical Forestry, 2013, 41(3): 39-40.

[4] 黄浩,韦鹏霄,岑秀芬,等.红芽大戟组培苗移栽技术的研究[J].热带农业科技,2007,30(3):27-31.

Huang H, Wei P X, Cen X F, et al. Study on transplanting technology *Knoxia valerianoides* Plantlets in vitro [J]. Tropical agricultural science and technology, 2007, 30(3): 27-31.

[5] 何茂全,胡延松,黄健君.红芽大戟的生态环境及生物学特性的观察[J].中国野生植物资源,1994(2):12-14.

He M Q, Hu Y S, Huang J J. Study on ecological environment and biological characteristics of *Knoxia valerianoides* [J]. Resources of Wild Plants China, 1994(2): 12-14.

[6] 陈芳清,丘安机.药用植物红芽大戟的组织培养[J].广西植物,1997,17(2):149-151.

Chen F Q, Qiu A J. Cultivation of medicinal plant *Knoxia valerianoides* organization [J]. Guihaia, 1997, 17(2): 149-151.

[7] 周传明,吕曼芳,陈奎,等.山苍子继代培养中芽增值效果研究[J].广西科学,2012,19(4):374-376.

Zhou C M, Lv M F, Chen K, et al. Multiplication in the successive transfer culture of *Litsea cubeba* [J]. Guangxi Sciences, 2012, 19(4): 374-376.

[8] 傅兵,汤丽云,徐祥浩.药用植物红芽大戟的生态特性研究[J].华南农业大学学报,1996,17(4):71-77.

Fu B, Tang L Y, Xu X H. Study on the ecological characteristics of medicinal plant *Knoxia valerianoides* [J]. Journal of South China Agricultural University, 1996, 17(4): 71-77.

(责任编辑:竺利波)