

魏冬梅,钟凯鸿,梁 铮. 鱼腥草叶片再生体系的建立[J]. 江苏农业科学 2013, 41(10): 45-47.

鱼腥草叶片再生体系的建立

魏冬梅,钟凯鸿,梁 铮

(台州学院生命科学学院 浙江台州 318000)

摘要:以鱼腥草叶片为外植体,在添加不同浓度的6-BA以及不同配比的6-BA与NAA组合的MS培养基上离体培养。结果表明:最适合叶片分化的培养基是MS+3.0 mg/L 6-BA,诱导分化率高达93.3%;分化出的芽转接到MS+1.5 mg/L NAA+0.5 mg/L 6-BA的培养基上根长势良好,能较快长成新的植株。

关键词:鱼腥草; 叶片; 再生体系

中图分类号: Q943.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)10-0045-02

鱼腥草(*Houttuynia cordata*)为三白草科多年生草本植物,因鲜嫩茎叶含有鱼腥味,故得名鱼腥草。分布于我国中部、东南及西南部各省区,尤以四川、湖北、湖南、江苏、浙江等省居多^[1]。其性辛,具有抗菌、抗病毒、抗炎、利尿、镇痛止血、增强体质免疫等功效^[2-7],是重要的药用植物。因幼嫩茎叶和地下茎可作蔬菜食用,鱼腥草为药食兼备的植物,被国家卫生部正式确定为“既是药品,又是食品”^[8]的极具开发潜力的资源之一,受到人们广泛关注。随着其药用和食用价值不断被发现和应用,社会需求量越来越大,但现有的野生资源由于病虫害加重,繁殖系数较低^[9],产量已经难以满足市场的需要。

目前,鱼腥草主要采用传统的地下茎切段和扦插的方法进行繁殖,严重阻碍了鱼腥草的生产。为了满足市场需求,加快鱼腥草的产业化进程,建立鱼腥草的再生体系,进行快速繁殖研究尤为重要。

1 材料与方

1.1 材料

采用的鱼腥草种子采自厦门大学生命科学学院。

1.2 方法

1.2.1 无菌苗的获得 选取籽粒饱满、大小一致的鱼腥草种子,流水冲洗30 min,用体积分数75%的乙醇表面消毒30 s,无菌水清洗3次,放于1 mg/L的HgCl₂溶液中(加3~5滴吐温-20)灭菌8~10 min(此过程需要振荡),消毒完成后无菌水清洗5次,无菌滤纸吸干表面水分接种于1/2 MS基本培养基上。25℃暗培养2 d,之后光照条件下发芽,获得鱼腥草无菌苗。

1.2.2 愈伤组织的诱导和不定芽的分化 切取苗龄14 d的叶片,将叶片切成0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm的小块,接种在含有蔗糖30 mg/L、琼脂8.0 mg/L,分别含1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mg/L 6-BA的MS培养基上,调节pH值5.8~6.2,考察

不同浓度的6-BA对愈伤组织的诱导和不定芽分化的影响。每种激素浓度培养基接种5瓶,每瓶6块叶片。培养条件:温度(25±2)℃,光照12 h/d,30 d后统计愈伤组织诱导率和不定芽分化率。愈伤组织诱导率或不定芽分化率=诱导愈伤组织或分化出不定芽的叶片数/叶片总数×100%。

1.2.3 生根培养 将高2~3 cm的不定芽切下,接种在含有蔗糖20 mg/L、琼脂8.0 mg/L,分别含0.25、0.5、1.0、1.5、2.0 mg/L NAA和0.5 mg/L 6-BA的1/2 MS培养基上,调节pH值5.8~6.2,考察不同NAA和6-BA激素浓度对比对根分化的影响。每种激素配比的培养基接种10瓶,每瓶不定芽5个。培养条件:温度(25±2)℃,光照12 h/d,20 d后统计生根率:生根率=生根的不定芽数/不定芽总数×100%。

2 结果与分析

2.1 种子萌发

用75%的乙醇进行表面消毒后,再用1 mg/L的HgCl₂消毒8~10 min,观察种子萌发情况。试验过程中发现消毒时间与种子萌发有直接关系。消毒时间小于5 min,种子全部污染;大于12 min,种子萌发需要时间长,并且萌发的小苗很快成为白化苗死亡;8~10 min消毒效果很好,没有污染,3 d后开始萌发,14 d后长成健壮的植株(图1)。



图1 萌发14 d的鱼腥草无菌苗

2.2 不定芽分化

将鱼腥草无菌苗叶片切成三角形小块(图2),接种于含不同浓度6-BA的MS培养基上。试验过程中发现,鱼腥草叶片不形成愈伤组织,可以直接分化出不定芽。7 d后叶片边缘开始变白,13 d开始有小芽点萌动,30 d叶片边缘长满不定芽(图3)。由表1可知,不添加6-BA的MS培养基中,

收稿日期:2013-03-18

基金项目:浙江省大学生科技创新活动计划(编号:2011R428009);
浙江省自然科学基金(编号:Y3110395)。

作者简介:魏冬梅(1979—),女,山东德州人,博士,讲师,主要从事植物分子生物研究。E-mail: weidongmei@tzc.edu.cn。

分化率最低,为0;添加3.0 mg/L 6-BA的MS培养基中,分化率最高,达到93.3%;随着6-BA浓度的升高或降低,不定芽分化率也随之减低。



图2 鱼腥草叶片



图3 叶片分化出的丛生芽

表1 6-BA对鱼腥草不定芽分化的影响

| 培养基 (mg/L) | 外植体数量 (个) | 分化出芽的叶片数 (个) | 分化率 (%) |
|---------------|-----------|--------------|---------|
| MS | 30 | 0 | 0 |
| MS + 1.0 6-BA | 30 | 4 | 13.3 |
| MS + 2.0 6-BA | 30 | 12 | 40.0 |
| MS + 3.0 6-BA | 30 | 28 | 93.3 |
| MS + 4.0 6-BA | 30 | 5 | 16.7 |
| MS + 5.0 6-BA | 30 | 3 | 10.0 |

2.3 生根培养

将高2~3 cm的鱼腥草不定芽切下,接种在添加不同浓度配比的NAA和6-BA的MS培养基中。试验结果,不添加任何激素的MS培养基中,不定芽基部没有膨大,不能分化形成根。在添加低浓度NAA和高浓度6-BA的MS培养基中,不定芽基部膨大,但不能分化形成根。在添加高浓度NAA和低浓度6-BA的MS培养基中,不定芽基部略微膨大,7 d后开始生根。由表2可知,添加1.5 mg/L NAA和0.5 mg/L 6-BA的MS培养基中,生根率最高,达到82%。培养过程中发现,根的长势良好,14 d后根伸长至2~3 cm,有侧根形成(图4) 植株生长旺盛;20 d后长满组培瓶(图5)。添加1.0 mg/L NAA和0.5 mg/L 6-BA的MS培养基中,根伸长缓慢,粗且短,侧根很少。添加2.0 mg/L NAA和0.5 mg/L 6-BA的MS培养基中,根生长快,但根细长。

3 讨论

鱼腥草快速繁殖外植体材料的选择至关重要。相关研究多用生长在外界环境中的鱼腥草叶片、茎段、芽为材料^[10-13],在操作中细菌污染率不容易控制。本试验采用了无菌苗的叶

表2 NAA和6-BA对鱼腥草生根的影响

| 培养基 (mg/L) | 外植体数量 (个) | 生根的不定芽数 (个) | 生根率 (%) |
|--------------------------|-----------|-------------|---------|
| MS | 50 | 0 | 0 |
| MS + 0.25 NAA + 0.5 6-BA | 50 | 0 | 0 |
| MS + 0.5 NAA + 0.5 6-BA | 50 | 0 | 0 |
| MS + 1.0 NAA + 0.5 6-BA | 50 | 27 | 54.0 |
| MS + 1.5 NAA + 0.5 6-BA | 50 | 41 | 82.0 |
| MS + 2.0 NAA + 0.5 6-BA | 50 | 34 | 68.0 |

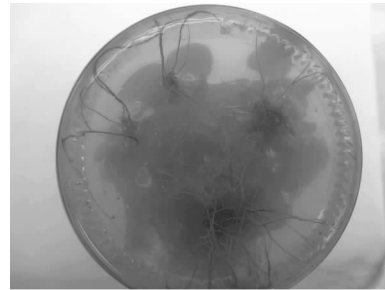


图4 不定芽分化出的根系

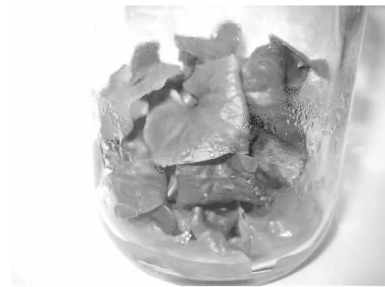


图5 具有粗壮根系的试管苗

片和茎段,大大减少了污染的概率。其中茎段很难诱导出愈伤组织,有研究证明单根茎段很难诱导出愈伤组织,成束茎段愈伤诱导率明显提高^[12]。

鱼腥草快速繁殖已有较多报道^[10-13],再生体系的建立均是外植体形成愈伤组织,不定芽形成,最终诱导生根获得再生植株。但未见从外植体叶片直接分化出不定芽的报道,笔者探索建立了鱼腥草直接由叶片分化出不定芽的再生体系,大大缩短了鱼腥草植株再生的时间。鱼腥草叶片在MS + 3.0 mg/L 6-BA上,很容易诱导分化出不定芽,表明细胞分裂素对鱼腥草的诱导分化不定芽具有重要作用。分化出的丛生芽转接到含1.5 mg/L NAA和0.5 mg/L 6-BA的培养基上能较快生根长成新的植株,符合高浓度生长素低浓度细胞分裂素易生根的原理。鱼腥草快速繁殖高效体系的建立,为开展鱼腥草细胞工程、基因工程等相关研究奠定了基础。

参考文献:

[1]吴卫. 鱼腥草的研究进展[J]. 中草药, 2001, 32(4): 81-82.
 [2]侯远生, 张旭梅. 鱼腥草注射液体外和小鼠体内抗菌作用研究[J]. 中国中药杂志, 1990, 15(4): 29-30.
 [3]朱宇同, 杨汝才, 苏章, 等. 鱼腥草非挥发油提取物抗病毒作用的研究[J]. 中草药, 1983, 14(7): 25-26.

杜敏华,柯涛,韩雪梅,等.连香树下胚轴高频离体再生体系的建立[J].江苏农业科学,2013,41(10):47-49.

连香树下胚轴高频离体再生体系的建立

杜敏华,柯涛,韩雪梅,张可可,何雨晴,周亮

(南阳师范学院生命科学与技术学院,河南南阳 473061)

摘要:以连香树(*Cercidiphyllum japonicum*)下胚轴为外植体进行离体培养,以MS、1/2MS和B5为基本培养基,附加不同浓度的细胞分裂素(CPPU、6-BA)及生长素(2,4-D)诱导下胚轴直接再生不定芽。结果表明,不定芽未经过愈伤组织而直接产生于下胚轴的表皮或近表皮等表层细胞;不同激素浓度和组合、不同培养基对不定芽的分化有影响;下胚轴的不同部位不定芽的分化能力差异显著。适宜不定芽分化的最佳培养体系为1/2MS + AgNO₃ 3.5 mg/L + 蔗糖 3.5% + 琼脂 0.5% + 2,4-D 0.4 mg/L + CPPU 1.5 mg/L,最佳外植体为靠近子叶端的下胚轴部分,分化率最高达89.3%,最高的平均每个外植体再生芽数达到18.07;生根培养基选用1/4MS + 蔗糖 4.5% + 琼脂 0.5% + 活性炭 2.5% + DA-6 3.5 mg/L + CSN 2 mg/L,生根率为83.6%,平均根数8.2。

关键词:连香树;离体培养;下胚轴;不定芽;植株再生

中图分类号:Q943.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2013)10-0047-03

连香树(*Cercidiphyllum japonicum* Sieb. et Zucc.)为连香树科连香树属原始木本植物^[1]。上白垩纪和第三纪曾广泛分布北半球,第四纪冰川期后分布区急剧缩小,现呈散分布于皖、浙、赣、鄂、川、陕、甘、豫及晋东南地区,数量不多,已成为东亚著名孑遗植物之一,对于研究第三纪植物区系起源以及中国与日本植物区系关系等具有很高的科研价值,被定为国家二级重点保护植物^[2-3]。连香树除在药材、食品、医药和化工等领域具有较高利用价值外,还作为彩叶树种被世界各国广泛引种栽培,具有较高的经济价值和观赏价值^[1,4]。连香树雌雄异株,天然更新能力较差,现多为单株分布,结实量少,种子极小,出苗纤细,难以成苗^[5-6]。通过植物组培快繁技术,可在短期内获得基因型一致的优质连香树苗,大大加快连香树育苗进程,为珍稀濒危树种连香树种质资源的保存开辟了一条新途径。组织培养繁殖连香树,仅见麦苗苗^[6]等以带腋芽茎段的离体快繁初步研究,但不定芽分化率和生根率偏

低,目前国内外尚未见到以连香树离体下胚轴为外植体而建立的高效再生体系。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试连香树种子由河南省内乡宝天曼自然保护区提供。

1.2 方 法

1.2.1 连香树下胚轴外植体的获得 在无菌条件下取连香树种子(子叶期),75%乙醇表面消毒35s,无菌水冲洗3~5次,然后2%次氯酸钠灭菌15min,无菌水冲洗4~6次;最后接种到不含激素的MS培养基上,当下胚轴长至3~4cm时,将下胚轴切成3~5mm长的小段作为外植体,用于不定芽的诱导。

1.2.2 连香树下胚轴不定芽分化 将下胚轴切成3~5mm长的小段,接种到含不同植物激素浓度及组合的MS培养基上(激素配比见表1),根据相关报道^[7-8]与预试验,确定所有培养基中均附加3.5mg/L AgNO₃、3.5%蔗糖、0.5%琼脂粉,pH值5.6。培养条件:25℃±2℃、光强为26μmol/(m²·s)、光-暗周期为15h-9h。每个处理最少接种80个外植体,3次重复。以培养5周后的不定芽分化率和外植体平均再生芽数为考察指标。

收稿日期:2013-03-19

基金项目:河南省科技攻关项目(编号:0524050006);南阳师范学院 SPCP 项目。

作者简介:杜敏华(1964—),男,河南南阳人,硕士,教授,主要从事植物组织培养及食品生物技术研究。E-mail:duminhua@163.com。

[4] Hayashi K, Kamiya M, Hayashi T. Virucidal effects of the steam distillate from *Houttuynia cordata* and its components on HSV-1, influenza virus and HIV[J]. *Planta Medica*, 1995, 61(3): 237-241.

[5] 籍秀梅, 马丽萍. 鱼腥草的研究进展[J]. 河南职工医学院学报, 2007, 19(1): 91-93.

[6] 宋志军, 王潮临, 程建祥, 等. 鱼腥草、田基黄和丁公藤注射液对大鼠免疫功能的影响[J]. 中草药, 1993, 24(12): 643-644, 648.

[7] 邵兰, 于庆海, 黄晴, 等. 合成鱼腥草素对脾切除动物细胞免疫功能的影响[J]. 中国药理学通报, 2001, 17(1): 51-54.

[8] 国家卫生部. 关于进一步规范保健食品原料管理的通知[S]. 2002.

[9] 黄世琼, 肖礼娥. 药用植物鱼腥草的研究进展[J]. 现代医药卫

生, 2010, 26(19): 2953-2954.

[10] 龚伟, 胡庭兴, 宫渊波, 等. 鱼腥草组织培养研究[J]. 亚热带植物科学, 2005, 34(1): 60-62.

[11] 袁艺, 李燕, 应明. 鱼腥草组织培养的研究[J]. 激光生物学报, 2004, 13(6): 414-417.

[12] 傅华英. 鱼腥草愈伤组织的诱导技术[J]. 亚热带农业研究, 2010, 6(4): 225-227.

[13] Chakraborti S, Sinha S, Sinha R K. High-frequency induction of multiple shoots and clonal propagation from rhizomatous nodal segments of *Houttuynia cordata* Thunb. - An ethnomedicinal herb of India[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 2006, 42: 394-398.