## 不同植物生长调节物质和培养基对浙江雪胆 组培苗繁殖系数的影响

雷祖培1、余宏傲2、张书润1、林瑞丰1、康华靖2

(1. 浙江乌岩岭国家级自然保护区 管理局,浙江 泰顺 325500; 2. 温州科技职业学院 园林系,浙江 温州 325006)

摘要:研究了 6-苄氨基腺嘌呤 (6-BA)和  $\alpha$ -萘乙酸 (NAA)2 种植物生长调节物质,以及 MS (Murashige and Skoog), B5 (Gamborg),N6 和 WPM (woody plant medium)等 4 种培养基对浙江雪胆 Hemsleya zhejiangensis 组培幼苗繁殖系数的影响。结果表明:不同 6-BA 和 NAA 质量浓度对浙江雪胆组培苗繁殖系数有较大影响,其最佳质量浓度分别为  $0.50~mg\cdot L^{-1}$  和  $0.20~mg\cdot L^{-1}$ ,其繁殖系数分别为 10.80 和 5.60,且 6-BA 的效果显著高于 NAA;而不同质量浓度的 NAA 和 6-BA 配比的最佳配方为 MS+6-BA  $1.00~mg\cdot L^{-1}$  + NAA  $0.02~mg\cdot L^{-1}$  和 MS+6-BA  $1.00~mg\cdot L^{-1}$  + NAA  $0.05~mg\cdot L^{-1}$  和 MS+6-BA MS

关键词: 植物学: 浙江雪胆: 组织培养: 植物生长调节物质: 培养基: 繁殖系数

中图分类号: Q948.1; S718.54 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2011)04-0662-05

# Hemsleya zhejiangensis seedling culture with two hormones and four types of medium

LEI Zu-pei<sup>1</sup>, YU Hong-ao<sup>2</sup>, ZHANG Shu-run<sup>1</sup>, LIN Rui-feng<sup>1</sup>, KANG Hua-jing<sup>2</sup>

(1. Management Office, Wuyanlin Nature Reserve of Zhejiang, Taishun 325500, Zhejiang, China; 2. Department of Landscape Architecture, The Science and Technology College of Wenzhou, Wenzhou 325006, Zhejiang, China)

Abstract: Hemsleya zhejiangensis is an endemic species in China, its population of H. zhejiangensis is declining due to the lack of seedlings and the resource volume should expanded to sustain the population exist. The tissue culture was of H. zhejiangensis maily disccused in this paper. The effects of two hormones: 6-benzyladenine(6-BA) and Naphthalene acetic acid (NAA), and four types of culture media: Murashige and Skoog (MS), Gamborg (B5), N6-benzylaminopurine (N6) and woody plant medium (WPM) on the propagation of H. zhejiangensis were studied. The results were all means ±SD of fourty independent experiments. Results showed the optimum concentration (for 6-BA) was 0.50 mg·L<sup>-1</sup> and (for NAA) was 0.20 mg·L<sup>-1</sup> with propagation coefficients of 10.80 (6-BA) and 5.60 (NAA). When both hormones were used together, treatment (1) of MS + 6-BA 1.00 mg·L<sup>-1</sup> + NAA 0.02 mg·L<sup>-1</sup> and treatment (2) of MS + 6-BA 1.00 mg·L<sup>-1</sup> + NAA 0.05 mg·L<sup>-1</sup> were much better, which propagation coefficients of 19.30 (for treatment 1) and 18.10 (for treatment 2). [Ch., 1 fig. 4 tab. 7 ref.]

Key words: botany; Hemsleya zhejiangensis; tissue culture; plant growth regulating substances; culture medium; propagation coefficient

收稿日期: 2010-11-18; 修回日期: 2010-12-14

基金项目: 浙江省温州市科技局社会发展项目(S20080044)

作者简介: 雷祖培, 工程师, 从事林业保护研究。 E-mail: Leizp2007@163.com。通信作者: 康华靖, 讲师, 从 事植物学研究。 E-mail: kanghuajing@126.com

浙江雪胆 Hemsleya zhejiangensis 为葫芦科 Cucurbitaceae 雪胆属 Hemsleya 多年生攀援草本,仅分布于浙江温州泰顺乌岩岭海拔 800 m 以下的山谷灌丛中和竹林下,为浙江特有种[1]。浙江雪胆块茎具有清热解毒、消肿止痛之功效,广泛用于治疗肠炎、菌痢、冠心病、气管炎、慢性子宫颈炎、带状疱疹、肿瘤等多种疾病[2-4]。因其疗效好,副作用低,因而在医学上日益受到青睐,应用前景十分广阔。目前,对浙江雪胆的研究较少,哀建国等[5]对浙江雪胆群落学特征进行了调查研究;雷祖培等[6]对浙江雪胆体内几种金属元素分布及其与土壤养分之间的关系进行了研究;叶晓霞等[4]探讨了超声提取——分光光度法测定浙江雪胆中总皂苷含量;叶晓霞等[7]从药用角度测定浙江雪胆块茎中的微量元素,证明浙江雪胆中含有丰富的人体必需微量元素,且微量元素的含量明显高于中华雪胆,这为浙江雪胆的进一步的开发利用提供了科学依据。由于浙江雪胆种群稀少,使用茎蔓扦插繁殖母本数量极少,扦插繁殖速度慢,同时容易受季节限制,严重阻碍了以这一新药源植物的生产利用。本研究主要通过研究浙江雪胆的初代培养基和最佳植物生长调节物质配比对其增殖的影响,以进一步为块茎的快速诱导和增殖打下良好的基础,最终实施人工栽培,以解决其资源匮乏和物种的有效保护。

#### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

浙江雪胆块茎于 2008 年 12 月采自浙江乌岩岭国家级自然保护区内竹林下的雪胆群落,栽植于装有腐殖质土的花盆中,待长出幼苗后,采集具芽的幼嫩茎段作为外植体。试验于 2009 年 2 月至 2010 年 5 月在温州科技职业学院农生系生物工程研究所植物组织培养实验室中完成。

#### 1.2 试验方法

剪取茎段,用洗涤剂涮洗后自来水冲洗 1 h,再用蒸馏水冲洗 3 次,然后在超净工作台中进行操作。用体积分数为 70%乙醇浸泡 30 s,100.0 g·kg<sup>-1</sup> 次氯酸钠浸泡 8 min 进行杀菌。消毒后的幼嫩茎段用无菌水浸洗 5 次,剪去基部,留 1 cm 左右的茎段,插栽在固体 MS(Murashige and Skoog)基本培养基(蔗糖 30.0 g·kg<sup>-1</sup>,琼脂 6.0 g·kg<sup>-1</sup>,pH 5.8)中,插入深度 2~3 mm。在  $(25\pm2)$ ℃组培室中培养。7 d 后除去污染瓶,继续培养,21 d 时转接,然后进行以下植物生长调节物质和培养基对浙江雪胆组培苗繁殖系数影响的研究。

- 1.2.1 6-苄基氨基腺嘌呤(6-BA)对浙江雪胆组培苗繁殖系数的影响 以 MS 为基本培养基,附加  $\alpha$  萘乙酸(NAA)0.02 mg·L<sup>-1</sup>,酸碱度整为 pH 5.8~6.0;蔗糖为 30.0 g·L<sup>-1</sup>,琼脂作凝固剂。设置质量浓度分别为 0, 0.10, 0.20, 0.50, 1.00, 2.00, 5.00 和 10.00 mg·L<sup>-1</sup>。
- 1.2.2 NAA 对浙江雪胆组培苗繁殖系数的影响 以 MS 为基本培养基,附加 6-BA 1.00 mg·L<sup>-1</sup>,设置质量浓度分别为 0, 0.01, 0.05, 0.10, 0.50 和 1.00 mg·L<sup>-1</sup>。
- 1.2.3 不同质量浓度 NAA 和 6-BA 配比对繁殖系数的影响 以 MS 为基本培养基,附加 6-BA 和 NAA,均设置 5 个质量浓度  $(2.00,\ 1.00,\ 0.50,\ 0.10$  和  $0\ mg\cdot L^{-1}$ )组合进行不同配比试验。
- 1.2.4 不同基本培养基对繁殖系数的影响 分别以 MS, B5, N6 和 WPM(woody plant medium)等4种培养基为基本培养基,附加植物生长调节物质 6-BA  $1.00~{\rm mg}\cdot {\rm L}^{-1}$  + NAA  $0.05~{\rm mg}\cdot {\rm L}^{-1}$  进行培养试验。

在光照强度为 2 000 lx 左右, 光照时间为 10 h·d¹的培养室中进行恒温(25 ± 2) ℃培养 35 后,记录不同处理下浙江雪胆生长情况和繁殖系数。繁殖系数是指在一次继代培养中,由一个繁殖单位(嫩茎、芽、或芽丛等)产生的新苗(芽)个数。以上实验均设 5 个重复,求其平均数。

#### 2 结果与讨论

#### 2.1 6-BA 对浙江雪胆组培苗繁殖系数的影响

不同 6-BA 质量浓度对浙江雪胆组培苗的繁殖

表 1 6-BA 对浙江雪胆组培苗繁殖系数的影响

Table 1 Effect on the propagation coefficient of *Hemsleya zhejiangensis* of 6-BA

$6\text{-BA/(mg} \cdot L^{-1})$	繁殖系数
0	$1.0 \pm 0.00$ a
0.1	$2.2 \pm 0.84 \; \mathrm{bc}$
0.2	$5.2 \pm 1.48 \; \mathrm{d}$
0.5	$10.8 \pm 1.48 e$
1.0	$6.8 \pm 1.92~\mathrm{c}$
2.0	$4.6 \pm 0.89~\mathrm{d}$
5.0	$2.4 \pm 1.14 \mathrm{\ c}$
10.0	$1.6 \pm 0.89 \text{ b}$

说明:不同英文字母表明两者的差异达到显著水平(P<0.05)。

系数影响较大,不同质量浓度之间差异都达到显著水平 (表 1)。在质量浓度  $0.1\sim10.00~mg\cdot L^{-1}$ 范围内,浙江雪胆组培苗的繁殖系数随 6-BA 质量浓度的升高而呈现先升高后下降的趋势,在  $0.50~mg\cdot L^{-1}$  时其繁殖系数最大,达到 10.80; 其次为  $1.00~mg\cdot L^{-1}$ ,其值达到 6.80; 再次为  $0.20~mg\cdot L^{-1}$  和  $2.00~mg\cdot L^{-1}$ ;其余质量浓度下浙江雪胆组培苗的繁殖系数较低。

#### 2.2 NAA 对浙江雪胆组培苗繁殖系数的影响

浙江雪胆组培苗的繁殖系数在 NAA 质量浓度为 0  $mg \cdot L^{-1}$  时,组培苗的繁殖系数为 1.0;在低质量浓度(小于 0.20  $mg \cdot L^{-1}$ )下,其繁殖系数随着NAA 质量浓度的升高而增大,在 0.20  $mg \cdot L^{-1}$  时其值最大,达到 5.6(表 2);当 NAA 质量浓度

#### 表 2 NAA 对浙江雪胆组培苗繁殖系数的影响

Table 2 Effect on the propagation coefficient of *Hemsleya zhejiangensis* of NAA

NAA/(mg·L <sup>-1</sup> )	繁殖系数
0	1.0 ± 0.00 a
0.01	$2.8\pm0.84~\mathrm{c}$
0.02	$3.0 \pm 0.55 \; \mathrm{d}$
0.05	$4.0 \pm 0.89~\mathrm{e}$
0.10	$5.0 \pm 1.22 e$
0.20	$5.6 \pm 1.14 \text{ f}$
0.50	$2.0 \pm 1.22 \text{ b}$
1.00	$1.6 \pm 0.89 \text{ b}$

说明:不同英文字母表明两者的差异达到显著水平(P<0.05)。

增加至 0.50 mg·L-1 时, 浙江雪胆组培苗的繁殖系数开始受到抑制。

#### 2.3 不同质量浓度的 NAA 和 6-BA 配比对浙江雪胆组培苗繁殖系数的影响

不同质量浓度的 NAA 和 6-BA 配比对浙江雪胆组培苗繁殖系数的影响结果见表 3。试验表明:最适宜于浙江雪胆组培快繁的芽分化诱导培养基配方为 MS + 6-BA 1.00  $mg \cdot L^{-1}$  + NAA 0.02  $mg \cdot L^{-1}$  和 MS + 6-BA 1.00  $mg \cdot L^{-1}$  + NAA 0.05  $mg \cdot L^{-1}$ 。2 种配方下的浙江雪胆组培苗繁殖系数无显著差异。

#### 表 3 6-BA 和 NAA 不同质量浓度配比对浙江雪胆组培苗繁殖系数的影响

Table 3 Effect on the propagation coefficient of Hemsleya zhejiangensis of 6-BA and NAA

植物生长调节物质		NAA 质量浓度/(mg·L <sup>-1</sup> )					
		0	0.02	0.05	0.1	1.0	2.0
6-BA 质量 浓度/(mg·L <sup>-1</sup> )	0	1.0 ± 0.00 a	6.3 ± 0.56 d	3.2 ± 0.25 c	3.2 ± 0.27 c	1.0 ± 0.00 a	1.6 ± 0.22 b
	0.1	$3.2 \pm 0.22~\mathrm{c}$	$3.4 \pm 0.45~\mathrm{c}$	$6.1 \pm 0.83~\mathrm{d}$	$2.0 \pm 0.13~\mathrm{b}$	$3.2 \pm 0.11~\mathrm{c}$	$7.6 \pm 1.05~\mathrm{e}$
	0.5	$10.3 \pm 0.65 \text{ f}$	$9.2 \pm 2.33 \text{ ef}$	$14.2 \pm 2.03 \text{ g}$	$6.3 \pm 1.34 \; \mathrm{d}$	$12.1 \pm 1.78$	$8.0 \pm 0.54~\mathrm{e}$
	1.0	$8.5\pm1.57~\mathrm{e}$	19.3 ± 3.57 h	18.1 ± 2.93 h	$10.2 \pm 1.79 \text{ f}$	$10.2 \pm 1.96 \text{ f}$	$2.8 \pm 0.37~\mathrm{c}$
	2.0	$6.4 \pm 1.24 \; \mathrm{d}$	$10.6 \pm 2.61 \text{ f}$	$13.4 \pm 1.89 \; \mathrm{g}$	$11.1 \pm 2.14 \text{ f}$	$9.3\pm1.69~\mathrm{ef}$	$6.0 \pm 1.02~\mathrm{d}$

说明:不同英文字母表明两者的差异达到显著水平(P<0.05)。

# 2.4 不同基本培养基对浙江雪胆组培苗繁殖系数的影响

以 WPM, B5, N6 和 MS 为基本培养基对 浙江雪胆组培苗繁殖系数的影响见表 4。不同 培养基下浙江雪胆组培苗繁殖系数均较高,其 中以 MS 培养基的效果最佳,其繁殖系数达到 16.80,与其他 3 种培养基相比,其差异达到了 显著水平。

#### 3 讨论和结论

试验表明: 在没有植物生长调节物质处理

#### 表 4 不同培养基对浙江雪胆组培苗繁殖系数的影响

Table 4 Effect of basic medium on the propagation coefficient of Hemsleya zhejiangensis

培养基	繁殖系数
MS	16.8 ± 0.89 c
B5	$12.6 \pm 2.65 \text{ b}$
N6	$8.6 \pm 2.30 \text{ a}$
WPM	$12.4 \pm 2.97 \text{ b}$

说明:不同英文字母表明两者的差异达到显著水平(P<0.05)。

下,浙江雪胆组培苗繁殖系数均为 1.00; 不同 6-BA 和 NAA 质量浓度对其组培苗繁殖系数有较大影响,最佳质量浓度分别为  $0.50~\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $0.20~\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,其繁殖系数分别为 10.80~和~5.60; 6-BA 对浙江雪胆丛生芽分化的促进作用显著高于 NAA。不同质量浓度的 NAA 和 6-BA 配比的最佳配方为 MS + 6-BA 1.00

 $mg \cdot L^{-1} + NAA 0.02 mg \cdot L^{-1}$  和 MS + 6-BA 1.0  $mg \cdot L^{-1} + NAA 0.05 mg \cdot L^{-1}$ , 2 种配比下组培苗繁殖系数分别 为 19.30 和 18.10,与单一植物生长调节物质最佳质量浓度下相比,其差异也均达到了显著水平。

通过试验观察, 25~35 d 为 1 个继代周期是较为适宜的, 因为这个时期诱导的效果可以充分表现出来, 而培养基的成分还没有完全变化到影响组织的生长, 并且可为转接提供较大量的材料。浙江雪胆对组织培养的培养基成分的要求并不严格, 基本培养基 MS, B5, N6 和 WPM 均可作为组织培养的基本培养基, 都可满足浙江雪胆生长的需要, 就快速繁殖而言, MS 和 B5 培养基是比较适宜的培养基。

植物组织培养再生小植株一般有3条途径:一是外植体先形成愈合组织,愈合组织分化出不定芽,由不定芽再发育成小植株;二是由外植体表面直接诱导产生小鳞茎或小芽,再由小鳞茎或不定芽发育成小植株;三是由组织表层和内层一些特化了的胚性细胞经多次分裂发育成胚状体而形成小鳞茎,小鳞茎再形成小植株。本实验采用第1种途径,该方法较易进行,但繁殖周期较长。本实验发现除了以上3种增殖方式外,浙江雪胆的组培苗在初代培养(2009年2月)中不经生根阶段就可形成微型块茎(2009年9月)(图1),且该微型块茎可直接发育成新个体。此法如能和茎尖培养结合起来,将为浙江雪胆脱毒种

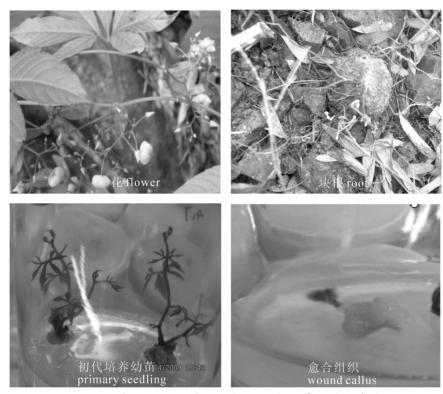


图 1 分别为浙江雪胆的花、块根、初代培养幼苗和愈合组织 Figure 1 Hemsleya zhejiangensis: flower, tuber, initial culture seedling and callus

块茎的繁育建立很好的体系。但是第 2 年(2010 年)继代培养则未发现微型块茎的形成,推测与取样时间和部位相关,具体原因尚需进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 胡绍庆, 丁炳扬, 陈征海. 浙江省珍稀濒危植物物种多样性保护的关键区域[J]. 生物多样性, 2002, **10** (1): 15 23.
  - HU Shaoqing, DING Bingyang, CHEN Zhenghai. The critical regions for conservation of rare and endangered plant species diversity in Zhejiang Province [J]. *Biodiversity Sci*, 2002, **10** (1): 15 23.
- [2] 施亚琴,杨培金,王化远,等. 巨花雪胆中的两种皂甙[J]. 华西药学杂志, 1995, **10** (2): 90 92. SHI Yaqin, YANG Peijin, WANG Huayuan, *et al.* Two saponins isolated from *Hemsleya gigantha* [J]. *West China Pharmaceut Sci*, 1995, **10** (2): 90 92.
- [3] 陶朝阳,易杨华,林厚文,等. 雪胆根抗肿瘤活性成分研究[J]. 第二军医大学学报, 1999, 20 (5): 337 339.

TAO Zhaoyang, YI Yanghua, LIN Houwen, *et al.* Study of activity component to antineoplastic in *Hemsleya sinesis*'s root [J]. *Acad J* Sec *Mil Med Univ*, 1999, **20** (5): 337 – 339.

[4] 叶晓霞,丁立生,黄可新.超声提取-分光光度法测定浙江雪胆中总皂苷含量[J].天然产物研究与开发,2006,18 (4):631-633,662.

666

- YE Xiaoxia, DING Lisheng, HUANG Kexin. Studies on determination of the total saponins in *Hemsleya zhejiangens* [J]. *Nat Prod Res Dev*, 2006, **18** (4): 631 633, 662.
- [5] 哀建国, 俞琳, 章丽英, 等. 浙江雪胆群落学特征研究[J]. 浙江林学院学报, 2007, **24** (6): 706 710. AI Jianguo, YU Lin, ZHANG Liying, *et al.* Plant community properties in a *Hemsleya zhejiangensis* habitat in Wuyanling Nature Reserve, Zhejiang Province [J]. *J Zhejiang For Coll*, 2007, **24** (6): 706 710.
- [6] 雷祖培,张书润,康华靖,等.浙江雪胆几种金属元素分布及其与土壤养分之间的关系 [J].中国野生植物资源,2010,29(4):48-52.
  - LEI Zupei, ZHANG Shurun, KANG Huajing, et al. Element distribution and its relationship with soil nutrients of Hemsleya zhejiangensis [J]. Chin Wild Plant Resour, 2010, 29 (4): 48 52.
- [7] 叶晓霞, 蒋绛雪, 艾常春, 等. ICP-AES 法测定浙江雪胆中的微量元素[J]. 广东微量元素科学, 2005, **12** (9): 26 29.
  - YE Xiaoxia, JIANG Jiangxue, AI Changchun, et al. Determination of trace elements in *Hemsleya zhejiangensis* [J]. Guangdong Trace Elem Sci, 2005, 12(9): 26 29.

### "973" 计划项目 "物联网体系结构基础研究" 工作会议召开

2011年5月7-8日, "973" 计划项目 "物联网体系结构基础研究"工作会议在浙江农林大学召开。来自北京邮电大学、上海交通大学、北京大学、北京工业大学、中国科学院和浙江农林大学的众多知名教授、专家出席会议。

该项目第5课题组负责人浙江农林大学校长周国模教授主持会议。周国模指出,由于森林生态系统的时空异质性和尺度复杂性,在森林中很难获取大范围、长期、持续、同步的监测数据,利用无线传感网的技术优势进行森林生态环境和碳汇监测,相比传统的林学研究方法具有很多优势,是未来森林碳汇监测的新的发展方向,也是物联网技术的一个重要实际应用。这是该项目的重要亮点。

会议希望项目组成员精诚合作,早出成果,顺利完成项目研究目标。

会议期间,与会专家和学者们还参观、考察了浙江农林大学物联网实验场地、天目山物联网科研基 地和西溪湿地等。

杜春华