

药用植物大戟的快速繁殖研究

戴传超^{1,2}, 余伯阳³, 董晨², 蒋继宏¹

(1. 江苏省药用植物生物技术重点实验室, 江苏徐州 221116; 2. 南京师范大学生命科学学院, 江苏南京 210097; 3. 中国药科大学, 江苏南京 210009)

摘要:以野生大戟为材料,探讨了大戟茎尖扦插繁殖和组织培养等快速繁殖技术的条件。结果表明:大戟茎尖扦插繁殖,其成活率可以达到88.6%,用含有腋芽的茎在MS培养基上培养,发芽比例可以达到55%;用愈伤组织诱导生芽,最高可以达到12%。嫩芽在不含激素的1/2 MS培养基中培养,生根率达到47.1%。幼苗接种本源的或同科外源植物5株内生真菌,比较其生长表明,接种大戟来源的两株内生真菌全苗重分别达到对照的1.51和2.08倍,根重达到对照的2.09和3.68倍,最有利于宿主生长。

关键词:大戟; 快速繁殖; 组织培养; 生根; 内生真菌

中图分类号: Q945 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2005)02-0152-04

The rapid propagation of medicinal plant *Euphorbia pekinensis*

DAI Chuan-chao^{1,2}, YU Bo-yang³, DONG Chen², JIANG Ji-hong³

(1. Jiangsu Key Lab for Medicinal Plant Biotechnology, Xuzhou 221116, China; 2. Life Science College of Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China; 3. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract: The condition of propagation of *Euphorbia pekinensis* by cutting propagation and tissue culture were studied. Propagated by shoot-tip, the survival ratio would get 88.6%. Using the stem with gemmules cultured by MS medium, the bud could get 55%. Use callus induced the bud, it could get 12%. The 47.1% of buds could get root at 1/2 MS culture medium without hormone. Use the shoot-tip propagated seedlings and inoculated five kinds of endophytic fungi from different host plants. The results showed that two strains from *E. pekinensis* could stimulate the growth of seedlings. The dry weight of seedlings got 1.51 and 2.08 times than that of CK respectively. The dry weight of root got 2.09 and 3.68 times than that of CK respectively.

Key words: *Euphorbia pekinensis*; rapid propagation; tissue culture; rhizogenesis; endophytic fungi

大戟(俗称京大戟, *Euphorbia pekinensis*)是大戟科大戟属植物,为中国民间常用药材,收载于历次中药药典中。性苦、寒、有毒。用于水肿、血吸虫病、肝硬化、结核性结膜炎引起的腹水、胸腔积液,外用于疮、疖肿(中国药材公司,1994;江苏新医学院,1977)。野生大戟作为药材来源,由于环境被破坏,已经非常稀少。在江苏等地区有大戟栽培,但是由于大戟是多年生宿根植物,大戟的繁殖,以种子繁殖

为主;但大戟种子数量少,繁殖受限制的因素多,而且生长慢,栽培需要多年,因此探讨大戟的快速繁殖有十分重要的意义。目前中国药材市场,大戟往往有价无货,这也成了大戟进入国际市场的瓶颈。针对大戟药材的严重缺乏现状,广东、广西等地区已经对红芽大戟(*Konxia valerianoides*)进行了生物技术繁殖方法的探索,积累了有益的经验(陈芳清等,1997)。对于其它来源的大戟,比如大戟科的大

收稿日期: 2003-12-29 修订日期: 2004-04-22

基金项目: 江苏省药用植物生物技术重点实验室开放项目(KJS03079)资助

作者简介: 戴传超(1970-),男,江苏泗阳人,博士,副教授,从事植物内生菌与微生物工程研究。E-mail: daichuancho@njnu.edu.cn

戟组织快繁技术,未见研究。本文以野生大戟为材料研究大戟的扦插与组织培养繁殖,以期为大戟的快速繁殖提供技术支持。

1 材料和方法

1.1 研究材料

1.1.1 植物材料 大戟原植物采自安徽省琅琊山森林公园,经江苏省植物研究所徐增莱同志鉴定后移栽于花盆中。

1.1.2 培养基 植物细胞组织培养培养基为 MS 培养基,加蔗糖 30 g/L,6-BA 2.0 mg/L,NAA 0.4 mg/L(固体培养基加琼脂 10 g/L),用 0.2 N KOH 和 0.2 N HCl 调 pH 值为 5.8,然后在高压灭菌锅中高温 121 °C,灭菌 20min(Murashige 等,1962)。植物内生菌菌种保藏培养基用马铃薯葡萄糖培养基(PDA)。

1.1.3 内生菌菌种 五种内生菌由本实验室分离保藏,E4(*Fusarium* sp.)和 E5(*Fusarium* sp.)分离自大戟。B3(*Phomopsis* sp.)和 B6(*Ceratobasidium* sp.)分离自重阳木(*Bischofia polycarpam*),S12(*Alternaria* sp.)分离自乌桕(*Sapium sebiferum*)。

1.2 组织培养方法

取含有腋芽的茎,自来水冲洗 3 次后,在超净工作台上用 70%酒精消毒 2 min,0.1%升汞消毒 15 min,无菌水冲洗多次。将腋芽向上插入 MS 液体培养基,28 °C 照光培养。待腋芽长到 1cm 以上,切取嫩芽,插入 1/2 无激素 MS 培养基中。等须根长到 10 根以上,打开组织培养瓶口炼苗。

1.3 植物内生菌回接促生长试验

(1)将大戟盆栽苗切取茎尖 1 cm 长,插入花盆中,置于室外,保持湿润,定期施加微量尿素,获得大戟盆栽幼苗。(2)内生菌的回接参照吴嵩民等(2002)的方法,本实验取长势相同的苗共做六组。(3)生长量的测定参照于雪梅等(2000)的方法,将大戟幼苗从土壤中取出,用水洗净泥土,吸水纸吸干水分,用 60 °C 烘干至恒重。

2 结果

2.1 用茎尖繁殖

切取大戟幼嫩的茎尖扦插入土壤中,保持潮湿,遮荫,30 d 左右可以见到幼苗明显生长。第一批幼苗 70 株茎尖获得了 62 株苗,成苗率为 88.6%。切

取茎段 70 株直接插入泥土,仅仅有两株可以形成幼苗(图版 I:A)。

2.2 组织培养方法繁殖

虽然茎尖可以获得幼苗,但是,大戟幼苗茎尖数量有限,萌孽产生新茎尖也很缓慢。要想在短时间内获得大量幼苗仍然十分困难,因此我们继续探索用腋芽以及愈伤组织诱导嫩梢进行繁殖的方法。

采用两种方法获得嫩梢。(1)用大戟茎(包含腋芽),在特定培养基上,无菌条件下长出嫩芽。(2)用大戟愈伤组织诱导形成嫩芽。为了探讨不同激素组合对幼芽和愈伤组织形成的影响,首先对不同激素作用下嫩芽和愈伤组织的形成比较。

2.2.1 腋芽产生嫩芽 用茎作外植体,MS 为基本培养基,附加不同配比激素组合,培养 14 d,比较幼梢和愈伤组织的形成(表 1)。表 1 表明,一定比例细胞分裂素对嫩芽形成有帮助。含有 1~3.0 mg/L 的 6-BA,NAA 为 0.2~0.5 mg/L 的几个组合均获得了 55%的嫩芽。大戟在不加激素的情况下,也可以形成较大比例的嫩芽,生长量也较好。从繁殖成本上看,可以选择不添加激素组用于生产繁殖。高浓度的生长素能够诱导愈伤组织的产生,当 NAA 逐步增加,形成愈伤组织的比例也增加。只使用 NAA 不加 6-BA,形成的愈伤组织颜色发褐,质地疏松;使用 6-BA 则愈伤组织致密,颜色为淡黄色中透出一点绿色,从形成愈伤组织角度,宜将一定浓度的 6-BA 和 NAA 配合使用。在 6-BA 2.0、NAA 0.4 激素组合时,愈伤组织生长最大,形成愈伤组织的比例也达到 100%,因此是形成愈伤组织的最佳激素组合。从嫩芽生长量来看,添加一定比例的 6-BA,生长效果明显好于不添加组。其中,6-BA 5.0、NAA 0.05 的组合,嫩芽生长最大。

2.2.2 愈伤产生嫩芽 选择表 1 生长最大的愈伤组织,比较在不同继代培养基上愈伤组织生长与发芽的影响(表 2)。结果表明,在 6-BA 2.0、NAA 0.1 的激素组合下,有 12%左右的愈伤可以形成嫩芽。

2.2.3 生根培养基的选择 获得嫩梢之后,进一步探讨生根培养基的激素配比。用 1/2MS 培养基,添加低浓度的 NAA 进行生根试验。结果表明(图版 I:B,C;表 3),不添加激素的培养基可以获得 47.1%的生根比例,是最佳的生根培养基。加入一定浓度的激素之后,嫩芽在切口处又会形成愈伤组织反而不利于生根。如果用切去顶芽的幼茎作为生根材料,70 个实验样本中有 4 个形成根,仅占 5.7%

表 1 激素的配比对大戟茎形成愈伤组织和嫩芽的影响

Table 1 Effect of phytohormone composition on the *Euphorbia pekinensis* stem producing callus and buds

激素组成 Phytohormone composition(mg/L)		愈伤 Callus		生根 Rhizogenesis		长芽 Bud		褐化 Brown
		比例 (%)	生长量 Growth amount	比例 (%)	比例 (%)	生长量 Growth amount	比例 (%)	
1	0	0	0	0	55	大	30	
2	NAA 0.1	10	小	0	20	中	10	
3	NAA 0.2	55	小	10	20	中	20	
4	NAA 0.3	70	小	0	30	小	20	
5	NAA 0.4	75	中	0	20	小	20	
6	NAA 0.5	85	大	0	15	小	15	
7	NAA 0.6	85	大	0	20	中	0	
8	NAA 0.7	100	大	20	30	中	5	
9	NAA 0.8	95	大	0	20	中	5	
10	NAA 0.9	95	大	10	25	大	5	
11	NAA 1.0	95	大	0	25	中	5	
12	NAA 1.5	100	大	0	0	—	0	
13	NAA 2.0	100	大	0	15	大	5	
14	NAA 2.5	100	大	0	5	大	10	
15	NAA 3.0	90	大	0	25	大	0	
16	NAA 3.5	100	大	0	15	小	0	
17	NAA 4.0	100	大	0	10	小	0	
18	NAA 4.5	100	大	0	15	小	0	
19	NAA 5.0	100	大	0	20	小	0	
20	6-BA 2.0, NAA 0.25	100	大	0	0		0	
21	6-BA 2.0, NAA 0.4	100	最大	0	0		0	
22	6-BA 2.0, NAA 0.5	90	大	0	30	大	0	
23	6-BA 2.0, NAA 0.2	85	大	0	55	大	0	
24	6-BA 2.0, NAA 0.10	20	小	0	15	小	0	
25	6-BA 3.0, NAA 0.05	40	小	0	40	大	40	
26	6-BA 5.0, NAA 0.05	50	中	0	35	最大	0	
27	6-BA 1.0, NAA 0.2	80	中	0	55	大	0	
28	6-BA 3.0, NAA 0.2	90	大	0	45	大	0	
29	6-BA 1.0, NAA 0.5	80	大	0	55	大	0	
30	6-BA 3.0, NAA 0.2	100	大	0	55	大	0	

表 2 不同继代培养基对植物愈伤组织生长的影响

Table 2 Effect of different phytohormone composition on callus growth

激素配比 Phytohormone composition(mg/L)	存活率 Livability (%)	生长量 Growth condition	出芽 Budding (%)
6-BA 2.0, NAA 0.2	84	中	0
6-BA 2.0, NAA 0.1	24	大	12
6-BA 3.0, NAA 0.05	92	中	4
6-BA 5.0, NAA 0.05	44	中	4

的比例,这结果同直接用含腋芽的茎进行扦插结果一致。

2.2.4 试管苗的移栽 将生根组培苗打开瓶口,室温光照培养 3~5 d 炼苗。洗净根部培养基,移入细沙土中室温培养,待苗高约 10 cm,可以移栽大田。

2.3 不同来源的内生菌对大戟幼苗生长的影响

由于自然状态下,大戟生长缓慢,因此进一步探

讨大戟幼苗加快生长的方法。文献报道,许多植物的内生菌均可以加快宿主植物的生长(梁宇等,2000;郭良栋,2001)。我们选择大戟科三种植物的

表 3 不同生根培养基激素组合对幼芽生根的影响

Table 3 Effect of phytohormone composition on the *Euphorbia pekinensis* root induction

NAA (mg/L)	实验个数 Samples number	生根个数 Rhizogenesis number	百分比 Percent(%)
0	70	33	47.1
0.1	20	0	0
0.2	20	0	0
0.3	20	0	0
0.4	20	0	0

五株不同的内生菌接入大戟幼苗,考察接入内生菌对生长的影响(图 1)。结果表明,大戟来源的两株内生菌(E4、E5),显著有利于大戟的生长。其处理组全苗重、根重都高于对照组;苗重分别达到对照的

1.51 和 2.08 倍,根重分别达到对照的 2.09 和 3.68 倍。重阳木来源的两株内生菌, B3 处理组苗重和根重也高于对照, B6 两个指标都不如对照, 但差距不是很大。乌柏来源的内生菌 S12, 显著不利于植物生长, 表现为全苗重、根重均低于对照。从根占苗的百分比看, 大戟两种内生菌处理, 根分别占全苗的 20.71% 和 20.25%, 均比对照的 14.50% 高。大戟是根类药材, 因此这是一个很有益的结果。接种大戟内生菌是加快生长和促进药用部位积累的有效方法。

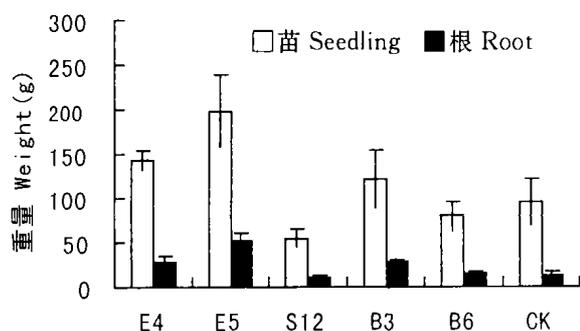


图 1 内生菌对大戟幼苗生长

Fig. 1 Effect of endophytic fungi on the seedling of *Euphorbia pekinensis*

3 小结与讨论

大戟幼苗通过扦插繁殖, 成活率达到 88.6%; 组织培养繁殖, 生根率达到 47.1%, 具有良好的可行性。生物技术繁殖, 占地少, 生长快, 可以短时间从腋芽获得大量幼苗, 是非常有效的繁殖方法。

植物内生菌和宿主关系研究, 是现代整体生物学研究的热点。用宿主植物内生菌接种到幼苗中, 可以加快幼苗的生长, 有效缩短药材生长的时间。

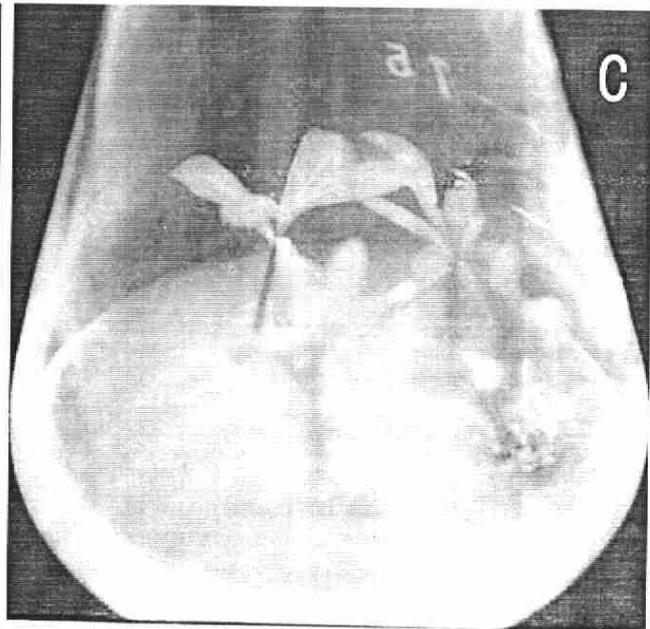
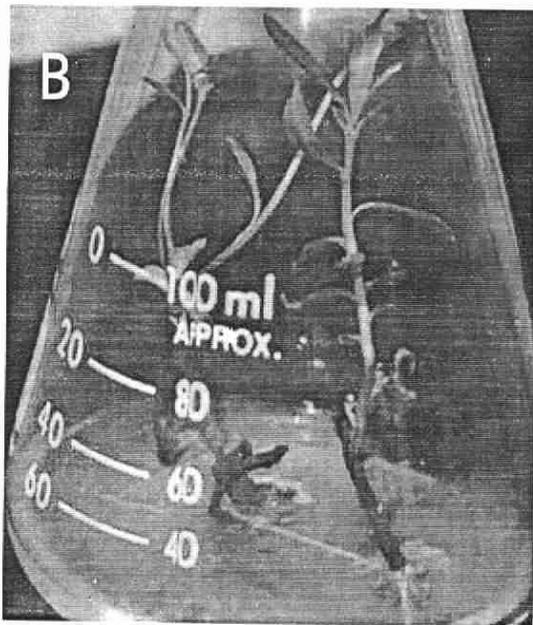
根据内生菌研究文献分析, 这个结果可能和内生菌可以促进生根导致营养吸收加快以及更好抵抗病原菌侵袭有关(梁宇等, 2000; 郭良栋, 2001)。同科植物内生菌促生长效果不如大戟自身内生菌的促生长效果, 可能和内生菌的专一性有关(梁宇等, 2000; 郭良栋, 2001)。如何用内生菌刺激大戟药材的生产, 是一个值得探讨的课题。

参考文献:

- 中国药材公司编. 1994. 药用植物资源志要[M]. 北京: 科学出版社. 618—641.
- 江苏新医学院编. 1977. 中药大词典[M]. 上海: 上海人民出版社, 108—109.
- Chen FQ(陈芳清), Qiu AG(丘安机), Xu XH(徐祥浩). 1997. Tissue culture of medical plant *Knoxia valerianoides* (药用植物红芽大戟的组织培养)[J]. *Guihaia*(广西植物), 17(2): 149—151.
- Guo LD(郭良栋). 2001. Advances of researches on endophytic fungi(内生真菌研究进展)[J]. *Mycosystema*(菌物系统), 20(1): 148—152.
- Liang YU(梁宇), Gao YB(高玉葆). 2000. Effects of endophyte infection on growth, development and stress resistance of plants(内生真菌对植物生长发育及抗逆性的影响)[J]. *Chin Bull Bot*(植物学通报), 17(1): 52—59.
- Murashige T, skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture[J]. *Physiol Plant*, 15(4): 473—479.
- Wu AM(吴嵩民), Gu BK(顾本康), Fu ZQ(傅正擎), et al. 2002. Mechanism of controlling cotton *Verticillium* Wilt with endophytic bacterium 73a(内生菌 73a 防治棉花黄萎病机理)[J]. *Jiangsu J Agricul Sci*(江苏农业学报), 18(1): 48—51.
- Yu XM(于雪梅), Guo SX(郭顺星). 2000. Establishment of symbiotic system for *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) and endophytic fungi(金线莲与内生真菌共生培养体系的建立)[J]. *China J Chinese Material Medica*(中国中药杂志), 25(2): 81—83.

戴传超, 等: 药用植物大戟的快速繁殖研究
DAI Chuan-chao, *et al.*: The rapid propagation of medicinal plant
Euphorbia peginensis

图版 I
Plate I



A. 用茎尖繁殖的大戟幼苗; B,C. 大戟嫩梢和幼茎在 MS 培养基上生根。
A. The seedlings propagated by shoot-tip; B,C. Root inducing of the buds and stems on MS culture medium.