

金钱草组织培养及其快速繁殖研究

杨冬业¹, 张丽珍^{2*}, 韦雅芳² (1. 桂林医学院, 广西桂林 541004; 2. 桂林师范高等专科学校化学与药理学系, 广西桂林 541001)

摘要 [目的]建立金钱草茎段组织培养再生体系。[方法]于4、5月取当年生金钱草茎段为外植体, MS作为基础培养基, 研究不同植物生长调节剂对诱导、增殖、生根过程的影响。[结果]MS+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.20~0.50 mg/L适合金钱草不定芽诱导, 诱导率为100%; MS+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.10~0.20 mg/L适合继代增殖培养; 1/2MS+IBA 0.50 mg/L+NAA 0.1~0.5 mg/L适合不定根诱导, 诱导率高达100%; 组培苗移植到盛有腐殖质花盆中, 成活率为100%。[结论]该研究可为金钱草野生种质资源保存和优质种苗生产提供技术参考。

关键词 金钱草; 组织培养; 再生

中图分类号 S503.53 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2019)01-0090-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.01.028

开放科学(资源服务)标识码(OSID): 

Tissue Culture and Rapid Propagation of *Lysimachia christinae* Hance.

YANG Dong-ye¹, ZHANG Li-zhen², WEI Ya-fang² (1. Guilin Medical College, Guilin, Guangxi 541004; 2. Department of Chemistry and Pharmacy, Guilin Normal College, Guilin, Guangxi 541001)

Abstract [Objective] To establish the tissue culture regeneration system of *Lysimachia christinae* Hance. stem. [Method] In April and May, the stems of *L. christinae* were used as explants and MS as basic medium to study the effects of different plant growth regulators on induction, proliferation and rooting. [Result] MS+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.20~0.50 mg/L was suitable for adventitious bud induction of *L. christinae*, the induction rate was 100%. MS+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.10~0.20 mg/L was suitable for seedling subculture. 1/2MS+IBA 0.50 mg/L+NAA 0.1~0.5 mg/L was suitable for root induction culture, the induction rate was 100%. The tissue culture seedlings were transplanted to pots in flowerpot with humus and the survival rate was 100%. [Conclusion] The study can provide technical reference for the conservation of wild germplasm resources and the production of high-quality seedlings of *L. christinae*.

Key words *Lysimachia christinae* Hance.; Tissue culture; Regeneration

金钱草(*Lysimachia christinae* Hance.)为报春花科珍珠菜属植物, 分布于云南、广西、四川、贵州、河南、湖北、湖南、江苏、陕西、江西、安徽、浙江等地。金钱草味苦、酸、微寒, 归肝、胆、肾、膀胱经。清热解毒, 利尿排石, 活血化瘀, 用于治疗肝、胆结石, 胆囊炎, 黄疸型肝炎, 泌尿系结石, 水肿, 跌打损伤, 毒蛇咬伤及药物中毒^[1-3]。近年来, 国内学者对金钱草在利胆排石方面进行了大量临床应用。对金钱草在排石、利胆、抗炎、抗氧化等多方面的药理作用进行全面分析, 发现金钱草对肾结石和胆结石都有防治作用, 对治疗肝胆系统的炎症更显优势^[4-6]。传统上金钱草繁殖以分株繁殖和种子繁殖为主, 亦可扦插繁殖。近年来由于过度的采摘利用, 金钱草野生资源几乎枯竭, 目前金钱草虽然可以采用种子或扦插进行人工繁殖栽培, 但繁殖率低且苗势退化现象严重。植物组织培养是指以离体植物器官、组织、细胞或原生质体, 在一定条件下进行培养, 并诱导其增殖、分化, 建立无性繁殖体系, 或获取人类所需要的植物细胞产物的技术过程。应用植物组织培养快繁技术扩大繁殖金钱草是一条较好的解决途径。采用组织培养快繁技术, 可以保持金钱草品种优势, 避免由于种子繁殖引起杂种分离, 并有助于对金钱草抗真菌、抗细菌、抗虫等基因工程研究的顺利进行。笔者利用植物组织培养技术, 建立金钱草无性繁殖体系, 以期为金钱草人工

选育及工厂化育苗提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料 试验于2016年3月—2018年6月在桂林师范高等专科学校分子生物学实验室进行。金钱草由广西植物研究所提供, 取4、5月金钱草新生枝条为材料进行试验。

1.2 方法

1.2.1 不定芽诱导培养。截取粗壮、生长良好的金钱草植株, 剪去带柄叶片, 用洗洁精清洗腋芽和茎干, 自来水冲洗清洗液的泡沫, 再用自来水流动冲洗2 h。在无菌超净台上, 将金钱草茎干剪成带有茎节小段, 置于无菌三角瓶中, 0.1%升汞消毒10 min, 无菌蒸馏水清洗2~3次, 接种到金钱草不定芽诱导培养基中, 培养基中均添加3%蔗糖和0.8%琼脂。置于(25±1)℃的培养室中培养, 光照12 h/d, 光照强度为1 000~1 500 lx, 观察并记录其生长情况, 分化率=发芽外植体数/接种数×100%。

1.2.2 继代增殖培养。当金钱草侧芽长至2~3 cm时, 可转接到继代培养基中进行扩大增殖培养, 置于(25±1)℃的培养室中培养, 光照12 h/d, 光照强度为1 000~1 500 lx, 定期观察并记录生长情况。

1.2.3 生根培养。取生长良好、茎节间均匀、高度3~4 cm的苗进行生根培养。截取生长良好的组培苗2~3 cm, 转接到附加有不同浓度IBA的1/2MS诱导生根培养基中, 置于(25±1)℃的培养室中培养, 光照12 h/d, 光照强度为1 000~1 500 lx, 观察并记录其生长情况。

1.2.4 移栽。当组培苗植株不定根长至3~5 cm时, 打开瓶塞, 炼苗2~3 d, 再移植到盛有腐殖质的花盆中, 前3 d进行

基金项目 国家自然科学基金项目(41471270); 广西高校科研项目(2013LX078); 桂林师范高等专科学校科研项目(KYA201706)。

作者简介 杨冬业(1976—), 男, 广西昭平人, 讲师, 硕士, 从事细胞工程研究。*通信作者, 副教授, 博士, 从事植物细胞工程研究。

收稿日期 2018-08-03

遮阴,注意保湿,观察统计组培苗生长情况及成活率。

2 结果与分析

2.1 金钱草不定芽诱导培养 以金钱草嫩茎段为外植体诱导不定芽发生,建立金钱草高效繁殖再生体系。将金钱草外植体接种到 MS 诱导培养基后,第 8 天观察到个别外植体茎节处出现不定芽,20 d 后观察到不定芽长至 1 cm 左右(图 1),30 d 后观察统计结果。

从表 1 可以看出,不同浓度的细胞分裂素和生长素对比对金钱草外植体不定芽诱导的影响是不同的。低浓度细胞分裂素和生长素可诱导少数不定芽,而且不定芽生长较快,诱导率较高;高浓度细胞分裂素和生长素可诱导较多不定芽,但容易出现愈伤组织,浓度越高愈伤组织越多。对照组没有不定芽产生,说明植物生长调节剂对金钱草茎段不定芽诱导是必需的。综上所述,金钱草茎段最佳诱导培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L +IBA 0.20~0.50 mg/L,在此条件下能诱导出较多不定芽,且均为有效芽,茎干粗壮,茎节间距适

中,叶片伸展翠绿,适合继代增殖培养。



图 1 外植体诱导培养
Fig. 1 Explant induction culture

表 1 不同生长调节剂对不定芽诱导的影响
Table 1 Effects of different growth regulators on adventitious bud induction

培养基序号 Number of medium	生长调节剂 Growth regulator//mg/L		外植体个数 Number of explant	出芽外植体个数 Number of budding explant	分化率 Differentiation rate//%	不定芽生长情况 Adventitious bud growth performance
	6-BA	IBA				
1	0	0	30	0	0	生长缓慢,叶片泛黄
2	0.5	0.02	30	24	80	1~2 个不定芽,生长快,茎节较长
3	0.5	0.05	30	27	90	2~3 个不定芽,粗壮,伸展
4	1.0	0.10	30	30	100	4~5 个不定芽,叶片翠绿,伸展,茎节适中,粗壮,生长良好
5	1.0	0.20	30	30	100	4~6 个不定芽,叶片翠绿,伸展,茎节适中,粗壮,生长良好
6	1.0	0.50	30	30	100	5~8 个不定芽,叶片翠绿,伸展,茎节适中,生长良好
7	2.0	0.20	30	30	100	6~8 个不定芽,叶片伸展,生长良好,端部出现少量愈伤组织
8	2.0	0.50	30	30	100	6~8 个不定芽,生长良好,端部出现较多愈伤组织
9	2.0	1.00	30	30	100	6~8 个不定芽,植株纤细,叶片细小,端部出现较多愈伤组织

2.2 金钱草继代培养 当金钱草侧芽长至 2~3 cm 时,可转到继代培养基中进行扩大增殖培养,20 d 后观察统计结果。

由表 2 可知,当培养基为 MS+6-BA 0.2~0.5 mg/L +

IBA 0.02~0.05 mg/L 时,不定芽粗壮,高达 3~4 cm,叶片较大伸展,呈嫩绿色,适合用于生根培养(图 2);当培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.10~0.20 mg/L 时,增殖系数较高,有效不定芽为 5~10 个,适合用于增殖培养。

表 2 不同生长调节剂对继代增殖培养的影响
Table 2 Effects of different growth regulators on subculture

培养基序号 Number of medium	生长调节剂 Growth regulator//mg/L		不定芽生长情况 Adventitious bud growth performance
	6-BA	IBA	
1	0.2	0.02	不定芽 2~3 个,节间距较长,叶片伸展,适合用于生根培养
2	0.2	0.05	不定芽 2~3 个,节间距 1 cm 左右,叶片伸展,植株粗壮,适合生根培养
3	0.5	0.02	不定芽 3~5 个,节间距 1 cm 左右,叶片伸展,嫩绿色,植株粗壮,植株长势较好,适合生根培养
4	0.5	0.05	不定芽 3~5 个,节间距 1 cm 左右,叶片伸展,嫩绿色,植株粗壮,植株长势较好,适合生根培养
5	1.0	0.10	不定芽 5~10 个,植株粗壮,节间距小,叶片小,嫩绿色,适合增殖培养
6	1.0	0.20	不定芽 5~10 个,植株粗壮,节间距小,叶片小,嫩绿色,适合增殖培养
7	1.0	0.50	不定芽 10 个以上,植株较细,叶片变黄,端部出现愈伤组织

2.3 金钱草生根培养 取生长良好、茎节间均匀、高度 3~4 cm 的苗进行生根培养,10 d 左右出现不定根,20 d 观察统计结果。

由表 3 可知,金钱草不定根容易诱导,低浓度生长素可诱导出不定根,而且生长良好(图 3)。当向 1/2 MS 培养基中添加 0.50 mg/L IBA+0.1~0.5 mg/L NAA 组合生长素时,生根率高达 100%,组培苗根系旺盛,有气生根,多根毛,叶子

深绿,植株健壮,适合移栽。

2.4 移栽 当组培苗植株不定根长至 3~5 cm 时,打开瓶塞,炼苗 2~3 d,再移植到盛有腐殖质花盆中,移栽 20 d,成活率达 100%(图 4)。

3 讨论

3.1 外植体灭菌剂的选择 取自自然界中的外植体,一般带有多种生长迅速的微生物,其在营养丰富的培养基中会大



图 2 壮苗培养
Fig. 2 Strong seedling culture

量繁殖,使得培养基被感染,从而抑制培养物生长。因此初代培养前必须对外植体进行严格的灭菌处理。灭菌剂的选择和处理时间的长短取决于外植体对试剂的敏感性。对灭菌剂敏感的外植体,一般选用易分解的次氯酸钠,灭菌时间不宜过长;而对灭菌剂不敏感的,一般选用毒性较强的升汞消毒,且灭菌时间适当延长。升汞溶液几乎可以杀死自然界中大部分微生物,是所有灭菌剂中灭菌效果最好的。但是用升汞溶液灭菌也有缺点,就是溶液浓度过高或者灭菌时间过长会毒死幼嫩的外植体,浓度过低或灭菌时间短又不能杀死外植体表面的微生物,使得试验过程中培养基受到污染而发霉长菌。该试验选用 0.1% 升汞溶液作为金钱草灭菌剂,灭菌时间为 10 min。此处理方式,虽然也有极个别金钱草茎段被杀死和感染,但是绝大多数的金钱草茎段都未被污染,达到了很好的灭菌效果。

表 3 不同生长调节剂对不定根诱导的影响
Table 3 Effects of different growth regulators on adventitious root induction

培养基序号 Number of medium	生长调节剂 Growth regulator//mg/L		接种苗数 Number of inoculation seedling	生根苗数 Number of rooting seedling	生根率 Rooting rate//%	不定根生长情况 Adventitious root growth performance
	IBA	NAA				
1	0	0	30	3	10	不定根 1~2 条,长 0.5~1.0 cm,生长缓慢,植株矮小
2	0.20	0.1	30	25	83	不定根 3~5 条,长 1.0~3.0 cm,根粗而短,叶子较大、嫩绿,植株健壮
3	0.20	0.5	30	27	90	不定根 4~5 条,长 2.0~5.0 cm,根细而长,叶子较大、嫩绿,植株健壮
4	0.50	0.1	30	30	100	不定根 5~8 条,长 3.0~6.0 cm,有气生根,多根毛,叶子较大、深绿,植株健壮
5	0.50	0.5	30	30	100	不定根 5~10 条,长 4.0~7.0 cm,有气生根,多根毛,叶子深绿,植株健壮



图 3 不定根诱导培养
Fig. 3 Adventitious root induction culture



图 4 组培苗移栽
Fig. 4 Tissue culture seedling transplantation

3.2 外植体的增殖及继代培养 外植体进行无菌接种后,随之而来的是外植体不定芽的诱导和生长分化。从外植体分化产生的丛生芽、不定芽数量少,达不到直接生产生根苗的阶段,必须进一步培养增殖,才能达到快速繁殖的目的。在适宜培养基和适宜培养条件下,培养物或外植体能按几何倍数增殖^[7]。进行多次增殖培养试验发现,最初 2 次增殖培养,金钱草植株生长速度较快,一般在 20~25 d 就可以长至 5 cm 左右,植株粗壮、伸展、叶片翠绿,但增殖系数较低。随后继代增殖培养时,金钱草的生长速度比较慢,60 d 才长至

5 cm,但增殖系数较高。
3.3 不同植物生长调节剂对植物组织培养的影响 在进行金钱草不定芽诱导培养、继代增殖培养及不定根诱导培养时,一般使用 6-BA、NAA 及 IBA 等植物生长调节剂。适宜浓度的细胞分裂素与生长素配比有利于不定芽的形成及生长^[8]。但若细胞分裂素的浓度过高,会形成过多的不定芽,从而使不定芽的长势受到抑制,结果使植株过于纤细、密集,小苗不能生长,很难获得健壮组培苗;若细胞分裂素的浓度

神经网络具有很强的稳定性和容错性^[19],综合信息能力强,能够很好地处理复杂的非线性关系。以上分析说明 2 种预测模型均能预测林内 PM_{2.5} 浓度的小时平均值,相较而言,采用人工神经网络模型对林内 PM_{2.5} 浓度值变化的预测结果比通过多元线性回归模型的预测结果更加接近实际观测值的变化。

表 3 不同预测模型的预测精度

Table 3 Prediction accuracy of different prediction models			
方法 Method	R ²	E _{MR}	E _{RMS}
BP 神经网络 BP neural network	0.982	1.71×10 ⁻³	6.77
MLR	0.931	0.27	22.92

4 小结

(1)BP 人工神经网络和传统多元线性回归模型 2 种方法均可以用于林内大气 PM_{2.5} 质量浓度预测,尽管二者在 PM_{2.5} 浓度急剧变化时预测存在一定缺陷,但仍然能够在稀疏监测数据输入条件下基本反映林内 PM_{2.5} 污染的时间变化规律。

(2)相对于多元线性回归模型,BP 人工神经网络具有很强的自学习、自组织与自适应功能,可以更加准确地实现林内 PM_{2.5} 质量浓度小时平均值的预测,其预测结果能更好地捕捉气象因素对大气污染物浓度的非线性影响规律。BP 人工神经网络能够成为预测林内 PM_{2.5} 质量浓度的较优方法。

(3)文中所选的污染源强表征变量和气象参数数据容易获得,且可以比较准确地反映气象变化和林分作用对 PM_{2.5} 质量浓度的影响,是预测林内 PM_{2.5} 质量浓度较为理想的输入变量。

(4)采用人工神经网络方法建立的林内 PM_{2.5} 质量浓度预测模型适用于不同大气污染程度,但是在一般污染浓度情况下对林内 PM_{2.5} 浓度的预测效果比高污染时期的预测效果更为准确。

参考文献

[1] 邵龙义,时宗波,黄勤. 都市大气环境中可吸入颗粒物的研究[J]. 环境

保护,2000(1):24-26,29.
[2] 孙淑萍,古润泽,张晶. 北京城区不同绿化覆盖率和绿地类型与空气中可吸入颗粒物(PM₁₀) [J]. 中国园林,2004,20(3):77-79.
[3] YU Y, SCHLEICHER N, NORRA S, et al. Dynamics and origin of PM_{2.5} during a three-year sampling period in Beijing, China[J]. Journal of environmental monitoring, 2011, 13(2): 334-346.
[4] 吴海龙,余新晓,师忱,等. PM_{2.5} 特征及森林植被对其调控研究进展[J]. 中国水土保持科学,2012,10(6):116-122.
[5] BECKETT K P, FREER-SMITH P H, TAYLOR G. Particulate pollution capture by urban trees: Effect of species and windspeed[J]. Global change biology, 2000, 6(8): 995-1003.
[6] LANGNER M. Reduction of airborne particulates by urban green[J]. Bundesamt für naturschutz, 2008, 179: 129-137.
[7] CAVANAGH J A E, ZAWAR-REZA P, WILSON J G. Spatial attenuation of ambient particulate matter air pollution within an urbanised native forest patch[J]. Urban forestry & urban greening, 2009, 8(1): 21-30.
[8] 郭二果,王成,郝光发,等. 北京西山典型游憩林空气悬浮颗粒物季节变化规律[J]. 东北林业大学学报,2010,38(10):55-57.
[9] 殷杉,蔡静萍,陈丽萍,等. 交通绿化带植物配置对空气颗粒物的净化效益[J]. 生态学报,2007,27(11):4590-4595.
[10] 汪永英,孙琪,李昭,等. 典型天气条件下哈尔滨城市森林不同林型对 PM_{2.5} 的调控作用研究[J]. 安徽农业科学,2016,44(5):175-179.
[11] GARDNER M W, DORLING S R. Statistical surface ozone models: An improved methodology to account for non-linear behaviour[J]. Atmospheric environment, 2000, 34(1): 21-34.
[12] CHALOULAKOU A, SAISANA M, SPYRELLIS N. Comparative assessment of neural networks and regression models for forecasting summertime ozone in Athens[J]. Science of the total environment, 2003, 313(1/2/3): 1-13.
[13] MCKENDRY I G. Evaluation of artificial neural networks for fine particulate pollution (PM₁₀ and PM_{2.5}) forecasting[J]. Journal of the air & waste management association, 2002, 52(9): 1096-1101.
[14] KOLEHMAINEN M, MARTIKAINEN H, RUUSKANEN J. Neural networks and periodic components used in air quality forecasting[J]. Atmospheric environment, 2001, 35(5): 815-825.
[15] PAPANASTASIOU D K, MELAS D, KIOUTSIKIS I. Development and assessment of application of neural network and multiple regression models in order to predict PM₁₀ levels in a medium-sized Mediterranean city[J]. Water, air & soil pollution, 2007, 182: 325-334.
[16] 曹虹. 基于 BP 神经网络的交通流量预测[D]. 西安: 长安大学, 2012: 30.
[17] 王敏,邹滨,郭宇,等. 基于 BP 人工神经网络的城市 PM_{2.5} 浓度空间预测[J]. 环境污染与防治, 2013, 35(9): 63-70.
[18] 石灵芝,邓启红,路婵,等. 基于 BP 人工神经网络的大气颗粒物 PM₁₀ 质量浓度预测[J]. 中南大学学报(自然科学版), 2012, 43(5): 1969-1974.
[19] 宰松梅,郭冬冬,韩启彪,等. 基于人工神经网络理论的土壤水分预测研究[J]. 中国农学通报, 2011, 27(8): 280-283.

(上接第 92 页)

过低,繁殖系数降低,利于植株生长。在金钱草不定芽诱导培养、继代增殖培养及不定根诱导培养时,植物生长调节剂种类及浓度都在不断地变换,从而使金钱草茎能够快速增殖生长。在培养过程中发现,当添加相同浓度的 IBA 和 6-BA 时,主要诱导出金钱草不定根,抑制不定芽生长。IBA 浓度过高时,组培苗的叶片皱缩而卷曲,不利于植株生长。

参考文献

[1] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1986: 538.

[2] 江苏新医学院. 中药大词典(上册)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1997: 150-151.
[3] 中国科学院西北植物研究所. 秦岭植物志: 第 1 卷 第 4 册[M]. 北京: 科学出版社, 1983: 29-54.
[4] 李静,胡国全,桂敬强,等. 金钱草水提液对小鼠肾脏草酸钙结石形成的干预作用[J]. 安徽科技学院学报, 2014, 28(2): 5-11.
[5] 李惠芝,姚崇舜,陈济民,等. 广金钱草粗提物中多糖的含量测定[J]. 沈阳药科大学学报, 1995, 12(1): 21-24.
[6] 李静,贺绍君,刘德义. 金钱草防治泌尿系统结石机理研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2015, 17(3): 79-81.
[7] 余伯阳. 中药生物技术[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2005: 195-196.
[8] 梁定仁,黄明勋,林伟,等. 植物生长调节剂对广金钱草扦插繁殖效果的影响[J]. 南方农业学报, 2016, 47(4): 614-617.