

宋 刚,沈 菲,王庆涛,等. 茅苍术无菌培养体系的构建[J]. 江苏农业科学,2013,41(11):46-47.

茅苍术无菌培养体系的构建

宋 刚,沈 菲,王庆涛,杨士虎,谢正林

(江苏农林职业技术学院生物工程系,江苏句容 212400)

摘要:以野生茅苍术种子为外植体,研究不同清水浸泡时间和氯化汞消毒时间对茅苍术种子无菌培养的影响和不同培养基对茅苍术种子的影响。结果表明,清水浸泡 0.5 h、0.1% 氯化汞消毒 15~18 min 的消毒处理,污染率最低,与其他处理比较差异达显著水平($P < 0.05$)。MS、1/2MS、1/4MS 培养基间发芽率差异不显著。

关键词:茅苍术;种子;无菌培养体系

中图分类号: S567.21⁺1.043 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)11-0046-02

茅苍术 [*Atractylodes lancea* (Thunb.) DC.] 是菊科苍术属多年生草本植物,以根茎入药,是我国传统中药材。茅苍术性辛、苦、温,归脾、胃、肝经。临床上主要用于治疗脘腹胀满,水肿,脚气痿痹,风湿痹痛,风寒感冒,雀目夜盲等。近年来对茅苍术的综合开发使茅苍术的用途扩大,除药用外可用作各种饮料的添加剂和加工工艺品香包^[1]。

茅苍术,茎直立,上部分枝,株高一般 30~80 cm,性喜凉爽较干燥气候,耐寒,幼苗最低能耐 -15℃ 低温,最适生长温度 15~22℃,怕高温高湿,茅苍术主要分布在海拔 40~400 m 的丘陵山区,对土壤要求不高,喜丛生在疏松的砂质土壤和富含腐殖质的土壤中。根际土壤多为酸性,pH 在 5 左右,极少弱碱性(pH 值 7.5),向阳山坡疏林下及少见阳光的密林下皆可生长。现代《中药志》记录“茅苍术主产于湖北、江苏及河南”。至今茅苍术主要分布于长江流域的江苏、安徽、湖北、四川、浙江、江西等省,江苏茅山一带是茅苍术地道药材的产区^[2]。但长期以来,茅山野生茅苍术被掠夺性采挖,野生资源面临枯竭。根据中国中医研究院中药研究所孙宇章博士的遥感监测,茅山大茅峰、二茅峰和小茅峰的茅苍术生物量为 12.17~10.08 kg,大约 10 000 余株^[3],茅山苍术面临濒危和枯竭^[4]。繁殖上茅苍术既可以用种子繁殖也可用根茎繁殖,但种子的生命力较差,种子繁殖的繁殖系数低,用根茎繁殖则需要大量根茎材料,而且品质易退化。通过组培快繁技术能在短期内获得大量无菌苗,解决茅苍术种苗问题,为大规模繁殖种苗提供有效途径。通过组培不仅能提供优质

茅苍术种苗,还可以在此基础上选育出高产优质的新品种。

本研究试图以种子为材料建立茅苍术无菌培养体系后深入开展茅苍术组培快繁奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

试验所用茅苍术种子于 2011 年 11 月采自句容茅山野生苍术植株。

1.2 外植体预处理

首先在培养皿中放入大小适宜的滤纸,选取粒大饱满的种子,用洗衣粉清洗后,放在滤纸上,加入适量清水浸泡^[5-6](以刚好浸没种子为宜)。浸泡结束后,用流水反复冲洗,再用蒸馏水冲洗 2 次,备用。

1.3 无菌播种形成无菌苗

1.3.1 种子无菌处理 种子清水浸泡时间设置 0.5、5.0、12.0 h 3 个水平;茅苍术种子消毒灭菌采用常规的先 70% 乙醇浸泡后 0.1% 氯化汞浸泡的 2 次消毒方法。0.1% 升汞浸泡时间设置 9、12、15、18、21 min 5 个水平。接种时每瓶培养基接入 1 粒种子,每处理组合接 10~15 瓶,培养 25 d 后,统计污染率。

1.3.2 种子最优发芽培养基筛选 以“1.3.1”节试验筛选出的最佳灭菌组合进行种子灭菌处理,接入 MS、1/2MS、1/4MS 3 种发芽培养基^[5],每瓶培养基接入 1 粒种子,每处理接 10~15 瓶,培养 36 d 后,统计发芽率。发芽培养基均添加琼脂 7.5 g/L,白砂糖 30.0 g/L,培养基 pH 值调至 5.8~6.2。

1.4 培养条件

光照度:2 000~2 500 lx;光照时间:12 h/d;培养温度:(22±2)℃。

收稿日期:2013-04-07

基金项目:江苏农林职业技术学院 2011 年科研课题。

作者简介:宋 刚(1978—),男,江苏盐城人,硕士,讲师,研究方向为植物资源利用。E-mail:sgdxxx@126.com。

[8] Pogranichnyy R M, Yoon K J, Harms P A, et al. Characterization of immune response of young pigs to *Porcine circovirus* type 2 infection [J]. *Viral Immunology*, 2000, 13(2): 143-153.

[9] Liu Q, Tikoo S K, Babiuk L A. Nuclear localization of the ORF2 protein encoded by *Porcine circovirus* type 2 [J]. *Virology*, 2001, 285(1): 91-99.

[10] Lekcharoensuk P, Morozov I, Paul P S, et al. Epitope mapping of the major capsid protein of type 2 *Porcine circovirus* (PCV2) by using

chimeric PCV1 and PCV2 [J]. *Journal of Virology*, 2004, 78(15): 8135-8145.

[11] Grierson S S, King D P, Wellenberg G J, et al. Genome sequence analysis of 10 Dutch *Porcine circovirus* type 2 (PCV-2) isolates from a PMWS case-control study [J]. *Research in Veterinary Science*, 2004, 77(3): 265-268.

[12] Segalés J, Olivera A, Grau-Roma L, et al. PCV-2 genotype definition and nomenclature [J]. *Vet Rec*, 2008, 162(26): 867-868.

1.5 数据统计方法

种子无菌播种污染率 = 污染瓶数/接种瓶数 × 100% ; 种子无菌播种发芽率 = 发芽瓶数/接种瓶数 × 100% 。

2 结果与分析

2.1 清水浸泡时间和氯化汞消毒时间对茅苍术种子无菌培养的影响

表 1 结果显示清水浸泡时间和 0.1% 氯化汞消毒时间对污染率的影响都达到极显著水平 ($P < 0.01$) 。

多重比较结果 (表 2) 表明, 3 种清水浸泡时间处理间污染率各处理差异均达到显著水平, 其中 0.5 h 浸泡处理污染率最低。

0.1% 氯化汞 5 种消毒时间处理间, 9、12 min 处理污染率极显著高于 15、18、21 min 处理; 15 min 和 18 min 处理污染率显著高于 21 min 处理。但在试验过程中也发现, 当 0.1% 氯化汞消毒时间为 21 min 时, 大多数茅苍术种子死亡, 发芽率极低,

表 1 茅苍术种子无菌培养污染率方差分析结果

变异来源	SS	df	MS	F 值	$F_{0.01}$
清水浸泡时间	2 743.33	2	1 371.67	19.14 **	8.65
0.1% 氯化汞消毒时间	7 176.67	4	1 794.17	25.03 **	7.01
误差	573.33	8	71.67		
总变异	10 493.33	14			

表 2 不同时间清水浸泡和氯化汞消毒处理对茅苍术种子培养污染的影响

清水浸泡时间 (h)	平均污染率 (%)	0.1% 氯化汞消毒时间 (min)	平均污染率 (%)
12.0	63.00aA	9	78.33aA
5.0	44.00bB	12	63.33aA
0.5	30.00cB	15	28.33bB
		18	38.33bB
		21	20.00cB

注: 同一列数据后不同大小写字母分别表示差异达 0.01 和 0.05 显著水平。

说明消毒时间过长, 已危害到种子萌发, 不符合生产目的。所以, 适合的 0.1% 氯化汞消毒时间应选 15 ~ 18 min。

2.2 不同培养基对茅苍术种子无菌培养的影响

将茅苍术种子按照清水浸泡 0.5 h、0.1% 氯化汞浸泡 16 min 处理后接种到 MS、1/2MS、1/4MS 3 种不同发芽培养基上, 培养 36 d。图 1 为 1/2MS 培养基培养的茅苍术的无菌苗。



图1 1/2MS 培养基培养 36 d 后茅苍术无菌苗

表 3 结果表明, MS、1/2MS、1/4MS 3 种发芽培养基对茅苍术种子发芽率影响差异不显著, 即任何一种培养基均可作为茅苍术发芽培养基。

表 3 不同发芽培养基下茅苍术种子无菌培养发芽率方差分析结果

变异来源	SS	df	MS	F 值	$F_{0.05}$
不同发芽培养基	33.33	2	16.67	0.076 9	9.55
误差	650.00	3	216.67		
总变异	683.33	5			

3 讨论

3.1 不同清水浸泡时间对无菌播种污染率和发芽率的影响

张辉等^[7]研究发现, 水稻种子浸水后, 矿物质和有机物会渗到溶液中去, 活力高的新种子外渗少, 活力低的陈种子外渗多。米粒浸泡液的离子浓度变化与发芽率呈极显著或显著负相关。他们认为水稻种子和其他大多数植物种子都一样, 外渗离子浓度变化可反映细胞膜系统的完整性程度。种子浸泡时间越长, 外渗溶液离子浓度越高, 此时细胞膜可能已破损, 其表面的菌体易渗入内部, 造成污染率显著增加^[7]。本试验结果表明, 茅苍术种子清水浸泡时间越长, 污染率越高。

3.2 不同 0.1% 氯化汞消毒时间对无菌播种污染率和发芽率的影响

种子表面灭菌的关键是选择合适的消毒剂 and 消毒时间。因为消毒剂不仅能杀死微生物, 也对种子产生一定的伤害。常见的消毒剂有氯化汞、次氯酸钠、次氯酸钙、乙醇、过氧化氢、漂白粉等, 其中氯化汞杀菌能力最强, 但对植物材料伤害最大, 不易除去, 故采用氯化汞对种子消毒时应尽量缩短时间^[6-8]。在对茅苍术种子进行表面消毒时, 12 ~ 18 min 对其伤害都不大。综合污染率和发芽率等指标, 0.1% 氯化汞消毒时间以 15 ~ 18 min 为宜。

综上, 以种子为外植体, 用清水浸泡 0.5 h 后, 70% 乙醇浸泡 30 s, 0.1% 氯化汞消毒 15 ~ 18 min, 随即接种在 1/2MS 中, 36 d 后诱导出无菌苗, 污染率低。

参考文献:

[1] 张惠芝. 茅苍术种子育苗关键技术研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2010.

[2] 李西腾, 吴沿友. 茅苍术的组织培养和快速繁殖[J]. 广西热带农业, 2006, 103(2): 33-34.

[3] 孙宇章, 郭兰萍, 朱文泉, 等. 道地药材茅苍术的资源遥感监测[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(4): 353-356.

[4] 郭兰萍, 黄璐琦, 阎洪, 等. 基于地理信息系统的苍术道地药材气候生态特征研究[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(8): 565-569.

[5] 解继红, 于靖怡, 陈景芋, 等. 鹅观草属种子消毒及无菌播种的研究[J]. 种子, 2009, 28(3): 25-27.

[6] 陈华涛, 陈新, 顾和平, 等. 小豆组织培养中种子灭菌方法研究[J]. 江苏农业科学, 2011, 39(5): 208-209.

[7] 张辉, 王辉宪. 水稻种子浸泡液外渗离子与种子发芽率的相关性研究[J]. 吉首大学学报: 自然科学版, 1996, 17(2): 80-83.

[8] 蒙爱东, 闫志刚, 余丽莹, 等. 七叶一枝花种子无菌培养萌发观察[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(11): 258, 260.