

韦 范,李 翠,韦坤华,等. 岩黄连的高频再生体系建立与优化[J]. 江苏农业科学,2014,42(11):68-71.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.11.020

岩黄连的高频再生体系建立与优化

韦 范,李 翠,韦坤华,王晓峰,郭晓云,李林轩

(广西药用植物园/广西药用资源保护与遗传改良重点实验室,广西南宁 530023)

摘要:以岩黄连(*Corydalis saxicola* Bunting)茎尖为外植体,以 MS、1/2MS 为基本培养基,采用正交试验探讨植物生长调节剂多因素组合(6-BA、NAA、IAA、IBA、AC)对岩黄连初代诱导、不定芽分化、诱导生根的影响。结果表明,岩黄连不定芽最佳诱导培养基为:MS+0.5 mg/L 6-BA+0.2 mg/L IAA。6-BA 浓度过低会导致植物丛生芽较少、繁殖速度减缓,6-BA 浓度过高又会致丛生芽出现玻璃化、变形。在 MS+0.6 mg/L 6-BA+0.2 mg/L IBA+0.2 mg/L IAA 培养基中,岩黄连不定芽能够进行高效繁殖,不但增殖倍数非常高,而且芽苗质量非常好。

关键词:岩黄连;组织培养;不定芽;基质

中图分类号: R284;S567.23+9.043 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)11-0068-03

岩黄连(*Corydalis saxicola* Bunting)别称石生黄堇,为紫堇科紫堇属多年生草本植物,全草含脱氢卡维丁(岩黄连碱)等活性成分,具有显著的抗菌、消炎、镇痛、安定作用,并有抑制肿瘤细胞作用,主治疮疗肿毒、肝炎、肝硬化、肝癌等症,多见于桂西北山区^[1-3]。岩黄连总生物碱注射剂、片剂等中药制剂及产品已被研制出来,并已批量投产^[4]。由于人为破坏、生境脆弱等原因,岩黄连野生资源濒临枯竭,难以满足药材市场的需求。本研究利用现代生物技术,建立岩黄连高频再生体系,为岩黄连组织培养规模化生产育苗提供技术支撑,旨在为更好地开发利用岩黄连药用植物资源提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

岩黄连采自广西药用植物园科研基地,采用其茎尖作为材料展开诱导。将岩黄连茎尖洗净,用 75% 乙醇灭菌 30 s,再用无菌水涮洗 1 遍,将洗净的茎尖置于 0.1% HgCl₂ 溶液(加 1~2 点表面活性物质吐温)中浸泡消毒 5~10 min,用无菌水浸洗 2 次,每次浸洗 5 min,用无菌纸将材料表层水分吸干,然后置于 MS 培养基上进行培养,平均光照度为 2 000 lx,光照时间 12 h/d,温度(25±3)℃。

1.2 不定芽诱导

在 MS 培养基上以 NAA(0.1、0.2、0.4 mg/L)、IAA(0.1、0.2、0.4 mg/L)、6-BA(0.5、1.0 mg/L)3 种不同类型激素的 3 个水平进行正交试验,对岩黄连不定芽诱导进行改进与优化,每处理 10 瓶,每瓶 4 个外植体,30 d 后记录外植体的诱导情况,比较不同组合诱导不定芽能力的差异。

1.3 丛生芽繁殖

在 MS 培养基上以 6-BA(0.3、0.6、1.0 mg/L)、IAA(0.1、0.2、0.4 mg/L)、IBA(0.1、0.2、0.4 mg/L)3 种激素的 3 个水平进行正交试验,对岩黄连的繁殖培养基进行优化,每处理 10 瓶,每瓶 4 个单芽,30 d 后测试管苗生长情况、芽增殖倍数。

芽增殖倍数=(30 d 后芽数-接种时芽数)/接种时芽数。(1)

1.4 生根培养

为了选择最理想的生根培育基,在 1/2MS 培养基上以 IBA(0.2、0.5、1.0 mg/L)、NAA(0.1、0.3、0.5 mg/L)、AC(0.3、0.5 g/L)3 种激素的 3 个水平进行正交试验,对岩黄连的生根培养基进行优化,每处理 10 瓶,每瓶 10 个单芽,30 d 之后记录生根率与生根数。

生根率=生根根数/接种总数×100%; (2)

平均生根数=总生根数/接种总数。 (3)

1.5 炼苗及移栽

挑选生长旺盛,根系发达的试管苗移入常温室,在盖上盖子的状态下松开盖子,2 d 后掀开盖子,让岩黄连幼苗与空气完全接触,其间向瓶内洒水保持瓶内水分充足。3 d 后取出幼苗,洗净根部的培养基,移入装有事先消毒好的黄沙、蛭石、泥炭、泥炭+蛭石(1:1)、泥炭+黄沙(1:1)5 种不同基质上,适度遮阴,并保持一定的湿度,30 d 后统计不同基质中组培苗的成活率。

2 结果与分析

2.1 消毒时间筛选

消毒时间分别设 5、6、7、8、9、10 min 6 个梯度,接种后 15 d 统计岩黄连的污染率与成活率。由表 1 可知,持续消毒灭菌 8 min,消毒灭菌效果最佳,成功率高达 85%。消毒 8 min,污染率较高,灭菌时间超过 8 min,污染率有所下降,但是死亡率明显上升,消毒 10 min 的外植体死亡率达 60%。

2.2 不定芽的诱导

用茎尖作为外植体接入初代诱导培养基,7 d 左右切口处开始增大疏松,颜色逐渐变乳黄色,15 d 左右培养基上长出翠绿色的不定芽,20 d 时不定芽成簇生长,呈翠绿色。从

收稿日期:2014-04-10

基金项目:国家自然科学基金(编号:31200305)。

作者简介:韦 范(1984—),女,硕士,助理研究员,从事药用植物资源保护与开发利用研究。E-mail:fanfanmeister@gmail.com。

通信作者:李林轩,助理研究员,从事中药资源保护与开发利用研究。E-mail:starry1125@sina.com。

表 1 0.1% HgCl₂ 不同消毒时间对岩黄连诱导分化的影响

消毒时间 (min)	接种数 (个)	污染数 (个)	死亡数 (个)	成活数 (个)	污染率 (%)	死亡率 (%)	成功率 (%)
5	20	20	0	0	100	0	0
6	20	16	0	5	80	0	20
7	20	6	2	12	30	10	60
8	20	1	2	18	5	10	85
9	20	1	6	13	5	30	65
10	20	0	12	8	0	60	40

表 2 可以看出,0.5 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L IAA + 0.2 mg/L NAA 条件下,不定芽个数最多。各激素对不定芽的诱导影响由大到小依次为:6-BA > IAA > NAA。当 6-BA 浓度保持在 0~0.5 mg/L 之间时,不定芽数量与浓度成正比;当 6-BA 浓度高于 0.5 mg/L 时,二者成反比关系,并且不定芽变为黄绿色,说明 6-BA 浓度过高会对不定芽诱导起到抑制影响。低浓度生长素有利于不定芽诱导及生长。当 IAA 浓度在 0.1~0.2 mg/L 范围时,不定芽数量与浓度成正比,当其浓度高于 0.2 mg/L,就会起到相反的效果。NAA 对不定芽的诱导影响不显著,可以不考虑(表 3)。所以,选取 MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L IAA 培养基诱导岩黄连不定芽(图 1)。

表 2 岩黄连初代诱导出芽培养基筛选正交试验结果与极差分析

序号	A:6-BA 浓度 (mg/L)	B:IAA 浓度 (mg/L)	C:NAA 浓度 (mg/L)	不定芽数量 (个)
1	0	0.1	0.1	6
2	0	0.2	0.2	9
3	0	0.4	0.4	7
4	0.5	0.1	0.2	15
5	0.5	0.2	0.4	17
6	0.5	0.4	0.1	13
7	1.0	0.1	0.4	10
8	1.0	0.2	0.1	13
9	1.0	0.4	0.2	11
k ₁	7.33	10.33	10.67	11.33
k ₂	15.00	13.00	11.67	10.67
k ₃	11.33	10.33	11.33	11.67
R	7.67	2.67	1.00	1.00

表 3 初代诱导出芽培养基筛选方差分析

方差来源	离均差平方和	自由度	方差	F 值	P 值
6-BA	88.22	2	44.11	56.71	0.01 ≤ P < 0.05
IAA	14.22	2	7.11	9.14	0.05 ≤ P < 0.10
NAA	1.56	2	0.78	1.00	0.10 ≤ P
误差	1.56	2	0.78		

注: F_{0.01}(2,2) = 99.0, F_{0.05}(2,2) = 19.0, F_{0.1}(2,2) = 9.0。

2.3 丛生芽继代

将长 0.5~1.0 cm 的不定芽切下接种到繁殖培养基上。由表 4、表 5 可见,6-BA 对岩黄连不定芽增殖倍数影响极显著。不定芽增殖倍数的范围为 3.4~7.3。当 6-BA 浓度为 1.0 mg/L 时,岩黄连生长现象异常,如有轻微玻璃化;当 6-BA 浓度为 0.6 mg/L 时,岩黄连植株健壮、展叶良好。IBA 浓度对岩黄连增殖倍数影响不显著,但对苗质量有影响,当 IBA 浓度为 0.2 mg/L 时,芽苗翠绿色,长势快,质量好,有利于后期诱导生根。因此,在 MS + 0.6 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L

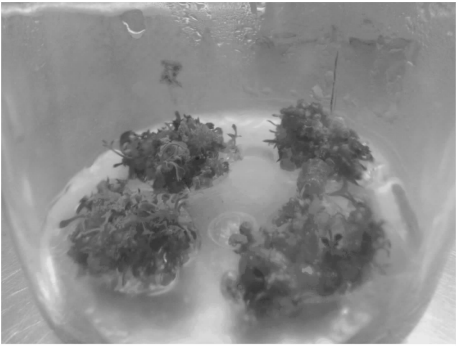


图 1 岩黄连不定芽初代诱导

IBA + 0.2 mg/L IAA 培养基中,岩黄连不定芽能够进行高效繁殖。重复试验发现,在此培养基上不但增殖倍数非常高,而且芽苗质量也非常好(图 2)。

表 4 岩黄连丛生芽诱导繁殖正交试验结果与极差分析

组合	A:6-BA 浓 度(mg/L)	B:IBA 浓 度(mg/L)	C:IAA 浓 度(mg/L)	增殖 倍数	苗的生长情况
1	0.3	0.1	0.1	4.0	较弱,长势慢
2	0.3	0.2	0.2	5.6	翠绿色,长势快
3	0.3	0.4	0.4	3.4	绿色,长势快
4	0.6	0.1	0.2	7.3	较弱,长势慢
5	0.6	0.2	0.4	6.4	翠绿色,长势快
6	0.6	0.4	0.1	6.2	绿色,长势快
7	1.0	0.1	0.4	5.9	较弱,长势慢
8	1.0	0.2	0.1	6.1	翠绿色,长势快
9	1.0	0.4	0.2	6.3	绿色,长势快
k ₁	4.33	5.73	5.43	5.57	
k ₂	6.63	6.03	6.40	5.90	
k ₃	6.10	5.30	5.23	5.60	
R	2.30	0.73	1.17	0.33	

表 5 丛生芽增殖倍数方差分析结果

方差来源	离均差平方和	自由度	方差	F 值	P 值
6-BA	8.70	2	4.35	43.00	0.01 ≤ P < 0.05
IBA	0.82	2	0.41	4.03	0.10 ≤ P
IAA	2.34	2	1.17	11.55	0.05 ≤ P < 0.1
误差	0.20	2	0.10		

注: F_{0.01}(2,2) = 99.0, F_{0.05}(2,2) = 19.0, F_{0.1}(2,2) = 9.0。

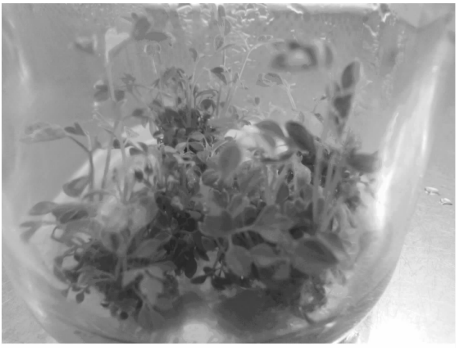


图 2 岩黄连丛生芽继代培养

2.4 丛生芽诱导生根试验

将生长健壮的芽苗单切接入岩黄连生根培养基中,30 d 后统计生根率及平均生根数(表 6)。IBA 浓度对试管苗生根率影响极显著,NAA 对试管苗生根率影响显著,AC 对岩黄连

试管苗生根率影响不大(表 7、表 8)。生根率、平均生根数都主要受 IBA 浓度的影响,当 IBA 浓度为 0.2~0.5 mg/L,随着 IBA 浓度升高,岩黄连试管苗生根率、平均生根数增加;当 IBA 浓度大于 0.5 mg/L,生根率、平均生根数均降低。当 NAA 浓度在 0.1~0.3 mg/L 范围内时,岩黄连试管苗平均生根数、生根率均与浓度呈正比,但是如果 NAA 浓度超出 0.3 mg/L,则两者均降低,NAA 浓度过高会影响丛生芽的进一步生根。1/2MS + 0.5 mg/L IBA + 0.3 mg/L NAA + 0.5 g/L AC 生根培养基中,岩黄连试管苗生根率达 100%,平均生根数达 26.7 条(图 3)。

表 6 岩黄连丛生芽生根诱导正交试验结果与极差分析

组合	IBA 浓度 (mg/L)	NAA 浓度 (mg/L)	AC 浓度 (g/L)	D (空白)	生根率 (%)	平均生根 数(条)
1	0.2	0.1	0	1	90	12.0
2	0.2	0.3	0.3	2	88	15.6
3	0.2	0.5	0.5	3	78	12.8
4	0.5	0.1	0.3	3	97	22.8
5	0.5	0.3	0.5	1	100	26.7
6	0.5	0.5	0	2	90	19.7
7	1.0	0.1	0.5	2	78	14.0
8	1.0	0.3	0	3	80	14.8
9	1.0	0.5	0.3	1	72	13.4

生根率				
k_1	85.33	88.33	86.67	87.33
k_2	95.67	89.33	85.67	85.33
k_3	76.67	80.00	85.33	85.00
R	19.00	9.33	1.33	2.33

平均生根数				
k_1	13.47	16.27	15.50	25.69
k_2	23.07	19.03	17.27	28.35
k_3	14.07	15.30	17.83	29.08
R	9.60	3.73	2.33	3.39

表 7 生根培养基生根率的方差分析

方差来源	离均差平方和	自由度	方差	F 值	P 值
IBA	542.89	2	271.44	56.81	$0.01 \leq P < 0.05$
NAA	157.56	2	78.78	16.49	$0.05 \leq P < 0.10$
AC	2.89	2	1.44	0.30	$P > 0.10$
误差	9.56	2	4.78		

注: $F_{0.01}(2,2)=99.0,F_{0.05}(2,2)=19.0,F_{0.1}(2,2)=9.0$ 。

表 8 生根培养基平均生根数的方差分析

方差来源	离均差平方和	自由度	方差	F 值	P 值
IBA	173.52	2	86.76	130.79	$P < 0.01$
NAA	22.53	2	11.26	16.98	$0.05 \leq P < 0.10$
AC	8.89	2	4.44	6.70	$P > 0.10$
误差	1.33	2	0.66		

注: $F_{0.01}(2,2)=99.0,F_{0.05}(2,2)=19.0,F_{0.1}(2,2)=9.0$ 。

2.5 再生苗的移栽

由表 9 可知,不同基质成活率由高到低依次为泥炭+蛭石(1:1)>泥炭+黄沙(1:1)>蛭石>黄沙>泥炭。因此,试管苗移栽最适宜基质为泥炭+蛭石(1:1),移栽 30 d 成活率为 84%。

3 结论与讨论

植物细胞的分化、脱分化,是1个较为复杂的过程,其生

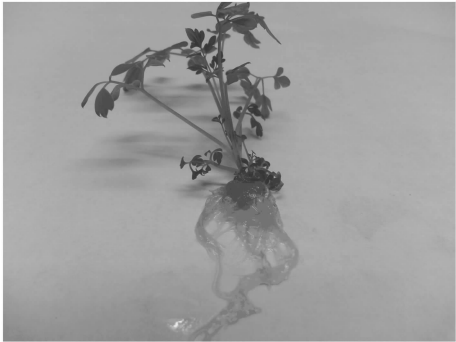


图3 岩黄连试管苗生根

表 9 不同基质对岩黄连试管苗移栽成活率的影响

移栽基质	移栽苗数 (株)	成活苗数 (株)	成活率 (%)
黄沙	50	33	66
蛭石	50	38	76
泥炭	50	29	58
泥炭+蛭石(1:1)	50	42	84
泥炭+黄沙(1:1)	50	39	78

理生化过程受基因的控制。促进植物发育物质的浓度与分类、外植物体的属性、不同植物激素的比例成分都会对不定芽的生成产生至关重要的影响。本研究表明,没有细胞分裂素(6-BA)的对照组不定芽诱导率较低,说明岩黄连茎尖不定芽诱导中,细胞分裂素是必需的。低浓度的 IAA 有助于不定芽的形成。本研究表明,岩黄连不定芽最佳诱导培养基为 MS+6-BA 0.5 mg/L+IAA 0.2 mg/L。本试验中,6-BA 浓度过低会导致植物丛生芽较少、繁殖速度减缓,6-BA 浓度过高又会导致丛生芽玻璃化、变形。IBA 属于植物内源生长素,植物无需借助其他外力就能够自动生成,具有促进细胞分裂、发育等功能。在组织培养过程中,内源激素形成速度较慢,无法满足植物生长的需求,需要从培养基中吸收。不同种类的生产调节素多管齐下,效果要比只使用 1 种激素好很多^[5-8]。本研究表明,在 MS+0.6 mg/L 6-BA+0.2 mg/L IBA+0.2 mg/L IAA 培养基中,岩黄连不定芽能够进行高效繁殖,不但增殖倍数非常高,而且芽苗质量非常好。生根的关键因素是选苗,主要是依据苗的健壮程度进行,虽然苗高也可作为 1 项参考指标,但并不是主要因素。生根时应选择健壮度与高度都达到要求的组培苗进行生根培养。岩黄连移栽试验出现萎蔫现象主要是由于岩黄连移栽之后,根部与土壤基质还没有相互适应,但是根系及叶片的呼吸作用没有停止,产

岑湘涛,沈伟,杨美纯,等.木薯组织培养外植体选择和灭菌研究[J].江苏农业科学,2014,42(11):71-72.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.11.021

木薯组织培养外植体选择和灭菌研究

岑湘涛^{1,2},沈伟¹,杨美纯¹,农艳丰¹,苏小茜¹

(1.广西大学农学院,广西南宁 530005; 2.百色学院化学与生命科学系,广西百色 533000)

摘要:以木薯品种华南 205 为材料,研究外植体类型与不同灭菌方法对其组织培养的影响。试验结果表明:9—10 月份室外取材灭菌效果最理想,HgCl₂ 灭菌处理 7—8 月份取的外植体的时间需控制在 10 min 内,而灭菌处理 9—10 月份取的外植体的时间需控制在 5 min。此外,室内水培木薯茎段和室外茎段的中部均可作为组织培养的良好材料。

关键词:木薯;外植体;组织培养;灭菌

中图分类号:S533.043 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)11-0071-02

木薯(*Manihot esculenta* Crantz)别称树木薯、树番薯,大戟科木薯属,是世界 3 大薯类作物(马铃薯、甘薯、木薯)之一。木薯耐贫瘠、耐干旱、抗性强,单位面积产量高,淀粉产出量高,素有“地下粮仓”、“淀粉之王”和“能源作物”之美誉^[1]。目前木薯主要用途是食用、饲用和在工业上的开发利用。其中 90% 以上的木薯主要用于淀粉和变性淀粉的生产。近年来用木薯作为能源植物生产燃料乙醇,使得国家可再生能源法将木薯列为发展生物质能源的少数几种植物之一,能源木薯产业显示出极大的发展潜力^[2]。

广西是我国最大的木薯种植省区,其木薯乙醇产量、变性淀粉、山梨醇等产量均居全国前列,木薯及其产品群总值也位居全国之首^[3]。目前生产上木薯多采用成熟的茎段进行营养繁殖,这种方式繁殖率低,导致良种推广速度慢。利用组织培养技术对木薯进行快速繁殖,将是加速木薯良种大面积推广的有效途径^[4-6]。在木薯组织培养中,选择适合的外植体,是其组织培养能否成功的一个关键。此外,木薯外植体表面和内部常携带一些微生物,是组织培养过程的主要污染源,解决外植体污染是木薯组织培养能否成功的另一个关键。因此,在本研究中,针对木薯组织培养中存在的问题,将重点研

究外植体类型和灭菌方法对其组织培养效果的影响,以期为木薯组培快繁提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试品种为华南 205 的室外茎段和水培茎段,室外采样地点为广西大学农学院大田。

1.2 试验方法

1.2.1 室外茎段取材和灭菌 取样时间与灭菌过程:分别于 5—6 月、7—8 月、9—10 月在田间选取木薯健康植株上带芽的茎段作为外植体。将茎段从叶柄基部切除叶片,用洗衣粉溶液浸泡 10~15 min,再用自来水冲洗 10~15 min,然后将茎段切成带 1~2 个芽、长约 1.5 cm 的小段,在超净工作台内进行表面灭菌,方法如下:75% 乙醇漂洗 20 s 后,再加入含有吐温的 0.1% HgCl₂ 溶液中,灭菌时间设 5、7、10 min 3 个处理。灭菌期间不断摇动,使外植体与灭菌剂充分接触。经上述灭菌处理后无菌水冲洗 5~6 次,接种到 MS 培养基中。

外植体类型:将带芽茎段分为 3 个部分,顶芽以下第 1~2 个芽为上部;第 3~6 个芽为中部;第 7 个芽以下为下部。按照上述方法对外植体进行预处理后,用 75% 乙醇进行表面灭菌 20 s,无菌水冲洗 1 次,再加入含有吐温的 0.1% HgCl₂ 的溶液中灭菌 5 min,最后用无菌水冲洗 5~6 次,接种到 MS 培养基中。

1.2.2 水培茎段取材与灭菌 田间采集的茎段经剪裁处理

收稿日期:2014-02-07

基金项目:国家自然科学基金(编号:31160300)。

作者简介:岑湘涛(1984—),女,广西百色人,硕士研究生,主要从事植物组织培养研究。E-mail:18379905@qq.com。

生大量水分,叶片利用二氧化碳、阳光进行光合作用,消耗营养,导致叶片在消耗水分、养分,但是根部又供应不上。岩黄连所生之处主要集中在山岩边缘等危险、阴凉区域。因此在栽培中要保持一定的湿度及温度,每天给叶片喷洒少量水,移栽 5 d 后可在水中加入少量液体生根培养基促进根的生长。

参考文献:

- [1]文和群,许兆然,Villa-Lobos J,等.中国南部石灰岩稀有濒危植物名录[J].广西植物,1993,13(2):110-127.
- [2]广西壮族自治区卫生厅.广西中药材标准[M].南宁:广西科学技术出版社,1992.

- [3]毛宇昂,梁永红.岩黄连的研究综述[J].时珍国医国药,2006,17(4):630-631.
- [4]蒋水元,胡兴华,赵瑞峰.岩黄连引种栽培研究[J].广西植物,2002,22(5):469-473.
- [5]姜灵敏,徐有明,张冬梅,等.红刺玫愈伤组织诱导再生体系的建立[J].江苏农业学报,2012,28(4):914-916.
- [6]苏钰,黄宁珍,付传明.匙羹藤组织培养条件优化研究[J].广西植物,2009,29(1):87-91.
- [7]陈豫,胡伟,何磊.不同浓度激素对胡萝卜愈伤组织诱导的影响[J].江苏农业科学,2013,41(2):54-56.
- [8]王菲彬,王斐,管玲玲,等.植物激素对东方百合试管苗鳞片分化不定芽的影响[J].江苏农业科学,2013,41(6):53-55.