

张振霞, 张惠婷, 庞立志, 等. 暗紫贝母鳞茎的组织培养[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(3): 17–19.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.03.005

暗紫贝母鳞茎的组织培养

张振霞¹, 张惠婷¹, 庞立志¹, 辛贵忠², 詹华强², 董婷霞², 郑玉忠¹

(1. 韩山师范学院生物系, 广东潮州 521041; 2. 香港科技大学生命科学部, 中国香港 999077)

摘要: 由于不合理的采挖, 暗紫贝母野生资源奇缺, 而植物组织培养技术不仅可以有效地保存暗紫贝母种质资源, 而且可以解决人工种植的种苗问题。以暗紫贝母鳞茎为外植体, 通过选择流水冲洗时间和消毒时间, 研究不同激素组合对不定芽的诱导效果以及诱发产生不定芽或不定根从而长成完整的植株的过程, 以期建立暗紫贝母的快速无性繁殖体系。结果表明, 以暗紫贝母鳞茎为外植体, 先用流水冲洗 3 h, 经 75% 乙醇表面消毒后, 用 0.10% 氯化汞处理 8 min, 最后用无菌水清洗 5 次的效果最佳, 污染率仅为 7.5%; 不定芽诱导的最佳培养基配方是 MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA, 诱导率达 66.7%; 最佳继代培养基配方同不定芽诱导, 增殖系数可达 8.27; 在 1/2MS + 0.5 mg/L NAA 的培养基上的生根情况较好。

关键词: 暗紫贝母; 组织培养; 培养基配方; 鳞茎; 不定芽; 诱导; 增殖; 生根

中图分类号: Q945.51 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)03-0017-03

暗紫贝母(*Fritillaria unibracteata* Hsiao et K. C. Hsia)为著名中药材川贝的主要来源之一, 入药部位为地下鳞茎, 具有清肺润燥、化痰止咳的功效^[1]。暗紫贝母喜寒凉气候, 主要分布于四川省阿坝地区的海拔较高的高原与草地, 生长环境特殊, 人工引种栽培有很多困难。另外, 暗紫贝母生长周期长, 一般 4~5 年才可采收, 而且产量很低, 因此目前暗紫贝母的资源比较短缺, 很大程度上都依赖于野生资源。经过多年采挖, 暗紫贝母的野生资源破坏严重, 产量逐年减少, 货源紧缺, 价格逐年攀升, 因此寻找新的途径以解决其资源问题是非常迫切的。植物组织培养技术可以从根本上解决暗紫贝母的种苗问题, 成本低, 见效快; 此外, 可以研究组培出来的暗紫贝母愈伤组织的药效, 有可能成为有效的替代技术。因此, 暗紫贝母组培技术的研究在药用植物开发研究和生产中具有特殊的意义和应用潜力^[2], 本研究探讨不同植物激素组合对暗紫贝母鳞茎不定芽诱导、增殖、生根情况的影响。

1 材料与与方法

1.1 试验材料

暗紫贝母地下鳞茎于 2012 年 6 月采自四川省康定地区。

以 MS 为基本培养基, 附加 30 g/L 蔗糖、7 g/L 琼脂, 调节 pH 值为 5.8, 添加不同浓度 2,4-D、NAA、6-BA 等激素。所有培养基均在 121 ℃ 条件下高压灭菌 15 min。

培养条件为温度 (25 ± 1) ℃、空气相对湿度 50% ~ 60%、光照时间 12 h/d、光照度 1 000 ~ 1 500 lx。

1.2 试验方法

收稿日期: 2014-04-28

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81202907); 广东省国际合作项目 (编号: 2012B050300025)。

作者简介: 张振霞 (1975—), 女, 甘肃兰州人, 博士, 副教授, 从事植物生物技术研究。E-mail: zhangzhenxia2006@gmail.com。

通信作者: 郑玉忠, 博士, 副研究员, 从事中药学研究。E-mail: zhengyuzhong@gmail.com。

1.2.1 外植体的消毒 选取白嫩、健康的新鲜贝母地下鳞茎, 用自来水冲洗 1~2 h, 置于超净工作台上用 75% 乙醇进行表面消毒, 采用 5 种方式对鳞茎外植体进行消毒处理, 分别为: 处理 1: 流水冲洗 1 h + 70% 乙醇处理 30 s + 0.05% 氯化汞浸泡、振荡 8 min; 处理 2: 流水冲洗 1 h + 70% 乙醇处理 30 s + 0.10% 氯化汞浸泡、振荡 8 min; 处理 3: 流水冲洗 1 h + 70% 乙醇处理 30 s + 10% 次氯酸钠浸泡、振荡 20 min; 处理 4: 流水冲洗 3 h + 70% 乙醇处理 30 s + 0.10% 氯化汞浸泡、振荡 8 min; 处理 5: 流水冲洗 3 h + 70% 乙醇处理 30 s + 0.10% 氯化汞浸泡、振荡 10 min。消毒后用无菌水清洗 5 次后接种于附加不同激素组合的 MS 培养基中进行培养, 接种 2 周后统计污染率, 以期筛选出适合的灭菌方式。

1.2.2 不同激素组合对暗紫贝母鳞茎诱导的比较 选用当年生鳞茎作为外植体, 将其切成 0.5 cm 大小、厚度 0.2 cm 左右, 置于含 NAA (0.5、2.0 mg/L)、6-BA (0.5、2.0 mg/L)、2,4-D (2.0 mg/L)、KT (1.0 mg/L)、TDZ (1.0 mg/L) 的不同种类与浓度植物激素组合的 MS 培养基上, 培养周期为 30 d, 通过统计和对比诱导效率以及生长状况, 研究不同激素种类与浓度组合对暗紫贝母鳞茎诱导的影响。

1.2.3 继代培养的选择 选用鳞茎诱导出的不定芽, 转移到含有 NAA (0.5、1.0、2.0、3.0 mg/L)、6-BA (0.5、1.0、2.0、3.0 mg/L) 的 MS 培养基中, 每种培养基 30 块, 培养 30 d 后观察记录, 比较 NAA、6-BA 对其继代生长的影响。

1.2.4 暗紫贝母鳞茎诱导生根培养 选取生长较一致且健壮、未生根的绿色鳞芽单株, 转入含 NAA (0.5、2.0 mg/L)、IBA (0.5 mg/L)、6-BA (0.5、2.0 mg/L)、KT (1.0 mg/L)、TDZ (1.0 mg/L) 的 1/2MS、MS 生根培养基中, 培养 30 d 后统计生根数、出根率。

2 结果与分析

2.1 不同灭菌方法对暗紫贝母鳞茎消毒的效果

由于暗紫贝母的地下鳞茎带菌严重, 本研究采用不同的

消毒方法对暗紫贝母鳞茎进行了灭菌,2 周后比较染菌率及存活状态。从表 1 可以看出,处理 4、处理 5 的灭菌效果比较好,但是从染菌率和暗紫贝母鳞茎存活状态明显可以看出,方法 4 更适合于暗紫贝母鳞茎器官的表面灭菌。因此认为流水冲洗 3 h、0.1% 氯化汞灭菌 8 min、无菌水清洗 5 次方法的灭菌效果最佳。

表 1 不同灭菌和处理方法对暗紫贝母鳞茎灭菌效果的影响			
处理	染菌外植体数/ 接种数(个)	染菌率 (%)	存活状态
1	17/42	40.5	染菌较严重
2	15/42	35.7	染菌较严重
3	28/40	70.0	染菌严重,生长不好
4	3/40	7.5	生长较好
5	3/45	6.6	生长不好,有些萎焉

2.2 不同激素组合对暗紫贝母地下鳞茎诱导的影响

暗紫贝母鳞茎切片成大小为 0.5 cm、厚度为 0.2 cm 左右,接种在含有不同植物激素的 MS 诱导培养基上,培养 20 d 左右发现从贝母外植体切块四周逐渐分化出小的不定芽,30 d 后统计不定芽诱导率,详见图 1。由表 2 结果可知,培养基中不同组合配比的植物激素对鳞茎的诱导效率不同;在含高浓度生长素的培养基上,发现 NAA、2,4-D 对于贝母鳞茎

诱导都有明显的促进作用,其中 MS + 2.0 mg/L NAA + 0.5 mg/L 6-BA 的出芽率达 43.7%,且新生芽长势旺盛,数量多,较健壮,状态佳。在 2.0 mg/L 6-BA 的培养基上,鳞茎外植体也诱导出不少的新生芽,只是芽较细小。在此基础上各添加 1.0 mg/L KT 或 TDZ,对新生芽的诱导促进作用并不明显,但是个别外植体长出浅黄色的根状物;在含 KT 的培养基上,几个新生芽变成绿色。综合上述研究结果可知,选择 MS 附加 2.0 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA 作为暗紫贝母鳞茎诱导芽的较优激素组合培养基。

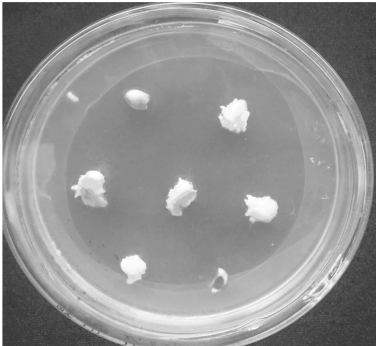


图1 培养 30 d 的暗紫贝母鳞茎

表 2 不同激素组合对暗紫贝母鳞茎诱导的影响							
NAA (mg/L)	6-BA (mg/L)	2,4-D (mg/L)	KT (mg/L)	TDZ (mg/L)	出芽数/ 接种数	出芽率 (%)	芽生长状况
2.0	0.5				14/32	43.7	+++
	0.5	2.0			27/46	58.7	+
0.5	2.0				30/45	66.7	++
0.5	2.0		1.0		7/36	19.4	+
0.5	2.0			1.0	3/24	12.5	+

注:“+”表示生长状况,越多表示生长越好。

2.3 不定芽的继代培养

将暗紫贝母鳞茎诱导分化出的不定芽转移到含有不同浓度组合 NAA、6-BA 的 MS 培养基中,每种培养基接种 30 个,培养 10 d 后就发现在外植体块上长出不少新芽(图 2)。35 d 后统计芽数,从表 3 可以看出:在不定芽继代培养中,6-BA 和 NAA 的不同组合在一定程度上都能促进暗紫贝母鳞茎不定芽的增殖,且随着植物激素浓度的上升,增殖系数也提高;但是当 NAA、6-BA 分别达到 3.0 mg/L 时,培养的不定芽出现一定程度的玻璃化现象,可见植物激素能促进诱导贝母鳞茎生长,但是使用浓度不能太高。最终选定 2.0 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA 为最佳的继代培养基激素组合,此条件下新生芽旺盛,增殖系数为 8.27。

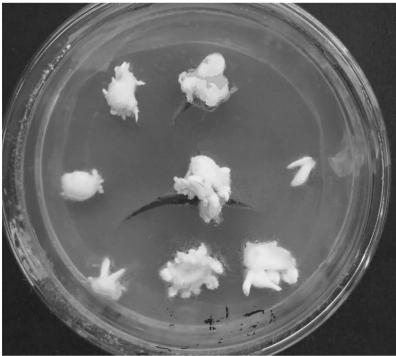


图2 继代培养后出现大量不定芽

表 3 不同浓度激素组合对暗紫贝母鳞茎继代培养的影响					
NAA (mg/L)	6-BA (mg/L)	出芽数 (个)	增殖系数	芽平均长度 (cm)	新生芽生长状态
1.0	0.5	39	1.30	0.35	生长不旺盛,大多无变化,有些褐变
2.0	0.5	142	4.70	0.50	生长较旺盛
3.0	0.5	276	9.20	0.50	长势旺盛且玻璃化较严重
0.5	1.0	155	5.16	0.35	长势较旺盛,芽小,底部愈伤化且偏黄
0.5	2.0	248	8.27	1.00	长势旺盛,芽大、密集,有些带绿色
0.5	3.0	105	3.50	1.00	长势不旺盛,芽大,但玻璃化严重

2.4 生根培养

本试验将以分化再生暗紫贝母鳞茎转入到不同的生根培养基中,培养 30 d 后观察生根结果,详见表 4、图 3。在贝母鳞茎诱导增殖的培养过程中,MS + 2.0 mg/L NAA + 0.5 mg/L 6-BA 培养基上添加 1.0 mg/L KT 或 1.0 mg/L TDZ,培养一段时间后发

现鳞茎外植体周围长出许多鹅黄色、长短粗细各异的不定根,可见贝母鳞茎生根相对容易。而在 1/2MS 生根培养基中,NAA 和 IBA 的存在有利于生根,特别是在含 0.5 mg/L NAA 的培养基中,培养 10d 后就长出健壮的根,约 83.3% 的鳞茎生根密集,长势好。在 1/2MS + 0.5 mg/L NAA + 0.5 mg/L IBA 和 1/2MS + 0.5 mg/L IBA 的培养基中,生根效果也较好。综合比较可知,贝母鳞茎生根对培养成分的要求不高,试验过程中基本都能生根,但 1/2MS + 0.5 mg/L NAA 的培养基上生根率最高,长出的根更加健壮,生根速率也快。生根后鳞茎长出的绿芽见图 4。

表 4 暗紫贝母鳞茎的生根培养

编号	NAA (mg/L)	IBA (mg/L)	6-BA (mg/L)	KT (mg/L)	TDZ (mg/L)	生根个数/ 接种数	生根率 (%)	根的生长状态
1	2.0		0.5	1.0		7/23	30.43	根鹅黄色,呈现玻璃化
2	0.5		2.0		1.0	10/24	41.60	根较粗短,鹅黄色,部分玻璃化
3	0.5					20/24	83.30	根健壮,生长密集
4		0.5				19/31	61.30	根极短
5	0.5	0.5				17/24	70.80	根细长

注:1-2 号培养基以 MS 培养基为基础,3-5 号培养基以 1/2MS 培养基为基础。



图3 鳞茎的生根培养

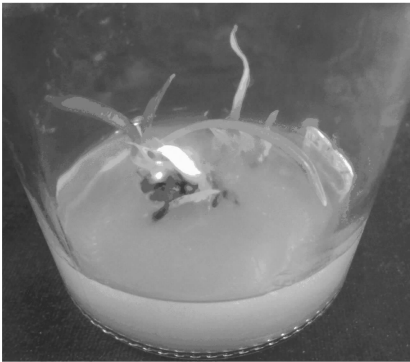


图4 鳞茎绿芽

3 结论与讨论

3.1 不同消毒方法的除菌效果

贝母地下鳞茎带菌严重,通常的消毒方法往往难以取得满意的效果。已有研究多数是用传统的灭菌方法^[3-5],基本是采用 70% 的乙醇浸泡 30 s,再用 0.1% ~ 0.2% 的 HgCl₂ 处理 5 ~ 8 min,最后用无菌水漂洗 5 ~ 8 次。本研究采用上述方法,但消毒效果都不甚理想,这主要由于贝母鳞茎通常都是 2 ~ 3 枚鳞叶相互合抱,加剧了外植体消毒处理的难度。而调

整之后的消毒方法则取得不错的结果:将贝母地下鳞茎先用流水冲洗 3 h 以上,经 75% 乙醇表面消毒后,再用 0.10% 氯化汞振荡 8 min 消毒处理,最后用无菌水清洗 5 次,获得外植体的污染率为 7.5%,同时且消毒剂对外植体生长的影响也较小。

3.2 不同激素配比对暗紫贝母鳞茎诱导增殖的影响

不定芽的产生主要取决于培养基的类型及植物激素种类与浓度的配比组合。李隆云等通过对暗紫贝母鳞茎再生组织培养技术的研究指出,NAA 和 KT 的组合有利于鳞茎的诱导^[3]。王跃华等认为,2.0 mg/L 6-BA 和 0.2 mg/L NAA 组合为卷叶贝母鳞茎再生最佳条件^[4]。高燕等研究发现,诱导不定芽的最佳培养基为 MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L 2,4-D^[5]。刘亚菊等研究了 TDZ 在平贝母组织培养中的作用,结果表明,TDZ 在浓度很低时可刺激平贝母外植体脱分化和再分化^[6]。选用 NAA、6-BA、KT、TDZ、2,4-D 这 5 种激素不同组合诱导出不定芽,结果表明,2.0 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA 组合诱导不定芽的生长效果较好,同样的培养基条件在继代培养中的增殖系数为 8.27,效果也最佳。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:化学工业出版社,2005.
[2] 耿茂林,马琳,常莉,等. 贝母组织培养研究进展[J]. 淮北煤炭师范学院学报:自然科学版,2007,28(1):38-42.
[3] 李隆云,周裕书,代敏,等. 暗紫贝母鳞茎再生组织培养技术研究[J]. 中国中药杂志,1995,20(2):78-80.
[4] 王跃华,代勇,何宗晟,等. 离体培养条件对卷叶贝母鳞茎再生的影响[J]. 中药材,2010,33(6):854-856.
[5] 高燕,贺宾,范弢,等. 贝母愈伤组织的诱导及植株再生[J]. 新疆农业科学,2005,42(1):35-37.
[6] 刘亚菊,殷红,朱四易. 噻二唑苯基脲在平贝母组织培养中的作用[J]. 西北大学学报:自然科学版,2000,30(2):139-142.