【中药研究】

三叶青的组织培养与快速繁殖研究

钟毓倩

浙江中医药大学附属第二医院 浙江 杭州 310005

关键词 三叶青 组织培养 快速繁殖

三叶青又名有角乌蔹莓、石老鼠，为葡萄科崖爬藤属植物三叶崖爬藤。主要分布于长江以南地区，但多年来三叶青被毁灭性挖取，种源稀少。笔者应用组织培养进行快速繁殖研究，以期解决资源紧缺问题。

1 材料

1.1 药材：试验材料采自安徽省，外植体取茎尖、带腋芽的茎段和叶片。

1.2 培养基：基本培养基为 M S 按不同处理方案添加不同类型的植物激素，用 0.1N NaOH 和 0.1N HCL 调节 pH 值为 5.8～6.0，在高压灭菌锅中高温（121℃）灭菌 20min。上述培养基均加 3%蔗糖、1%琼脂，培养室温度 25℃左右，每天光照 13h，光照强度 2000 1x 左右。移栽基质经过灭菌消毒处理，按 m（珍珠岩）：m（草炭）：m（菜园土）=1：1：1 比例混合。

2 试验方法与结果

2.1 样品处理：取茎尖、茎段（带芽）和叶为外植体，按下列程序进行消毒：取材→自来水粗洗→5%洗衣粉水溶液漂洗 5min→自来水冲洗 30min→75%乙醇擦洗表面→0.1%升汞溶液中消毒 5min→2%次氯酸钠溶液中消毒 20min→无菌水冲洗 4～6 次，然后在无菌工作台中将外植体切成 0.5～1.0cm 长的小段。

2.2 诱芽培养：分别将不同部位的外植体接种到表 1 各培养基中，观察出芽情况，计算诱芽率。

表 1 诱导三叶青不定芽的培养基配方与诱导效果（mg/L）

序号	基本培养基	6-BA	IBA	NAA	诱导率（%）
1	MS	0.5		1.0	64
2	MS	1.0	0.5		54
3	MS	2.0		0.2	86
4	MS	1.0	0.1	0.1	71
5	MS	1.0		0.1	79

不同植体对愈伤组织诱导不一样，在由 3 号培养基的激素浓度配比下试验结果（见表 2）。

表 2 不同外植体诱芽的影响

外植体	接种数(块)	愈伤组织数(个)	出愈率(%)	不定芽数(个)
顶芽	50	42	83	534
茎段	50	34	62	311
叶片	50	19	24	0

2.3 继代增殖：将诱导出来的愈伤组织及芽丛转到新的 3 种不同激素组合的培养基上进行继代培养。将初代培养的芽丛分离并切割成 2cm 的茎段，接种于培养基 MS＋NAA 0.2；MS＋6-BA 0.02＋NAA 0.5；MS＋6-BA 2＋NAA 0.2。接种后给予全天光照，室温 20～28℃。1 周后腋芽萌动且萌蘖生长很快。

2.4 生根培养：不同激素组合对其生根状况影响较大（表 4）。将诱导成活的丛生芽切割成单芽，分别转接到表 3 各培养基中（每瓶接 1 个芽），30 d 后 4 号培养基的生根率最高达 74%。

表 3 生根培养基配方（mg/L）

序号	基本培养基	IBA	NAA
1	1/2MS	1.0	
2	1/2MS	1.0	0.1
3	1/2MS		1.0
4	1/2MS	0.5	1.0

表 4 不同培养基的生根率比较

培养基序号	接种瓶数	生根瓶数	生根率（%）
1	54	22	41
2	60	43	72
3	50	26	52
4	50	37	74

2.5 移栽定植：芽长到 3～4cm 时，切取健壮的植株转到生根培养基上，所有的植株都能正常生长，培养 1 周后，即诱导出根，10d 后每株可长出 3～5 条根，根长达 4～5cm。再培养 1 周，植株健壮，叶色浓绿，然后揭去纸盖练苗。轻轻洗去根部培养基，移到蛭石的小盆中，盖上塑料膜及烧杯，保持较高的温度，10d 后揭去塑料膜及烧杯，可移栽到大田，小苗成活率 95%。

3 小结

对三叶青不同部位的外植体进行诱导，在相同消毒处理下和同种培养基中，最佳诱导外植体为茎尖。初代培养过程中以 3 号培养基为最佳，生根培养基以 4 号为最佳。6-BA 在三叶青的继代培养中的作用可以忽略不计，可以认为 MS＋NAA 0.2 是最佳组合的继代增殖培养基。

收稿日期 2007-02-05