

广金钱草组培快繁培养基配方的研究

杨洪元¹ 覃吉胜²

(1 广西职业技术学院, 广西南宁 530226; 2 桂林亦元生现代生物技术有限公司, 广西桂林 541004)

摘要:取带腋芽的广金钱草茎段作外植体, 进行组织培养快繁培养基配方的研究。实验结果得出, 广金钱草的初代培养基为: MS + 6-BA 1.5 + NAA 0.1; 继代培养基为: MS + 6-BA 1.5 + NAA 0.18; 采用 MS + 6-BA 0.6 + NAA 0.08 + IBA 0.05 培养基可诱导广金钱草愈伤组织分化出芽, 其增殖倍数达到 3-4 以上。

关键词:广金钱草; 组培快繁; 愈伤组织; 增殖; 诱导分化

中图分类号 S339.4

文献标识码 B

文章编号 1007-7731(2007)24-59-02

前言

广金钱草为豆科山蚂蝗属多年生半灌木状草本植物, 又名落地金钱, 铜钱草, 假花生等, 是一味常用的中草药, 其味甘、性凉, 具有清热、利尿、排石的功效, 主要用于泌尿系统感染, 泌尿系统结石症, 急性黄疸型肝炎等疾病的治疗。广金钱草既可以不带根的全草入药, 还可以作为主要原料生产中成药如“消石饮”, “消石片”, 和“广金钱草冲剂”等。近年来由于过度的采伐利用, 广金钱草野生资源枯竭, 目前广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, 应用植物组织培养快繁技术繁育广金钱草, 无疑是一条较好的解决途径。本实验取带腋芽的广金钱草茎段作外植体, 进行组织快繁培养基配方研究, 给广金钱草组培工厂化育苗提供一定的技术帮助。

1 材料和方法

采用一年生经过无菌盆栽驯化幼嫩广金钱草茎段(种源来自广西百色右江矿务局长岭分局果园)进行以下 4 种试验:

1.1 外植体处理方法试验 取幼嫩带茎节的广金钱草茎段, 经自来水冲洗, 再用洗衣粉液, 轻轻刷洗广金钱草茎枝上绒毛, 然后在无菌条件下用 75℃ 酒精、0.1% 升汞、添加适量浓度的漂白粉设计 6 个不同的处理方法进行表面消毒与灭菌如下。

(1) 75% 酒精浸泡 10s, 0.1% 升汞浸泡 5min, 无菌水洗 6 次; (2) 75% 酒精浸泡 10s, 0.1% 升汞 8 浸泡 min, 无菌水洗 6 次; (3) 75% 酒精浸泡 15s, 0.1% 升汞 6min (加适量的洗衣粉), 无菌水洗 6 次; (4) 75% 酒精浸泡 20s, 0.1% 升汞 10min, 2% 漂白粉浸泡 2min, 无菌水洗 6 次; (5) 75% 酒精浸泡 15s, 0.1% 升汞 15min, 2% 漂白粉 3min, 无菌水洗 8 次; (6) 75% 酒精浸泡 20 秒, 0.1% 升汞 20min, 漂白粉 3min, 无菌水洗 8 次。

1.2 初代培养基配方试验 将已消毒灭菌的外植体剪成

带有一个茎节的 1-2cm 茎段, 在无菌条件下接种到初代培养基上进行培养。培养温度 24-25℃, 光强 100-2000Lx, 光周期 12h。诱导芽和愈伤组织的大量形成。初代培养实验研究以 MS 为基础培养基, 设计 7 个不同浓度的 6-BA、NAA 研究其对广金钱草初代培养物形成的影响。

1.3 继代培养基配方试验 将初代诱导出来的愈伤组织团粒打碎, 均匀接种到继代增殖培养基上, 培养温度 24-26℃, 光照强度 800-1000Lx, 光周期 12h。继代培养基实验以最适初代培养基为基础, 设计不同浓度的 NAA 和 6-BA 人研究其对广金钱草增殖的影响。

1.4 诱导愈伤组织分化成苗试验 通过器官发生重新形成新的芽称不定芽, 先取形状整齐, 结构紧密, 并带有少量芽眼的愈伤组织接种于诱导分化培养基中, 培养温度 24-25℃, 光照强度 800-1000 Lx 光周期 12h。设计不同浓度的 6-BA、NAA 及 IBA 研究其对诱导分化愈伤组织不定芽形成影响。依据经验, 愈伤组织分化形成后, 调节激素用量, 可诱导愈伤组织分化成苗, 实现广金钱草快速繁殖的目的, 实验设计总的原则是在原用激素用量的基础上, 逐步降低各激素用量, 直至找出最佳诱导分化率的激素用量。

2 结果与分析

2.1 外植体消毒灭菌处理方法的比较

表 1 外植体不同消毒灭菌处理方法的污染率和成活率统计

编号	接种瓶数	污染瓶数	污染率 (%)	成活瓶数	污染率 (%)
1	10	6	60	2	20
2	10	5	50	3	30
3	10	10	100	0	0
4	15	3	20	5	33.3
5	15	2	13.3	10	66.6
6	10	1	10	2	20

由表 1 可看出, 75% 酒精作用 15-20s 为宜, 0.1% 升汞灭菌 20min 可能会伤害到外植体, 带绒毛的外植体用

作者简介: 杨洪元 (1971-), 四川剑阁人, 副教授, 理学硕士, 主要从事植物病毒分子生物学方面的教学与科研。

收稿日期: 2007-12-16

2%漂白粉浸泡2-3min则效果较好。综合实验结果,广金钱草外植体消毒灭菌处理的较适宜方法为:75%酒精消毒15s,再用0.1%升汞灭菌15min,然后加入2%漂白粉浸泡3min,无菌水冲洗8次,可获得低污染率,高成活率的无菌苗。

2.2 初代培养培养基配方的比较 外植体接种到初代培养基后,先是茎段顶端切口处膨大,长出肉眼可见的淡绿色的瘤状物,瘤状物随时间延长逐渐增多,呈疏松堆叠状,颜色也变为翠绿色,15d后瘤状物堆叠成约2-3cm不规则的近圆团粒,边缘整齐,有些成云朵状。从表2实验结果得出,不使用NAA不能诱导出愈伤组织,不使用6-BA,虽能诱导愈伤组织的形成,但形成的愈伤组织很容易老化,褐化直至死亡,是无效的愈伤组织。将NAA和6-BA进行适当配合能获得高达60%的诱导率(见第3组),即初代培养基配方为:MS+NAA0.5+6-BA1.5。

表2 不同浓度的6-BA和NAA对茎段愈伤组织形成的影响

序号	培养基配方		带茎节的茎段		
	6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)	外植体数	愈伤组织数	诱导率 (%)
1	2.0	0	10	0	0
2	1.5	0.05	10	2	20.0
3	1.5	0.10	10	6	60.0
4	1.0	0.20	15	5	33.3
5	1.0	0.50	15	6	40.0
6	0.5	1.00	10	5	50.0
7	0	1.50	15	8	53.3

2.3 愈伤组织的增殖试验结果

表3 不同浓度6-BA对愈伤组织的增殖结果

编号	培养基配方		入愈伤组 织体积(cm ³)	增殖系数
	NAA(mg/L)	6-BA(mg/L)		
1	0.1	1.0	1.0	4.0
2	0.1	1.2	1.0	4.0
3	0.1	1.4	1.0	4.5
4	0.1	1.5	1.0	5.0
5	0.1	1.6	1.0	4.5
6	0.1	1.8	1.0	4.5
7	0.1	2.0	1.0	4.0

表4 不同浓度NAA对愈伤组织的增殖结果

编号	培养基配方		入愈伤组 织体积(cm ³)	增殖系数
	NAA(mg/L)	6-BA(mg/L)		
1	0.05	1.5	1.0	3.0
2	0.08	1.5	1.0	3.5
3	0.1	1.5	1.0	4.0
4	0.12	1.5	1.0	4.0
5	0.15	1.5	1.0	4.5
6	0.18	1.5	1.0	5.0
7	0.20	1.5	1.0	4.5

(注:表8和表9增殖系数指增殖后的愈伤组织体积数和原来接入前的愈伤组织体积数的比值。)

从表3、表4得出:0.1mg/L NAA使用浓度,6-BA使用量在1.5mg/L有5倍体积的增殖倍数即:MS+NAA0.1+BA1.5;6-BA的使用浓度在1.5mg/L时,NAA使用浓度在0.18mg/L时有5倍体积的增殖倍数。即MS+6-BA1.5+NAA0.18。

综合实验结果,广金钱草愈伤组织的增殖培养基配方为:MS+6-BA1.5+NAA0.18

2.4 广金钱草愈伤组织分化培养基配方培养基配文的比较

表5 广金钱草愈伤组织分化培养基配方实验结果

编号	培养基配方			植入的愈 伤组织颗 粒数	分化的不 定芽数	分化率 (%)
	6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)	IBA (mg/L)			
1	1.5	0.15	0.05	30	10	33.3
2	1.2	0.12	0.05	30	14	46.7
3	1.0	0.10	0.05	20	12	60.0
4	0.8	0.10	0.05	20	14	70.0
5	0.6	0.08	0.05	30	22	73.3
6	0.5	0.05	0.05	30	18	60.0

在继代培养基使用激素的浓度基础上,逐步减少各激素的使用量,会出现愈伤组织分化不定芽数目不断增多的现象。从表5可以看出,NAA的使用浓度降至0.05mg/L,6-BA降至0.5mg/L时愈伤组织分化率开始下降,当6-BA用量在0.6mg/L,NAA用量在0.08mg/L和IBA用量在0.05mg/L时,愈伤组织分化率最高(73.3%),因此愈伤组织分化培养基为:MS+NAA0.08+6-BA0.6+IBA0.05

3 结果与讨论

该实验初步得出广金钱草组织培养各阶段的培养基配方为:

初代培养基:MS+6-BA1.5+NAA0.1可诱导愈伤组织的形成,但形成的愈伤组织在后期易褐化且忍耐培养环境的能力很差,因此其最适培养基还有待进一步研究;

继代培养基:MS+6-BA1.5+NAA0.18可使愈伤组织增殖,但增殖的愈伤组织形状不规则,且易褐化,若应用于大生产还需做进一步的实验;

愈伤组织分化培养基:MS+6-BA0.6+NAA0.08+IBA0.05可使广金钱草分化出芽,增殖倍数可达到3-4以上,但分化出来的苗势较弱,生长缓慢,还需对培养基配方做进一步的优化。

参考文献

- [1]朱建华著,植物组织培养实用技术.中国计量出版社,2002
- [2]王其新等,广金钱草栽培品与野生品的质量比较.中草药2000.31(12)
- [3]陆善旦,广西部分中草药走势.全国药材商情2003(34)

(责编:洪萨丽,冯继明)

更正:本刊2007年第13卷第21期18页《浅议我国发展保护性耕作的必要性、面临的问题及对策》一文作者应为:姜玉美 罗奥 祁倩倩 崔红秋。