

牛大力茎段组织培养技术研究

黄碧兰, 徐立*, 李志英, 马千全, 李克烈, 陈伟

(中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所, 农业部热带作物种质资源利用重点开放实验室, 海南儋州 571737)

摘要 [目的]为牛大力的规模化生产提供依据, 保护牛大力野生资源。[方法]以牛大力的幼嫩茎段作为外植体, 研究其组织培养和离体快繁技术。[结果]用0.1%升汞处理外植体20 min, 可获得无菌材料。以MS+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.1 mg/L为启动培养基, 诱导率可达100%, 接种后20 d, 腋芽开始萌发, 且生长正常。以MS+6-BA 2.0 mg/L+IBA 0.1 mg/L为增殖培养基, 培养30 d后, 增殖系数达7.0, 有少量的愈伤组织产生, 但不定芽生长发育正常。用1/2MS+IBA 0.5 mg/L+IAA 0.5 mg/L培养基进行生根培养, 生根效果最好, 生根率达80%, 根生长状态良好。将生根的小苗移栽到椰糠:砂为3:1的基质中, 覆盖地膜保湿15 d, 成活率达85%以上。[结论]牛大力茎段组织培养的最佳生根培养基为:1/2 MS+IBA 0.5 mg/L+IAA 0.5 mg/L。

关键词 牛大力; 茎段; 组织培养

中图分类号 S603.6 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)32-13993-02

Study on Tissue Culture Techniques for Stem Segment of *Millettia speciosa* Champ.

HUANG Bi-lan et al (Tropical Crops Germplasm Resources Institute of China Academy of Tropical Agriculture, Key Opening Laboratory of Tropical Crops Germplasm Utilization of Agriculture Ministry, Danzhou, Hainan 571737)

Abstract [Objective] The study was to provide the basis for the scale production of *Millettia speciosa* Champ. and protect its wild resource.

[Method] With tender stem segments of *M. speciosa* as explants, the techniques of its tissue culture and rapid propagation in vitro were studied. [Result] The explants were treated by 0.1% HgCl₂ for 20 min and the asepsis material could be obtained. With MS+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.1 mg/L as the initial medium, the induction rate could reach 100%. After inoculation for 20 d, the axillary buds begun to germinate and normally grow. With MS+6-BA 2.0 mg/L+IBA 0.1 mg/L as the multiplication medium, after culture for 30 d, the multiplication coefficient reached 7.0, and there were a few callus emerged, but the growth and development of adventitious buds were normal. When the medium of 1/2 MS+IBA 0.5 mg/L+IAA 0.5 mg/L was used for rooting culture, the rooting effect was the best and the rooting rate reached 80%, and the growth of root was good. When the rooted small seedling were transplanted into the matrix of coconut bran and sand (3:1), and the plastic film was covered on it for keeping moisture for 15 d, the survival rate reached more than 85%. [Conclusion] The optimum rooting medium for stem segments culture of *M. speciosa* was 1/2 MS+IBA 0.5 mg/L+IAA 0.5 mg/L.

Key words *Millettia speciosa* Champ.; Stem segment; Tissue culture

牛大力植物学名为美丽崖豆藤(*Millettia speciosa* Champ.), 是一种分布于热带和亚热带地区的野生名贵药材, 主治肺热、肺虚咳嗽、肺结核、风湿性关节炎、腰肌劳损、慢性支气管炎、慢性肝炎、白带等^[1-2]。目前在市场上需求量大, 是多种中成药的主要原料。近年来, 由于两广民间大量使用牛大力做药膳, 牛大力野生资源已面临日益枯竭的境地。笔者以牛大力茎段作外植体, 对其组织培养和离体快繁技术进行全面、系统的研究, 为牛大力规模化生产奠定基础, 对保护牛大力野生资源具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 材料 牛大力茎段取自热带农业科学院品种资源研究所南药圃。

1.2 方法

1.2.1 无菌材料的获得。 大田采取牛大力幼嫩茎段, 用洗衣粉清洗1次, 在自来水下冲洗干净, 吸干水分, 用0.1%升汞浸泡20 min, 再用无菌水冲洗4~6次后置于无菌滤纸上吸干水分, 接种至启动培养基上。

1.2.2 启动和增殖培养。 以MS+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.1 mg/L为启动培养基进行启动培养, 以MS为基本培养基, 添加不同浓度的BA和IBA, 组成10种培养基, 每个组合接种50瓶, 每瓶接5个带一个芽的无菌材料, 30 d后统计增殖系

数, 观察材料状态。

1.2.3 生根培养。 以1/2 MS为基本培养基, 添加不同浓度的IBA和IAA, 组成12种培养基, 每个组合接种10瓶, 每瓶接10个3~5 cm不定芽, 30 d后统计生根率, 研究适合生根的IBA和IAA浓度。

1.2.4 移栽驯化。 以椰糠:砂=3:1为基质, 用多菌灵灭菌, 移栽后用地膜保湿15 d以上, 观察其移栽效果。

2 结果与分析

2.1 无菌材料的获得 材料通过灭菌后接种至启动培养基上, 共接种50瓶, 每瓶接种1个材料, 30 d后统计结果, 其中有30瓶污染褐变, 20瓶未污染的材料中有10瓶材料褐变, 10瓶材料萌发腋芽。由此方法灭菌可获得无菌材料, 但材料成活率较低, 灭菌方法还有待改进。

2.2 不同激素浓度对比对增殖的影响 试验结果表明, MS+BA 1.0 mg/L+IBA 0.1 mg/L的启动培养效果较好, 接种后20 d腋芽即开始萌发, 且腋芽生长发育正常。通过调整BA和IBA的浓度和比例来协调顶芽和腋芽的生长, 使其处于一个对整体较有利的水平(图1)。由表1可见, BA 2.0 mg/L+IBA 0.1 mg/L的增殖系数最大, 且生长状况最好。在增殖过程中, 都会产生愈伤组织, 但少量的愈伤组织对不定芽的生长无影响; 此外, 顶芽的快速生长为增殖系数的提高提供了基础, 若顶芽不能快速生长, 而材料整体将长期处于较弱的体积, 很难有高的增殖系数。

2.3 不同培养基组合对生根的影响 将培养长至3~5 cm的牛大力不定芽, 接入生根培养基试验, 生根培养15 d后, 基部出现根原基, 30 d后统计结果并直观分析(图1)。结果表

基金项目 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助(PZS020); 农业部热带作物种质资源利用重点开放实验室开放基金资助; 海南省重点科技项目资助。

作者简介 黄碧兰(1973-), 女, 福建上杭人, 硕士, 助理研究员, 从事植物离体保存与快速繁殖研究。*通讯作者。

收稿日期 2008-09-16

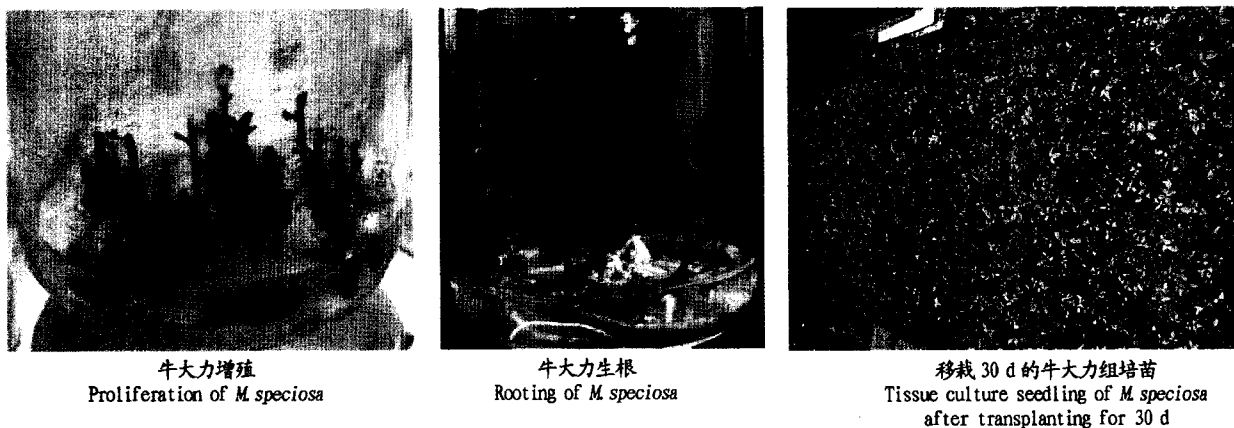


图 1 牛大力茎段组织培养

Fig. 1 Tissue culture of the stem of *M. speciosa*

表 1 不同激素浓度对比对增殖的影响

Table 1 Effects of different phytohormones on proliferation

激素浓度 //mg/L Hormone concentration		增殖系数 Proliferation coefficient	材料状态 Material status
BA	IBA		
1.0	0.1	4.5	生长正常,产生少量愈伤
1.5	0.1	5.5	生长正常,产生少量愈伤
2.0	0.1	7.0	生长正常,产生少量愈伤
2.5	0.1	6.5	生长缓慢,产生较多愈伤
3.0	0.1	6.0	生长缓慢,较多愈伤
1.0	0.2	4.0	生长正常,少量愈伤
1.5	0.2	5.5	生长正常,少量愈伤
2.0	0.2	6.5	生长正常,有少量愈伤产生
2.5	0.2	6.0	生长较慢,有较多愈伤产生
3.0	0.2	5.5	生长缓慢,产生大量愈伤

明(表 2),一定激素浓度下利用 1/2 MS 培养基生根效果较好,MS 培养基也能诱导根原基的形成,并有部分根的出现,但达不到移栽的要求,不适宜牛大力的生根培养。在 1/2 MS 培养基中,IBA 0.5 mg/L + IAA 0.5 mg/L 的组合生根率最高,且根生长状态最好,所以组合 1/2 MS + IBA 0.5 mg/L + IAA 0.5 mg/L 为最佳生根培养基。

2.4 移栽驯化 把生根的瓶苗移至温室自然光下炼苗 1 周,然后取出小苗,洗去培养基,再用 1 000 倍多菌灵浸泡 3 min,移栽在基质为椰糠:砂 = 3:1 的苗床上,移栽后用地膜保湿 15 d 以上,成活率达 85% 以上(图 1)。

3 结论与讨论

牛大力茎段灭菌比较困难,因为牛大力茎段表面被有绒毛,用 0.1% 升汞消毒 20 min 可获得无菌材料;牛大力的启

动培养基以 MS + 6-BA 1.0 mg/L + IBA 0.1 mg/L 为好,诱导率可达 100%,且腋芽生长正常;以 MS + 6-BA 2.0 mg/L + IBA 0.1 mg/L 为增殖培养基,培养 30 d,增殖系数可达 7.0,虽然有少量的愈伤组织产生,但不定芽生长发育正常;牛大力的生根较为困难,以 1/2 MS + IBA 0.5 mg/L + IAA 0.5 mg/L 组合生根效果最好,生根率达 80%;移栽到以椰糠:砂 = 3:1 的基质中,覆盖地膜保湿 15 d,成活率可达 85% 以上。

表 2 不同培养基与激素组合对生根的影响

Table 2 Effects of different culture media and hormone combination on rooting

培养基 Culture medium	激素浓度 //mg/L Hormone concentration		生根率 // % Rooting rate	根生长状态 Rooting status
	IBA	IAA		
1/2 MS	0.1	0.1	8	生长速度慢,形态正常
	0.5	0.1	20	生长速度慢,形态正常
	1.0	0.1	18	生长速度慢,形态正常
	0.1	0.5	7	生长速度慢,形态正常
	0.5	0.5	80	生长速度快,形态正常
	1.0	0.5	46	生长速度快,形态正常
	0.1	1.0	5	生长速度慢,形态正常
	0.5	1.0	16	生长速度慢,形态正常
	1.0	1.0	10	生长速度慢,形态正常
	0.1	0.5	4	只形成根原基,但没有长根
MS	0.5	0.5	20	只形成根原基,无根伸出
	1.0	0.5	15	根原基出现,但无根伸出

参考文献

[1] 广西壮族自治区卫生厅. 广西中药材标准[S]. 南宁:广西科学技术出版社,1992:31-32.
[2] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编(上册)[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社,1986:200.
[5] 施和平. 植物组织培养[M]. 广州:广东高等教育出版社,2000:27-32, 36-37, 48-51.
[6] 杨霞,徐康. 洋桔梗的组织培养及快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,1997, 33(6):435-438.
[7] 及华,温春秀,高延厅. 洋桔梗的离体快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 1996,32(6):431-432.
[8] 裴洪平. 生物统计学[M]. 杭州:浙江教育出版社,1990:96-125.
[9] 倪德祥. 植物生长调节剂在组织培养中的调控作用[J]. 自然杂志, 1987,10(1):27-30,35-39.
[10] 崔德才. 植物组织培养与工厂化育苗[M]. 北京:化学工业出版社, 2003:27-30,35-37.
[11] 陈正华. 木本植物组织培养及其应用[M]. 北京:高等教育出版社, 1986:301-307.
[12] 张丕芳. 植物激素对桉树愈伤组织生长和器官发生的作用[J]. 复旦学报:自然科学版,1982,21(4):445-452.

(上接第 13963 页)

验结果可以看出,当激素种类和浓度分别为 6-BA 0.5 mg/L + IBA 2.0 mg/L + GA 2.0 mg/L 时,丛生芽的诱导率分蘖率最高。

参考文献

[1] 张彦萍. 切花新秀——洋桔梗[J]. 植物杂志,1998(2):20.
[2] 赵梁君,宿有民. 我国花卉种业与发展战略[J]. 中国花卉园艺,2003 (3):6-8.
[3] 金波,宋俊果. 鲜切花栽培技术手册[M]. 北京:中国农业出版社, 1998:167-170.
[4] 朱广廉. 植物组织培养中的外植体灭菌[J]. 植物生理学通讯,1996,32 (6):444-449.