

药用植物“三叶青”的组培快繁技术研究

钱丽华

(杭州市农业科学研究院生物技术研究所,杭州 310024)

摘要 以药用植物“三叶青”的腋芽为供试材料,通过开展腋芽外植体诱导技术、不定芽继代增殖技术及试管苗生根技术研究,形成一套完整的“三叶青”组培快繁技术。试验结果表明:1/2MS + BA 0.03~0.5 mg/l可作为“三叶青”腋芽外植体诱导配方,25 d腋芽平均萌发率最高达92%,在此诱导配方上,23 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的光照强度有利于腋芽的萌发,较8 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 下最高萌发率高出15.38%;MS基本培养基 + BA 2 mg/l + NAA 0.2 mg/l或BA 2 mg/l为不定芽继代增殖配方,不定芽平均增殖系数达5.455和4.135,继代周期缩短到35~40 d;1/2MS + 20 g/l蔗糖 + NAA 0.2 mg/l为三叶青不定芽生根培养基配方,10~15 d不定芽生根率达到98%以上。

关键词 三叶青;诱导;萌发率;生根率

三叶青是葡萄科多年生蔓生藤本植物,分布于浙江、江西、福建等10多个等省区,有效成分为黄酮类物质,医学临床试验表明具有清热解毒、消肿散结、祛风化痰、活血止痛的功效,可用于治疗小儿高热、扁桃体炎、肝炎及病毒性脑膜炎等多种疾病,也是抗肿瘤常用药物,其三叶青乙酸乙酯提取物为最有效的成分,它不但能减慢癌细胞的生长,而且对肝癌和血癌细胞株具有“促凋亡作用”,这一重要发现极大地推动了其在医学上的应用价值和前景,在国内已有少量三叶青药理、三叶青化学成分分析方面的研究报道。但三叶青野生资源已被狂采滥挖,已濒临灭绝,远远满足不了医学需求,作者拟通过对三叶青开展组培快繁技术研究,起到保护已濒临灭绝的三叶青野生资源和提供医药原材料,这项研究在国内外尚未见报道。

1 试验材料与方法

1.1 试验材料

以三叶青腋芽、试管不定芽为试验材料

1.2 试验方法

1.2.1 腋芽诱导 将经0.1%升汞消毒后的带茎段的单个腋芽接种于1/2MS培养基附加6个不同6-BA浓度处理的培养基上,每个处理30瓶,每瓶接种1个外植体,分别置于23 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 和8 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光照强度下培养,25 d左右统计腋芽萌发率。

1.2.2 不定芽继代增殖 将带有三张叶片的不定芽接种到外加4种不同浓度的6-BA的培养基上,每个处理10瓶,每瓶接种3株不定芽,置25℃左右温度、46 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光照强度下培养,培养35 d统计增殖系数,筛选单因素的适宜处理浓度;然后将筛选出的6-BA的适宜处理浓度与4种不同浓度的NAA进行组合处理,试验设8个处理组合,2次重复,每个处理组合10瓶,每瓶接种3株不定芽,置25℃左右温度、46 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光照强度下培养,培养35 d统计增殖系数,最终筛选出两种激素组合的适宜处理浓度,确定三叶青不定芽继代增殖培养基配方。

1.2.3 不定芽生根 将带有三张叶片的不定芽在节间分节处切断接种到生根培养基上,置25℃左右温度、46 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光照强度下培养,统计生根率。

2 试验结果与分析

2.1 不同6-BA浓度处理对三叶青腋芽萌发的影响

由表1可见:在6个处理中,培养25 d后,处理1~5中腋芽萌发率均极显著高于处理6,前5个处理中腋芽平均萌发率最高可达到92%,即当6-BA浓度从0.03 mg/l逐渐上升至0.5 mg/l,各处理腋芽萌发率之间不存在显著差异,但当6-BA浓度达到1 mg/l,腋芽萌发率呈急剧下降,与前5个处理之间腋芽萌发率最大差值达到35.75%,所以1/2MS + BA 0.03~0.5 mg/l可作为三叶青腋芽萌发培养基

作者简介:钱丽华(1975-),女,浙江淳安人,农艺师,多年从植物生物技术研究。

Tel:0571-87311794;E-mail:menoyqlh@hotmail.com

钱丽华:药用植物“三叶青”的组培快繁技术研究

配方。

2.2 不同光照强度对三叶青腋芽萌发的影响

23 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 下三叶青腋芽的萌发率明显高于 8 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 腋芽萌发率最高达到 100%, 而 8 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 下三叶青腋芽萌发率最高为 84.62%, 两者相差 15.38%。因此可认为适宜的光照强度即 23 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 更有利于三叶青腋芽的萌发(详见表 1)。

表 1 不同 6-BA 浓度处理及光照强度对三叶青腋芽萌发的影响

处理 编号	6-BA /(mg/l)	萌发率/%		平均萌发率 /%	
		光照强度($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)			
		23	8		
1	0.03	91.67	80	86.36 a	A
2	0.05	100	84.62	92 a	A
3	0.1	81.82	75	78.26 a	A
4	0.2	100	78.57	89.29 a	A
5	0.5	83.33	81.82	82.61 a	A
6	1.0	57.14	55.56	56.25 b	B

2.3 6-BA 不同浓度处理对三叶青不定芽继代增殖的影响

表 2 结果表明:在 6-BA 4 个不同浓度处理中, 以 6-BA 1.5 mg/l 和 2.0 mg/l 处理三叶青不定芽继代增殖最好, 平均增殖系数达到 3.125 和 4.135, 两者之间不存在显著差异, 但均显著优于 0.8 mg/l 和 1.0 mg/l 两处理, 不定芽增殖系数差值达到 1.21 ~ 2.22, 因此可选择在 MS 基本培养基 + 6-BA 1.5 mg/l 或 2.0 mg/l 基础上, 外加不同浓度 NAA, 进一步开展两种激素浓度组合对三叶青不定芽继代增殖的影响(详见表 2)。

表 2 6-BA 不同浓度处理对三叶青不定芽继代增殖的影响

处理 号	6-BA/ (mg/l)	不定芽增殖系数		平均值	差值
		I	II		
1	0.8	2.0	1.83	1.915b	A 0
2	1.0	1.7	2.33	2.015b	A +0.1
3	1.5	3.0	3.25	3.125ab	A +1.21
4	2.0	4.5	3.77	4.135a	A +2.22

2.4 6-BA 和 NAA 不同浓度处理组合对三叶青不定芽继代增殖的影响

表 3 结果表明:处理因素 A 即 6-BA 之间不存在显著差异, 这与表 2 结果一致; 处理因素 B 即 NAA 之间也不存在显著差异。在 8 个处理组合中, 以处理 2、处理 4 和处理 5 对三叶青不定芽继代增殖效果明显, 均显著优于其它 5 个处理组合, 不定芽增殖系

数为 3.68 ~ 5.455, 并极显著优于处理 3 和处理 6, 因此 MS + 6-BA 2.0 mg/l + NAA 0.2 mg/l 或 MS + 6-BA 2.0 mg/l + NAA 0.1 mg/l 或 MS + 6-BA 1.5 mg/l + NAA 0.05 mg/l 均可作为三叶青不定芽继代培养的培养基配方。

表 3 不同浓度 6-BA 与 NAA 组合处理对三叶青不定芽继代增殖的影响

处理 号	6-BA/ (mg/l)	NAA/ (mg/l)	不定芽增殖系数		平均值	
			I	II		
1	2.0	0.05	3.8	3.25	3.525 b	AB
2	2.0	0.1	3.63	4.33	3.98ab	AB
3	2.0	0.15	3.6	2.0	2.8 b	B
4	2.0	0.2	5.2	5.71	5.455a	A
5	1.5	0.05	4.06	3.3	3.68 ab	AB
6	1.5	0.1	3.0	3.5	3.25 b	B
7	1.5	0.15	3.13	3.21	3.17 b	B
8	1.5	0.2	3.0	2.2	2.6 b	B

2.5 三叶青不定芽生根

在试验中发现, 将不定芽接种到 1/2MS + 20 g/l 蔗糖 + NAA 0.2 mg/l, 10 ~ 15 d 不定芽生根率达到 98% 以上, 可作为三叶青不定芽生根配方。

3 小结与讨论

(1) 适当浓度的 6-BA 和合适的光照强度有利于三叶青腋芽的萌发, 当浓度超过 1.0 mg/l, 反而起到抑制作用, 导致萌发率呈下降趋势, 所以在三叶青组织培养中应控制适当的 6-BA 浓度, 6-BA 浓度不宜超过 1.0 mg/l, 并置于 23 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光照强度下进行培养, 有利于三叶青腋芽的萌发。

(2) 三叶青不定芽继代增殖将 6-BA 和 NAA 配合使用, 通过不定芽基部发生的愈伤上新生芽可达到增殖的目的, 虽然 MS + 6-BA 2.0 mg/l + NAA 0.2 mg/l 或 MS + 6-BA 2.0 mg/l + NAA 0.1 mg/l 或 MS + 6-BA 1.5 mg/l + NAA 0.05 mg/l 均达到较好的不定芽增殖效果, 但从增殖系数看, MS 外加单一激素 6-BA 2.0 mg/l 不定芽平均增殖系数也可达到 4.135, 因此我们认为 MS + 6-BA 2.0 mg/l + NAA 0.2 mg/l 或 MS 外加单一激素 6-BA 2.0 mg/l 可作为三叶青不定芽继代培养较适宜的培养基配方。

参考文献:

- [1] 刘世彪, 陶民, 姜业芳, 等. 五柱绞股蓝的组织培养和快速繁殖. 植物生理学通讯, 2007, 43(3): 308.
- [2] 凌征柱, 贾文流, 余丽莹, 等. 红大戟的组织培养及植株再生. 中草药, 2005, 36(10): 1555 - 1557.
- [3] 黄衡宇. 药用植物青叶胆的组织培养. 中草药, 2005, 36(2): 261 - 265.