

葛藤组织培养快速繁殖技术研究

郭军战¹ 张 葵¹ 李怀仓² 解周彭¹

(1 西北农林科技大学林学院 2 陕西省林业厅)

摘 要:通过对葛藤组织培养快繁技术进行研究,结果表明:初代采用带腋芽的茎段作为外植体,继代培养采用带愈伤组织的茎段作外植体,接种效果最好;消毒用70%酒精20 s + 0.1%氯化汞4 min,消毒效果最好,存活率能达到75%以上;用MS + BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L + 琼脂5.5 g/L + 蔗糖25 g/L的培养基诱导丛生芽分化,有较高的诱导率;生根培养基用MS + NAA 0.05 mg/L + 琼脂5.5 g/L + 蔗糖25 g/L能有效促进芽生根。

关键词:葛藤;组织培养;快速繁殖

葛藤(*Pueraria lobata*)又名葛,俗称野葛,属豆科蝶形花亚科葛属一种多年生落叶藤本植物。葛藤全身是宝,茎皮纤维可织葛布,也可作造纸原料^[1,2],叶片是优良的青饲料,可喂猪养兔等^[3-5],葛渣可作食用菌栽培,葛根辛甘性平,能鼓胃气,止咳退热,能治湿疹、伤寒等^[6],富含大量淀粉,同时还含有少量维生素和矿物质,可加工成保健食品和药膳食品,也可酿葛酒,葛花可制成葛花茶解酒功效神奇。对妇女产后的多种疾病有抑制作用,同时具有丰胸、美容效果^[7-9]。除此而外,葛藤极耐干旱瘠薄,茎蔓茂盛,根系多,坚固土壤,能有效防止径流和冲刷。可在山坡、陡壁、荒谷沙地上旺盛生长,具有很强的萌芽力,是世界各国极为重视的优良水土保持植物^[1,2,9,10]。总之,葛藤是一种集优良纤维、优良饲料、医疗保健、水土保持为一体的优良栽培植物,具有很大的发展前景与研究价值。但由于葛藤的生长习性以及受季节与气候的影响较大,收种困难而且其种子硬实率高,自然发芽率很低,限制了该种的种子扩繁速度,育苗效率低^[11,12],不能在生产中大量推广,而用组织培养快速繁殖苗木,不仅可以加速良种繁育,而且在离体培养条件下,个体小群体大,试验条件易于控制,不受时间和季节的限制,大大提高繁殖系数和工作效率,能在很大程度上保持母体的优良经济性状,具有重要的理论意义和市场前景。因此,本研究对葛藤组培快繁技术进行了全面系统的研究,以加快葛藤良种的推广和优良种苗的商业化生产。

1 材料与方法

1.1 试验材料

材料为葛藤1 a生的藤条。繁殖采用茎尖和带腋芽的茎段。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的选择

在葛藤1 a生的藤条上取长1~2 cm的茎尖的顶芽和带腋芽的茎段作为外植体。

1.2.2 外植体的表面消毒

为了减少外植体污染,在晴天的中午,采集材料并将其叶片剪去,剪成适宜大小,用流水冲洗2~3 h,冲去表面灰尘,然后将其泡在洗衣粉(去污粉)溶液中,用毛刷轻刷,再用自来水流水冲洗干净,转入无菌操作室备用。以氯化汞作消毒剂,设计消毒时间的不同序列(见表1),先以酒精消毒20~30 s,再用0.1%的氯化汞消毒4~8 min。

表1 初代培养消毒时间组合对比

70%酒精/s	0.1%氯化汞/min		
	4	6	8
20	I-1	I-2	I-3
30	I-4	I-5	I-6

1.2.3 初代培养

采集1 a生的葛藤茎段,经消毒接种在MS + BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L上,建立葛藤的无菌系。分别在不同月份(4月、5月、6月、8月和10月)采集葛藤的藤条进行接种试验,确定最佳取材季节;在同一天的不同时段(早9点、午3点和晚6点)分别取材接种,研究同一天最佳取材时间;分别用顶芽和带腋芽的茎段为外植体接种,以研究不同外植体对分化和污染率的影响。

1.2.4 分化培养

以初代培养获得的无菌芽为外植体,分别接种在

收稿日期:2006-08-28

修回日期:2006-09-15

基金项目:陕西省苗木繁育中心项目“林果新品种的引种与克隆”,企业资助的横向项目“葛藤优良无性系选育”。

第一作者简介:郭军战(1963-),男,副教授,博士生,主要从事林木新品种的选育与繁殖研究。

技术开发

不同 MS 附加不同激素组合(见表 2)的培养基中,观察和分析不同激素组合对葛藤芽分化的影响。

表 2 激素组合对比

BA/mg·L ⁻¹	NAA / mg·L ⁻¹		
	0.05	0.5	0.1
0.3	II - 1	II - 4	II - 10
0.5	II - 2	II - 5	II - 11
1.0	II - 3	II - 6	II - 12
1.5	-	II - 7	-
2.0	-	II - 8	-
3.0	-	II - 9	-

1.2.5 生根培养

选择生长健壮的无菌芽为接种外植体,诱导生根激素组合见表 3。

表 3 诱导生根激素组合

BA/mg·L ⁻¹	NAA/mg·L ⁻¹		
	0.02	0.05	0.1
0	III - 1	III - 2	III - 3
0.05	III - 4	III - 5	III - 6

以 MS + BA 0~0.05 mg/L + NAA 0.02 ~ 0.1 mg/L 为培养基,研究不同激素组合对葛藤生根的影响。

1.2.6 培养条件

培养温度在 26 ~ 28℃;每天光照 12 h(日光灯),光照强度 1 800 ~ 2 000 lx;室内要保持 70% ~ 80% 的相对湿度。

1.2.7 调查统计

初代培养 7 d 后,观察并记录污染率及成活率;无菌材料接种 28 d 后,统计芽增殖情况;生根培养结果在接种 28 d 后统计。

2 结果与分析

2.1 不同消毒方法对污染率的影响

由于外植体都带有苞片,考虑到其对消毒效果的影响,特在 MS + 0.3 mg/L BA + 0.1 mg/L NAA + 5.5 g/L 琼脂 + 25 g/L 蔗糖的培养基上试验。接种后 14 d 所得结果为:(1)先去苞片后消毒,总接种 11 瓶,污染 5 瓶,污染率 45.45%;(2)先消毒后去苞片,总接种 36 瓶,污染 25 瓶,污染率 69.44%。可以看出:先去苞片后消毒效果较好,污染率较低,避免因苞片的存在导致藏在苞片里的菌没被杀死。

2.2 不同消毒时间对污染率的影响

在 MS + 0.3 mg/L BA + 0.1 mg/L NAA + 5.5 g/L 琼脂 + 25 g/L 蔗糖的培养基上,分别接种经不同消毒时间灭菌的外植体,培养 7 d 后,观察污染率,结果见表 4。

表 4 消毒时间组合效果对比

消毒时间(70%酒精+0.1%氯化汞)	总接种瓶数/个	污染瓶数/个	褐变死亡数/个	存活数/个	存活率/%
20 s + 4 min	20	5	0	15	75
20 s + 6 min	20	6	4	10	50
20 s + 8 min	20	5	5	9	45
30 s + 4 min	20	6	4	10	50
30 s + 6 min	20	5	7	8	40
30 s + 8 min	20	4	9	7	35

从表 4 中可以看出:用 70% 酒精消毒 20 s,再用 0.1% 氯化汞消毒 4 min,消毒效果最好,存活率达到 75%,低于或高于这个组合都会导致污染率提高或死亡率增加。

2.3 不同取材时间对污染率的影响

分别在 4 月、5 月、6 月、8 月、10 月采集外植体进行初代培养,观察结果为 4 月份采外植体较好。另外又分别在晴天与阴天的早晨、中午、傍晚 3 个不同时间采取幼嫩葛藤为外植体,接种于 MS + BA 0.3 mg/L + NAA 0.1 mg/L + 琼脂 5.5 g/L + 蔗糖 25 g/L 的培养基上,观察其污染率,得出晴天取材比阴天取材的污染率低,而一天当中中午取材污染率最低。所以最佳取材时间为 4 月晴天的中午。

2.4 不同接种材料对芽分化的影响

2.4.1 初代培养时不同外植体的影响

在初代培养时,取同一植株上的带腋芽的茎段和茎尖上的顶芽,一起消毒,接入相同的培养基上,在相同条件下培养。结果表明,顶芽接入后常常发黑而死,但污染率较低,茎段生长较好。可见顶芽由于太幼嫩,消毒时间难于掌握,稍短易污染,稍长又易被消毒剂杀死。所以初代时采用带腋芽的茎段做外植体较好。

2.4.2 继代培养时接入不同材料的影响

在继代培养时接入不同材料,生长分化情况就不同。继代培养时接入不同材料对生长分化情况的影响,总接种瓶数均为 30 瓶,试验 14 d 后结果为:接入茎段的,愈伤组织较小,分化 2 个芽,生长迟缓;接入愈伤组织的,愈伤组织生长较好,但不分化;接入茎 + 愈伤组织的,平均分化 5 个芽。可以看出:继代时接入带愈伤组织的茎段分化较好。仅接入茎段则生长迟缓,而仅接入愈伤组织则导致愈伤组织生长很好却不分化。所以继代时接入带愈伤组织的茎段最好。

2.5 不同激素组合对芽分化的影响

以 MS 为基本培养基,附加不同激素浓度组合的 BA 与 NAA,接种无菌芽 28 d 后,观察芽分化情况,

结果见表5。

表5 不同激素组合对芽分化的影响

试验号	培养基/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	平均丛生芽数	生长情况
II-1	MS+0.3 BA+0.05 NAA	3	生长缓
II-2	MS+0.5 BA+0.05 NAA	3	生长缓
II-3	MS+1.0 BA+0.05 NAA	4	生长较缓
II-4	MS+0.3 BA+0.1 NAA	4	生长较缓
II-5	MS+0.5 BA+0.1 NAA	6	芽生长势较强
II-6	MS+1.0 BA+0.1 NAA	8	芽生长势强
II-7	MS+1.5 BA+0.1 NAA	5	愈伤组织较大
II-8	MS+2.0 BA+0.1 NAA	3	愈伤组织直径大于1cm
II-9	MS+3.0 BA+0.1 NAA	3	愈伤组织直径大于2cm
II-10	MS+0.3 BA+0.5 NAA	4	生长缓
II-11	MS+0.5 BA+0.5 NAA	4	芽生长良好
II-12	MS+1.0 BA+0.5 NAA	6	芽生长良好

从表5可以看出,不同激素组合对芽诱导效果不同,细胞分裂素和生长素分别影响细胞质和细胞核的分裂,从而影响嫩芽的生长与分化。因此,对于嫩芽的生长与分化,细胞分裂素和生长素均为重要因子。二者适当配合提高了嫩芽的数量和质量,是因为NAA保持浓度(0.1 mg/L)不变,随BA浓度增大,刚开始时芽的增殖数随浓度增加而增加,当BA浓度超过1.0 mg/L后,随BA浓度增大愈伤组织形成过快而影响芽的分化;BA浓度不变,加入不同浓度NAA可以比较得出加入NAA适宜浓度为0.1 mg/L。从表5的分析可以得出诱导芽分化的最佳浓度组合为1.0 mg/L BA+0.1 mg/L NAA。

2.6 不同激素组合对生根率的影响

选择生长健壮、高度2 cm以上的无菌芽,接种在MS+琼脂5.5 g/L+蔗糖25 g/L+不同激素组合的培养基中,培养28 d后,观察统计生根情况,结果见表6。

表6 不同激素组合对生根率的影响

激素组合	附加成分/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	接种数/个	生根数/个	生根条数/条	生根率/%
S1	NAA 0.02	20	16	3	80
S2	NAA 0.05	17	16	5	94
S3	NAA 0.10	20	15	3	75
S4	NAA 0.02+BA 0.05	18	13	3	72
S5	NAA 0.05+BA 0.05	19	13	4	68
S6	NAA 0.1+BA 0.05	20	12	3	60

根据表6可以看出,NAA的浓度对生根的影响较大,而BA的影响较小。随生长素浓度的增加,生根率逐渐降低,这主要是由于附加的生长素使基部愈伤组织增生造成。浓度越高,基部愈伤组织越大,长出的根越短,而其中最佳激素组合为NAA 0.05 mg/L。同时添加BA容易导致基部愈伤化。

3 结语

(1)最佳的取材时间是4月晴天的中午;以带腋芽的茎段作为最佳接种外植体;外植体先去苞片后消毒效果较好;最佳消毒方案为70%酒精20 s+0.1%氯化汞4 min。

(2)初代培养基为MS+BA 0.3 mg/L+NAA 0.1 mg/L。

(3)继代增殖培养时接入带愈伤组织的茎段对芽分化最好;最好的分化培养基为MS+BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L。

(4)生根培养的最佳培养基为:MS+NAA 0.05 mg/L,生根率达94%,而且根系发达。

参考文献

- [1]丁艳芳.葛藤的价值及其开发前景[J].西北林学院学报,2003,18(3):86-89.
- [2]毛富春,赵伯善.野生植物葛藤的研究利用现状及其开发前景[J].西北林学院学报,1995,10(3):88-92.
- [3]朱邦长,何胜江,张川黔,等.贵州天然豆科牧草——云南葛藤的引种驯化[J].四川草原,1996(2):19-22.
- [4]赖志强,莫琼才,李邦君,等.葛叶——一种优质的畜牧饲料[J].广西畜牧兽医,2005,21(1):14-15.
- [5]朱五星.大别山区具有开发前途的饲用植物——葛藤[J].中国草地,1996(6):68.
- [6]顾志平,陈碧珠,冯瑞芝,等.中药葛根及其同属植物的资源利用和评价[J].药学学报,1996,31(5):387-393.
- [7]刘义鹏,宛晓春.葛根资源的开发与利用[J].中国林副特产,1998,5(2):40.
- [8]朱永言.葛藤[J].湖南农业,1998(2):10.
- [9]孙振元.葛藤及其开发利用[J].林业科技管理,2001(3):41-43.
- [10]杨吉华.葛藤保持水土效益的研究[J].山东林业科技,1990(4):37-40.
- [11]刘建林.葛藤的繁殖方法及其栽培技术[J].西昌农业高等专科学校学报,2003,17(4):25-26.
- [12]岑秀芬,庞冬辉.葛根の利用价值及栽培[J].广西农业科学,1994(5):209-210.
- [13]颜昌敬.植物组织培养手册[M].上海:上海科学技术出版社,1990.

(通讯地址:712100,陕西省杨凌区邠城路3号)

