

蔓性千斤拔组织培养中种子灭菌和芽增殖的研究

刘芳¹, 韦鹏霄¹, 岑秀芬¹, 黄浩^{2*}, 余丽莹² (1. 广西大学农学院, 广西南宁 530005; 2. 广西药用植物园, 广西南宁 530023)

摘要 [目的]研究蔓性千斤拔组织培养中种子灭菌的方法, 筛选适宜芽增殖的外植体及激素组合。[方法]用乙醇、次氯酸钠和升汞的不同组合对种子进行灭菌, 然后比较顶芽和带腋芽的茎段作为外植体进行继代增殖的效果, 探讨不同激素组合对芽增殖的影响。[结果]较好的种子灭菌方法为: 75% 乙醇 30 s + 10% NaClO 10 min + 0.1% HgCl₂ 5 min; 带腋芽的茎段为较好的继代增殖外植体。6-BA 对芽增殖有显著促进作用; KT 对芽的增殖效果不如 6-BA; 芽增殖的最佳激素组合为 6-BA 2.0 mg/L + IAA 0.1 mg/L, 增殖倍数为 6.74。[结论]获得了较好的种子灭菌方法, 筛选出适合继代增殖培养的外植体和激素组合, 为蔓性千斤拔组织培养的深入研究提供实验基础。

关键词 蔓性千斤拔; 组织培养; 种子灭菌; 芽增殖

中图分类号 S567.23⁹ 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)32-13981-03

Study on Seed Sterilization and Bud Proliferation in Tissue Culture of *Flemingia philippinensis* Merr. et Rolf

LIU Fang et al (College of Agronomy, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530005)

Abstract [Objective] The aim of this paper was to study the method of seed sterilization and to select the suitable explant and hormone combination for bud proliferation in tissue culture of *Flemingia philippinensis* Merr. et Rolf. [Method] Different combinations of ethanol, NaClO and HgCl₂ were used for seed sterilization, then the comparison between apical bud and stem with axillary buds as explant for subculture was conducted. Finally, the effects of different hormone combinations on bud proliferation were discussed. [Result] The better seed sterilization method of *F. philippinensis* was 75% ethanol 30 s + 10% NaClO 10 min + 0.1% HgCl₂ 5 min. The optimal explant for subculture and multiplication was stem with axillary buds. 6-BA had significant positive effect on bud proliferation of *F. philippinensis* while the effect of KT on bud proliferation was poorer than 6-BA. The optimum hormone combination for bud proliferation of *F. philippinensis* was 6-BA 2.0 mg/L + IAA 0.1 mg/L and proliferation multiple of buds achieved 6.74. [Conclusion] The seed sterilization method of *F. philippinensis* was established and the suitable explant and hormone combination for bud proliferation were screened, which offered the foundation of further study on tissue culture of *F. philippinensis*.

Key words *Flemingia philippinensis* Merr. et Rolf; Tissue culture; Seed sterilization; Bud proliferation

蔓性千斤拔 (*Flemingia philippinensis* Merr. et Rolf) 又名一条根、土黄芪、老鼠尾等, 属于多年生豆科蔓性千斤拔属的一种常用药用植物。以根入药, 为《中国药典》2005 年版收载^[1]。其味甘、微涩、性平。具有壮腰健肾、除风湿、活血通络、消痰解毒等功效。主治风湿骨痛、腰肌劳损、慢性肾炎、跌打损伤、痲肿、偏瘫、阳痿、妇女白带多等, 是妇科千金片、金鸡胶囊、金鸡冲剂、壮腰健肾丸等中成药的主要原料药^[2-4]。蔓性千斤拔主要分布在广西、贵州、湖南、湖北、广东、海南、福建、台湾等地。多生于较干旱的山坡、路旁灌丛或草丛中^[5]。由于分布稀疏, 生长缓慢, 在分布地不是优势种, 种子极易被害虫蛀食。加上近年来过度采挖, 野生资源日益减少, 市场已连续多年紧缺, 价格逐年攀升, 常常有价无市^[6]。为解决种源紧缺问题, 利用组织培养技术对蔓性千斤拔进行快速繁殖具有重要意义^[7]。笔者着重研究了蔓性千斤拔组织培养中种子灭菌和芽快速增殖的方法, 为蔓性千斤拔的进一步保存与开发利用提供组培快繁技术依据。

1 材料与方法

1.1 材料 蔓性千斤拔成熟种子, 由广西药用植物园保育中心提供。

1.2 方法

1.2.1 无菌苗的获得。将种子用自来水冲洗 30 min 后, 置于超净台上, 分别用浓度 75% 乙醇、10% NaClO 和 0.1% HgCl₂ 3 种灭菌剂设计了双因子和三因子共 5 个灭菌处理。灭菌后的种子用无菌水冲洗 5 次, 放入无菌水中吸胀 6 h, 然

后用无菌滤纸吸干水分后接种到无激素的 MS 培养基上获取无菌苗。每个处理 12 瓶, 每瓶接种 5 粒, 3 次重复。接种后 15 d 统计污染率, 30 d 统计发芽率。

1.2.2 继代增殖培养。

1.2.2.1 外植体的筛选。当无菌苗长至 3~4 cm, 分别剪取顶芽(长约 1.5 cm)或带 1 个腋芽的茎段作为继代增殖培养的外植体, 接入 MS + 6-BA 2.0 mg/L 培养基中, 研究不同外植体对芽增殖的影响。

单激素试验:取无菌苗带腋芽的茎段接种。以 MS 为基本培养基, 分别附加不同浓度的 6-BA 和 KT, 设 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mg/L 5 个浓度梯度, 研究不同细胞分裂素种类及浓度对芽增殖的影响。

1.2.2.2 激素配组试验。取无菌苗带腋芽的茎段接种。以 MS 为基本培养基, 细胞分裂素选用 1.0、2.0 mg/L 6-BA, 生长素分别为 0.1 mg/L NAA、IBA 和 IAA, 共 6 个处理, 研究不同细胞分裂素和生长素配组对芽增殖的影响。

每个处理 12 瓶, 每瓶接种 6 个外植体, 3 次重复, 继代周期 25 d。

1.2.3 培养基处理及培养条件。培养基均附加蔗糖 30 g/L, 琼脂 5 g/L, pH 值调至 5.8, 121 °C 高压灭菌 20 min。培养室温度为 26~28 °C, 光照 1 500~1 800 lx, 光照 12 h/d。

1.2.4 统计方法。污染率(%) = (污染总数/接种总数) × 100; 发芽率(%) = (发芽种子数/接种种子总数) × 100; 芽增殖倍数 = 增殖芽总数/接种基本芽数。

2 结果与分析

2.1 不同灭菌处理对蔓性千斤拔种子灭菌效果的影响 由表 1 可见, 在双因子灭菌处理中, A₂ 和 A₃ 处理较 A₁ 的种子污染率低, 说明升汞的灭菌效果比次氯酸钠强。而 3 因子灭菌处理中, 即 75% 乙醇 + 10% NaClO + 0.1% HgCl₂ 组合(A₄

基金项目 广西大学博士启动基金项目(X061116)。

作者简介 刘芳(1975-), 女, 广西融安人, 博士, 助理研究员, 从事植物遗传育种和生物技术研究工作。* 通讯作者, E-mail: hmouse@163.com。

收稿日期 2008-09-09

和 A₅) 的灭菌效果最好。A₄ 处理的种子污染率仅为 1.1%，A₅ 处理的污染率为 0，与双因子灭菌处理的种子污染率达极显著差异。随着升汞灭菌时间的延长，对种子的毒害作用也增强，A₄ 处理的种子发芽率为 52.8%，而 A₅ 处理的则下降为 36.7%，两者的差异极显著。因此综合其污染率和发芽率，蔓性千斤拔较好的种子灭菌处理为 A₄，即 75% 乙醇 30 s + 10% NaClO 10 min + 0.1% HgCl₂ 5 min。

表 1 不同灭菌处理对蔓性千斤拔种子灭菌的影响

Table 1 Effect of different sterilizing treatments on seed sterilization of *Flemingia philippinensis* Merr. et Rolf

处理号	75% 乙醇	10% 次氯酸钠	0.1% 升汞	污染率//%	发芽率//%
Treatment code	75% ethanol s	10% NaClO min	0.1% HgCl ₂ min	Contamination rate	Germination rate
A ₁	30	10	0	48.3 a A	62.2 a A
A ₂	30	0	5	26.1 b B	52.2 b B
A ₃	30	0	10	20.0 c C	37.8 c C
A ₄	30	10	5	1.1 d D	52.8 b B
A ₅	30	10	10	0 d D	36.7 c C

注：同列不同大、小写字母分别表示在 0.01 和 0.05 水平的差异显著。下表同。

Note: The different lowercases and capital letters mean significant differences at 0.05 and 0.01 levels, respectively. The same as follows.

2.2 不同外植体对蔓性千斤拔芽增殖的影响 试验表明，芽增殖倍数受外植体影响较大。以顶芽为外植体，产生的芽较小、纤细，芽增殖倍数为 3.72，而以带腋芽的茎段为外植体，产生的芽较粗、健壮，芽增殖倍数为 5.31，两者的芽增殖倍数差异达到了极显著水平。因此适合用于继代增殖培养的外植体为带腋芽的茎段。

2.3 6-BA 对蔓性千斤拔芽增殖的影响 由表 2 可见，在 1~5 mg/L 的浓度范围内，6-BA 对芽的增殖有显著的促进作用，芽生成多，且苗粗叶绿，苗长势好。但不同浓度的 6-BA 对芽的增殖效果不同，在 1~2 mg/L 浓度时，随着 6-BA 浓度的升高，芽增殖倍数也升高，当 6-BA 浓度为 2 mg/L 时，芽增殖倍数达到最高值 5.31；之后随着 6-BA 浓度的升高，芽增殖倍数下降，芽也越来越纤细。邓肯新复极差分析显示，当 6-BA 浓度为 1~3 mg/L 时，芽增殖倍数与对照的相比差异极显著，是蔓性千斤拔继代增殖培养的适宜浓度范围。

表 2 6-BA 对芽增殖的影响

Table 2 Effects of 6-BA on bud proliferation of *Flemingia philippinensis* Merr. et Rolf

处理号	6-BA 浓度//mg/L	芽增殖倍数	生长状况
Treatment code	6-BA concentration	Proliferation multiple of buds	Growing condition
CK	0	1.89 d B	芽纤细，苗细叶黄
B ₁	1	4.84 ab A	芽健壮，苗壮叶绿
B ₂	2	5.31 a A	芽健壮，苗壮叶绿
B ₃	3	4.34 abc A	芽健壮，苗壮叶绿
B ₄	4	3.71 bc AB	芽纤细，苗壮叶绿
B ₅	5	3.46 c AB	芽纤细，苗壮叶绿

2.4 KT 对蔓性千斤拔芽增殖的影响 由表 3 可知，在 1~5 mg/L 的浓度范围内，KT 对芽的增殖有一定的影响。随着 KT 浓度的升高，芽增殖倍数也升高，至 3 mg/L 时，芽增殖倍

数达到最高值 3.01，之后，芽增殖倍数下降。总体来看，KT 对芽的增殖效果较 6-BA 差。除了 3 mg/L 外，其余各供试浓度的芽增殖倍数与对照的相比均未达极显著差异。而且，添加 KT 后产生的芽纤细，不如添加 6-BA 的芽健壮。

表 3 KT 对芽增殖的影响

Table 3 Effects of KT on bud proliferation of *Flemingia philippinensis* Merr. et Rolf

处理号	KT 浓度//mg/L	芽增殖倍数	生长状况
Treatment code	KT concentration	Proliferation multiple of buds	Growing condition
CK	0	1.89 b B	芽纤细，苗细叶黄
C ₁	1	2.63 ab AB	芽纤细，苗细叶黄
C ₂	2	2.85 a AB	芽纤细，苗细叶黄
C ₃	3	3.01 a A	芽纤细，苗壮叶绿
C ₄	4	2.81 a AB	芽纤细，苗壮叶绿
C ₅	5	2.46 ab AB	芽纤细，苗壮叶绿

2.5 激素组合对蔓性千斤拔芽增殖的影响 由表 4 可知，6-BA + NAA 组合(D₁ 和 D₂) 的芽增殖倍数与单独使用 6-BA (B₁ 和 B₂) 的相比没有显著差异，而且在 6-BA 基础上添加 NAA 后，导致芽基部愈伤化，影响了芽的分化和生长；6-BA + IBA 组合(D₃ 和 D₄) 的芽增殖倍数显著低于单独使用 6-BA (B₁ 和 B₂) 的，在 6-BA 基础上添加 IBA 后，芽变得纤细，叶片呈水渍透明状，出现玻璃化现象，可见，6-BA + IBA 组合不适宜用于蔓性千斤拔芽的增殖；而 6-BA + IAA 组合(D₅ 和 D₆) 对芽的增殖有极显著的促进作用，尤其是 D₆ 的芽增殖倍数极显著高于单独使用 6-BA (B₁ 和 B₂) 的，该处理获得的苗健壮、叶片鲜绿。根据各项指标进行综合分析，芽增殖的最佳激素组合为 6-BA 2.0 mg/L + IAA 0.1 mg/L。

表 4 激素配组对芽增殖的影响

Table 4 Effect of different hormone combinations on bud proliferation of *Flemingia philippinensis* Merr. et Rolf

处理号	激素种类及浓度//mg/L				芽增殖倍数	生长状况		
	Hormone category and concentration						Proliferation multiple of buds	Growing condition
	6-BA	NAA	IBA	IAA				
CK	0	0	0	0	1.84 e D	芽纤细，苗细叶黄		
B ₁	1.0	0	0	0	4.31 bc BC	芽健壮，苗壮叶绿		
B ₂	2.0	0	0	0	4.85 b B	芽健壮，苗壮叶绿		
D ₁	1.0	0.1	0	0	3.36 cd C	芽基部愈伤化，苗壮叶绿		
D ₂	2.0	0.1	0	0	3.98 b BC	芽基部愈伤化，苗壮叶绿		
D ₃	1.0	0	0.1	0	3.05 d (D)	芽纤细，苗玻璃化		
D ₄	2.0	0	0.1	0	3.56 cd BC	芽纤细，苗玻璃化		
D ₅	1.0	0	0	0.1	4.24 bc BC	芽健壮，苗壮叶绿		
D ₆	2.0	0	0	0.1	6.74 a A	芽健壮，苗壮叶绿		

3 讨论与结论

蔓性千斤拔植株嫩枝、顶芽、腋芽、叶片密被毛，消毒较困难，不易建立无菌培养材料，因此宜选用种子为外植体进行无菌苗的诱导。蒙爱东等的研究发现，蔓性千斤拔的种子经 0.1% HgCl₂ 浸泡 10 min 的一次消毒灭菌方法，灭菌效果较差，污染率为 26%，虽然再用 0.1% HgCl₂ 浸泡 5 min 的二次消毒灭菌方法可以使污染率降低到 2%，但是其种子发芽率只有一次消毒法(45.9%)的近一半，为 22.4%^[7]。在常用的灭菌剂中，升汞的灭菌效果最好，但必须较严格地掌握灭

菌时间,否则,植物材料易产生毒害或受到强烈抑制。次氯酸钠灭菌的彻底程度不如升汞,但是性质比较温和,对植物材料杀伤较轻^[8]。乙醇具有较强的穿透力,使菌体蛋白质脱水变性,同时它还具有较强的湿润作用,利于其他灭菌剂的渗入^[9]。因此该试验选用了75%乙醇、10% NaClO 和0.1% HgCl₂ 3种灭菌剂进行联合灭菌处理。研究表明,采用75%乙醇30 s + 10% NaClO 10 min + 0.1% HgCl₂ 5 min 的灭菌方法,既可以有效地控制种子污染,污染率仅为1.1%,又可以保持较高的种子发芽率52.8%,是蔓性千斤拔种子较好的灭菌方法。

对不同的外植体顶芽和带腋芽的茎段进行继代增殖培养,发现茎段芽增殖倍数高于顶芽的。这可能是由于顶芽的内源生长素浓度高于茎段,形成的顶端优势不易被打破,对侧芽的萌发产生了抑制作用,从而降低了芽增殖倍数。所以,蔓性千斤拔应采用带腋芽的茎段为外植体进行快速繁殖。

细胞分裂素的主要生理作用是促进细胞的分裂与扩大,促进芽的分化和侧芽的发育^[10]。因而是植物组织培养中用于芽形成和增殖的主要激素。该试验结果表明,6-BA 对蔓性千斤拔芽增殖有显著促进作用,而KT对芽的增殖效果不如6-BA。生长素在组织培养中的作用是诱导愈伤组织的产生,促进细胞伸长和茎尖(茎段)生根,并与细胞分裂素共同作用诱导不定芽分化及侧芽的萌发与生长^[9]。诱导分化和增殖阶段一般选用的生长素有萘乙酸(NAA)、吲哚丙酸(IBA)、吲哚乙酸(IAA),其作用强弱的顺序为 NAA ≥ IBA >

IAA。通常认为生长素和细胞分裂素的比值大时有利于根的形成,比值小时,则促进芽的形成。故应根据植物种类和培养的部位,选择适宜的激素种类和浓度配比,才能有效地控制器官的分化^[11]。该试验表明,6-BA 与 NAA 组合会导致蔓性千斤拔芽基部愈伤化,影响了芽的增殖;6-BA 与 IBA 组合生成的芽最少,而且芽纤细,苗玻璃化;6-BA 与生长素活力最弱的 IAA 配合,对蔓性千斤拔芽增殖效果最好,生成的芽健壮,苗长势好。蔓性千斤拔芽增殖的最佳激素组合为 6-BA 2.0 mg/L + IAA 0.1 mg/L。

参考文献

- [1] 中华人民共和国国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2005年版一部)[S]. 北京:化学工业出版社,2005:22.
- [2] 饶伟文,黄建楷,温志芳,等. 千斤拔的品种调查与质量研究[J]. 中草药,1999,30(3):219.
- [3] 广西壮族自治区卫生厅. 广西中药材标准(1990年版)[S]. 南宁:广西科学技术出版社,1992:297.
- [4] 张丽霞,彭建明,马浩. 千斤拔研究进展[J]. 中药材,2007,30(7):887-890.
- [5] 陈焕镛. 海南植物志(第8卷)[M]. 北京:科学出版社,1965:311.
- [6] 柯芳,施力军,马小军,等. 蔓性千斤拔引种栽培的研究[J]. 中国中药杂志,2007,32(2):143-144.
- [7] 蒙爱东,黄雪彦,黄美蓉. 蔓性千斤拔的组织培养和快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2005,41(5):640.
- [8] 程家胜. 植物组织培养与工厂化育苗技术[M]. 北京:金盾出版社,2003:51.
- [9] 陈世昌. 植物组织培养[M]. 重庆:重庆大学出版社,2006:29.
- [10] 郝建军,康宗利. 植物生理学[M]. 北京:化学工业出版社,2005:173-175.
- [11] 袁文达,曹致义. 植物组织培养实用技术[M]. 北京:高等教育出版社,1989:16-17.

(上接第13978页)

2.4.2 气孔观察.对变异植株叶片进行气孔观察,叶片表面粗糙,易碎,撕取下表皮较困难,气孔比对照组的大,排列较松散(图1-3、1-4)。

2.4.3 根尖染色体观察.分别取各处理的变异植株根尖进行染色体鉴定,结果表明:采用秋水仙素浸泡法、混培法及穿线法都可以获得一定频率的多倍体细胞,四倍体细胞的染色体数目为 $2n = 4x = 40$ (图1-5),而二倍体细胞的染色体数目为 $2n = 2x = 20$ (图1-6),有其他倍性的细胞存在,对照组中只有二倍体细胞存在。每个处理浓度随机统计180个分裂相细胞,统计四倍体的细胞个数并计算四倍体细胞诱导率。

3 结论与讨论

利用秋水仙素进行染色体加倍具有经济、方便、诱变作用专一性强的特点。近年来,在离体状态下,利用秋水仙素诱导染色体加倍的研究越来越多。不同材料对秋水仙素的敏感度不同。对同一种材料而言,秋水仙素浓度和处理时间对诱导染色体加倍至关重要。秋水仙素的浓度从0.03%~0.5%;处理时间6h~7d都有报道^[8]。一般认为,对具体材料而言,浓度高时,处理时间短;浓度低时,处理时间长。该试验中,秋水仙素处理红掌气生根再生团块时,浓度0.3%处理7h的组合最好,表明较高浓度较长时间的处理也可以得

到较高的诱导率。秋水仙素有剧毒,不仅伤害外植体,明显抑制不定芽的分化,还可以导致再生植株生长缓慢,毒害程度往往随着处理浓度的增加和处理时间的延长而加剧。试验结果表明,随着秋水仙素浓度的增加,再生团块死亡率加重。秋水仙素的浓度和处理时间共同影响外植体的成活率及诱导效果,高浓度长时间的处理可使多倍体的诱导率升高,同时死亡率也升高;而低浓度短时间的处理不易获得多倍体材料。

参考文献

- [1] 江如蓝,张施君,郑迎东,等. 红掌的组织培养与快速繁殖[J]. 仲恺农业技术学院学报,2003,15(4):49-53.
- [2] 朱饱卿,柴向华,李军,等. 红掌的花序培养及快速繁殖技术研究[J]. 中国农学通报,2004,20(4):223-224.
- [3] 肖三元,梁国平,杨焱,等. 红掌不同品种产生于愈伤组织的差异[J]. 热带农业科技,2005,28(2):7-9,33.
- [4] 丁爱萍,张艳春. 红掌组织培养研究[J]. 中国花卉园艺,2003(5):24-26.
- [5] 蔡能,易自立,黄丽芳. 安祖花离体培养快速繁殖技术的优化[J]. 中农林学院学报,2005,25(3):85-88.
- [6] 陈柏君,高山林,卞云云. 黄芩组织培养同源四倍体的诱导[J]. 植物资源与环境学报,2000,9(1):9-11.
- [7] 王桂兰,陈超,李朝霞,等. 红掌气生根根段再生快繁体系的建立[J]. 植物生理学通讯,2005,41(3):297-301.
- [8] 李贤,钟仲贤. 植物离体组织细胞染色体加倍技术在育种中的应用[J]. 上海农业学报,1998,14(3):99-101.