

西藏八角莲的组织培养条件筛选

兰小中¹ 李春燕² 鲍隆友¹

(1 西藏大学农牧学院动物科技系)

(2 西藏大学农牧学院资源环境系, 西藏 林芝 860000)

摘要:本文主要从消毒处理、激素比例、是否添加活性炭利组织培养材料选择4个方面进行西藏八角莲组织培养条件的筛选,最终筛选出:选用已经萌动的芽,消毒时采用70%酒精消毒1min后,再用0.1%升汞消毒2min左右,6-BA和NAA的比例控制在1.8/0.2,同时加入5S/L的活性炭为最佳培养条件。

关键词:西藏八角莲 组织培养 筛选

中图分类号:Q949.95

西藏八角莲(*Dysosmatsayuensis* Ying)别名八角盘、山荷叫、八角七、八角金盘、八两半、叶下珠。多年生草本,高50~90cm;根状茎粗壮,横生。茎高35~55cm,不分枝,无毛,基部被棕褐色大鳞片。茎生2叶,对生,纸质,圆形或近圆形,几为中心着生的质状,直径约30cm,叶两面被毛,上面尤密,叶缘密被毛;叶片5~7深裂,几达中部;裂片楔状矩圆形,长8~12cm,宽4~7cm,顶端锐尖,边缘有针刺状细齿;浆果椭圆形或卵形,2~4枚簇生于2叶相交处,长约3cm,红色,宿存柱头大而呈流梳状,果梗长3~8cm。花未见。果期7月,7~9月采挖。性温、味苦辛,有毒。西藏八角莲具有清热解毒、散结祛瘀、活血舒筋、祛风除湿、水肿止痛,治跌打损伤、劳伤、风湿痒痛、热毒疮、腰腿痛、毒蛇咬伤等功效,此外,由于西藏八角莲含有鬼臼毒素,对治疗肺癌、白血病以及其他的恶性肿瘤都有特殊疗效,尤其是通过近年来的研究发现,鬼臼毒素在治疗尖锐湿疣等方面还具有极为特殊的作用。随着研究的不断深入,人们对西藏八角莲的资源需求也逐渐加大,导致西藏八角莲目前处于令人十分担忧的濒危境地,因此,我们十分有必要通过组织培养的方式来获得西藏八角莲的无菌苗,既可以缓解西藏八角莲的资源压力,同时还可以为西藏八角莲的现代生物技术研究提供理论基础。

1 材料及方法

1.1 实验材料

西藏八角莲(*Dysosmatsayuensis* Ying)隶属小檗科

(*Berberidaceae*),鲜活外植体(已萌动芽、未萌动芽)取农牧学院自藏药材种植基地,该物种由鲍隆友副教授鉴定。

1.2 实验方法

1.2.1 外植体消毒。选取西藏八角莲未萌动芽、已萌动芽,洗净,用白米水冲洗较长时间(浸泡30min),在超净:工作台上分别用70%的乙醇、0.1%升汞进行消毒处理,用无菌水冲洗4~5次,放在无菌的培养皿中备用。

1.2.2 培养条件。培养温度为22~25℃,空气相对湿度为40%~60%,10~12h进行光照培养。基本培养基为MS,含糖量为25g/L~30g/L,琼脂为5g/L~6g/L, pH为5.8。

1.2.3 筛选方案。本文主要对消毒处理方法、激素配比、添加活性炭以及萌动芽利未萌动芽之间进行比较实验。消毒处理主要考虑酒精和升汞的不同作用;激素配比主要是6-BA与NAA的比例分别为1.8/0.2(0号培养基)、1.8/0.6(1号)、2.0/0.6(2号);活性炭实验主要针对1号和2号培养基进行;萌动芽和未萌动芽之间的比较实验在相同处理方法的条件下进行。具体方案见结果部分。

2 结果与分析

2.1 不同消毒处理对萌动芽无菌苗诱导的影响

在组织培养中,对无菌苗获得必须对材料进行消毒处理,消毒时间的确定要根据不同的外植体而定。如果处理时间太长,就会杀死外植体组织;但如果时间

太短,就达不到彻底灭菌的效果。因此,灭菌时间的选择是极其重要的,它将直接关系到培养成功与否。实验说明,合适的灭菌时间,不仅污染率低,生长也良好,见表1。

表1 不同灭菌处理对萌动芽无菌苗的诱导

处理酒精(min)	升汞(min)	接种数(个)	污染率(%)	褐变率(%)
1	1	2	50	40
2	1	3	50	36
3	1	4	50	28
4	2	1	50	80
5	3	1	50	50
6	4	1	50	30

从表1看出,每个处理水平都有不同程度的褐变,只是不同的消毒处理出现褐变的程度并不一样,培养材料一旦出现褐变,最终将会导致植株的死亡。从表中还可以看出在相同的酒精处理时间上,升汞处理时间以2min效果最佳,其褐变率仅为26%,但污染率相对较高,达到40%;而在相同的升汞处理时间上,酒精处理时间以4min的污染率相对较低(30%),但褐变率却很高(98%)。因此,在西藏八角莲的消毒处理时,最好用70%的酒精消毒1min,然后用0.1%的升汞消毒2min最好。

2.2 培养基激素对比对未萌动芽无菌苗诱导的影响

植物组织培养成功与否,一方面取决于培养材料本身的性质,另一方面取决于培养基的种类和成分,不同的植物材料对培养基及其种类的要求不同。因此,必须根据不同的植物材料来选择合适的培养基。经实验发现,激素配比不同对植物的无菌苗诱导有很大的差异,实验结果见表2。

表2 培养基激素对比对萌动芽无菌苗的诱导影响

培养基	接种数(个)	褐变率(%)	分化率(%)
0	50	0	90
1	50	32	70
2	50	78	54

通过表2表明,在3种不同的培养基中由于加入的6-BA和NAA的比例不同,从而导致实验结果出现明显的差异,其中以0号培养基为最佳培养基,6-BA和NAA的比例为1.8/0.2,其他两种培养基由于激素比例发生了变化,使得西藏八角莲外植体的分化率出现极大差异,0号培养基分化最为明显,效果最佳。

2.3 添加活性炭对西藏八角莲外植体诱导的影响

因为西藏八角莲其次生代谢产物中含有鬼臼毒素,鬼臼毒素具有很强的毒性,为了防止西藏八角莲分泌出鬼臼毒素而发生褐变将植株杀死,本实验采取在培养基中添加活性炭以吸附其分泌出的鬼臼毒素,降低植株死亡率,延长其生命周期,见表3。

表3 添加活性炭对西藏八角莲外植体诱导的影响

培养基	接种数(个)	分化率(%)	褐变率(%)
1	50	30	35
1+活性炭	50	20	10
2	50	25	72
2+活性炭	50	15	40

从表3中可以看出,在无菌苗诱导过程中,遇到了不同程度的褐变现象,添加活性炭可以吸附鬼臼毒素,同时减小了外植体在培养过程中的褐变率。虽然减小褐化可以延长外植体的生长周期,但不能抑制其分泌。因此,为了进一步降低褐变率,在实验过程中还发现,每隔10天更换一次培养基,也是一种很好地解决办法。

2.4 对不同外植体诱导的分化情况

在上述的研究中发现,制约西藏八角莲外植体生K的关键因子是实验材料发生了褐变现象,针对这一问题,我们对实验材料进行了对比实验,结果见表4。

表4 对不同外植体诱导的分化情况

外植体	升汞处理(min)	接种数(个)	萌动时间(d)	分化率(%)
已萌动芽	10	50	6	80
未萌动芽	10	50	10	10

结果表明,升汞处理10min(此处没有用酒精消毒),已萌动芽分化率较高(80%),且生长较好,但未萌动芽的分化率则很低(10%),所以,在进行西藏八角莲的外植体诱导培养时最好选用萌动芽。

3 讨论

植物组织培养受多种因素的影响,每种植物都有它自身的生长条件和营养需求,所以在进行植物组织培养时要筛选合理的培养方案,以便提高组织培养的效率,药用植物由于在培养过程中会产生一些次生代谢产物,其组织培养的难度更大。通过我们的不同消毒处理来看,酒精消毒的时间延长会导致外植体的褐变率增加,但时间缩短又会由于消毒不彻底而致使污染率增加,这主要是应为酒精对鲜活组织有一定的刺激作用,甚至破坏外植体组织,但我们不能一味的使用升汞进行消毒,因为升汞对环境的污染严重,我们可以

将二者结合使用,同时还可以采用 NaClO 进行消毒处理,同样可以取得很好的效果。

培养基中激素的比例不同,通常会使得外植体发生分化的效果产生极大的差异,这主要因为每种激素在外植体生长的过程所起的作用各不相同,有的是诱导根分化,有的是诱导芽分化,所以在进行外植体诱导时,我们要根据实验目的选择不同的激素比例。

加入活性炭主要起到吸附的作用,它并不会对外植体的生长产生直接的积极作用,它可以通过吸附培养基中的分泌物产生间接的作用。

已经萌动的芽进行诱导时其分化率明显高于未萌动的芽,主要是因为萌动芽的生理活性明显要高于未萌动的芽,并且萌动芽生活力旺盛分生能力强,因此,在进行组织培养时最好选用已经萌动的芽。

综上所述,通过我们的实验证明:在进行西藏八角莲的组织培养时,材料最好选用已经萌动的芽,消毒时

采用 70%酒精消毒 1min 后,再用 0.1%升汞消毒 2min 左右,6-BA 利 NAA 的比例控制在 1.8/0.2,同时加入 5g/L 的活性炭为最佳培养条件。

参考文献

- [1] 西藏自治区革命委员会卫生局,西藏军区后勤部卫生处编.《西藏常用中草药》.西藏人民出版社,1973
- [2] 谢启昆主编.《药用植物组织培养》.上海科学技术出版社,1986
- [3] W. 巴尔茨, E. 赖因哈德, M.H. 岑克主编, 夏镇澳等译.《植物组织培养及其在生物技术上的应用》.科学技术出版社,1983
- [4] Heyenga AG, Lucas JA, Dewick PM(1990) Production of tumourinhibitory lignans by callus cultures of Podophyl-lumhexandrum. Plant Cell Rep. 9:382 ~ 385

编校 陈莎莎

.....

(上接 51 页)

3.2 加强鼠害防治队伍建设

西藏牧区由于缺乏相应专业的草原保护人才和各级技术人员,因此举办各级各类培训班,对技术人员进行培训,增强对鼠害的认识,提高防治技术水平,逐步建立一支整体素质较高的草原保护和建设队伍。

3.3 合理、正确使用化学农药

在采用化学毒饵灭鼠时,根据具体情况,选择氟敌鼠钠盐等高效低毒的农药,尽量减少其使用量和使用面积。结合生态、C 型肉毒素等生物防治措施,预防二次中毒,保护和利用现有天敌。

3.4 制定灭鼠规划,走综合防治之路

各级政府应提前计划和统筹,调拨药品和灭鼠工具等物资,安排好人员。组织牧户、牧民,有组织、有纪律、统一进行灭鼠活动。可以同时采用化学灭鼠和物理灭鼠法,结合生物灭鼠法进行综合防治。适合当地的物理法是水淹法。利用当地比较充足的水源条件,在春季或夏季进行草地大面积漫灌,对灭杀高原鼠兔有较好的效果。或以 C 型肉毒梭菌毒素为毒饵,以青稞、胡萝卜为诱饵,在 4~5 月进行生物灭鼠,有同样好的效果。

3.5 改良草地

利用草原上的小溪和河流,建议在溪流的不同部位修建水闸,建设必要的灌水设施,疏通河道,利用草地天然的坡度,截水灌溉。或建立科学合理的放牧制度,给草地休养生息的机会。促进植被恢复过程,提高草地盖度,破坏高原鼠兔生境。同时,适当补播适应当地的禾本科植物,如早熟禾属的早熟禾 SP、藏北早熟禾和冷地早熟禾等,羊茅属的弱须羊茅和羊茅 SP. 等,对改良草地、恢复植被、消灭鼠害,具有重要的意义。

参考文献

- [1] 甘肃农业大学. 草原保护学(草原动物学)[M]. 北京:中国农业出版社,1999.95~96
- [2] 西藏自治区土地管理局. 西藏自治区畜牧局. 西藏自治区草地资源[M]. 北京:科学出版社,1994.35~55
- [3] 赵登科,梁卫国. 新疆塔城地区草地鼠害及其防治对策[J]. 草原与草坪,2002,2(4):13~14
- [4] 魏学红. 西藏林芝松多镇围栏草地草原鼠兔鼠害调查及防治. 草业科[J]. 2003,121(08):48~49

编校 陈莎莎