

千年健的组织培养与快速繁殖技术

石云平^{1,2} 李利锋¹ 杨美纯¹ 李 锋² 黎颖菁¹ 覃剑峰¹

(¹广西大学, 南宁 530005; ²广西植物研究所)

摘要: 以千年健带腋芽的茎段为外植体, 以 MS 为基本培养基, 附加不同激素浓度进行培养。结果: 千年健带腋芽茎段以 MS+6-BA1.5 mg·L⁻¹ 为初代诱导培养基比较好; 诱导丛生芽的增殖培养基以 MS+6-BA1.5 mg·L⁻¹+NAA0.1 mg·L⁻¹ 较适合, 增殖系数达 5.3; 生根诱导较好的培养基为 MS+6-BA0.05 mg·L⁻¹+IBA0.1 mg·L⁻¹+NAA0.1 mg·L⁻¹。

关键词: 千年健 组织培养 药用植物

千年健 [*Homalomena occulta* (Lour.) Schott] 别名一包针、团芋、香芋等, 为天南星科千年健属多年生草本植物, 主要分布于广西、海南和云南等热带地区^[1]。千年健含有挥发油^[2], 倍半萜类^[3]、甘油酯及其苷类等多种有效化学成分。据统计, 以千年健为原料的中成药产品达 20 多种, 全国千年健年需要量约为 150~200 t, 而分布在西南各省的野生资源蕴藏量约为 340 t, 在《一九九二年进口南药生产统计表》中, 全国栽培千年健仅留存 3335 m²^[4]。由于过度采挖, 导致了千年健野生资源的不断减少。而千年健常规的种子繁殖和无性繁殖系数低, 速度慢, 因此必须进行千年健的人工栽培。本研究以千年健的茎段为材料进行组培快繁, 为工厂化育苗和大规模人工栽培提供技术和参考依据。

1 材料与方 法

1.1 材料和培养条件

广西药用植物园无病虫害千年健植株的带腋芽茎段。

基本培养基为 MS, 附加 3% 蔗糖, 0.5% 琼脂, 按不同处理方案添加 α -萘乙酸 (NAA)、吲哚丁酸 (IBA) 和 6-苄基腺嘌呤 (6-BA), pH 值为 6.0, 高压 (121 ℃) 灭菌 20 min, 接种后置于温度为 27 ± 1 ℃, 光照强度为 1500 lx, 光照时间 12 h/d 培养

室中培养。

1.2 灭菌试验

取千年健带腋芽的茎段, 自来水冲洗表面污物, 洗衣粉溶液浸泡 20 min, 自来水冲洗 60 min, 无菌水清洗后, 放入超净工作台中, 用 75% 酒精浸泡 30 s 后再用 0.1% 升汞 (HgCl₂) 溶液进行灭菌, 灭菌时间设 3 min、5 min、7 min、9 min、11 min 5 个处理, 无菌水冲洗 5~6 次。切取长约 1 cm 带腋芽的茎段, 接种到 MS 培养基上, 每个处理接种 15 个外植体, 重复 3 次。7 d 后对污染外植体数进行统计, 污染率 = 污染的外植体数/接种的外植体数 × 100%, 筛选出较适宜的灭菌时间。

1.3 初代诱导培养

将千年健茎段用较适宜的灭菌时间处理后, 接入初代诱导培养基中, 每个处理接种 9 个外植体, 重复 3 次。50 d 后统计萌芽的外植体数: 萌芽率 = 萌芽的外植体数/接种的外植体数 × 100%。

1.4 继代增殖培养

把初代培养中获得的无菌芽切下, 接种于增殖培养基上进行丛生芽诱导, 每个处理接种 9 个芽, 重复 3 次。40 d 后统计有效芽数, 按下式计算增殖系数: 增殖系数 = 增殖后有效芽数/接种芽数。

1.5 生根培养

将继代增殖培养基上获得的丛生芽切分成单芽,

作者简介: 石云平, 女, 广西桂林人, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 作物细胞工程与生物技术。

通讯作者: 杨美纯

收稿日期: 2008-01-31

接种于生根培养基上进行生根诱导,每个处理接种9个芽,重复3次。40 d后统计生根数、根长,并观察苗长势。

1.6 假植

当组培苗有10条根以上时,即可移出培养室,在室内炼苗3 d,洗净粘附在根部的培养基后,分别移入河沙、50%河沙+50%泥土、珍珠岩+泥炭3种基质中,每种基质种苗10株,重复3次。20 d后统计成活苗数,筛选出较适合千年健组培苗的假植基质。

2 结果与分析

2.1 灭菌时间对灭菌效果的影响

从表1可以看出,千年健茎段污染率随着灭菌时间增长而下降。在灭菌时间为11 min时,污染率最低,仅为7.6%,但部分外植体出现变黄甚至死亡现象。因此,外植体适宜的灭菌时间为9 min。

表1 灭菌时间对灭菌效果的影响

灭菌时间 (min)	污染数 (个)	污染率 (%)
3	15	100
5	9.7	64.7
7	5.3	35.1
9	3.2	21.3
11	1.1	7.6

2.2 初代诱导培养

将灭菌过的外植体接种到初代诱导培养基上培养,15 d后在茎节部位出现一些白色的突起,20 d后白色突起渐渐变绿长大,最后形成芽。50 d后的萌芽率及芽的长势见表2。在所设置的几种培养基上均能使千年健的茎段诱导出芽。在不加6-BA时,萌芽率仅为18.9%,芽长得较细,叶色青黄;当6-BA浓度从0.5 mg·L⁻¹增加到1.5 mg·L⁻¹时,萌芽率随着6-BA浓度的增加而增加,芽长得粗壮,叶色青绿;当6-BA浓度为1.5 mg·L⁻¹和1.8 mg·L⁻¹时,萌芽率都达100%,但1.5 mg·L⁻¹培养基中诱导出的芽比1.8 mg·L⁻¹的好,芽长得较粗壮,叶

色青绿;当6-BA浓度达2.0 mg·L⁻¹时,萌芽率反而下降,芽长得较纤细,叶色青黄。综合考虑萌芽率、芽的长势以及下一步继代增殖和保持原品种性状,初代诱导较佳培养基为MS+6-BA1.5 mg·L⁻¹。

表2 初代诱导培养基对外植体萌芽的影响

6-BA (mg·L ⁻¹)	萌芽数 (个)	萌芽率 (%)	芽的长势
0	1.7	18.9	一般
0.5	4.3	47.8	壮、好
0.8	5	55.6	较壮、好
1.2	6.7	74.4	较壮、好
1.5	9	100	较壮、较好
1.8	9	100	一般
2.0	5.3	58.9	纤细

2.3 继代增殖培养

把初代诱导获得的芽切分成单芽接入继代增殖培养基中培养,20 d开始形成丛生芽,40 d后统计芽数,计算增殖系数,并对各培养基上芽的生长状况进行观察,结果见表3。

6-BA浓度高低对千年健的增殖系数影响比较大。6-BA浓度从0 mg·L⁻¹增至1.5 mg·L⁻¹时,增殖系数随着6-BA浓度的增高而增大,芽长得壮,平均高度约为6.7 cm;6-BA浓度为1.5 mg·L⁻¹配合浓度为0.1 mg·L⁻¹的NAA组合时,增殖系数达5.3,芽长得比较壮,平均高度约为4.5 cm,叶色青绿;当6-BA浓度增加到2.0 mg·L⁻¹配合浓度为0.05 mg·L⁻¹的NAA组合时,增殖系数也达5.3,但芽长得较细,平均高度约为2.6 cm,叶色青黄。NAA与6-BA组合使用,有一定的壮苗作用。

继代培养以MS+6-BA1.5 mg·L⁻¹+NAA0.1 mg·L⁻¹培养基比较适合千年健增殖,增殖系数大,芽长得较粗壮。

2.4 生根培养

继代增殖培养基上获得的丛生芽长到3 cm高时切分成单芽接种到生根培养基上,40 d后观察生长素NAA与IBA对无茵苗生根的影响,统计根的数量和根长以及苗的生长状况,结果见表4。

表3 继代增殖培养基对丛生芽诱导的影响

6-BA ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	NAA ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	有效芽数(个)	增殖系数	芽长势
0	0	10	1.1	一般
0.5	0.05	24	2.7	好
0.5	0.1	20.3	2.3	好
1.0	0.05	37.7	4.2	好
1.0	0.1	41.7	4.6	好
1.5	0.05	45.7	5.1	较好
1.5	0.1	48	5.3	好
2.0	0.05	47.7	5.3	一般
2.0	0.1	44.3	4.9	较好

表4 生根培养基对无菌苗生根的影响

6-BA($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	NAA($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	IBA($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	生根数(条/株)	平均根长(cm)	苗的长势
0	0	0	5.4	2.1	一般
0.05	0.1	0	21.2	3.5	较好
0.05	0.2	0	24.5	4.3	较好
0.05	0	0.1	11.6	1.7	一般
0.05	0	0.2	9.5	1.2	一般
0.05	0.05	0.05	25.8	2.8	好
0.05	0.1	0.1	31.4	3.2	好

试管苗在生根培养基上均能长根,在NAA与6-BA配合使用的生根培养基上长的根比较细长,易断;而在IBA与6-BA配合使用的生根培养基上长的根短粗,不易断,但移栽时苗也不易成活,可能是由于根的木质化比较严重;在NAA、IBA与6-BA 3种激素配合使用的培养基上长的根粗细适当,长度适中,生根数多达31.4条/株,苗健壮,叶色青绿。因此,试管苗在MS培养基中添加NAA与IBA浓度均为 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、再添加适当浓度为 $0.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的6-BA的培养基生根比较好。

2.5 炼苗假植

千年健组培苗高为3~4 cm,有10条根时,即可按照1.7的方法进行炼苗移栽,栽好后用塑料薄膜遮盖保湿,7 d后揭去薄膜,20 d后统计并计算出河沙、50%河沙+50%泥土、珍珠岩+泥炭3种基质的成活率分别为:92.5%、75%、46.7%。

3 小结

升汞在灭菌的同时也对外植体有毒害作用,试验表明,用0.1%升汞溶液灭菌9 min较适宜。

不同激素浓度与组合对千年健的腋芽萌发、增殖培养及生根都有重要影响。试验表明,6-BA浓度为 $1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 比较好,腋芽萌芽率高,增殖系数大,芽壮。在诱导生根阶段,以 $\text{BA}0.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} + \text{NAA}0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} + \text{IBA}0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 效果比较好,苗的长势好,根数多,假植成活率高。

组培苗假植基质以河沙为好,成活率高达92.5%,可能是由于河沙的透气性比较好,利于根的生长发育。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 科学出版社, 1979, 13(2): 48-49.
- [2] 刘国声, 李乃文. 千年健挥发油成分研究(J). 药学通报, 1984, 19(12): 22.
- [3] 胡永美, 杨中林, 叶文才, 等. 千年健化学成分的研究(I)(J). 中国中药杂志, 2003, 28(4): 342-344.
- [4] 易建文. 试述千年健的产销及其发展前景(J). 中药材, 1993, 19(10): 37-39.