

苦参组培快繁技术体系的初步研究

程广有, 唐晓杰

(北华大学 林学院, 吉林吉林 132013)

摘要: 采用正交实验设计($L_9 3^4$)用 MS、White 和改良 MS 培养基, 分别加入不同质量浓度的玉米素(ZT)、6-苄基氨基腺嘌呤(6-BA)、异戊烯基腺嘌呤(2-ip)进行苦参组培快繁技术体系研究。结果表明, 以苦参种子萌发的幼苗为外植体效果较好。3 种基本培养基对诱导芽增殖效果差异不显著; 在基本培养基中分别加入 6-BA、2-ip 和 ZT 诱导芽增殖, 但 3 种细胞分裂素之间差异不显著。培养基中含 2 mg/L 6-BA(或 ZT 或 2ip)增殖效果最好, 其次是 3 mg/L 的细胞分裂素; 以改良 MS+2 mg/L 6-BA 是苦参较好的增殖培养基; 组培苗在 1/2 MS+1.5 mg/L IBA 培养基上根诱导效果最好(98%), 移栽到珍珠岩+蛭石基质(1:1)中成活率最高(96%)。

关键词: 苦参; 组织培养; 增殖; 移栽

中图分类号: Q813.1⁺2

文献标识码: A

Study on Tissue Culture and Rapid Propagation of *Sophora flavescens* Ait.

CHENG Guang-you, TANG Xiao-jie

(Forestry College, Beihua University, Jilin, Jilin 132013, China)

Abstract: The technology of tissue culture and rapidly propagation of *Sophora flavescens* Ait. was studied by orthogonal design($L_9 3^4$), in which there were 3 kinds of basal cultural medium (MS, White and modified MS), 3 kinds of cytokinin [zeatin (ZT), 6-benzyladenine 6-BA and isopentenylaminopurine (2-ip)] and 3 kinds of mass concentration (1, 2 and 3 mg/L). The results showed: there was no significant difference among 3 kinds of basal cultural medium on bud propagation. The buds grown better in modified MS than that in MS and White medium. The propagation number of the medium with 6-BA or 2-ip was more than ZT, although there was no significant difference among 3 kinds of cytokinin. The propagation number of buds was significant difference among 3 kinds of concentration of cytokinin. The most number of bud was in medium plus 2 mg/L cytokinin (18.64a), the better one was the medium plus 3 mg/L cytokinin (15.33a), the fewer one was 1 mg/L (8.29b). The preferential culture medium of propagation buds of *S. flavescens* was modified MS+2 mg/L 6-BA. It was easier to root from the buds, and more roots grew from callus. The good medium to induce root was 1/2 MS+1.5 mg/L IBA (98% rooted ratio). There was higher proportion of viability planted test-tube seedlings in the mixed substratum (perlite and vermiculite, 1:1), after soaking the seedlings 20 min in the solution of 1.2 g/L carbendazim.

Key words: *Sophora flavescens* Ait.; tissue culture; propagation; transplant

苦参(*Sophora flavescens* Ait.) 为豆科槐属植物, 中国内陆约有 12 种, 集中分布于北方沙漠地区。苦参的根是传统中药, 苦参主要的化学成分为苦参

碱及黄酮类化合物。苦参碱(matrine)具有抑制肿瘤细胞增殖和转移, 促进凋亡, 以及诱导肿瘤细胞分化等抗肿瘤的作用^[1-8]。苦参黄酮提取物在抗心律

失常,治疗糖尿病,杀虫抗菌,抗肿瘤方面均有良好效果,有较好的应用前景^[9]。此外,苦参又是良好的抗风沙、耐盐碱植物。

苦参野生资源越来越少,而市场需求越来越大,人工种植以播种繁殖为主,但种子发芽率低和遗传分化问题严重。利用植物组织培养技术,不仅可保留原有植株的优良性状,而且将优良单株快速繁殖成无性系,可在生产中推广。

目前,苦参组培快繁技术未见报道。本试验旨在筛选和确定苦参组培快繁过程中影响芽分化、增殖和生根的主要因素,以期为苦参种苗的组培快繁生产提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

初级培养时,选用种子、休眠芽、萌动芽为外植体。研究培养基和激素对苦参芽体增殖的影响时,外植体均为无菌苗的茎尖或茎段。

1.2 外植体的消毒

在超净工作台上用质量分数为 75% 的酒精先对用于初接种的外植体消毒 30 s,倒去酒精,用无菌水冲洗干净,再用质量分数为 0.1% 的 HgCl₂ 消毒 10 min,最后用无菌水冲洗 3~4 次,用于初代培养。

1.3 芽增殖培养正交试验设计

为探讨培养基种类、激素种类和激素浓度对芽增殖的影响,做了 3 因素 3 水平正交实验设计(L₉3⁴)(表 1)。9 次试验,各 50 瓶。

1.4 培养基及培养条件

培养基中蔗糖质量浓度均为 30 g/L,琼脂质量浓度为 9 g/L,培养基 pH 6.5,配制好的培养基在 1.05 MPa(121℃)条件下灭菌 20 min,灭菌后的培养基平放于工作台上,冷却备用。

将接种的培养材料放在培养室内培养架上培养。培养条件为温度 22~28℃,每日光照时间 10~12 h,光照强度 2 000~3 000 lx;在弱光(500~800 lx)条件下诱导不定根。

表 1 正交实验(L₉3⁴)设计及试验结果分析

Table 1 The orthogonal design(L₉3⁴) and results of cultural propagation

实验序号 Experimental number	培养基种类 Kind of medium	细胞分裂素种类 Kind of cytokinin	细胞分裂素质量浓度 Concentration of cytokinin(mg/L)	不定芽数量 Number of adventitious buds
1	MS	ZT	1.0	2.14(2~3)
2	MS	6-BA	2.0	6.71(4~8)
3	MS	2-ip	3.0	5.40(3~6)
4	White	ZT	2.0	5.67(3~6)
5	White	6-BA	3.0	5.25(3~4)
6	White	2-ip	1.0	2.46(2~5)
7	改良 MS Modified	ZT	3.0	4.68(2~6)
8	改良 MS Modified	6-BA	1.0	3.69(3~5)
9	改良 MS Modified	2-ip	2.0	6.26(4~7)
K ₁	14.25	12.49	8.29	Σ42.26
K ₂	13.38	15.65	18.64	
K ₃	14.63	14.12	15.33	
X ₁	4.75	4.16	2.76	
X ₂	4.46	5.22	6.21	
X ₃	4.88	4.71	5.11	
R	0.42	1.06	3.51	

注:改良 MS 为 MS+酵母提取物 100 mg/L+水解蛋白 100 mg/L + V_{B1} 100 mg/L。

Note: Modified MS is composed of MS+100 mg/L extracted matter from yeast+100 mg/L hydrolysis protein+100 mg/L V_{B1}.

1.5 试管苗生根及移栽

壮苗培养基为 MS+0.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L IBA;生根培养基为 1/2 MS+1.0 mg/L IBA、1/2 MS+1.5 mg/L IBA 和 1/2 MS;分别移栽到基质为珍珠岩+蛭石(1:1)、草炭土+珍珠岩(1:1)和草炭土+蛭石(1:1)上。

2 结果与分析

2.1 初接种外植体的筛选

以休眠芽、种子和萌动芽等材料为初接种外植体,在 MS 基本培养基上进行初代培养。培养 1 周后,休眠芽外表皮变褐、变黑;3 周后,接触培养基的

部位陆续形成愈伤组织。接种萌动芽时,生长较快,易形成愈伤组织,但芽增殖效果不佳。将种子种在 MS 培养基上,3 d 后陆续发芽,获得种胚苗,即无菌苗(图版 I, 1),生长迅速。将 3~4 cm 高的无菌苗剪掉根系,移栽到细胞分裂素含量不同的 MS 培养基上,无根苗基部很快形成愈伤组织,培养 4 周后,愈伤组织发生不定芽,同时无根苗长出侧芽(图版 I, 2)。表明由种子长出的幼苗是适宜的初接种外植体,在适宜的分化培养基上可以增殖。

2.2 培养基及激素对芽增殖的影响

由表 1 可见,不同基本培养基对诱导芽增殖效果差异不显著($F=1.172\ 7$)。不定芽或侧芽伸长生长在改良的 MS 培养基上表现较好,且芽苗粗壮。但试验中发现在 MS 培养基与 White 培养基上芽苗表现细弱、生长缓慢,说明酵母提取物、水解酪蛋白对苦参幼苗生长有促进作用。

正交实验结果表明,6-BA 和 2-ip 诱导芽体增殖的效果略好于 ZT,但 3 种不同的细胞分裂素,对诱导芽增殖的效果未达到显著差异($F=7.132\ 8$)。因此,批量生产组培苗时,从成本上考虑,建议采用 6-BA 诱导不定芽,既经济又可靠。

3 种细胞分裂素含量对芽增殖效果显著不同($F=79.059^*$),由表 1 可知,以质量浓度为 2 mg/L 细胞分裂素的增殖效果最好(18.64),其次是 3 mg/L (15.33),质量浓度为 1 mg/L 时芽增殖效果最差(8.29)。综合分析基本培养基、激素种类和用量,认为改良 MS+2 mg/L 6-BA 是苦参离体培养中芽增殖的适宜培养基组成。

2.3 试管苗壮苗与生根诱导

将增殖获得的不定芽或侧芽进行分割,接种在壮苗培养基上,经过 21 d 的培养,芽苗变得粗壮(图版 I, 3)。再将生长健壮的无根芽苗取出,接种在生根培养基上,培养 2 周时部分芽苗开始产生不定根,多为愈伤组织生根型(图版 I, 4)。培养 3 周时,无根苗在 1/2 MS+1.5 mg/L IBA 上生根率最高

(98%),且根系较发达,其次是 1/2 MS+1.0 mg/L IBA(73%),1/2 MS 的生根率最低(56%)。

2.4 试管苗移栽

待试管苗根长为 1.5 cm 左右时,用镊子将试管苗从培养瓶中轻轻取出(图版 I, 5),洗去粘附的培养基,勿伤苗体,浸入质量浓度为 1.2 g/L 的多菌灵水溶液中 20 min,然后进行移栽,浇透水。第 1 周温度控制在 25℃,空气相对湿度为 80%~90%;第 2 周温度为 23℃,空气相对湿度为 70%~80%;第 3 周温度为 18~20℃,空气相对湿度为 60%~70%。在移栽初期每周喷 1 次 1.2 g/L 多菌灵水溶液。移栽 3 周后,组培苗开始长出新叶,发出新根。这时便可以放在自然条件下正常管理。在 3 种基质中,以珍珠岩+蛭石成活率最高(96%;图版 I, 6),草炭土+珍珠岩成活率次之(60%),草炭土+蛭石成活率最低(38%)。

3 小 结

以苦参种子萌发的种胚苗去根后的无根苗为外植体,不定芽及侧芽增殖效果较好。MS、White 和改良 MS 等 3 种基本培养基对诱导芽增殖效果差异不显著($F=1.172\ 7$),但芽伸长生长在改良 MS 培养基上较好,且芽苗粗壮。质量浓度为 80 mg/L 酵母提取物、水解酪蛋白对幼苗生长有促进作用,这与程广有^[10]关于有机营养在植物组培过程中的作用结论相同。在基本培养基中分别添加 6-BA、2-ip 和 ZT 等 3 种不同的细胞分裂素,对诱导芽增殖效果差异不显著($F=7.132\ 8$)。但培养基中不同激素含量对芽增殖效果显著($F=79.059^*$),以质量浓度为 2 mg/L 细胞分裂素的增殖效果最好。综合分析养分条件、激素种类和用量,认为改良 MS+2 mg/L 6-BA 是苦参芽增殖的适宜培养基。

适宜生根培养基为 1/2 MS+1.5 mg/L IBA,根诱导率可达 98%,且根系较发达。试管苗在珍珠岩+蛭石(1:1)基质中移栽成活率最高可达 96%。

参考文献:

- [1] JIN Y SH(金艳书),WU X M(吴学敏),LOU J L(娄金丽). Effects of matrine on cell proliferation, cell cycle and apoptosis of human hepatocarcinoma cells[J]. *Chinese Journal of Clinical Rehabilitation* (中国临床康复), 2006, 10(3): 107-109(in Chinese).
- [2] ZHANG L P, JIANG J K, TAM J W, et al. Effects of matrine on proliferation and differentiation in K562 cells[J]. *Leuk. Res.*, 2001, 25(9): 793-800.
- [3] DOTE J S, LOOK A T. Three molecular determinants of malignant conversion and their potential as therapeutic targets[J]. *Clin. Opin. Oncol.*, 1999, 11: 58-67.
- [4] AKIYAMA M, IWASE S, HORIGUCHI Y, MADA J, et al. Interferon alpha repressed telomerase along with G-accumulation of D2audi cells[J]. *Cancer Lett.*, 1999, 142: 23-30.

- [5] DORRIE J, SAPALA K, ZUNINO S J. Carnosol induced apoptosis and downregulation of bcl-2 in blinleage leukemia cells[J]. *Cancer Lett.*, 2001, **170**(1):33-39.
- [6] SHIRATON H, KOSHINO T, LLSUGI M, *et al.* Acceleration of lung metastasis by up-regulation of CD44 expression in osteosarcoma-derived cell transplanted mice[J]. *Cancer Lett.*, 2001, **170**(2):177-182.
- [7] WANG T J(王铁军), LI SH P(李绍平), JIAN J R(简家荣), WANG Y T(王一涛). Advances in the studies of anti-tumour activity of alkaloids in radix *Sophora flavescens* (Kushen)[J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*(中国实验方剂学杂志), 2004, **10**(4):52-55(in Chinese).
- [8] TAN M Q(谭孟群), LUO ZH Y(罗志勇), WANG Q R(王绮如), JIANG D ZH(蒋德昭). The anti-leukemia effect of *Sophora flavescens* and its mechanism[J]. *Bull. Hunan Med. Univ.* (湖南医科大学学报), 2000, **25**(5):443-445(in Chinese).
- [9] WANG J N(王静妮), HOU H X(侯华新). Advance in the pharmacological research on flavonoid in *Sophora flavescens* (Kushen)[J]. *Strait Pharm Aceutical Journal*(海峡药学), 2006, **18**(1):14-16(in Chinese).
- [10] 程广有. 名优花卉组织培养技术[M]. 北京:科学技术文献出版社, 2003:23.



图版 I 1. 无菌苗;2. 不定芽增殖;3. 壮苗培养;4. 芽苗生根;5. 生根苗出瓶;6. 组培苗移栽。

Plate I Fig. 1. Aseptic seedling; Fig. 2. Propagation of adventitious bud; Fig. 3. Tonic seedling culturing; Fig. 4. Adventitious bud rooting; Fig. 5. Test-tube plantlet getting out; Fig. 6. Test-tube plantlet transplanting.