

维吾尔药材刺山柑外植体的筛选与组培快繁条件研究

曹 锐, 马生军, 周 旋, 周 琳, 王 颖

(新疆农业大学 药学院 新疆 乌鲁木齐 830052)

摘 要:以从新疆吐鲁番地区沙漠采集的维吾尔民间传统药材刺山柑为试验材料, 择其茎段、叶片、侧芽、萼片和花朵 5 种外植体进行组培筛选并探索其最佳培养条件。结果表明: 其外植体最佳灭菌条件为升汞加吐温-20 消毒 5 min, 最适培养基为 MS+0.6 mg/L 6-BA+1.0 mg/L 2,4-D+3.0 mg/L NAA, 5 种外植体的诱导率均在 65% 以上, 但茎、叶为最佳; 增殖培养基中, 随着生长激素 NAA 的浓度增加, 增殖系数升高, 丛生芽的发芽数增多; 最佳生根培养基为 MS+0.8 mg/L IBA+300 mg/L 活性炭。

关键词: 刺山柑; 外植体; 组培快繁

中图分类号: S 567.23⁺9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)08-0251-04

刺山柑(*Capparis spinosa* Linn), 为白花菜科山柑属植物, 又称野西瓜、老鼠瓜、槌果藤、瓜儿菜或抗旱草等^[1]。该属我国约有 30 种, 新疆仅 1 种, 产量较多, 疆内分布较广, 主要在南疆吐鲁番、阿克苏地区, 为半灌木状匍匐藤本。刺山柑多生长在干燥的在石质低山, 丘陵坡地, 山麓冲沟以及砾石质戈壁中的径流沟, 或有细土沉积的小地形及薄沙地^[1]。由于其独特的生态特性, 在一些多风、植被稀少和沙暴肆虐地区, 具有降低风速、抗击风沙、防止土地风蚀及保护生态环境等方面的重要作用。

刺山柑的经济用途很广泛。其可药用, 据《新疆药用植物志》记载, 刺山柑叶、果和根皮均能入药, 主要功能有祛风除湿、止痛、消肿, 外敷患处治风湿性关节炎和疮毒。



图1 刺山柑花朵



图2 刺山柑果实

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料采自新疆吐鲁番沙漠植物园, 采集地点位于北纬 42°85'45.9", 东经 89°18'78.1", 海拔 102 m, 分别于 2008 年 5 月和 10 月采集 2 次, 正置刺山柑的开花期和果熟期, 采摘时用修枝剪剪取刺山柑分枝的尖端 5~10 cm, 入袋密封。带回后立即用纱布包好, 淋洒水放入冰箱, 4℃ 保存。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的消毒 选取健壮无病虫害的嫩枝条, 首先要对所需要的材料进行修正, 分装到不同大烧杯中, 绑好纱布在流水下冲洗 5~6 h, 然后放入生物安全柜中紫外线杀菌 30 min, 再用 70% 酒精浸泡 30 s, 无菌水清洗 1 次 1 min, 最后用 0.1% 升汞配以 1~2 滴吐温-20 表面灭菌后, 无菌水洗 3 次, 每次 1 min。

1.2.2 外植体的接种 取处理好的刺山柑外植体, 放在大号培养皿中的滤纸上, 吸干残留水分, 然后用已在酒精灯上灼烧灭菌的枪状镊和剪刀, 将茎部裁剪成 0.5 cm 的茎段, 叶片为 0.5 cm×0.5 cm, 萼片、花瓣和侧芽均整片接种。

1.2.3 培养基 启动培养基以 MS 和 B5 培养基为主, 增殖和生根培养基均以 MS 为主; ①启动培养基, 附加不同浓度激素 6-BA、NAA 和 2,4-D; ②增殖培养基, 附加不同浓度激素 6-BA 和 NAA; ③生根培养基, 附加不同浓度激素 IBA、NAA 和活性炭。

1.2.4 培养条件 培养温度控制在 25~28℃ 之间, 光照强度为 1 500~2 000 lx, 光照时间 12 h/d。

2 结果与分析

2.1 启动培养

第一作者简介: 曹锐(1984-), 男, 硕士, 研究方向为生化药学。
E-mail: cr5599@126.com.

通讯作者: 王颖(1957-), 女, 甘肃人, 硕士, 教授, 硕士生导师, 现任新疆农业大学药学院院长, 现主要从事药理与毒理学研究工作。

E-mail: wy2028@yahoo.com.cn.

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(200821105)。

收稿日期: 2009-03-20

2.1.1 不同消毒时间及方法对外植体的影响 植物组织培养技术首先要解决的是对外植体的消毒, 继而建立无菌培养系, 此环节是植物组织培养中难度较大的环节之一^[2]。试验通过流水冲洗时间和升汞消毒时间, 2 个因素考察刺山柑污染率和褐变率, 灭菌时所用的升汞中滴加 1~2 滴吐温-20, 用以增加升汞灭菌活性, 缩短灭菌

时间, 降低褐变率的发生。如表 1 所示, 随着流水冲洗时间的增加, 升汞消毒时间的延长, 各种外植体的污染率都呈现下降的趋势, 但升汞消毒时间过长, 污染情况虽然能得到控制, 但是褐变程度将大幅提高。综合考虑, 流水冲洗应在 6 h 以上, 升汞灭菌时间控制在 5 min 左右为宜, 污染率为 20%, 褐变率为 24.4%。

表 1 不同消毒时间及方法对刺山柑外植体的影响

流水冲洗 /h	升汞消毒 时间/min	污染率/%					褐化率/%				
		茎	叶	芽	萼片	花	茎	叶	芽	萼片	花
5	3	40	90	90	20	20	0	25.5	25	40	0
5	5	20	57.5	60	20	15	10	35	35	30	20
5	8	22.5	17.5	15	10	10	65.8	42.5	55	50	60
5	10	10	10	10	5	5	90.8	58	60	80	85
6	3	22.5	65	75	20	15	9.2	25	10	10	10
6	5	22.5	22.5	40	10	5	17	35	35	25	10
6	8	15	15	15	10	5	60.3	35	25	55	40
6	10	2.5	3	10	5	0	77.5	50.5	60	60	80

2.1.2 不同外植体对于刺山柑愈伤组织诱导的影响 不同外植体由于生理状态之间存在一定差异, 因此其发生愈伤组织的情况也有所差别, 试验选择茎段、叶片、侧芽、萼片和花瓣 5 种外植体, 对刺山柑外植体筛选做出具体评估。如表 2 所示, 5 种外植体中, 茎段和叶片的愈伤组织发生率较高, 分别为 74.17% 和 55.00%, 也是诸多组培快繁试验所选择的外植体。就茎段和叶片而言, 叶片更容易污染, 褐变率也相对较高, 所以选择茎段作

为外植体更为适宜。

表 2 不同外植体对于刺山柑愈伤组织诱导的影响

外植体 类型	愈伤组织 发生率/%	愈伤组织 行程时间/d	愈伤组织 状态
茎	74.17	11	黄绿色, 质地疏松
叶	55.00	9	绿色, 质地松软
芽	47.50	10	黄绿色, 质地疏松
萼片	51.25	9	绿色, 质地松软
花	58.75	8	白色, 质地松软

表 3 不同激素的浓度配对外植体愈伤组织的诱导影响

培养基	6 BA /mg · L ⁻¹	2,4-D /mg · L ⁻¹	NAA /mg · L ⁻¹	愈伤组织发生率/%					存活率 /%
				茎	叶	芽	萼片	花	
MS	0.6	0.5	1.0	3.3	20.5	5	30	20	15.76
MS	0.6	0.5	3.0	11.7	18	0	10	10	9.94
MS	0.6	1.0	1.0	75	52.5	65	10	10	42.50
MS	0.6	1.0	3.0	80	75.5	65	65	85	74.10
B5	0.6	0.5	1.0	9.8	27.5	0	35	50	24.64
B5	0.6	0.5	3.0	6.7	25	0	35	35	20.34
B5	0.6	1.0	1.0	68.3	42.5	35	50	60	51.16
B5	0.6	1.0	3.0	73.3	67.5	25	80	80	65.16

2.1.3 不同激素的浓度配对外植体愈伤组织的诱导影响 针对最佳的流水冲洗和升汞灭菌时间, 以下试验均在流水冲洗 6 h 后, 升汞中滴加吐温-20 的溶液对外植体做表面消毒 5 min, 无菌水水洗 3 次的试验条件下进行。对于诱导刺山柑外植体发生愈伤组织, 在 MS 和 B5 2 种基本培养基中, 在前期试验中, 试验得出 6-BA 的浓度固定为 0.6 mg/L 的条件最适, 选择不同的 NAA 和 2,4-D 的浓度配比, 观察统计各外植体愈伤组织的发生率。如表 3 所示, 随着 2,4-D 浓度的增加, 愈伤组织诱导率呈现递增趋势。从生长情况来看, 2,4-D 和 NAA 的配比浓度越高, 愈伤组织生长情况越好, 最佳浓度比为 MS+0.6 mg/L 6-BA+1.0 mg/L 2,4-D+3.0 mg/L NAA, 愈伤组织诱导率高达 74.1%, 质地松软, 生长良好。由于该试验采集时间正处于刺山柑花期, 观察萼片

和花瓣的诱导率也相对较高, 花瓣的愈伤组织发生时间最短为 8 d, 颜色为白、质地松软, 诱导率高达 58.75%。对于 MS 和 B5 2 种培养基, 无论从诱导率、污染率还是褐变率, MS 培养基均优于 B5 培养基, 不仅如此, B5 培养基中外植体诱发的愈伤组织质地较硬, 转接到继代培养基不利于后期的增殖培养。

2.2 增殖培养

在无菌操作的条件下, 将生长良好的愈伤组织转移到增殖培养基, 进行继代培养, 转接前应先各瓶培养基进行标号并称重其重量, 为计算增殖系数做好准备, 增殖系数的计算公式如下:

$$\text{增殖系数} = \frac{30 \text{ d 后收获的愈伤组织鲜重}}{\text{接种前愈伤组织鲜重}} \times 100\%$$

表 4 不同激素的浓度对比对愈伤组织诱导丛生芽发生的影响

培养基	6-BA/ mg · L ⁻¹	NAA/ mg · L ⁻¹	增殖系数	愈伤组织状态	丛生芽发生时间及平均个数
MS	1.0	0	1.09±0.68	结块, 质地坚硬	无, 0个
MS	1.0	0.1	2.25±0.45	黄色略透明	11 d, 3个
MS	1.0	0.3	2.79±0.72	黄色, 质地松软	11 d, 2个
MS	1.0	0.5	2.35±0.49	土黄色或褐色	15 d, 2个

从表 4 可以看出, NAA 对于刺山柑愈伤组织的增殖效果明显, 当培养基中不添加 NAA 时, 增殖系数较低, 仅为 1.09, 愈伤组织发育不良无明显的丛生芽产生; 但随着 NAA 浓度的增加, 愈伤组织比重明显提高, 最高为 3.51, 而且愈伤组织质地松软, 个别的有白色毛状芽产生, 几天后就会生出丛生芽, 大概 30 d 左右即可更换

表 5 不同激素的浓度对比对刺山柑生根培养的影响

培养基	IBA/ mg · L ⁻¹	NAA/ mg · L ⁻¹	活性炭/ mg · L ⁻¹	个数	生根个数	生根率/ %	生根状态
MS	0.8	-	100	57	23	40.35	气生根 分支较多, 继代中 2、3 长势较好
MS	0.8	-	300	64	55	85.94	生根较好, 多数为实生根, 基部的愈伤组织较少
MS	0.8	0.5	-	35	14	40.00	气生根 根密, 根毛较多
MS	0.8	1.0	-	35	27	77.14	生根分支较少, 根体粗壮, 但是继代 3、4 愈伤组织较大

从表 5 可以看出, 经壮苗培养后的芽苗接种在各生根培养基上均可诱导出根, 形成完整植株。以生根率判断, 生根培养基中 MS+0.8 mg/L IBA+300 mg/L 活性炭为最佳, 生根率为 85.94%, 生根效果较好, 多数为实生根, 基部的愈伤组织较少。30 d 后调查发现, 所有培养基大多为实生根, 少数为气生根, 根数 4~6, 根长平均约 2 cm。



图 3 刺山柑外植体一形成愈伤组织



图 4 刺山柑不定芽的诱发



图 5 刺山柑不定芽的生长



图 6 形成刺山柑无菌植株

3 讨论

不同来源组织, 愈伤组织形成的迟早和形成继代愈伤组织的比率差异较大, 故选择适当的外植体对于愈伤组织细胞的建立非常重要^[3]。该试验采用茎段、叶片、侧芽、萼片和花瓣 5 种外植体, 分别考察不同消毒方式对刺山柑外植体消毒效率的影响, 以及不同激素配比对于外植体诱导产生愈伤组织的发生率的影响。研究表明, 由于刺山柑的采集时期正值春季, 茎叶枝条比较幼嫩, 升汞灭菌时间过长会导致外植体褐变率的提高, 所以选择适当的表面活性剂配合升汞, 借以缩短灭菌时间来控制褐变率。在 0.1% 升汞溶液中, 滴加 1~2 滴吐

成生根培养基。

2.3 生根培养

挑选增殖继代培养基中长势旺盛的刺山柑移栽到生根培养基中, 注意转接过程中的无菌操作过程, 避免因污染而降低存活率。试验通过 IBA 和 NAA、活性碳的不同浓度配比, 考察刺山柑的生根情况。

温 -20℃ 可以将灭菌时间控制在 10 min 以内。但是不同外植体的消毒灭菌时间要求不完全一致, 叶片、萼片和花瓣的灭菌时间相对较短, 茎段和侧芽的时间较长, 综合考虑, 流水冲洗应在 5 h 以上, 升汞灭菌时间控制在 5 min 左右为宜, 污染率为 20%, 褐变率为 24.4%。在多数植物组织培养中, 离体细胞在开始阶段往往缺乏合成生长激素和细胞分裂素的能力, 为此需要在培养介质中添加不同的外源激素, 以诱导细胞分裂、分化以及形态发生。不同激素类型和浓度对胚性愈伤组织增殖的影响不同, 钱丽华^[4]在要用植物“三叶青”快繁中和徐重益^[5]等人在日本木立芦荟离体快繁体系的研究中均用到 6-BA 和 NAA 2 种生长激素。该试验考察 0.6 mg/L 6-BA 配合不同浓度 NAA 和 2, 4-D 对于愈伤组织的诱导影响, 随着 2, 4-D 的浓度增加诱导率有所增加, 最高为 74.10%, 适当的激素配比是外植体诱导生成愈伤组织的关键。

继代增殖培养中, 愈伤组织分化形成丛生芽的过程是保证植物离体培养生长成为植株的重要过程, 也为后期生根过程提供必要的基础。NAA 能够诱导愈伤组织产生不定芽, 随着 NAA 浓度的增加增殖系数升高, 进而形成植株。转接至生根培养基后 30 d 左右, 所有培养基大多为实生根, 少数为气生根, 经移栽练苗后进入大田种植。

参考文献

- [1] 张立运, 杨春. 保护风蚀地刺山柑[J]. 植物杂志, 2004(4): 3-4.
- [2] 李红, 李永文, 寇凤仙, 等. 藜香植物组织培养技术研究[J]. 北方园艺, 2007(9): 195-197.
- [3] 王艳婷, 甘露, 刘薇, 等. 药用植物刺山柑愈伤组织诱导及细胞生长代谢特征研究[J]. 现代生物医学进展, 2007, 12(7): 1779-1783.
- [4] 钱丽华. 药用植物“三叶青”的组培快繁技术的研究[J]. 杭州农业科技, 2007(6): 22-23.
- [5] 徐重益, 傅木琳, 程智慧. 日本木立芦荟离体快繁体系研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2004, 32(6): 83-86.

微量元素对半夏组织培养诱导率及分化率的影响

魏莉霞

(甘肃省农业科学院 啤酒原料研究所特作研究室 甘肃 兰州 730070)

摘要: 研究微量元素 Mn、Fe、Zn 对半夏组织培养诱导率、分化率的影响。分别以半夏无菌试管苗的叶片、叶柄、块茎为外植体,以 MS+2, 4-D 0.5 mg/L+6-BA 1 mg/L 为基础培养基,改变其中 Mn、Fe、Zn 的浓度,每个因素设 3 个水平,正交试验设计,共选 9 个组合,每种外植体进行不同组合试验,寻找最佳的微量元素组合配方。结果表明:培养叶片叶柄的最佳微量元素浓度水平为 Mn 5.5 mg/L, Fe 为 9.5 mg/L, Zn 为 2.0 mg/L; 培养小块茎的最佳微量元素浓度水平为 Mn 7.5 mg/L, Fe 9.5 mg/L, Zn 为 1.0 mg/L。

关键词: 微量元素; 半夏; 诱导率; 分化率

中图分类号: S 567.23⁺9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)08-0254-03

半夏 (*Pinellia ternate* Briet) 是天南星科半夏属多年生草本植物,以块茎入药^[1],具有润燥化痰、降逆止呕、消痞散结之功,为常用大宗中药材。半夏多为野生,由于药用和出口量大,加上大量的采挖和山区开发,使得野生资源日趋枯竭而难以满足目前的需求。随着灾害性气候的影响,加之人工栽培过程中多年沿用块茎和株芽无性繁殖的方法,植株感染病毒严重,产量质量下降,致使半夏的栽培生产受到较大的限制,造成半夏的贮量越

来越少,而国内外对半夏的需求有增无减,市场价格逐年攀升^[2]。

近年来,学者们对半夏的生物学特性、化学成分、炮制方法、药用功效、引种驯化栽培技术、组织培养技术等方面进行了广泛的研究^[3,8],尤其在植物生长调节剂对半夏组织培养和植株再生快速繁殖方面做了大量研究,但对于半夏组培快繁中微量元素的影响研究甚少。在长期对半夏组织培养的研究中,发现微量元素对半夏组织培养的影响效应,在诱导培养基中添加不同浓度的 Mn、Fe、Zn,以叶片、叶柄和块茎为外植体,研究微量元素对半夏外植体直接诱导形成小块茎的影响,以期进一步提高半夏试管块茎的诱导分化率,为半夏组培快繁培养基的改良提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

作者简介: 魏莉霞(1976-),女,甘肃武都人,助理研究员,主要研究方向是中药材的组织培养及遗传育种。E-mail: wei.l.xia2008@163.com.

基金项目: 甘肃省农业生物技术研究与应用开发资助项目(CNSW-2005-05)。

收稿日期: 2009-03-20

Study on the Explant Screening and Rapid Propagation Condition through Tissue Culture of *Capparis spinosa* L

CAO Rui, MA Sheng-jun, ZHOU Xuan, ZHOU Lin, WANG Ying

(College of Pharmaceutical Science, Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang 830052, China)

Abstract: *Capparis spinosa* L, An Uyghur Traditional Herbal Medication from Turpan in Xinjiang as the experimental material. The stem, leaf, bud, flower and sepal were selected for tissue culture. In the condition of the best sterilization which use 0.1% HgCl₂ plus Tween-20 for five minutes. The results show that MS+0.6 mg/L 6-BA+1.0 mg/L 2,4-D+3.0 mg/L NAA was the best medium. Induction rate all above 65% of five explant, especially in stem and leaf. Multiplication coefficient and bud number was rising with the concentration of NAA increasing in proliferation medium. The optimum medium of root was MS+0.8 mg/L IBA+300 mg/L activated Carbon.

Key words: *Capparis spinosa*; Explant; Tissue culture and rapid propagation