

西藏产茅膏菜丛生芽诱导和增殖的研究

杨 爽¹, 王 勇²

(1. 西藏农牧学院 生物技术中心, 西藏 林芝 860000; 2. 西藏林芝地区农牧局, 西藏 林芝 860000)

摘 要:以茅膏菜的球茎、茎尖、茎段、叶片和实生苗无根芽为外植体,以 1/2MS 为基本培养基,研究了不同激素配比和不同接种株数对其丛生芽诱导和增殖的影响。结果表明:以茅膏菜实生苗无根芽为外植体,在光照 13 h/d, 3 000 lx 培养条件下,每瓶接种 5 丛,每丛 4 株,茅膏菜的最佳增殖培养基为 1/2MS+6-BA 0.1 mg/L+NAA 0.1 mg/L+蔗糖 25 g/L+琼脂 5.5 g/L。

关键词:茅膏菜;组织培养;丛生芽;增殖

中图分类号:S 567.23⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)06-0102-03

茅膏菜 (*Drosera peltata* Smith var. *Lunata* C. B. Clarke) 属茅膏菜科茅膏菜属多年生食虫草本植物,是茅膏菜科在西藏仅有的 1 属 1 种,分布于米林、林芝、亚东、聂拉木、吉隆各县,多生高山林下草地或沼泽边缘草地,海拔 2 300~3 500 m,全草入药,具有解疮毒等功效^[1],是一种极具经济价值的药用植物^[2-4]。随着市场需求量的不断增大,现有茅膏菜的数量已经供不应求,因此,利用组织培养技术对茅膏菜进行大量增殖,能够有效挽救匮乏的种质资源,填补市场供应的空缺。目前,有关茅膏菜属植物的研究主要集中于其药用价值、食虫机制、生态学研究^[4-7],对于西藏产茅膏菜的组织培养研究尚鲜见报道。该研究利用茅膏菜的球茎、茎尖、茎段、叶片和实生苗无根芽为外植体,以 1/2MS 为基本培养基,研究了不同激素配比、不同接种株数对其丛生芽增殖的影响,以期建立稳定的茅膏菜组培快繁体系提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

茅膏菜健壮母株于 2011 年 5 月上旬采自林芝县齐正藏药基地;茅膏菜种子于 2010 年 9 月下旬采自林芝县

齐正藏药基地,种子直径 0.2 mm,千粒重 0.01 g,在 4℃ 黑暗密封保存至 2011 年 5 月上旬用于试验。

6-BA、NAA 为 Sigma 公司产品;其它试剂均为国产分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的获取与灭菌 选取当年生的生长健壮的无病害植株,在自来水下冲洗 1~2 h,边洗边用毛刷刷洗表面,在高浓度的洗涤液中浸泡 20 min,自来水下冲洗干净;分别摘取球茎、茎尖和茎段后,在超净工作台上,使用浓度为 75% 的酒精处理 30~60 s,再用无菌水冲洗 2 次,然后用 0.1% 的升汞溶液浸泡茎尖和茎段 5 min,用 0.1% 的升汞溶液浸泡球茎 9 min,然后均用无菌水冲洗 6 次,最后用无菌滤纸吸干表面水分(以叶片为外植体时,从无菌的茎尖或茎段上剪下即可)。无菌实生苗的获得:在超净工作台上用质量分数为 75% 的酒精处理种子 30 s 后,无菌水冲洗 2 次,再用 0.1% 升汞处理 10 min,最后用无菌水冲洗 6 次后接种于 1/2MS(大量元素减半)培养基上。50 d 后挑选生长状态较为一致的无菌实生苗(图 1)作为外植体。

1.2.2 培养材料的筛选 以球茎、茎尖、茎段、叶片和实生苗无根芽为外植体,以 1/2MS 为基本培养基,附加 6-BA 0.1 mg/L 和 NAA 0.1 mg/L;观察记录各外植体的存活和生长等情况。每个处理接种 20 瓶,每瓶外植体 4 个(丛),重复 3 次。

第一作者简介:杨爽(1982-),女,本科,讲师,现主要从事西藏当地濒危植物组织培养研究等工作。E-mail: yangshuang346429@163.com.

基金项目:西藏大学农牧学院青年科研基金资助项目(2012016)。

收稿日期:2012-12-10

0.3, 0.5 mg/L; the concentration of white granulated sugar were 25, 35, 45 g/L; the concentration of agar were 3, 4, 6 g/L. The results showed that the effects of each factor on the tube seedlings rooting was white granulated sugar > IBA > agar, the action of sugar reached at significant level, and 1/2MS+IBA 0.3 mg/L+white granulated sugar 45 g/L+agar 4 g/L was the optimal combination.

Key words: *Hemerocallis hybridas*; caespitose shoots; white granulated sugar; rooting rate



图1 无菌实生苗

Fig. 1 Aseptic seed seedling

1.2.3 增殖培养 丛生芽增殖培养基的筛选试验中,以生长状态较为一致的茅膏菜实生苗茎段为外植体,设计7组不同浓度的6-BA和NAA组合的增殖培养基,培养基为:A:1/2MS+6-BA 0.1 mg/L+NAA 0.01 mg/L;B:1/2MS+6-BA 0.1 mg/L+NAA 0.05 mg/L;C:1/2MS+6-BA 0.1 mg/L+NAA 0.5 mg/L;D:1/2MS+6-BA 0.1 mg/L+NAA 0.1 mg/L;E:1/2MS+6-BA 0.01 mg/L+NAA 0.1 mg/L;F:1/2MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L;G:1/2MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L。接种无根茅膏菜试管苗,每个水平分别接种10瓶,每瓶接种5丛,每丛4株。不同接种株数试验采用单因素5水平的试验设计。挑选生长状态较为一致的茅膏菜实生苗,剪去根部接种到培养基1/2MS+6-BA 0.1 mg/L+NAA 0.1 mg/L上,每瓶接种5丛无根茅膏菜实生苗,每丛中分别有1、2、3、4、5株,每个处理接种5瓶。以上培养基均附加3.0%蔗糖和0.55%琼脂,pH为5.8。随时观察茅膏菜芽苗发生数以及幼苗生长状态,记录各个处理的冒芽时间(通过肉眼可见丛生芽出现的最初时间),培养40 d后统计和测量丛生芽形成率、增殖倍数、苗高等指标。

1.2.4 培养条件 培养温度(25±2)℃;光照时间为13 h/d,光照强度为3 000 lx。

1.3 数据分析

所有试验数据采用DPS软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同外植体对茅膏菜愈伤组织诱导率的影响

分别以当年生的球茎、茎段、叶片和实生苗无根芽为外植体诱导愈伤,其培养效果各不同。从表1可以看出,球茎、茎尖、茎段和实生苗无根芽都能诱导出芽,其中实生苗无根芽的芽诱导率89%为最高,平均出芽5.1个。茎尖和茎段芽诱导率均为15%左右,如此低的诱导率是因为污染率高达50%以上,同时褐化率也很高,达到70%以上,这说明当选用茎尖和茎段为外植体时,消毒剂的处理时间无论是延长还是缩短均无意义。球茎污染率为0,有轻微的褐化现象,但芽诱导率最低,仅为

9%,平均出芽0.2个。叶片全部褐化死亡,可能原因是叶片在茎尖、茎段上灭菌5 min,时间过长。从试验结果看,茅膏菜实生苗无根芽比球茎、茎尖、茎段、叶片更适宜作为茅膏菜组织培养的外植体。

表1 不同外植体对茅膏菜愈伤组织的诱导效果

Table 1 Effects of different explants on the induction of sundew bud and callus			
外植体	芽(愈伤)诱导率/%	出芽(出愈)个数/个	生长状况
球茎	9	0.2	轻微褐化
茎尖	14	1.2	褐化
茎段	18	1.5	褐化
叶片	0	—	褐化死亡
实生苗无根芽	89	5.1	健壮

2.2 不同激素组合对茅膏菜丛生芽诱导的影响

从表2可知,7组不同处理间丛生芽诱导的数量和生长状态均有较大差异,且有一定的规律性。当6-BA浓度一定时(A~D),在一定浓度梯度范围内,茅膏菜芽苗的生长质量随着NAA浓度的提高而呈上升趋势,但增殖倍数是先上升后下降,说明NAA在较低浓度(0.01~0.1 mg/L)时,随着浓度的提高,增殖倍数有上升趋势,但当NAA超过敏感浓度时,反而对芽的增殖有抑制作用。当NAA浓度一定时(D~G),在一定浓度梯度范围内,茅膏菜试管苗增殖倍数随着6-BA浓度的提高呈上升趋势,但芽苗趋于纤细、皱缩或愈伤化,芽苗质量逐渐下降;当超过一定浓度时,茅膏菜试管苗的增殖倍数则随着6-BA浓度的提高而下降。综合考虑,将茅膏菜无根苗接种到B培养基上,培养40 d,单芽增殖数量较高(5.10),且芽苗生长状况良好(舒展、健壮),增殖情况非常理想(图2)。因此培养基1/2MS+6-BA 0.1 mg/L+NAA 0.1 mg/L是茅膏菜丛生芽诱导的最佳培养基。

表2 不同激素组合对茅膏菜丛生芽诱导的影响

Table 2 Effect of different hormone combinations on the induction of sundew multiple bud cluster				
编号	每瓶接种芽数/个	平均每瓶总增殖芽数/个	增殖倍数	增殖芽生长状况
A	20	63	3.15Cd	皱缩、块状
B	20	97	4.85Bc	皱缩、团状
C	20	29	1.45Df	舒展、健壮
D	20	102	5.10Bb	舒展、健壮
E	20	33	1.65De	舒展、健壮
F	20	138	6.90Aa	细弱、愈伤化
G	20	100	5.00Bbc	皱缩、愈伤化

注:同列不同大小字母表示在0.05和0.01水平上差异显著。下同。

Note: Different small and capital letters in the same column indicated significant difference at the 0.05 and 0.01 levels. The same below.

2.3 接种每丛中无根芽数量对丛生芽形成和增殖的影响

由表3可知,接种单株芽不利于丛生芽的形成,而接种3株以上时,丛生芽的诱导率为100%;而且冒芽时间大大提前,接种每丛4个芽时,出芽时间比接种每丛1



图2 茅膏菜丛生芽增殖生长情况

Fig. 2 Growth condition of sundew multiple bud cluster

个芽时,出芽时间提前了 11 d。这些现象说明,茅膏菜丛生芽增殖表现出强烈的群体效应。但并不是接种芽丛越多越好,当接种 4 株以上时,增殖倍数差异性不显著,但增殖芽平均高度有下降趋势,且差异性呈极显著水平。这可能是由于早期形成的丛生芽过多,但后期营养不足,造成丛生芽的生长发育受到抑制,这一点与崔广荣等^[8]、莫昭展等^[9]的研究结果相同。

表3 每丛中无根芽数量对丛生芽诱导和增殖的影响

Table 3 Effects of different number of the rootless stem of seed seeding per bunch on the induction and proliferation of clustered buds of sundew

每丛株数	接种丛数	接种总株数	冒芽时间/d	丛生芽形成数	丛生芽形成率/%	增殖芽总数	增殖倍数	增殖芽平均高度
1	25	25	31	5	20	36	1.44Cd	5.6Aa
2	25	50	24	13	52	126	2.52Bc	4.8Bb
3	25	75	21	20	80	371	4.95Ab	4.6BCc
4	25	100	20	25	100	510	5.10Aab	4.5Cc
5	25	125	20	25	100	647	5.18Aa	2.8Dd

3 结论与讨论

试验结果表明,以茅膏菜实生苗无根芽为外植体,在光照 13 h/d, 3 000 lx 培养条件下,每瓶接种 5 丛,每丛 4 株,茅膏菜的增殖培养基为 1/2+6-BA 0.1 mg/L+NAA 0.1 mg/L+蔗糖 25 g/L+琼脂 5.5 g/L 时,单芽

增殖倍数最高(5.10),且芽苗生长状况良好(舒展、健壮),增殖情况理想。

在试验中发现,茅膏菜实生苗培养时间的长短,芽苗的高矮,对丛生芽的形成数量有很大影响。总体趋势为,接种的芽苗越小形成的丛生芽越多,芽苗越大,形成的芽越少。而且芽苗增殖部位不同,小芽苗在基部形成丛生芽,而大芽苗在叶腋处通过腋芽进行增殖。至于苗高为多少时,接种后形成的丛生芽最多,有待进一步研究。在种子萌发试验中发现,在种子萌发培养基中添加较低浓度的琼脂有利于种子的萌发,在丛生芽增殖培养中并未进行琼脂使用浓度对比试验。另外西藏产茅膏菜的野生生长环境多为阳光充足的潮湿草丛或林地,若能适当增加光照强度和光照时间,适当降低对培养基渗透压起重要作用的蔗糖的使用浓度和基础培养基,理论上是有助于茅膏菜试管苗的增殖培养。因此基础培养基、光照条件、琼脂和蔗糖的使用浓度等方面的研究,还有待进一步探讨。

参考文献

- [1] 吴征镒. 西藏植物志[M]. 北京:科学出版社,1985:411-412.
- [2] 余德贵. 山胡椒的药理作用[J]. 基层中药杂志,1996,10(4):41-42.
- [3] 余志雄,杨贤挥,王岳峰,等. 狭叶山胡椒叶油的化学成分[J]. 江西农业大学学报,1991,13(1):41-46.
- [4] 罗光富. 茅膏菜搽剂治疗神经性皮炎 150 例疗效观察[J]. 云南中医中药杂志,2004,25(5):59.
- [5] 吴启秀,王曙,何俊,等. HPLC 测定茅膏菜中的槲皮素[J]. 华西药理学杂志,2008,23(1):126-127.
- [6] 张彦文,王海洋. 食虫植物光萼茅膏菜的生物学研究[J]. 武汉植物学研究,1999,17(4):345-349.
- [7] 汤袁,卜兆君,陈祥义,等. 长白山金川泥炭地圆叶茅膏菜的生态可塑性[J]. 湿地科学,2009,7(4):358-362.
- [8] 崔广荣,刘士勋,何玉华,等. 文心兰试管苗不定芽高效增殖体系的建立[J]. 西北植物学报,2005,25(3):562-567.
- [9] 莫昭展,贝学军,贾贵华,等. 铁皮石斛丛生芽增殖研究[J]. 西北林学院学报,2008,23(6):104-107.

Study on the Induction and Proliferation of Clustered Buds of *Drosera peltata*

YANG Shuang¹, WANG Yong²

(1. Agriculture and Animal Husbandry College of Tibet University, Linzhi, Tibet 860000; 2. Agricultural and Animal Bureau of Linzhi, Linzhi, Tibet 860000)

Abstract: Different explants were used to be cultured on the 1/2MS basic culture medium dosed with different concentrations of 6-BA and NAA to induce clustered buds for quick proliferation. The effects of different explants, different hormone combination, different inoculum density on the shoot induction were studied. The results showed that the appropriate explant of *Drosera peltata* for shoot inducing was the rootless stem of seed seeding, the best inoculum density was 4×5 explants each glass, the best culture medium for proliferation of clustered buds was 1/2MS+6-BA 0.1 mg/L+NAA 0.1 mg/L+sucrose 25 g/L+agar 5.5 g/L.

Key words: *Drosera peltata*; tissue culture; multiple bud cluster; proliferation