

苦参组织培养及快繁体系研究初探

赵 晖, 纪 璞, 李秀丽

(甘肃农业职业技术学院, 甘肃 兰州 730020)

摘要: 采用苦参种子为外植体, 以 MS 为基本培养基, 添加不同浓度的 NAA 和 6-BA, 进行苦参组培快繁技术研究。结果表明, 采用 75%乙醇 8 s+0.1%升汞 8 min 对苦参种子消毒后, 污染率低, 易获得无菌材料。MS 培养基中分别添加 0.1 mg/L、3.0 mg/L 6-BA 和 0.5 mg/L NAA、3.0 mg/L 6-BA 的组培苗增殖效果较好, 增殖率最高可达 120.2%; 在 1/2 MS 培养基中添加 0.1 mg/L 的 NAA, 更利于苦参组培苗生根。根长 1~2 cm 的无菌苗, 在自然光下驯化培养 5 d 后移栽至蛭石基质中成活率较高。

关键词: 苦参; 组织培养; 快繁体系; 研究

中图分类号: S567.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1463(2014)12-0014-03

doi: 10.3969/j.issn.1001-1463.2014.12.005

Primary Research on Tissue Culture and Rapid Multiplication of *Sophora flavescens*

ZHAO Hui, JI Ying, LI Xiu-li

(Gansu Agriculture Technology College, Lanzhou Gansu 730020, China)

Abstract: In this experiment, seeds have been used as explants, MS as the basic medium adding NAA and 6-BA on different concentrations to research rapid propagation technology of *Sophora flavescens* var. The results shows that the best method of sterilization for seeds is 70% ethanol (8 s)+0.1% HgCl₂ (8 min) which have the lowest contamination rate and the highest seedling rate. The optimal culture medium for subculture is MS+0.1 mg/L NAA+3.0 mg/L 6-BA and MS+0.5 mg/L NAA+3.0 mg/L 6-BA, the highest multiplication rate is 120.2%, 1/2 MS+0.1 mg/L NAA is the best medium for rooting culture. The tissue culture seedling have 1~2 cm roots could be domesticated with natural light for 5 days, and then transplanted in vermiculite have higher survival rate.

Key words: *Sophora flavescens* var.; Tissue culture; Rapid multiplication; Study

苦参(*Sophora flavescens* var. *flavescens*)为豆科苦参属的变种, 从其根、茎、叶和种子中提取的苦参碱、苦参素被大量应用到医药、保健等方面, 提取苦参碱、苦参素后的残渣也是生产有机肥的好原料^[1-3]。苦参中的苦参碱作为植物杀虫剂杀虫效果好, 对人、畜无毒害, 且不产生抗药性, 具有广阔的发展前景。长期以来, 苦参生药资源大多以采挖野生植物为主, 超限量采挖造成野生资源日益枯竭。近年来, 一些地区相继开展了人工苦参栽培, 但大部分以采集野生种子繁殖为主, 且能采集的苦参种子量非常有限, 难以满足大规模生产的需要, 加之苦参种子硬实率高达 90%以上, 种皮硬, 发芽率低, 种苗严重不足已成为制约苦参规范化、规模化栽培的瓶颈^[4-6]。目前国内外对苦参组织培养技术的报道较少, 若将组织培

养技术应用到苦参种苗繁殖和生产中, 不仅可保持优良母株性状, 而且繁殖速度快, 对实现苦参规模化栽培, 提高产量和品质十分有利^[7-8]。我们进行苦参组培快繁体系中外植体选择、适宜培养基筛选、驯化移栽等关键性技术研究, 以期为苦参组培工厂化育苗提供技术支撑, 也为药用植物资源的种质离体保存提供一条新途径。

1 材料与方法

1.1 材料

初代培养的外植体选用当年收获的苦参种子, 增殖培养的外植体选用初代培养获得的生长健壮

的无菌苗茎尖或茎段, 生根培养的外植体选用继代培养获得的生长健壮的无菌苗茎尖或茎段, 驯化移栽苗选用生根培养时获得的生长健壮的无菌苗。NAA、6-BA 均为分析纯, 由上海惠世生化试

收稿日期: 2014-06-10

基金项目: 甘肃省科技攻关资助项目“苦参质量标准 and 规范化栽培(GAP)研究”(2GS064-A43-019-08); 甘肃省教育厅导师基金项目“苦参组织培养及快速繁殖技术体系研究”(1119-02)部分内容

作者简介: 赵 晖(1979—), 女, 甘肃清水人, 讲师, 主要从事植物生理及植物组织培养方面的研究工作。联系电话: (0931)4672630。E-mail: zhvh@163.com

剂有限公司生产。

1.2 方法

1.2.1 初代培养 选择粒大、饱满的苦参种子，先用 98%浓硫酸浸泡 40 min 后，再用自来水冲洗 3 次进行预处理，然后在无菌条件下采用乙醇与升汞联合的 3 种处理方法进行消毒，处理 1 为 75%乙醇 3 s+0.1%升汞 5 min，处理 2 为 75%乙醇 8 s+0.1%升汞 8 min，处理 3 为 75%乙醇 10 s+0.1%升汞 10 min。消毒后的种子接种在 MS 培养基（基础 MS+30 g/L 蔗糖 +7 g/L 琼脂，pH 5.8）上，每处理接种 60 瓶，每瓶 3~4 粒。置于 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ 、1 500~2 000 Lx(10 h/d)条件下培养，7 d 后统计污染率，21 d 后统计成苗率。

1.2.2 增殖培养 在无菌条件下，将无菌苗(株高约 10 cm)切割为带单芽的茎段，接种于增殖培养基上诱导腋芽与丛生芽。增殖培养基共设 9 个处理，处理①为 MS+0.1 mg/L NAA+1.0 mg/L 6-BA，处理②为 MS+0.3 mg/L NAA+1.0 mg/L 6-BA，处理③为 MS+0.5 mg/L NAA+1.0 mg/L 6-BA，处理④为 MS + 0.1 mg/L NAA + 2.0 mg/L 6-BA，处理⑤为 MS + 0.3 mg/L NAA + 2.0 mg/L 6-BA，处理⑥为 MS + 0.5 mg/L NAA + 2.0 mg/L 6-BA，处理⑦为 MS + 0.1 mg/L NAA + 3.0 mg/L 6-BA，处理⑧为 MS + 0.3 mg/L NAA + 3.0 mg/L 6-BA，处理⑨为 MS + 0.5 mg/L NAA + 3.0 mg/L 6-BA。每处理接种 30 瓶，每瓶接种 2~3 个单芽茎段，培养条件同初代培养，7、21 d 后统计总芽数及增殖率。

1.2.3 生根培养 在无菌条件下，将无菌苗切割为带 2 个芽的茎段，接入生根培养基中进行生根培养。生根培养基 6 个，编号分别为 I、II、III、IV、V、VI，I 为 MS+0.1 mg/L NAA，II 为 MS+0.3 mg/L NAA，III 为 MS+0.5 mg/L NAA，IV 为 1/2 MS+0.1 mg/L NAA，V 为 1/2 MS+0.3 mg/L NAA，VI 为 1/2 MS+0.5 mg/L NAA。每处理接种 30 瓶，每瓶接 3~4 个茎段，培养条件同初代培养。接种后 30 d 统计生根率，生根数及根长。

1.2.4 驯化与移栽 选择根长 1~2 cm 的无菌苗，在自然光照下驯化 5 d 后从培养瓶中取出，轻轻洗去根部的琼脂，分别栽入蛭石与田园土按 1:1 配制的混合基质和纯蛭石两种基质中，移栽前先将基质灭菌后装入营养钵中铺平压实，浇透水，移栽时用竹签在基质表面打孔，将组培苗栽入并压实。每钵栽 1 株，每处理 30 钵。初期保持环境温度 20~25 $^\circ\text{C}$ ，间隔 4 h 喷水 1 次，保持空气相对湿度 80%以上，5 d 后逐渐降低温度与湿度，转入自然光下培养，并于移栽后 5、10、15 d 统计组培苗成活率。

2 结果与分析

2.1 消毒处理对苦参种子初代培养成苗的影响

由表 1 可见，利用不同的消毒方法处理苦参种子后，初代培养时污染率均未超过 10%，成苗率为 30.0%~68.2%。其中以处理 2 的污染率相对较低，为 6.6%，成苗率最高，为 68.2%，污染率较处理 3 高 1.6 个百分点，较处理 1 低 3.4 百分点；成苗率较处理 3 高 38.2 百分点，较处理 1 高 32.1 百分点。且处理 2 成苗率与处理 1 差异显著，与处理 3 差异极显著。

表 1 不同消毒处理苦参种子初代培养的污染率与成苗率

处 理	接种瓶数 (瓶)	污染瓶数 (瓶)	污染率 (%)	接种种子数 (粒)	成苗数 (株)	成苗率 (%)
1	60	6	10.0	238	86	36.1 b AB
2	60	4	6.6	239	163	68.2 a A
3	60	3	5.0	240	72	30.0 b B

2.2 激素对比对苦参诱导芽增殖的影响

由表 2 可见，在添加不同浓度的 NAA 和 6-BA 的 MS 培养基中，苦参无菌苗诱导芽增殖率各不相同。其中，处理 9 (MS+0.5 mg/L NAA +3.0 mg/L 6-BA) 的培养基在接种 7 d 后和 21 d 后的芽增殖率均为最高，分别为 38.1%和 120.2%，分别较其它处理高 5.2~34.5 百分点和 38.1~101.2 百分点；其次是处理 7 (MS+0.1 mg/L NAA +3.0 mg/L 6-BA)，虽然在接种 7 d 后增殖率最低，但在接种 21 d 后的增殖率较高，达 82.1%。且接种 7 d 后，

表 2 不同激素配比的苦参诱导芽的增殖率

处 理	培养基激素配比		接种芽数 (个)	7 d 后		21 d 后	
	NAA (mg/L)	6-BA (mg/L)		总芽数 (个)	增殖率 (%)	总芽数 (个)	增殖率 (%)
①	0.1	1.0	74	83	12.2 b B	112	51.4 b BC
②	0.3	1.0	70	88	25.7 b AB	109	55.7 b BC
③	0.5	1.0	80	90	12.5 b B	119	48.8 b BC
④	0.1	2.0	75	91	21.3 b AB	121	61.3 b BC
⑤	0.3	2.0	83	91	9.6 b B	108	30.1 b C
⑥	0.5	2.0	88	117	32.9 b AB	150	70.5 b BC
⑦	0.1	3.0	84	87	3.6 b B	153	82.1 a AB
⑧	0.3	3.0	84	97	15.5 b B	100	19.0 b BC
⑨	0.5	3.0	84	116	38.1 a A	185	120.2 a A

表 3 不同移栽基质中苦参组培苗的移栽成活率

基质类型	移栽苗数 (株)	移栽后5 d		移栽后10 d		移栽后15 d	
		成活苗数 (个)	成活率 (%)	成活苗数 (个)	成活率 (%)	成活苗数 (个)	成活率 (%)
蛭石+田园土	30	26	86.67	20	66.67	17	56.67
蛭石	30	27	90.00	25	83.33	24	80.00

处理 9 与处理 6、处理 2、处理 4 差异显著,与其它处理差异极显著;接种 21 d 后,处理 9 与处理 7 差异不显著,与其它处理差异极显著。综合考虑可见,MS 培养基中分别添加 0.1、3.0 mg/L 6-BA 和 0.5 mg/L NAA、3.0 mg/L 6-BA 的芽增殖效果较好。

2.3 培养基对苦参组培苗生根的影响

由图 1、2、3 可见,在 MS 培养基中分别添加 0.1、0.3、0.5 mg/L NAA 培养 30 d 后,苦参组培苗的生根率和生根数均随 NAA 浓度的升高而增加,在添加 0.1 mg/L NAA 的培养基中,根系生长更快,

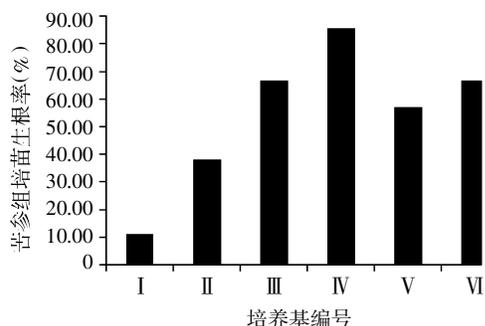


图 1 不同培养基对苦参组培苗生根率的影响

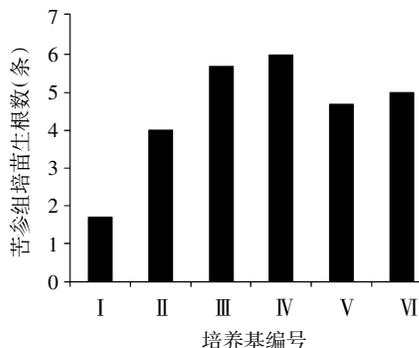


图 2 不同培养基对苦参组培苗生根数的影响

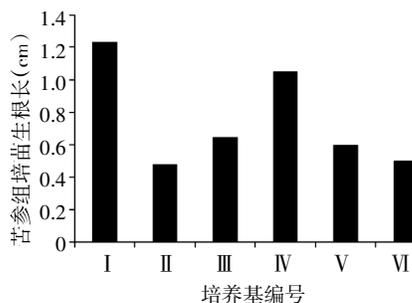


图 3 不同培养基对苦参组培苗平均根长的影响

平均根长最长。在 1/2 MS 培养基中,分别添加 0.1、0.3、0.5 mg/L NAA 培养 30 d 后,苦参组培苗的生根率、生根数及根长均以添加 0.1 mg/L NAA 时最高。表明含低浓度无机盐与生长素 NAA 的培养基更有利于苦参组培苗生根。

2.4 基质对苦参组培苗移栽成活率的影响

由表 3 可见,移栽后 5、10、15 d,均以纯蛭石为基质的组培苗成活率最高,达 80%以上。移栽后 15 d,蛭石与田园土混合基质中的组培苗成活率仅为 56.67%。在营养钵中培养 20 d 后,苦参苗平均株高 8.39 cm,叶片数 5 片,平均根长 4.23 cm,带土移栽至大田后成活率可达 90%以上。

3 小结

试验结果表明,以苦参种子作为外植体,采用 75%乙醇 8 s+0.1%升汞 8 min 消毒后,污染率低,易获得无菌材料。MS 培养基中分别添加 0.1、3.0 mg/L 6-BA 和 0.5 mg/L NAA、3.0 mg/L 6-BA 的增殖效果较好,增殖率最高达 120.2%。在 1/2 MS 培养基中添加 0.1 mg/L 的 NAA,更利于苦参组培苗生根。根长 1.00~2.00 cm 的无菌苗,在自然光下驯化培养 5 d 后移栽至蛭石基质中,成活率较高,移栽后 5~15 d 的成活率达 80%以上。

参考文献:

- [1] 程广有,唐晓杰.苦参组培快繁技术体系的初步研究[J].西北植物学报,2007,27(5):1026-1029.
- [2] 李如升,杨树春,郭宝英,等.苦参的开发利用与栽培[J].特种经济动植物,2002(8):27.
- [3] 郑永权,姚建仁,邵向东.苦参化学成分及农业应用研究概况[J].农药科学与管理,2000,21(1):24-26;30.
- [4] 张庆霞,纪瑛,杜彦斌,等.日光温室苦参播种育苗技术[J].甘肃农业科技,2010(1):56-57.
- [5] 谢琴淑,安永明,魏兵.四个苦参品种在甘谷县的引种初报[J].甘肃农业科技,2012(9):19-22.
- [6] 郭增祥.苦参人工栽培驯化技术[J].甘肃农业科技,2007(7):56-57.
- [7] 杨春梅,孟金贵,吴丽芳,等.苦参组培快繁技术研究[J].云南农业科技,2009(1):11-12.
- [8] 许继宏,马玉芳,陈锐平,等.苦参药用植物组织培养技术[M].北京:中国农业科学技术出版社,2003:104-105.

(本文责编:王建连)