

延龄草无菌培养体系的建立及防褐变措施

陈吉裕, 张文玲

(重庆三峡职业学院, 重庆 404155)

[摘要] **目的:**对延龄草外植体的筛选及灭菌条件和培养基进行优化,降低污染率和褐变率,建立延龄草根茎无菌组织培养体系。**方法:**从延龄草子房、叶、茎、地下根茎、根尖5种材料中筛选出最适宜的外植体,考察多种药液交替灭菌和培养基中添加抗生素对降低组培污染率的影响,研究培养基中添加抗坏血酸(V_C),聚乙烯吡咯烷酮(PVP),活性炭对降低褐变率的效果。**结果:**地下根茎为延龄草组织培养最适宜的外植体,可采用紫外线照射30 min,800倍多菌灵浸泡30 min和0.2% $HgCl_2$ 处理20 min交替灭菌,培养基中添加 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 氨苄青霉素和 $1.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 活性炭可降低根茎组培污染率和褐变率。**结论:**建立了低污染率和褐变率的延龄草根茎无菌培养体系,为其他根茎类植物组织培养提供参考。

[关键词] 延龄草; 外植体; 污染; 褐变

[中图分类号] R282 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)05-0040-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016050040

Establishment of Sterile Culture System of *Trillium tschonoskii* and Control of Browning

CHEN Ji-yu, ZHANG Wen-ling

(Chongqing Three Gorges Vocational College, Chongqing 404155, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize the screening, sterilization and culture medium for explants of *Trillium tschonoskii*, reduce the pollution rate and browning rate, and establish an aseptic tissue culture system of *T. tschonoskii*. **Method:** Most suitable explants were selected from ovary, leaves, stems, underground rhizomes and root tips of *T. tschonoskii*, and the effect of a variety of drug liquid alternating sterilization and addition of antibiotics in medium were studied on the contamination rate. VitC (V_C), polyvinyl pyrrolidone (PVP) and activated carbon were added to the medium to study their effect on reducing the browning rate. **Result:** The underground rhizome of *T. tschonoskii* was the most optimum explants. It could be alternately sterilized with ultraviolet radiation for 30 min, 800 times of carbendazim soaking for 30 min, and processed with 0.2% $HgCl_2$ for 20 min. The medium supplemented with $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ampicillin and $1.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ activated carbon could reduce the contamination rate and browning rate of the rhizome tissue culture. **Conclusion:** The rhizome sterile culture system of *T. tschonoskii* has been established with low contamination rate and browning rate. It can provide reference for tissue culture of other rhizome-plants.

[Key words] *Trillium tschonoskii*; explants; pollution; browning

延龄草为百合科延龄草属的多年生根茎类草本植物,也称为头顶一颗珠,以根茎和果实入药^[1],主要药效成分为皂苷^[2-5],具有抗炎、镇痛、凝血、抗肿瘤等作用^[6-7],为名贵中药材,被称为土家族四大神药之一。主要分布在神农架自然保护区、恩施自治

州、长江三峡库区等地^[8]。

延龄草种子繁殖存在休眠长、萌发率低^[8-9]、耗时长等问题;根茎切割繁殖存在易感染、品种退化等现象。因此,目前药材市场上野生采挖是延龄草药材主要来源,但由于过度采挖已面临濒危困局^[9-12],

[收稿日期] 20151010(001)

[基金项目] 重庆市教委科学技术研究项目(KJ1403301)

[第一作者] 陈吉裕,博士,讲师,从事药用植物资源和栽培研究,Tel:13883150494,E-mail:chen-jiyu@163.com

组织培养是保存和繁殖延龄草,解决资源急需问题的主要途径之一,因此,延龄草组织培养已成为目前研究热点。

据报道,延龄草种子^[9,13],子房^[14-16],叶^[14-16],茎^[14-16],地下根茎^[14-16],根^[14-16],根尖^[15],芽^[16]均已作为外植体来研究延龄草愈伤组织的诱导,其中外植体筛选结果不很一致,有待进一步探讨。但已有报道中均出现污染率高和易褐变这 2 种现象。延龄草任一器官作为外植体培养中污染率均较高^[14,16-18],甚至地下根茎为外植体时易引起 100% 污染^[16],外植体取材时间与部位对污染率的影响未见相关报道。培养基中添加抗生素对污染材料进行抑菌处理已有初步研究^[19],但改良外植体灭菌方法从而降低组培污染率未见相关报道。延龄草组织培养中,愈伤组织诱导过程中外植体易产生褐变^[14-18],另外诱导形成的愈伤组织接种至新培养中也易褐变^[15],对于解决延龄草组培抑制褐变问题,目前未见相关报道。

本研究通过利用重庆巫溪红池坝的天然延龄草资源库,药材资源充足,进行延龄草外植体取材时间和适宜部位的筛选,研究降低污染率和褐变率的方法,建立污染率和褐变率低的延龄草无菌培养体系,为延龄草组织培养奠定基础,也为其他根茎类药材组培提供参考。

1 材料

新鲜延龄草分别于 2015 年 5~8 月每月初采自重庆市万州区红池坝自然景区(海拔 1 800 m 以上),经重庆三峡中药研究所副所长付韶智副教授鉴定为 *Trillium tschonoskii*^[20],将整个植株连根带土挖取,置于纸箱中带回实验室。

MS 培养基(上海伊卡生物技术有限公司, Lot# EKKS1497), 6-苄氨基腺嘌呤(6-BA, 上海伊卡生物技术有限公司, Lot# EKKS1549), 吲哚-3-乙酸(IAA, 上海伊卡生物技术有限公司, Lot# EKKS1565), 制霉菌素(Sigma, Exp2014/12), 氨基青霉素(Sigma, Exp2014/09), 聚乙烯吡咯烷酮-40(PVP)(Biosharp, 201409), 抗坏血酸(V_c , 天津市天力化学试剂有限公司), 多菌灵(江苏华美园艺有限公司), 聚山梨酯-20(上海强顺化学试剂有限公司, 20140827)。

SW-CJ-1BU 超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司), UPT-11-20T 台式超纯水机(四川优普超纯科技有限公司)。

2 方法

2.1 外植体的处理

取完整无损伤的延龄草植株,

用自来水冲洗干净,分别取地上茎、叶片、子房、根尖、地下根茎为外植体。将地上茎、叶片、子房用洗洁精溶液轻抹表面,自来水冲洗干净后用滤纸吸干备用。根尖(新鲜完整幼嫩)和地下根茎用纱布包裹自来水冲洗 30 min,后浸泡于洗洁精溶液 10 min 并用细毛刷刷洗表面,自来水冲洗干净后用滤纸吸干备用。

2.2 外植体灭菌方法

将外植体置于 75% 乙醇中处理 30 s,用无菌水清洗 1 次后转移至 0.2% $HgCl_2$ 溶液中(加 1 滴聚山梨酯-20),并不断摇晃,其中地上茎、叶片、子房处理时间均为 6 min,根尖处理时间为 10 min,根茎处理时间为 20 min。再用无菌水冲洗 4~5 次,每次摇晃 2 min,用无菌吸水纸吸干后待用。

2.3 接种培养

将叶片切成 1 cm × 1 cm 的见方小块;子房对半切开;地上茎切成 2 cm 长的茎段;切取带根尖的 2 cm 长根段;地下根茎需切除表面组织,再切成顶端、中部、底端 3 部分,每部分再切成 0.5 cm 厚小块。将各组织块接种于培养基 MS + BA 2.5 mg · L⁻¹ + IAA 1.5 mg · L⁻¹ + 蔗糖 3% + 琼脂 0.6% (pH 5.8), 20~25 °C 培养 30 d,每 7 d 观察 1 次。

2.4 根茎组培防污染方法

将根茎用以上灭菌方法处理,并设置 15, 20, 25, 30 min 4 个处理时间。另外,除了用升汞灭菌外,还予紫外线照射,10% NaClO, 800 倍多菌灵溶液进行不同组合交替灭菌处理。其中,紫外线照射表面灭菌在其他方法前进行;800 倍多菌灵浸泡时需不断搅拌,且在 0.2% $HgCl_2$ 和 10% NaClO 溶液灭菌前使用。每个处理 3 次重复,每个重复 3 个根茎,每个根茎切除表面组织后再切成 0.5 cm 厚小块。

在培养基 MS + BA 2.5 mg · L⁻¹ + IAA 1.5 mg · L⁻¹ + 蔗糖 3% + 琼脂 0.6% (pH 5.8) 中分别添加不同浓度(50, 100, 150 mg · L⁻¹)的制霉菌素和氨基青霉素。将 0.2% $HgCl_2$ 处理 20 min 后的外植体接种至相应的培养基中,每个处理 3 次重复,每个重复 3 个根茎,每个根茎切成 0.5 cm 厚小块。培养 14 d 后观察其污染情况。

污染率 = 污染的组织块数 / 接种的组织块总数 × 100%

2.5 根茎组培防褐变方法

将灭菌处理后的外植体接种于基于 MS + BA 2.5 mg · L⁻¹ + IAA 1.5 mg · L⁻¹ + 蔗糖 3% + 琼脂 0.6% (pH 5.8) 分别添加有不同浓度的 V_c , 活性炭和 PVP 的培养基中,加对照共 10 个处理,每个处理 3 次重复,每个重复 3 个

根茎,每个根茎切除表面组织后切成 0.5 cm 厚小块。培养 30 d 后观察其褐变情况。

$$\text{褐变率} = \frac{\text{褐变的组织块数}}{\text{接种的组织块总数}} \times 100\%$$

3 结果与分析

3.1 不同外植体消毒效果比较 分别以延龄草的地下根茎、根尖、茎、叶、子房 5 种器官为外植体灭菌后进行培养,1 个月后观察发现,其中根尖和子房易消毒处理,无污染,培养过程也未发生褐变,但两者未产生愈伤组织;地上茎和叶不易消毒处理,污染率和褐变率较高,且两者均未产生愈伤组织;地下根茎在只用 HgCl₂ (加 1 滴聚山梨酯-20) 处理 20 min 时,污染率较高,达到 44.43%,但褐变率明显比茎和叶的褐变率低,且在培养 2~3 周后产生浅黄色紧实的愈伤组织。因此,延龄草的地下根茎是最适宜的外植体。见表 1。

表 1 延龄草不同外植体比较

Table 1 Culture results of different explants of *Trillium tschonoskii*

外植体	接种数	污染率/%	褐变率/%	愈伤组织
根茎	36	44.43	27.78	+
根尖	80	0	0	-
茎	120	27.50	72.50	-
叶	100	25.00	82.00	-
子房	30	0	0	-

注:“+”表示产生愈伤组织,“-”表示未产生愈伤组织。

3.2 延龄草根茎不同取材时间和部位组培情况比较 从 5 月(旺盛生长期)到 8 月(倒苗期、生长衰退期)取材的延龄草根茎作为外植体时,其组培污染率和褐变率均随着材料的老化而逐渐增加。因

表 3 延龄草根茎不同消毒方法效果比较

Table 3 Effects of different disinfection methods of rhizomes

试验号	消毒方法及处理时间/min				污染率 ($\bar{x} \pm s, n=3$)/%
	紫外线	800 倍多菌灵	0.2% HgCl ₂	10% NaClO	
1	-	-	15	-	71.48 ± 14.16a
2	-	-	20	-	44.43 ± 6.00c
3	-	-	25	-	40.27 ± 10.05c
4	-	-	30	-	39.26 ± 13.89c
5	30	-	25	-	36.57 ± 8.29cde
6	-	30	25	-	38.43 ± 13.94cd
7	30	30	25	-	31.21 ± 11.59de
8	-	-	-	25	53.70 ± 7.97b
9	-	-	25	25	31.11 ± 7.54de
10	30	30	25	25	30.20 ± 7.54e

注:75%乙醇处理时间均为 30 s;不同字母表示差异显著性(表 4~5 同)。

此,应采取生长旺盛期(5 月)的延龄草根茎作为外植体材料,另外,同一取材时间的地下根茎的顶端(芽端)的组培污染率和褐变率最低,底端(根端)的组培污染率和褐变率最高。因此,当外植体材料充分时,接种时在切除表面组织的同时,可切除根端部分,再切成适宜大小进行接种。见表 2。

表 2 根茎不同取材时间和部位组织培养情况

Table 2 Culture results of different parts of rhizomes in different sampling time

取材时间	根茎部位	污染率/%	褐变率/%
5 月	顶端	41.67	16.67
	中部	41.67	25.00
	底端	50.00	41.67
6 月	顶端	41.67	16.67
	中部	58.33	33.33
	底端	66.67	50.00
7 月	顶端	50.00	25.00
	中部	66.67	41.67
	底端	75.00	58.33
8 月	顶端	50.00	33.33
	中部	66.67	41.67
	底端	83.33	66.67

3.3 根茎组培防污染效果比较 地下根茎是诱导愈伤组织最适宜的外植体,但也存在污染率高的问题。改良灭菌方法是降低污染率的方法之一。从表 3 可见,除 75%乙醇外仅用 HgCl₂ 灭菌时,处理时间为 15 min 的污染率与处理 20,25,30 min 的污染率差异显著,但后三者的差异性不显著,因此 HgCl₂ 处

理时间延长至 20 min 即可,时间过长反而增加 HgCl₂ 的毒害作用。试验 3~6 差异不显著,即在 0.2% HgCl₂ 灭菌 25 min 前增加紫外线照射 30 min 或用 800 倍多菌灵溶液浸泡 30 min 对降低污染率无显著效果,但同时增加该两种方法则相反,因为试验 3 与试验 7 是有显著差异的。试验 9 与试验 10 无差异性,说明根茎用 0.2% HgCl₂ 灭菌和 10% NaClO 交替处理时,增加紫外线照射和多菌灵溶液浸泡对降低污染率无影响。试验 7 和试验 9 差异不显著,且污染率均较低,说明该两种方法均能降低污染率,是比较合适的延龄草根茎灭菌方法。见表 3。

为进一步解决根茎组培污染问题,在培养基中添加适量抗生素类物质。与对照相比,添加氨苄青霉素和制霉菌素均可明显降低根茎组培中的污染率。其中,添加有氨苄青霉素抑菌效果比添加有制霉菌素的效果明显。抗生素使用质量浓度在 100,150 mg·L⁻¹ 的结果差异不显著,因此这两者抗生素的使用均为 100 mg·L⁻¹。另外,培养过程中发现抗生素添加量过大会引起组织块生长缓慢的现象。因此,延龄草根茎组培培养基中可添加氨苄青霉素 100 mg·L⁻¹ 以降低污染率。见表 4。

3.4 几种防褐变方法效果比较 在培养基中分别添加 V_c, 活性炭和 PVP 均可明显降低延龄草根茎

表 4 培养基中添加不同质量浓度抗生素的污染率比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Anti-pollution effect of medium supplemented with different concentrations of antibiotics ($\bar{x} \pm s, n=3$) %

质量浓度 /mg·L ⁻¹	氨苄青霉素	制霉菌素
0 (ck)	44.45 ± 11.95a	44.45 ± 11.95a
50	25.95 ± 16.03b	28.97 ± 10.39b
100	11.77 ± 8.85c	18.38 ± 10.24c
150	9.79 ± 7.67c	16.24 ± 1.84c

组培种的褐变率。培养基中添加 V_c 为 10,20 mg·L⁻¹ 时的褐变率差异不显著,但与 40 mg·L⁻¹ 的结果差异显著,因此 V_c 的适宜添加量为 40 mg·L⁻¹。培养基中添加活性炭为 1.0,1.5 g·L⁻¹ 时与对照相比差异性显著,即可明显降低褐变率,但这两者本身之间差异不显著,因此活性炭的适宜添加量为 1.0 g·L⁻¹。同理,培养基中添加 PVP 的适宜质量浓度也为 1.0 g·L⁻¹。结果显示 3 种添加成分的抑制褐变效果差异不是很明显,但相对来说,其中活性炭防褐变效果最好,V_c 次之,PVP 效果最差。从操作方便、经济节约角度考虑,培养基中添加 1.0 g·L⁻¹ 的活性炭可减弱延龄草根茎组培的褐变情况。见表 5。

表 5 延龄草根茎防褐变效果比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Comparison of anti-browning effects for rhizomes of *Trillium tschonoskii* ($\bar{x} \pm s, n=3$)

V _c		活性炭		PVP	
质量浓度/mg·L ⁻¹	褐变率/%	质量浓度/g·L ⁻¹	褐变率/%	质量浓度/g·L ⁻¹	褐变率/%
0 (ck)	27.78 ± 11.95a	0 (ck)	27.78 ± 11.95a	0 (ck)	27.78 ± 11.95a
10	22.69 ± 6.27ab	0.5	23.32 ± 4.46a	0.5	24.91 ± 4.46a
20	17.68 ± 7.46bc	1.0	16.42 ± 10.02b	1.0	17.98 ± 11.92b
40	12.85 ± 3.22c	1.5	10.31 ± 7.89b	1.5	14.85 ± 5.30b

4 讨论

试验发现,5 种材料中仅根茎诱导产生愈伤组织,这与柳俊^[14],胡天印等^[15]的结果不同。取生长旺盛期(5 月初)的延龄草植株最好,此时接种的外植体污染率和褐变率较低,这与柳俊^[14]4 月上旬取材的结果亦不同。延龄草为多年生草本植物,生长环境为高寒地区,其地下根茎与土壤充分接触,所携带的微生物复杂,组织培养污染严重,目前已有的报道中污染率均在 50% 以上,李群^[16]以地下根茎为外植体污染率高达 100%。延龄草根茎组培过程中常出现无色或浅黄色黏性的物质,且部分污染情况出现在培养 2 周后。本试验通过大量摸索,将多药

剂交替浸泡表面灭菌与培养基添加抗生素相结合的方法明显降低污染率,延龄草根茎组培污染率仅 11.7%,是目前已有报道中最低。

组培中污染问题与外植体消毒方法相关。李群等^[12,16]和胡天印等^[15]仅使用 HgCl₂ 处理消毒,本试验将紫外线照射、广谱性杀菌剂、消毒剂相结合首次探讨延龄草地下根茎灭菌问题。最终筛选得到的 2 种根茎灭菌方法:法一,将处理后的根茎放于紫外线下杀菌 30 min,中间翻动几次,浸泡于 800 倍多菌灵溶液,并不断搅拌,无菌水冲洗 1 次后,75% 乙醇浸泡 30 s,再用无菌水冲洗 1 次,转移至 0.2% HgCl₂ 溶液(加 1 滴聚山梨酯-20),晃动 20 min;法二,75%

乙醇浸泡 30 s 后, 0.2% HgCl_2 溶液(加 1 滴聚山梨酯-20)处理 20 min, 再用 10% NaClO 处理 20 min。但试验过程中发现用 10% NaClO 处理后的根茎表面软化严重, 对材料有严重损伤。因此, 第一种灭菌方法更适用于愈伤组织的诱导, 且该法亦适用于其他根茎类的灭菌。

本试验除改良灭菌方法外, 再结合培养基中添加抗生素类物质来进一步降低污染率。其中培养基中添加氨苄青霉素比制霉菌素对降低污染率效果大。李群^[16]对延龄草组培过程中的微生物进行分离, 发现大部分是由于其携带的内生菌引起的, 且多为细菌的结果相对应。但李群等^[19]的研究中氨苄青霉素的用量为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时处理一般, 而增加至 $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 效果较好, 而本试验中添加 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 已达到明显抑制效果。

解决组织培养过程中的褐变是组培成功的关键之一。本试验初步探索了 V_c , 活性炭, PVP 这 3 种常见褐变抑制剂对抑制延龄草组织块褐变情况的影响, 取得了较好的效果。另外, 初代接种 1 周后将组织块更换至新培养基, 也可降低褐化率。分析延龄草组培褐变的原因有: 延龄草最佳外植体为根茎顶端带芽的幼嫩部位, 灭菌处理时间长, 对其伤害较大; 根茎中部及底端材料较老, 为从种子萌发到取材为止的多年茎段, 酚类物质积累较多。对于 V_c , 活性炭或 PVP 相互配合抑制褐变可作进一步研究。

[参考文献]

[1] 赵卉, 宋超, 李红, 等. 白花延龄草不同药用部位中氨基酸含量及组成对比分析[J]. 特产研究, 2015, 37(3): 47-51.

[2] 贾兰婷, 杨尚军, 白少岩. 延龄草根及根茎化学成分研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(6): 99-102.

[3] 高昕, 黄仟照, 江雨霖, 等. 不同产地延龄草中延龄草总皂苷的含量测定[J]. 西北药学杂志, 2015, 30(3): 234-236.

[4] 张忠立, 左月明, 王彦彦, 等. 延龄草根及根茎的化学成分研究[J]. 中草药, 2013, 36(11): 1779-1782.

[5] 贾兰婷. 头顶一颗珠的化学成分研究[D]. 济南: 济南大学, 2014.

[6] 喻玲玲, 邹坤, 汪鋆植, 等. 延龄草提取物抗炎、镇痛和凝血作用的研究[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(5): 1178-1180.

[7] 喻玲玲, 邹坤, 汪鋆植, 等. 延龄草总皂苷体内外抗肿瘤作用研究[J]. 中药材, 2008, 31(5): 733-736.

[8] 刘继永, 邵财, 张浩. 濒危物种白花延龄草的生物学特性调查研究[J]. 人参研究, 2014, 26(1): 36-37.

[9] 熊丹, 陈发菊, 梁宏伟, 等. 珍稀药用植物延龄草的体细胞胚诱导研究[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(32): 10316-10317.

[10] 胡天印, 钱丽华. 延龄草濒危机理及其保护策略[J]. 湖北农业科学, 2009, 48(8): 1945-1947.

[11] 李拴, 周凤琴, 李志勇, 等. 土家族七药延龄草质量与资源保护研究概况[J]. 辽宁中医杂志, 2012, 39(3): 511-514.

[12] 李群, 肖猛, 郭亮, 等. 四川省珍稀濒危植物延龄草遗传多样性分析[J]. 北京林业大学学报, 2005, 27(4): 1-6.

[13] 左彩莲. 重楼属和延龄草属的种子比较胚胎学研究[D]. 昆明: 云南大学, 2015.

[14] 柳俊. 延龄草组织培养研究[J]. 中国中药杂志, 1998, 23(9): 522-524.

[15] 胡天印, 钱丽华, 刘汉卿. 濒危植物延龄草愈伤组织诱导研究[J]. 浙江师范大学学报: 自然科学版, 2006, 29(3): 326-329.

[16] 李群. 濒危植物延龄草(*Trillium tschonoskii*)的遗传多样性研究[D]. 成都: 四川大学, 2004.

[17] 唐荣华. 重楼属植物的组织培养和分子系统学研究[D]. 成都: 四川大学, 2003.

[18] 陈吉裕. 延龄草组织培养研究进展[J]. 北京农业, 2015, 34(6): 65-66.

[19] 李群, 王丽. 濒危植物延龄草初代培养中无菌培养物的建立[J]. 四川师范大学学报: 自然科学版, 2014, 37(4): 585-588.

[20] 张嫚, 李志勇, 廖朝林. 民族药头顶一颗珠的文献考证与鉴定[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(10): 2504-2506.

[责任编辑 邹晓翠]