

· 中 药 材 ·

用组织培养方法繁殖龙胆草

浙江医学研究院药物研究所 张治国 严 霄

提要 本文报道了由龙胆草萌发再生植株的培养条件。实验结果表明：龙胆草不定芽和苗增殖及生长的适宜培养基是MS，附加玉米素0.5毫克/升，蔗糖浓度为3—5%。0.2%二甲亚砜可加快试管苗的生长。MS培养基附加吲哚丁酸2毫克/升、激动素0.5毫克/升，可诱导生根。关于试管苗移栽成活率和成本问题，有待进一步研究。

龙胆草(*Gentiana Scabra Bunge*)是一种常用中药，具有清肝胆实火、除下焦湿热功效，需要量较大^[1]。长期来由于盲目采挖、毁林种粮等原因，野生资源急剧下降，供需矛盾突出。近年来黑龙江、辽宁、浙江等省开展了野生变家种的研究，其繁殖方法一是采挖野生苗分根繁殖，二是用种子繁殖。前者繁殖系数低，后者因种子小(千粒重24—27毫克)，育苗较难，且实生苗很小，两种繁殖方法都不理想。我们从1982年开始，试图用组织培养方法繁殖龙胆草，获得一些效果。现将实验结果报道如下。

材料及方法

实验用材料为龙胆草种子、早春刚萌发的芽以及叶片。种子经0.1%升汞消毒、无菌水冲洗后置培养基上。芽、叶片处理方法同上。诱导器官分化采用两种基本培养基：MS、B₅(B₅培养基的大量元素，余均照MS)，蔗糖浓度为3%，水解乳蛋白(LH)为500毫克/升。附加不同种类和浓度的植物激素：玉米素(Z)、6-苄基腺嘌呤(BA)、激动素(KT)、萘乙酸(NAA)及吲哚丁酸(IBA)。蔗糖试验浓度分别为1%、3%和5%。二甲亚砜(DMSO)浓度为0.2%。培养温度为25℃，白天用日光灯照光9—10小时。试验温度采用

白天为20℃，夜间为13—14℃。

结果与讨论

一、龙胆草无性繁殖系的建立

在附加KT 4毫克/升、NAA 0.5毫克/升的MS培养基上培养叶片，可发现其主脉上再生出小苗，叶片切口产生愈伤组织。无菌种子在上述培养基上可萌发成小苗。我们继代培养的无性系是从地下根茎刚萌发出的芽获得的。在附加BA 4毫克/升、NAA 0.5毫克/升的N₀培养基和附加KT 5毫克/升、NAA 0.25毫克/升的MS培养基上，它们的芽都伸长成小苗，将这无菌苗切段再置于不同培养基上培养，发现在附加玉米素2毫克/升的B₅培养基上，形成大量(约几十棵)丛生苗，且基部形成硬块状结构，其内有许多不定芽，称为不定芽结节。从继代培养表明，这种不定芽结节繁殖苗很快。

二、不同植物激素对器官分化的影响

为促进不定芽的增殖和苗的生长，试验了在MS培养基中分别加入Z、BA、KT三种细胞分裂素，浓度均为0.5毫克/升。试验结果见表1。

试验结果表明，玉米素对龙胆草不定芽的增殖和苗的生长活性最强(图1)。

三、不同培养基对苗生长的影响

表1 不同细胞分裂素对器官分化的影响

细胞分裂素	器官分化		
	苗	根	不定芽结节
Z	丛生苗多、且高	无或极个别	硬块较大
BA	丛生苗少、较矮	每丛苗下4—5条根	硬块小
KT	与BA相似	与BA相似	硬块小

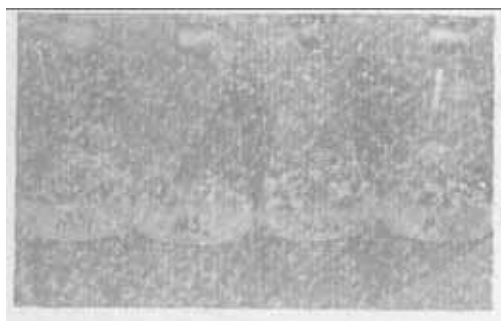


图1 不同细胞分裂素与附加二甲基亚砷对苗生长的影响

MS₁: MS+Z0.5, MS₂: MS+BA0.5, MS₃: MS+K0.5, MS₄: Z0.5+DMSO0.2%

在保持其它培养条件相同的情况下,比较测定生长在MS和B₅培养基上的试管苗,前者苗生长速度明显加快,当其苗高为5厘米时,在B₅培养基上的苗高仅2厘米(图2)。所用的MS和B₅培养基,其中微量元素、有机附加物以及植物的激素都是相同的,但其大量元素含量不同,尤以氮的含量差异最大,MS培养基氮的含量为60mM,而B₅培养基仅27mM,由此可知龙胆草试管苗的生长需要较高的氮源。

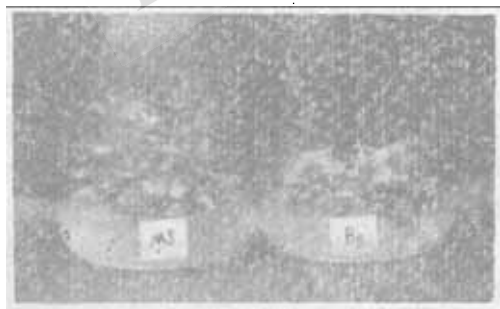


图2 在MS和B₅培养基上苗生长情况

四、蔗糖浓度对苗生长的影响

在1%蔗糖的培养基上,苗生长很慢,培养近2个月,其苗高仅1.5厘米,且叶片小,质薄、皱起或下垂,呈淡绿色。看来1%蔗糖浓度对苗的生长是不够的。如培养在含3%或5%蔗糖的培养基上,其苗高已达6厘米左右,可以转移。含5%蔗糖的培养基上的苗,茎较粗、叶片挺立,叶质较厚。因此,可知龙胆草培养需要较高的碳源。蔗糖浓度以3—5%为宜(图3)。



图3 不同蔗糖浓度对苗生长的影响

MS₁: 蔗糖1%, MS₂: 蔗糖3%, MS₃: 蔗糖5%

五、二甲基亚砷的效应

据资料^[2]指出,一般说来,DMSO与生理活性物质结合,能促进其吸收和转移到植物体内。考虑到玉米素价格昂贵,加入DMSO可能提高植物对玉米素的利用效率,从而减少使用浓度。试验表明,在培养基中添加0.2%的DMSO,可以加快苗的生长速度(图1)。

六、根的诱导

将无菌苗切取4—5节的切段,转移到附加NAA或IBA的 $\frac{1}{2}$ MS培养基上(即MS培养基的成分稀释一倍)培养发现,NAA和IBA的成根效应对苗生长的影响是不同的。当NAA 1—2毫克/升时,不能或很少使切段基部形成根,且苗生长很差,其苗高仅2厘米;而附加IBA 2毫克/升时,苗高可达7—8厘米,且在基部长出5—10条须根、但无根毛。NAA 2毫克/升与KT 1毫克/升

组合时,在近培养基表面的茎和叶上形成具有根毛的肉质根。当IBA 2毫克/升与KT0.5毫克/升组合时,试管苗生长及生根都较好。

七、温度对苗生长的影响

试管苗培养在昼夜25℃恒温或白天20℃、夜间13—14℃的温度下,结果表明在25℃恒温下,试管苗生长快得多,当其试管苗已长到6—7厘米高时,昼夜变温条件下培养的试管苗高仅2厘米左右(图4)。在25℃恒温下试管苗的长成需1个半月时间,而在较低温度下,试管苗延迟到3—4个月才长成。



图4 不同温度条件下苗生长情况

T₁: 25℃ T₂: 白天20℃夜间13—14℃

八、试管内不定芽繁殖苗,可能成为龙胆草快速繁殖的一个途径。

龙胆草试管苗的繁殖材料,可以用无菌苗切段和不定芽结节两种。试验发现用不定芽结节切块接种,形成的试管苗较多,苗生长快,而且基部形成的不定芽结节大。在相同条件下,接苗段者仅2厘米高,而接不定芽结节切块者,苗已7—8厘米高,且丛生

苗多(图5)。因此,将不定芽结节作为继代繁殖无菌苗的材料,而切下的苗段转移至生根培养基上,以诱导生根,形成完整植株供移栽。



图5 接种材料不同苗生长情况

M₁: 接二块不定芽结节 M₂: 接三段苗切段

初步研究表明,用组织培养方法繁殖试管苗、繁殖率高、速度快,一个100毫升的三角烧瓶可成苗几十株,约二个半月为一周期。试管苗一开始就是直立茎,具5~6对真叶,而用种子繁殖的实生苗,第一年只有2—4对真叶,并呈莲座状,第二年才直立。所以如移栽成活得好,可使生长期提前。为使试验成果应用到实际药材生产中去,还需解决试管苗移栽成活率和降低试管苗成本等问题。

参 考 文 献

- [1] 中国医学科学院药物所: 中药志,第二版,第二册,307—316,人民卫生出版社
- [2] Т. Н. Руте, Р. Г. Бутенко, Х. А. Маурина: Физиология Растений, 25(3):556—563, 1978