

东北龙胆茎段组织培养的研究

孙天国, 沙 伟

(齐齐哈尔大学 生命科学与工程学院 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

摘 要:以东北龙胆茎段为外植体,以 MS 为基本培养基,添加不同浓度的 BA 及 NAA,筛选诱导不定芽及生根的最佳培养基。结果表明:以 70%酒精处理 60 s+0.1%升汞处理 10 min,成活率可达 97.5%;以 MS+BA 3.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L 为不定芽诱导培养基,诱导率可达 94.44%,试管苗在 1/2MS+IBA 0.5 mg/L 生根培养基平均生根率为 94.74%。

关键词:东北龙胆;茎段;组织培养

中图分类号:S 567.23 .9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)05-0148-03

东北龙胆(*Gentiana manshuica* Kitagawa)为龙胆科龙胆属多年生草本植物,以根入药,有“清肝胆实火,除下焦湿热”之功能,可治疗多种疾病^[1]。东北龙胆在抗旱性、抗病性、光合效率、经济系数以及药材质量上明显优于其它龙胆。由于原植物生物学特性特殊、自我更新周期长,加上大规模开荒和掠夺式采挖,导致东北龙胆野生资源枯竭。但国内外市场对龙胆草的需求量呈逐年上升趋势。据统计,每年国内外需求量为 1 200 t 左右,而野生的龙胆草年产量仅 200 t^[2]。利用组织培养进行快速繁殖不但可以节省大量的资金,而且还可使东北龙胆的生长、发育避免受到外界环境的影响,大大缩短了育苗周期,具有重要现实意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为东北龙胆。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体消毒 于 5 月中旬取田间刚刚萌动的地上茎,去掉鳞叶和嫩叶后流水冲洗 12 h,在无菌条件下用 70%酒精杀菌 60 s,再转入 0.1%HgCl 或 3%NaClO 中灭菌,时间分别为 5、10、15、20、25 min,最后用无菌水冲洗 5~6 次,统计污染率和存活率。

1.2.2 不定芽诱导 为寻求芽分化的最适培养基的激素组合,在 MS 培养基上设立了 15 种激素组合,分别对外植体进行不定芽分化培养。其中 BA 含量 1.0、2.0、3.0、

4.0、5.0 mg/L 共 5 水平, NAA 含量 0.1、0.3、0.5 mg/L 共 3 个水平,共计 15 个处理组合(见表 1)。调节培养基的 pH 值在 5.8 左右。在 $(25 \pm 1)^{\circ}\text{C}$,光照强度为 3 000 lx,光照时间 16 h/d,诱导外植体生芽。所有组合均在 30 d 后统计分化率(分化率% = 外植体分化数/外植体成活数 $\times 100$)和每茎段平均分化芽数,重复 10 次。

1.2.3 根的诱导 将分化产生高约 1.0~2.0 cm 的不定芽,转入生根培养基进行生根培养。试验方案如下:以 MS 和 1/2 MS 为基本培养基,分别添加不同浓度的 IBA (0.1、0.3、0.5 mg/L)和 NAA (0.1、0.3、0.5 mg/L),组成 12 种培养基,每个组合接种 10 瓶,30 d 后统计生根率(生根率% = 生根株数/成活株数 $\times 100$)和每株平均生根数,研究适合生根的最佳培养基。

2 结果与分析

2.1 不同灭菌剂对东北龙胆外植体灭菌效果的影响

材料的灭菌是植物组织培养的首要环节,它既要求将外植体表面微生物彻底杀死,又要求尽可能少地伤害外植体组织和细胞^[3]。其中次氯酸盐是一种强氧化剂,在水中形成次亚氯酸,分解后形成盐酸和新生态的氧,具有极强的氧化性,故具有杀菌作用。它灭菌处理后易于去除,不留残毒,具有杀菌力强、低毒、价廉等优点,是组培工作者喜欢选用的杀菌剂之一;升汞是重金属杀菌剂, Hg^{+} 可与带负电荷的蛋白质结合,使菌体蛋白变性,酶失活,从而起到杀菌作用。从表 1 可以看出,2 种杀菌剂随着灭菌时间的延长,外植体的无污染率均呈现出先升高后降低的趋势。在 0.1%的 HgCl 中灭菌 15 min 时污染率为 0,但死亡率较高,使得成活率下降。灭菌时间为 10 min 时,虽有少数污染,但成活率达到 97.5%。3% NaClO 灭菌时间在 5~25 min 内都有不同程度污染,灭菌 10 和 15 min 成活率最高为 87.5%。所以东北龙胆茎段最佳的灭菌方法:70%酒精杀 60 s+0.1% HgCl 灭菌 10 min。

第一作者简介:孙天国(1966-),男,硕士,副教授,黑龙江肇源县人,现主要从事植物组织培养生理研究工作。E-mail: stg1966@163.com。

通讯作者:沙伟(1963-),女,黑龙江齐齐哈尔人,博士,教授,现从事植物遗传学和植物生态学研究。E-mail: shw1129@163.net。

收稿日期:2009-12-01

表 1 不同消毒方法对茎段灭菌效果的影响

灭菌试剂	接种数/个	灭菌时间 /min	污染数 /个	死亡率/个	污染率/%	成活率/%
0.1%升汞	40	5	24	0	60	40.0
	40	10	1	0	2.5	97.5
	40	15	0	3	7.5	92.5
	40	20	0	7	0	82.5
	40	25	0	9	0	77.5
3%NaClO	40	5	22	0	55	45.0
	40	10	5	0	12.5	87.5
	40	15	2	3	5	87.5
	40	20	1	6	2.5	82.5
	40	25	1	11	2.5	70.0

2.2 激素种类对茎段丛生芽诱导的影响

从试验结果得出,芽的诱导与BA和NAA 2种激素的配比密切相关。从表2看出,3种NAA浓度的平均分化芽数为,2.56、2.13和1.05个,通过方差分析显示,

表 2 不同激素和浓度对茎段丛生芽诱导的影响

培养基	外植体个数/个	外植体成活数/个	外植体分化数/个	再生芽数/个	分化率/%	每茎段平均分化芽数/个
MS+BA 1.0+NAA 0.1	40	33	30	92	90.90	2.78
MS+BA 1.0+NAA 0.3	40	34	31	68	91.17	2.00
MS+BA 1.0+NAA 0.5	40	38	30	41	78.95	1.08
MS+BA 2.0+NAA 0.1	40	35	29	96	82.86	2.74
MS+BA 2.0+NAA 0.3	40	36	25	84	69.44	2.33
MS+BA 2.0+NAA 0.5	40	32	20	31	62.50	1.95
MS+BA 3.0+NAA 0.1	40	36	34	114	94.44	3.16
MS+BA 3.0+NAA 0.3	40	36	22	102	61.11	2.83
MS+BA 3.0+NAA 0.5	40	32	20	41	62.50	1.28
MS+BA 4.0+NAA 0.1	40	36	19	87	52.78	2.41
MS+BA 4.0+NAA 0.3	40	35	16	65	45.71	1.85
MS+BA 4.0+NAA 0.5	40	34	30	32	88.24	0.94
MS+BA 5.0+NAA 0.1	40	30	21	52	70.00	1.73
MS+BA 5.0+NAA 0.3	40	28	18	46	64.29	1.64
MS+BA 5.0+NAA 0.5	40	0	0	0	0	0

表 3 NAA 和BA 对茎段丛生芽诱导的方差分析

激素种类	浓度/mg * L ⁻¹	平均数±标准差
NAA	0.1	2.56±0.54 ^a
	0.3	2.13±0.47 ^a
	0.5	1.05±0.70 ^b
BA	1.0	1.953±0.85 ^{ab}
	2.0	2.34±0.40 ^{ab}
	3.0	2.42±1.00 ^a
	4.0	1.73±0.34 ^{ab}
	5.0	1.12±0.97 ^b

注:表中同列数据后不同小写字母表示差异显著(P<0.05)。

2.3 不同培养基对生根的影响

在一定激素浓度下虽然MS培养基也能诱导根原基的形成,并有部分根的出现,与1/2MS培养基中相比生根效果不理想,在MS培养基中平均生根为6.52个,而1/2MS培养基中生根为9.12个,通过t测验显示二者之间差异显著(见表5)。说明1/2MS培养基培养的东北龙胆

0.1 mg/L与0.5 mg/L, 0.3与0.5 mg/L 差异显著(P<0.05),0.1与0.3 mg/L 无差异。说明0.1 mg/L和0.3 mg/L的NAA浓度对芽分化诱导效果明显。BA浓度对芽分化也有一定影响,当BA浓度为3.0 mg/L每茎段平均分化芽数最多为2.42,当BA浓度为5.0 mg/L每茎段平均分化芽数最少为1.12。方差分析显示二者差异显著(见表3)。虽然NAA浓度为0.1 mg/L和0.3 mg/L时对芽的诱导效果相近,但从表2看出,当0.1 mg/L NAA与3.0 mg/L BA组合时不但有较高的不定芽分化率94.44%,而且茎段平均分化芽数最多为3.16个。较低浓度的NAA与合适浓度的BA配比,有较高的芽分化率。培养基激素的种类和浓度对以东北龙胆茎段为外植体进行丛生芽的诱导的作用显著,诱导东北龙胆芽的最佳培养基为MS+BA 3.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L。

表 4 不同培养基对生根的影响

培养基+激素 /mg * L ⁻¹	处理数/个	存活数/个	生根数/个	生根率/%	平均根数/个
MS+NAA 0.1	40	21	16	76.19	4.6
MS+NAA 0.3	40	20	14	70.00	4.1
MS+NAA 0.5	40	24	17	70.83	6.5
1/2MS+NAA 0.1	40	26	20	76.92	8.9
1/2MS+NAA 0.3	40	31	25	80.64	8.6
1/2MS+NAA 0.5	40	33	28	84.85	9.3
MS+IBA 0.1	40	24	19	79.17	6.9
MS+IBA 0.3	40	26	20	76.92	7.4
MS+IBA 0.5	40	23	20	86.96	9.6
1/2MS+IBA 0.1	40	30	21	70.00	8.7
1/2MS+IBA 0.3	40	32	29	90.62	9.0
1/2MS+IBA 0.5	40	38	36	94.74	10.5

生根效果优于MS培养基培养的。NAA与IBA 2种激素对生根具有重要作用,研究表明,适当的浓度能够促进生根,从表4看出,2种激素加入到1/2MS培养基都

以高浓度 0.5 mg/L 生根效果最好,添加 0.5 mg/L NAA 生根率为 84.85%, 平均生根数 9.3; 而添加 0.5 mg/L BA 生根率为 94.74%, 平均生根数 10.05, 所以东北龙胆生根最佳培养基为 1/2MS+IBA 0.5 mg/L。

表 5 不同培养基对生根诱导的显著性检验

培养基种类	平均数±标准差	t	t _{0.05 10}
MS	6.52±1.99	-2.994	2.228
1/2MS	9.12±0.70		

3 讨论与结论

该试验中外植体的最佳灭菌方法是 70%的酒精中浸泡 60 s,再用 0.1%的 HgCl₂ 灭菌 10 min 时成活率较高。安永辉^[4]等在研究草原龙胆的无性快繁,邢震^[5]在研究蓝玉簪龙胆茎段组培时认为 0.1%的 HgCl₂ 灭菌 10 min 时达到最佳灭菌效果,所以龙胆草不同品种间的外植体灭菌方法基本相似。以往的研究表明,激素在植物组织培养中起着决定性作用。植物细胞具有全能性,但对于特定的器官或细胞能否表现出全能性则取决于是否具有合适的外源激素组合,只有细胞分裂素与生长素的合理配制才能有较高的诱导频率^[6]。通常细胞分裂素与生长素的比例较高,有利于芽的分化^[7],该试验选用芽诱导的培养基为 MS 加上激素 NAA 和 BA 不同浓度组合。BA 的主要作用是能刺激细胞分裂,诱导芽的分化。但 BA 浓度过大,可能会出现试管苗玻璃化。

NAA 的浓度不易过低,过低会降低芽的分化频率。所以该试验的最佳芽诱导培养基为 MS+BA 3.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L。组培试验经常应用 BA 和 NAA,在根的诱导和生长上作用强烈,且作用时间长,由于培养基中可能有氧化酶存在,所以在使用浓度上应相对较高。该试验中 BA 浓度为 0.5 mg/L 生根效果最好,与邢震^[5]的研究结果相似。生根效果 1/2MS 培养基优于 MS 培养基,其原因可能是 1/2MS 培养基降低无机盐浓度,促进了生根。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部) [M]. 北京: 化学工业出版社, 2000: 72-73.
[2] 丁立威. 东北龙胆草价升探因—东北三省龙胆草产销现状及后市浅析[J]. 中国现代中药, 2007, 9(6): 38-39.
[3] 及华, 温春秀, 高延厅. 洋桔梗的离体快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 1996, 32(6): 431-432.
[4] 安永辉, 田会倩, 魏健. 草原龙胆无性快繁体系的建立[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(32): 13962-13963, 13994.
[5] 邢震, 郑维列, 潘锦旭 等. 蓝玉簪龙胆茎段的组织培养技术[J]. 东北林业大学学报, 2000, 28(6): 93-94.
[6] 王景雪, 孙毅. 芸蓼属植物的组织培养和基因转化[J]. 山西农业大学学报, 1996, 16(3): 9-14.
[7] 刘晓庆, 沈源, 蔡小宁 等. 甘蓝型油菜下胚轴离体培养再生植株研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(31): 13547-13548, 13582.

Tissue Culture of Stem Segment of *Gentiana manshuica* Kitagawa

SUN Tian-guo, SHA Wei

(The Life Science and Engineering College Qiqihaer University, Qiqihaer, Heilongjiang, 161006)

Abstract: Stem segments of *Gentiana manshuica* Kitagawa were used as explants with MS as the basic medium. Add with different concentration BA and NAA, the best medium of induction on adventitious bud and rooting were selected. The results showed that the optimum disinfectant was 70% alcohol for 60 seconds and HgCl₂ for 10 minutes. The optimal medium for inducing adventitious bud was MS+BA 3.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L and the ratio of induction was 94.44%. The rooting culture medium was 1/2MS+IBA 0.5 mg/L and the ratio of rooting was 94.74%.

Key words: *Gentiana manshuica* Kitagawa; stem segment; tissue culture