

药用植物川东獐牙菜的组织培养

黄衡宇^{1,2}, 陈义光¹

(1. 吉首大学生物系, 湖南吉首 416000; 2. 云南大学生物系, 云南昆明 650091)

摘要: 针对川东獐牙菜野生资源受到严重破坏的情况, 系统地探讨了通过组织培养为手段进行人工繁殖的方法, 旨在为川东獐牙菜的保护提供坚实的理论依据。研究表明: 在所有的实验方案中, 幼茎和老叶是理想的外植体材料。对叶片来说, 较适宜的诱导愈伤组织的激素组合是 Zt1.0 mg/L+NAA0.05 mg/L+IBA0.05 mg/L、BA0.5 mg/L+2,4-D0.5 mg/L 或 BA0.2 mg/L+2,4-D0.2 mg/L+IBA0.1 mg/L; 对茎段来说, 较适宜的诱导愈伤组织的激素组合是 BA0.05 mg/L+kt0.05 mg/L+IBA0.05 mg/L; 诱导不定芽的适宜激素组合是 BA2.0 mg/L+NAA0.05 mg/L 或 BA2.0 mg/L+IBA0.1 mg/L; 而根的诱导则是 MS+BA0.05 mg/L+kt1.0 mg/L+NAA0.1 mg/L 或 MS+BA1.0 mg/L+kt0.3 mg/L+IAA0.5 mg/L 培养基上进行。

关键词: 川东獐牙菜; 组织培养; 愈伤组织; 芽丛; 生根

中图分类号: Q945 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2002)05-0433-04

Tissue culture of medical plant *Swertia davidii* Franch

HUANG Heng-yu^{1,2}, CHEN Yi-guang¹

(1. The Biology Department of Jishou University, Jishou 416000, China; 2. The Biology Department of YunNan University, Kunming 650091, China)

Abstract: In order to protect the natural resources of *Swertia davidii* Franch. which has been destroyed seriously, the method of artificial propagation by way of tissue culture has been systematically researched. The results showed that the mature stems and the immature leaves are the best material explants in speeding propagation in all of the experiments. As for leaves, the suitable phytohormone compositions to induct callus is Zt1.0 mg/L+NAA0.05 mg/L、BA0.5 mg/L+2,4-D0.5 mg/L+IBA0.05 mg/L or BA0.2 mg/L+2,4-D0.2 mg/L+IBA0.1 mg/L. As for stems, the suitable phytohormone compositions to induct callus is BA0.05 mg/L+kt0.05 mg/L+IBA0.05 mg/L. The suitable phytohormone compositions to induct adventitious buds is BA2.0 mg/L+NAA0.05 mg/L or BA2.0 mg/L+IBA0.1 mg/L, and that of induct roots is MS+BA0.05 mg/L+kt1.0 mg/L+NAA0.1 mg/L or MS+BA1.0 mg/L+kt0.3 mg/L+IAA0.5 mg/L.

Key words: *Swertia davidii* Franch; tissue culture; callus; adventitious bud; rooting

川东獐牙菜(*Swertia davidii* Franch)为龙胆科獐牙菜属(*Swertia*)多枝组多年生系草本植物^[1],又名水灵芝、鱼胆草、青鱼胆草、小板凳、小四方草等,

其性寒、味苦,有清热解毒、利胆健胃的功效,是我国的一种珍稀药材^[2]。在我省民间川东獐牙菜被广泛用来治疗黄疸型肝炎、痢疾、肺炎、扁桃体炎及妇

收稿日期: 2001-06-03

作者简介: 黄衡宇(1970-),男,江苏无锡人,理学硕士,现为云南大学生物系博士研究生,讲师,从事植物胚胎学研究。

基金项目: 湖南省教育厅资助项目(编号:00C191)

科炎症等。自 70 年代以来,一些科技及医务工作者先后对川东獐牙菜进行了专项研究、资源普查和临床观察等工作,证明了川东獐牙菜对菌痢、病毒性肝炎和宫颈炎的特殊疗效及广谱抗菌性,以及可能的抗癌、治癌作用^[3~6],展示了其广阔的开发利用前景。

然而,川东獐牙菜由于滥采过度,加之其生态环境的破坏及自然繁殖率低下,现野生种群已极为罕见。我国不少地方曾尝试地进行过人工引种栽培,但由于缺乏有关该类群生活史、有性生殖、无性繁殖及传粉生物学方面的资料,往往以失败而告终。国内也有不少学者研究了獐牙菜属其他植物的生物学特性^[7~12],但很少涉及到有关繁殖生物学的范畴。为有效地保护和利用这一我国特有的类群,有必要对该类群进行繁殖生物学研究,特别是通过组织培养为手段进行人工繁殖的研究,以期对其保护生物学、引种驯化及育种做出积极、有效的成绩。

表 1 不同激素组合对叶片诱导愈伤组织的影响¹⁾
Table 1 Effect of different phytohormone compositions on the callus induction

激素组合 (mg/L) Phytohormone composition	培养数 Tissues	愈伤组织形成数 Callus	出愈率 Inductivity (%)	生长量 Growth amount ²⁾
BA1.0+kt0.5+IBA0.1	125	36	28.8	+
BA0.2+kt0.1+IAA1.0	96	28	29.2	+
BA0.05+kt0.05+IBA0.05	137	46	33.6	++
BA0.5+2,4-D0.5+IBA0.05	87	76	87.4	+++
Zt1.0+NAA0.05	165	158	95.8	+++
BA0.2+2,4-D0.2+IBA0.1	117	106	90.6	+++
BA2.0+2,4-D1.0+NAA0.5	146	65	44.5	++
BA2.0+NAA0.5	65	0	0	-
BA1.0+NAA1.0	63	0	0	-

¹⁾污染数除外; ²⁾+少量; ++绿色,质地紧密; +++大量,表面有白色霜状组织层; -无。

1.3 培养基

基本培养基为 MS,附加不同浓度的 2,4-D(2,4-二氯苯氧乙酸)、BA(6-苄基腺嘌呤)、IBA(吲哚丁酸)、IAA(吲哚乙酸)、NAA(萘乙酸)、KT(激动素)和 Zt(玉米素),其浓度组合见下文。蔗糖 3%,琼脂 0.6%,用 0.1 NNaOH 和 0.1 NHCL 调节 pH 值为 5.8~6.0,在高压灭菌锅中(121 °C)灭菌 20 min。

2 观察结果

2.1 愈伤组织的诱导

外植体接种于诱导培养基上培养 1 周后,幼嫩茎尖切口处肿胀;2 周后,老茎段两段切口处肿胀;4 周后,幼叶从叶脉周围处肿胀开始形成愈伤组织。

1 材料与方 法

1.1 材料

材料为湖南省张家界市毛岩河沿岸采取的野生植株,带土移栽于吉首大学生态研究所试验地,取其嫩茎、叶和带芽茎段作为外植体。

1.2 方法

晴天取 3 种不同的外植体,按下列程序进行消毒:取材→自来水粗洗→5%洗衣粉水溶液漂洗 5 min→自来水冲洗 30 min→75%乙醇擦洗表面→0.1%升汞溶液中消毒 2 min→2%次氯酸钠中消毒 15 min→无菌水冲洗 4~6 次,然后在无菌工作台将外植体切成 0.5~1.0 cm 长的小段接种于诱导培养基上,将培养出来的愈伤组织切成小块,接种于增殖培养基上;最后将形成不定芽的块段移至生根培养基上,以培养出完整的小植株。以 7 d 为 1 周期。记录不同处理的生长状况。

2.1.1 不同外植体对愈伤组织发生的影响 不同的外植体材料对愈伤组织发生的影响不一样。实验表明:叶片诱导愈伤组织的能力最强,其次是幼嫩的茎尖,最差的是带芽的老茎段,诱导率几乎为 0。

2.1.2 不同激素组合对愈伤组织发生的影响 试验结果表明,以 MS 基本培养基添加不同激素组合,叶片、幼嫩茎、带芽茎段都能诱导出了愈伤组织,但能力及效果均有较大的差异。叶片的诱导能力最强,多种激素组合试验显示,对于叶片来说,较适宜的诱导愈伤组织的激素组合是 Zt1.0 mg/L + NAA0.05 mg/L、BA0.5 mg/L+2,4-D0.5 mg/L+ IBA0.05 mg/L 或 BA0.2 mg/L+2,4-D0.2 mg/L + IBA0.1 mg/L(表 1)。

幼嫩茎也能形成愈伤组织,但效果不如叶片好。多种激素组合试验显示,较适宜的诱导愈伤组织的激素组合是 BA0.05 mg/L+kt0.05 mg/L+IBA0.05 mg/L(表 2),但由幼嫩茎诱导的愈伤组织

随着培养时间的延长易褐变、衰老,不易做为继代培养的材料。

带芽老茎段同样也能少量地形成愈伤组织,但生长势小,几乎不分化出丛苗。但它的侧芽却都能

表 2 不同激素组合对幼嫩茎诱导愈伤组织的影响¹⁾

Table 2 Effect of different phytohormone compositions on the callus induction

激素组合(mg/L) Phytohormone composition	培养数 Tissues	愈伤组织形成数 Callus	出愈率 Inductivity(%)	生长量 Growth amount ²⁾
BA0.1+kt0.1+IBA0.1	65	43	66.2	++
BA0.2+kt0.1+IAA1.0	88	31	35.2	++
BA0.05+kt0.05+IBA0.05	99	93	93.9	+++
BA0.5+2,4-D0.5+IBA0.05	58	12	20.7	+
Zt1.0+NAA0.5	73	19	26.1	+
BA2.0+2,4-D1.0+NAA0.5	85	52	61.2	+
BA2.0+NAA0.5	93	0	0	-
BA1.0+NAA1.0	77	0	0	-

¹⁾污染数除外; ²⁾+少量; ++长势较旺盛,浅黄色,质地疏松; +++大量,长势旺盛,淡白色,较紧密; -无。

够生长,可以以类似“扦插”的方法进行繁殖。

2.2 继代培养

将不同外植体诱导出的愈伤组织转移到继代培养基中生长,发现有不同的情况:由叶片诱导出的愈伤组织很快就分化出不定芽,且长势旺盛;由带芽茎段生长出的侧芽进行培养,虽无从苗,但长势也较旺盛;而由幼嫩茎诱导出的愈伤组织在转瓶后不久便逐渐褐化死亡。不同激素组合对继代培养的影响也较大(表 3)。

表 3 不同激素组合对愈伤组织幼苗分化的影响

Table 3 Effect of different phytohormone composition on the seeding of callus

激素组合(mg/L) Phytohormone composition	芽丛诱导率(%) Frequency of root induction	不定根诱导率(%) Frequency of bud clump induction
BA1.0+NAA0.1	29.5	57.5
BA2.0+IAA0.5	56	23.5
BA2.0+NAA0.05	100	0
BA2.0+IBA0.1	100	5.8
BA3.0+NAA0.05	79.5	13.8

从表 3 中可以看出,在 BA 低浓度培养基中生长量较小,但不定根分化率较高;在 BA 高浓度培养基中生长量较大,但不定根的分化率较低。最佳的激素组合为 BA2.0 mg/L, NAA0.05 mg/L 或 BA2.0 mg/L, IBA0.1 mg/L, 在此组合的培养基中,生长量和增殖率均大,而几乎不产生不定根,这十分有利于继代培养。

2.3 生根

将诱导发生的不定芽接种于不同激素组合的

MS 培养基上,得到了较适宜的生根培养基配方: MS+BA0.05 mg/L+kt1.0 mg/L+NAA0.1 mg/L 或 MS+BA1.0 mg/L+kt0.3 mg/L+IAA0.5 mg/L(表 4)。

2.4 试管苗移栽

取出不定根诱导出来的试管苗,小心洗尽残余培养基后移栽到经 0.1% 甲醛消毒的细河沙中,保温保湿培养 28 d(温度 200~250 °C,湿度 80%左右),再移入沙土中培养,待小苗长出 4~5 片小叶便可移栽至大田。

3 讨论

(1)组织培养中通常以茎尖进行愈伤组织的诱导^[13~15],但从川东獐牙菜的培养来看,叶片却是最好的诱导材料。不仅材料易得,而且培养的效率也较高。

(2)愈伤组织的诱导需要较高水平的生长素。其中,2,4-D 是最普遍使用而有效的生长素。本实验结果表明诱导川东獐牙菜愈伤组织,培养基内添加生长素是必要的,而且以 2,4-D 浓度较高诱导效果更好。关于细胞分裂素对愈伤组织诱导的作用很多,6-BA 或 KT 明显抑制愈伤组织的形成,细胞分裂素能提高愈伤组织诱导频率及促进细胞胚胎发生。本实验观察到 KT 不仅对愈伤组织诱导有明显促进作用,而且可改善愈伤组织的质量,有利于致密愈伤组织的诱导。因此,兼用生长素和 KT 增效作

用更明显,可大大提高诱导率。比较 Kt 加 2,4-D 和 KT 加 NAA 或 IBA 的效果后,2,4-D 浓度较高,有利于愈伤组织诱导,而 NAA 的浓度低效果明显。看来,能否有效地脱分化而产生愈伤组织,除了与培养基,外植体有关外,更重要的是受培养基中所加入的生长调节物质种类及浓度的影响。从川东獐芽菜不同激素组合的诱导培养基配方中可以看出,Kt 或 2,4-D 在外植体愈伤组织的诱导中是不可避免的,但单独使用效果也不理想。对叶片来说,较适宜

的诱导愈伤组织的激素组合是 Zt1.0 mg/L + NAA0.05 mg/L + IBA0.05 mg/L, BA0.5 mg/L + 2,4-D0.5 mg/L 或 BA0.2 mg/L + 2,4-D0.2 mg/L + IBA0.1 mg/L,对茎段来说,较适宜的诱导愈伤组织的激素组合是 BA0.05 mg/L + kt0.05 mg/L + IBA0.05 mg/L。

(3)在川东獐芽菜的继代培养中,由幼嫩茎尖诱导出的愈伤组织不但不易分化出不定芽,而且随着培养时间的延长易褐变、死亡,几乎不能做为继

表 4 不同激素组合对根系分化的影响¹⁾

Table 4 Effect of different phytohormone compositions on the differentiation of rooting

激素组合(mg/L) Phytohormone composition	培养数 Tissues	愈伤组织形成数 Callus	出愈率 Inductivity(%)	生长量 Growth amount ²⁾
BA1.0+IBA0.1	60	26	43.3	++
BA0.2+IAA1.0	58	28	39.6	++
NAA0.5+IBA0.5	78	55	70.5	++
BA0.05 +Kt1.0+NAA0.1	87	87	100.0	+++
BA1.0+Kt0.3+IAA0.5	67	67	100.0	+++
IBA0.1	53	22	41.5	+
NAA0.5	46	21	45.6	+
BA2.0	77	2	2.6	-
BA1.0	63	3	4.8	-

¹⁾污染数除外;²⁾+少量,生长缓慢;++较多,生长迅速;+++大量,生长旺盛;一极少,几乎不生长。

代培养的材料。而由叶片诱导出的愈伤组织质地紧密,表面有白色霜状的组织层,易分化出不定芽,是理想的继代培养材料。有趣的是,与上述两种材料不同,带芽老茎段培养生长出的侧芽在继代中采用“扦插”的方式进行培养,繁殖系数也较高,表明川东獐芽菜的试管培养也能够用侧芽繁殖的方式进行。这与李启任对一些植物的组培研究类似^[16]。继代培养试验表明:适宜的激素组合是 BA2.0 mg/L + NAA0.05 mg/L 或 BA2.0 mg/L + IBA0.1 mg/L。

(4)对生根培养来说,添加 Kt 比仅用生长素的效果好得多。这表明 Kt 在川东獐芽菜的培养中不仅对愈伤组织的诱导有用,而且对根的分化也起作用,这与许多植物根分化的诱导不同^[17~18],其生理、生化机制还有待于进一步研究。生根培养试验表明:适宜的激素组合是 MS+BA0.05 mg/L + kt1.0 mg/L + NAA0.1 mg/L 或 MS + BA1.0 mg/L + kt0.3 mg/L + IAA0.5 mg/L。

(5)通过本研究笔者还发现,pH 值的大小对实验的成功与否是至关重要的。对川东獐芽菜来说,适宜的 pH 值范围为 5.8~6.0,低于这个范围或超

出这个范围都将影响样品的生长,主要表现为瓶苗叶片与培养基接触的地方发生肿大并逐渐死亡,或瓶苗基部“水化”。

参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(62卷)[M]. 北京: 科学出版社, 1988. 377-381.
 - [2] 中国医学科学院药用植物资源开发研究所. 中药志(第四册)[M]. 北京: 人民卫生出版社,
 - [3] 虞瑞生. 川东獐芽菜的成分研究[J]. 药学通报, 1983, 18(7): 50.
 - [4] 陈芳群. 水灵芝有效成分的初步研究[J]. 药检工作通讯, 1978, 8(5): 214.
 - [5] 田华泳. 水黄连中治疗急性病毒性肝炎 46 例疗效观察[J]. 湖南中医杂志, 1985, 02: 16-18.
 - [6] 湖南医科大学附二院肝病研究中心. 鱼胆草粉剂对急性腹泻的疗效观察[M]. 1997.
 - [7] 何廷农, 薛春迎, 等. 红直獐芽菜的胚胎学[J]. 西北植物学报, 1999, 19(1): 76-80.
 - [8] 薛春迎, 何廷农. 四数獐芽菜的胚胎学及其系统学意义[J]. 植物分类学报, 1999, 37(3): 259-263.
- (下转第 432 页 Continue on page 432)

- H. B. K. on germination and growth of weed species [J]. *Plant soil*, 1993, **157**(1): 107—113.
- [22] 曾任森, 林象联, 骆世明, 等. 螳螂菊的生化他感作用及生化他感物质的分离鉴定[J]. *生态学报*, 1996, **16**(1): 20—27.
- [23] 马敬能, 孟 沙, 张佩珊, 等. 中国生物多样性保护综述[M]. 北京: 中国林业出版社, 1998. 20.
- [24] 王震洪, 段昌群, 起联春, 等. 我国桉树林发展中的生态问题探讨[J]. *生态学杂志*, 1998, **17**(6): 64—68.
- [25] Simberloff D, Stiling P. How risky is biological control[J]. *Ecology*, 1996, **77**(7): 1965—1974.
- [26] Savidge J A. extinction of an island forest avifauna by an introduced snake [J]. *Ecology*, 1987, **68**: 660—68.
- [27] Rodda G H, Fritts T H, Chiszar D. The disappearance of Guam's wildlife; new insights for herpetology, evolutionary ecology, and conservation [J]. *Bio-science*, 1997, **47**: 565—574.
- [28] Steadman D W. Prehistoric extinctions of Pacific Island birds: biodiversity meets zoo archeology[J]. *Science*, 1995, **267**: 1 123—1 131.
- [29] Suarez A V, Bolger D T, Case T J. Effects of fragmentation and invasion on native ant communities coastal southern California [J]. *Ecology*, 1998, **79** (6): 2 041—2 056.
- [30] 国家环境保护局. 中国生物多样性国情研究报告 [M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1998. 53.
- [31] Berger J J. Ecological restoration and nonindigenous plant species: a review [J]. *Restor Ecol*, 1993, **2** (4): 74—82.
- [32] Child L E, Wall L C D, Wade P M, et al. Control and management of Reynoussia species (Knotweed) [J]. *Asp Appl Biol*, 1992, **29**: 295—307.
- [33] Kaiser J. Stemming the tide of invading species [J]. *Science*, 1999, **285**(17): 1 836—1 841.
- [34] 陆庆光. 论生物防治在生物多样性保护中的重要意义[J]. *生物多样性*, 1997, **2**(3): 224—230.
- [35] 蒲蛰龙. 害虫生物防治的原理和方法(第二版)[M]. 北京: 科学出版社, 1984. [36] Malakoff D. Fighting fire with fire [J]. *Science*, 1999, **285**(17): 1 841—1 843.
- [37] Strong D R, Pemberton R W. Biological control of invading species—risk and reform [J]. *Science*, 2000, **288**(16): 1 969—1 970.
- [38] Pimental D. (letter). Biological control of invading species [J]. *Science*, 2000, **289**(11): 869.
- [39] Louda S M, Kendall D, Connor J, et al. Ecological effects of an insect introduced for the biological control of weeds [J]. *Science*, 1997, **277**(22): 1 088—1 090.

(上接第 436 页 Continue from page 436)

- [9] 李 鸣, 高光跃. 獐牙菜属和花锚属药用植物花瓣的扫描电镜研究及其分类意义[J]. *植物研究*, 1994, **14**(3): 63—266.
- [10] 陈家春, 黄先石. 7 种獐牙菜属植物花粉形态的研究[J]. *武汉植物学研究*, 1991, **9**(2): 112—114.
- [11] 何廷农, 薛春迎. 獐牙菜属植物的起源, 散布和分布区形成[J]. *植物分类学报*, 1994, **32** (6): 25—537.
- [12] 向凤宁, 李建军民. 高寒藏药——川西獐牙菜的组织培养研究[J]. *中草药*, 1996, (27): 492—495.
- [13] 谭文澄, 戴策刚. 观赏植物组织培养技术 [M]. 北京: 中国林业出版社, 1991.
- [14] White P R. A hand book of plant tissue culture [M]. New York: The Ronald Press, 1943.
- [15] Van Nieuwkerk J P. Thidiazuron stimulation of apple shoot proliferation in vitro [J]. *Hort Science*, 1986, **21**(3): 516—518.
- [16] 李启任. 植物生物工程学 [M]. 昆明: 云南大学出版社, 1993.
- [17] 黄衡宇, 李 鹂, 杨胜辉. 芦荟的组织培养 [J]. *吉首大学学报*, 2000, **21**(3): 11—13.
- [18] 黄衡宇, 李 鹂, 杨胜辉. 非洲菊的组织培养 [J]. *吉首大学学报*, 2001, **22**(1): 4—6.