

滇龙胆丛芽高效诱导与植株再生体系的建立

席银凯¹, 王元忠², 黄衡宇^{1*}, 钱子刚¹

1. 云南中医学院 中药材优良种苗繁育工程研究中心, 云南 昆明 650500

2. 云南省农业科学院药用植物研究所, 云南 昆明 650200

摘要: 目的 以滇龙胆 *Gentiana rigescens* 带叶茎尖、带芽茎段、叶片、根为外植体, 建立滇龙胆高效、稳定的丛芽诱导体系, 筛选出适宜的植株再生途径。方法 以 MS 为基本培养基, 在单因素实验的基础上, 通过 $L_{16}(4^4)$ 正交及完全组合实验研究不同外植体和不同植物激素种类及其质量浓度对愈伤组织诱导、丛芽发生及植株再生的影响。结果 带芽茎段为间接器官发生最佳材料, 其在 MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 1.5 mg/L+KT 0.05 mg/L 中培养 10 d、节上腋芽开始萌发后, 基部可诱导出再分化能力极强的愈伤组织, 得愈率为 97.73%; 15 d 后愈伤组织开始分化出绿色丛芽, 分化率 100%; 30 d 后不定芽分化系数达 18.65, 增殖系数可达 63.58。带叶茎尖为直接器官发生最佳材料, 其在 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 1.0 mg/L+KT 0.5 mg/L 中培养 30 d 后, 增殖系数亦可达 44.36。2 种材料培养获得的试管苗茎细瘦弱, 不利于生根培养, 试管苗在 MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 1.5 mg/L+KT 0.05 mg/L+PP₃₃₃ 10 mg/L 中培养 60 d 后可获得健壮度大为改善的复壮苗。复壮苗生根则在 1/2 MS+6-BA 0.1 mg/L+NAA 2.0 mg/L 中进行, 45 d 后可获得生长健壮的再生植株, 生根率 100%。再生苗移栽成活率达 95% 以上。结论 建立的滇龙胆无性快速繁殖体系, 为保护滇龙胆野生资源、优质种苗繁育提供了有效途径, 也为其遗传转化研究奠定了实验基础。

关键词: 滇龙胆; 带芽茎段; 愈伤组织; 复壮培养; 无性快速繁殖体系; 植株再生体系

中图分类号: R282.21 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)06-1398-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.06.025

Efficient induction system of adventitious shoot and plantlet regeneration in *Gentiana rigescens*

XI Yin-kai¹, WANG Yuan-zhong², HUANG Heng-yu¹, QIAN Zi-gang¹

1. Engineering Research Center for Reproducing Fine Varieties of Chinese Medicinal Plants Yunnan University of Chinese Traditional Medicine, Kunming 650500, China

2. Institute of Medicinal Plants, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650200, China

Abstract: Objective An efficient and stable regeneration system was developed to select the optimal protocol for plant regeneration with various explants of *Gentiana rigescens*. **Methods** The study was designed as a $L_9(3^4)$ orthogonal experiment to explore the effects of different types and concentration of plant growth regulator combinations on adventitious shoot formation and plant regeneration, using different explants maintained on Murashige and Skoog (MS) medium after a single factor pre-experiment had been conducted. **Results** Stem with buds was the optimal explant for indirect organogenesis with a frequency of callus induction of up to 97.73% obtained on MS + 6-BA 1.5 mg/L + NAA 1.0 mg/L + KT 0.05 mg/L after 10 d with the axillary shoots starting to germinate along with the emergence of callus with a strong capacity of differentiation from the base; The callus started to generate green multiple shoots with a 100% rate after 15 d and a coefficient of differentiation in the clump shoot of 18.65. The multiplication coefficient was up to 63.58. However, the stem tip was the best explant for direct organogenesis with a propagation coefficient of up to 44.36 cultured on MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 1.0 mg/L + KT 0.5 mg/L 30 days later. The plantlet derived from two explants was too weak for rooting and the weak multiplication plantlet was maintained on MS medium supplemented with 6-BA 1.5 mg/L, NAA 1.0 mg/L, KT 0.05 mg/L, and PP₃₃₃ 10 mg/L to rejuvenation for 60 d. The regeneration plant with 100% rooting rate was obtained by culturing on 1/2 MS + 6-BA 0.1 mg/L + NAA 2.0 mg/L for 45 d and more than 95% of plantlets survived after transplanting. **Conclusion** The current study

收稿日期: 2017-10-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31260077, 81260608); 云南省自然科学基金重点项目 (2017FA049) 联合资助

作者简介: 席银凯 (1992—), 女, 本科, 从事药用植物学研究。E-mail: 1349987114@qq.com

*通信作者 黄衡宇 (1969—), 男, 博士, 教授, 主要研究方向为植物发育生物学。E-mail: hhyhy96@163.com

established a rapid propagation system which is helpful to protect the wild resources and high quality seedling propagation of *G. rigescens*, meanwhile providing scientific evidence for the research on genetic transformation.

Key words: *Gentiana rigescens* Franch. ex Hemsl; stem with buds; callus; rejuvenation culture; propagation system; transplanting system

滇龙胆 *Gentiana rigescens* Franch. ex Hemsl 为龙胆科 (Gentianaceae) 龙胆属 *Gentiana* (Tourn.) L. 多年生宿根草本植物, 又名坚龙胆、四叶胆、龙胆草、滇龙胆草、兰花根等, 主要分布于云南、四川、广西和贵州等地, 多生于海拔 1 350~2 500 m 向阳荒地、草坡和疏林^[1], 其中云南是其道地产区。《中国药典》2015 年版将滇龙胆与三花龙胆 *G. trifloral* Pall、条叶龙胆 *G. manshurica* Kitag、龙胆 *G. scabra* Bge. 并列为传统保肝中药龙胆的基原植物, 明确其根及根茎为入药部位^[2]。

植物化学和药理学研究表明滇龙胆含有环烯醚萜、裂环环烯醚萜、三萜、黄酮、龙胆苯甲酸酯等多类成分, 其中马钱苷酸、龙胆苦苷和当药苷具保肝、护肝活性, 是滇龙胆中主要资源性化学成分^[3]。滇龙胆是龙胆泻肝片、龙胆泻肝汤、龙胆注射液、泻肝安神胶囊等 100 多种中成药的主要原料, 仅在云南年需求量约 1 000 t^[4-6]。近年来由于市场对滇龙胆原料需求量的大幅增加, 加上生境不断遭到破坏, 导致滇龙胆野生种质资源锐减并逐渐匮乏, 部分道地产区现在已难觅其踪迹。目前, 滇龙胆已被列为国家重点保护野生药材物种 (3 级), 是云南省 10 个重要濒危药用植物之一^[6]。对滇龙胆展开人工快速繁殖研究, 进行基因型背景一致的工厂化种苗生产已势在必行。前人对滇龙胆的研究大多集中在化学成分、元素测定、种子萌发特性、居群生态学等方面, 人工繁殖、组织培养方面的研究仅有零星报道^[7-9]。本研究以滇龙胆不同器官为材料, 通过正交及完全组合实验建立滇龙胆丛芽高效诱导与繁殖技术体系, 筛选出适合工厂化规模生产的植株高效再生途径, 为保护其野生资源和种苗繁殖提供科学依据和有效途径, 也为其优良品种选育和遗传转化研究奠定了实验基础。

1 材料

滇龙胆植株于 2014 年 6 月采自云南省临沧市云县茶房乡响水村 (24°14'N, 100°13'E 及附近, 海拔 1 970 m), 移栽于云南中医学院中药材优良种苗繁育工程研究中心实验大棚中, 标本经云南省农业科学院药用植物研究所金航研究员鉴定为滇龙胆 *Gentiana rigescens* Franch. ex Hemsl。

2 方法

2.1 外植体的选择及消毒

选取生长健壮的滇龙胆植株, 分别取其带叶茎尖、带芽茎段、叶片和根为材料, 洗净后用 10% 洗衣粉溶液 (质量比) 浸泡 10 min 后流水冲洗 30 min, 置于超净工作台。75% 乙醇溶液 (体积比) 处理 3~5 s, 再经 0.1% 升汞水溶液 (质量比) 消毒 5 min (带叶茎尖和叶片)、8 min (带芽茎段)、10 min (根), 最后无菌水冲洗 6 次, 每次不低于 3 min, 备用。

2.2 培养基的配制

基本培养基为 MS, 蔗糖添加量为 3%, 琼脂 0.46%, pH 值 5.8~6.0。不同植物激素种类及其质量浓度组合添加入不同培养阶段培养基中, 培养基在 121 °C 灭菌 22 min。

2.2.1 预试验培养基 选用带芽茎段和叶片为外植体材料, 采用添加不同种类和不同质量浓度植物激素的 MS 培养基进行单因素预试验, 其中 2,4-D 和 KT 质量浓度分别为 0.05、0.1、0.5、1.0 mg/L; NAA、IBA 和 6-BA 质量浓度分别为 0.1、0.5、1.0、1.5 mg/L, 筛选适合滇龙胆离体培养的植物激素种类及其质量浓度范围。

2.2.2 愈伤组织诱导和芽丛发生培养基 根据启动培养结果, 以 4 种外植体为材料, 采用 L₁₆(4⁵) 正交试验, 正交因素为植物激素 6-BA、NAA、KT, 其组合见表 1。培养 30 d 后, 统计外植体愈伤组织诱导率和芽丛发生率。

表 1 不同外植体愈伤组织诱导 L₁₆(4⁵) 正交设计

Table 1 L₁₆(4⁵) orthogonal design for callus induction of different explants

水平	外植体	因素		
		6-BA/(mg·L ⁻¹)	NAA/(mg·L ⁻¹)	KT/(mg·L ⁻¹)
1	带叶茎尖	0.1	0.1	0.05
2	带芽茎段	0.5	0.5	0.10
3	叶片	1.0	1.0	0.50
4	根	1.5	1.5	1.00

2.2.3 复壮培养基 以增殖培养后的丛苗带叶茎尖和带芽茎段为材料, 在最适增殖培养基中附加多效唑 (PP₃₃₃) 进行复壮培养。PP₃₃₃ 质量浓度分别为 5.0、10.0、15.0、20.0 mg/L, 培养 60 d 后观察其生长状况并统计繁殖系数。

2.2.4 生根培养基 采用完全组合实验, 将试管苗接入添加不同质量浓度 6-BA 和 NAA 的 1/2 MS 培

培养基上，45 d 后统计生根率。

2.3 培养条件

培养室温度控制在 (22±1) °C，光照强度 1 500~2 000 lx，光照时间 10 h/d。

2.4 炼苗移栽

待幼苗长至 6~8 cm 高时，将生根瓶置于室温下炼苗 3 d 后，从培养基中取出幼苗，将残留培养基清洗干净，移栽至消毒后的腐殖质中保温保湿培养，30 d 后统计幼苗成活率及生长状况。

2.5 统计指标

按公式计算所测指标。所得数据采用 Excel 和 SPSS 19.0 软件处理分析。

愈伤组织诱导率 = 产生愈伤组织的外植体数 / 接种外植体总数

芽丛发生率 = 产生芽丛愈伤组织数 / 愈伤组织总数

丛芽增殖系数 = 增殖后的有效丛芽总数 / 起始接种总数

增殖系数 = 直接和间接器官发生有效转接数 / 起始接种总数

生根率 = 产生不定根的单苗数 / 接种单苗总数

3 结果与分析

3.1 愈伤组织诱导、芽丛发生和增殖培养

单因素预试验结果表明，6-BA、NAA 和 KT

较适合滇龙胆的离体培养。根据单因素各植物激素适宜的浓度水平，进一步以外植体类型 (A)、6-BA (B)、NAA (C) 和 KT (D) 为因素，进行 L₁₆(4⁵) 正交试验，40 d 后其愈伤组织诱导率和芽丛发生率的培养结果和极差分析见表 2，方差分析见表 3、4。

表 2 愈伤组织诱导率极差分析结果显示 $R_{\text{外植体}} > R_{6\text{-BA}} > R_{\text{KT}} > R_{\text{NAA}}$ ，说明对滇龙胆愈伤组织诱导来说，外植体为最主要的因素，带芽茎段为最适宜诱导愈伤组织的外植体 (表 3)；激素 6-BA， $B_4 > B_3 > B_2 > B_1$ ，说明水平 4 (1.5 mg/L) 较其他 3 个水平好，且具显著性差异 ($P < 0.05$) (表 3)；而激素 NAA 和 KT 各水平 K 值相差不大，对愈伤组织诱导效应无显著性差异 ($P > 0.05$) (表 3)。通过平均值分析，滇龙胆诱导愈伤组织的最适宜外植体为带芽茎段，最佳激素组合为 B₄C₄D₁，即 6-BA 1.5 mg/L + NAA 1.5 mg/L + KT 0.05 mg/L。

芽丛发生率极差分析 (表 2) 表明，外植体类型亦是愈伤组织再分化芽丛最主要的影响因子；除 NAA 外，其他 2 个因素极差均大于对照项 6.02，说明附加的 6-BA 和 KT 对芽丛发生的效应是可靠的，NAA 的效应则不可靠；各因素的影响大小依次为

表 2 不同外植体愈伤组织诱导和芽丛发生 L₁₆(4⁵) 正交试验结果

Table 2 Results of callus induction and adventitious shoots induction of different explants by L₁₆(4⁵) orthogonal test

编号	A	B/(mg·L ⁻¹)	C/(mg·L ⁻¹)	D/(mg·L ⁻¹)	E (误差)	愈伤诱导率/%	芽丛发生率/%
C01	带叶茎尖	0.1	0.1	0.05	1	36.58	26.38
C02	带叶茎尖	0.5	0.5	0.10	2	51.23	43.50
C03	带叶茎尖	1.0	1.0	0.50	3	63.32	56.32
C04	带叶茎尖	1.5	1.5	1.00	4	76.68	35.59
C05	带芽茎段	0.1	0.5	0.50	4	55.15	97.96
C06	带芽茎段	0.5	0.1	1.00	3	72.68	86.37
C07	带芽茎段	1.0	1.5	0.05	2	92.65	70.33
C08	带芽茎段	1.5	1.0	0.10	1	100.00	80.45
C09	叶片	0.1	1.0	1.00	2	15.75	18.50
C10	叶片	0.5	1.5	0.50	1	21.24	39.47
C11	叶片	1.0	0.1	0.10	4	36.66	22.85
C12	叶片	1.5	0.5	0.05	3	56.89	12.65
C13	根	0.1	1.5	0.10	3	1.29	0.00
C14	根	0.5	1.0	0.05	4	3.38	0.00
C15	根	1.0	0.5	1.00	1	4.37	0.00
C16	根	1.5	0.1	0.50	2	5.67	0.00
愈伤诱导	K ₁ 56.95	27.19	37.90	47.38	40.55		
	K ₂ 80.12	37.13	41.91	47.30	41.33		
	K ₃ 32.64	49.25	45.61	36.35	48.55		
	K ₄ 3.68	59.81	47.97	42.37	42.97		
	R ₁ 76.44	32.62	10.07	11.03	7.99		
芽丛发生	K ₁ 40.45	35.71	33.90	27.34	36.58		
	K ₂ 83.78	42.33	38.53	36.70	33.08		
	K ₃ 23.37	37.38	38.82	48.44	38.86		
	K ₄ 0.00	32.17	36.35	35.12	39.10		
	R ₂ 83.78	10.16	4.92	21.10	6.02		

表 3 愈伤组织诱导方差分析结果

Table 3 Variance analysis of callus induction

来源	III 型平方和	自由度	均方	F 值	显著性
A	1.290	3	0.430	82.52	$P < 0.05$
B	0.240	3	0.080	15.49	$P < 0.05$
C	0.023	3	0.008	1.49	$P > 0.05$
D	0.033	3	0.011	2.03	$P > 0.05$
E	0.016	3	0.005		

表 4 芽丛发生方差分析结果

Table 4 Variance analysis of adventitious shoots induction

来源	III 型平方和	自由度	均方	F 值	显著性
A	1.502	3	0.501	161.410	$P < 0.05$
B	0.021	3	0.007	2.301	$P > 0.05$
C	0.006	3	0.002	0.672	$P > 0.05$
D	0.091	3	0.030	9.789	$P < 0.05$
E	0.009	3	0.003		

$R_{\text{外植体}} > R_{\text{KT}} > R_{\text{6-BA}} > R_{\text{NAA}}$ 。芽丛发生方差分析结果(表 4)显示,外植体类型和 KT 各水平间对丛芽发生有显著影响 ($P < 0.05$),而 6-BA 和 NAA 各水平间则无显著影响 ($P > 0.05$)。通过平均值分析,带芽茎段所产生的愈伤组织为滇龙胆再分化芽丛的最佳来源,最佳激素组合为 $B_2C_3D_3$,即 6-BA 0.5 mg/L+NAA 1.0 mg/L+KT 0.5 mg/L。

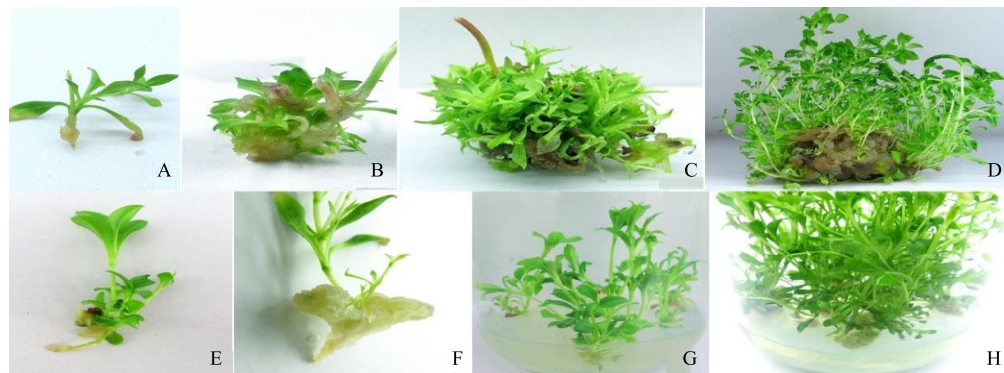
将正交试验培养材料切割为带叶茎尖和带芽茎段分别接入附加 6-BA 1.5 mg/L+NAA 1.5 mg/L+KT 0.05 mg/L 和 6-BA 0.5 mg/L+NAA 1.0 mg/L+KT 0.5 mg/L 的 MS 培养基中。结果发现,带芽茎段适合在 C17 培养基 (MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 1.0 mg/L+KT 0.05 mg/L) 中培养生长,可同时完成愈伤组织诱导、芽丛发生和丛生苗增殖过程。材

料在该培养基中培养 10 d、节上腋芽萌发生长后,其基部出现紧密的淡绿色愈伤组织(图 1-A),得愈率为 97.73%;15 d 后愈伤组织迅速生长并分化出致密芽丛(图 1-B),芽丛分化率 100%;20 d 后芽丛生长成为不定从芽(图 1-C),不定芽分化系数达 18.65;30 d 后随着基部愈伤组织的增殖生长,同时不断分化出新的芽丛,继而生长为丛苗,整个培养物呈簇状(图 1-D)。继代时可将其基部愈伤组织分割为小块,不定从苗则重复上述方法,增殖系数可达 63.58。

带叶茎尖则适合在 C18 培养基 (MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 1.0 mg/L+KT 0.5 mg/L) 中培养生长,在此培养基中随着茎尖的生长伸长,其下部节上休眠芽开始萌发生长,10 d 后休眠芽生长迅速,同时带叶茎尖基部产生分化能力较弱的、疏松的愈伤组织(图 1-E),偶见有不定芽的分化(图 1-F);20 d 后在茎尖、休眠芽生长的同时,各自茎节上的休眠芽或腋芽也不断萌发生长(图 1-G);培养 30 d 后形成簇状多枝多芽系统(图 1-H)。继代增殖时可将各枝带叶茎尖和带芽茎段分别剪下重复上述过程,增殖系数亦可达 44.36。

3.2 复壮培养

带叶茎尖或带芽茎段增殖培养后的不定从苗茎细而瘦弱(图 1-D、H),不利于下一步的生根培养。在 C17 和 C18 号培养基中添加不同质量浓度 PP₃₃₃,以带芽茎段为材料,采用完全组合实验,进行复壮培养。复壮培养结果(表 5)显示,在附加相同质量浓度 PP₃₃₃,C17 号培养基对滇龙胆试管苗的复壮效果明显优于 C18 号培养基。其中,以 C17



A-培养 10 d 后基部出现愈伤组织 B-培养 15 d 后愈伤组织开始分化不定芽丛 C-培养 20 d 后的不定从芽 D-培养 30 d 后的簇状培养物 E-培养 10 d 后休眠芽生长,基部出现疏松的愈伤组织 F-偶见愈伤组织有不定芽分化 G-培养 20 d 后的生长情况 H-培养 30 d 后形成的簇状多枝多芽系统
A-callusing at the basal portion of shoots after 10 d B-callus differentiated into adventitious shoots 15 d later C-adventitious shoots cultured for 20 d D-clustered cultures after 30 d E-dormant bud germinated 10 d later with friable callus from the base of shoots F-callus differentiated into adventitious shoots occasionally G-growth of culture after 20 d H-system of clustered multi-branches after 30 d

图 1 带芽茎段 (A~D) 在 C17 号培养基和带叶茎尖 (E~H) 在 C18 号培养基中的生长情况

Fig. 1 Culturing of stem with buds maintained on C17 (A—D) medium and stem tips incubated on C18 medium (E—H)

号培养基中附加 10 mg/L PP₃₃₃, 即 S02 号培养基: MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 1.5 mg/L+KT 0.05 mg/L+PP₃₃₃ 10 mg/L 复壮效果最好, 同时亦可保持较高的增殖系数 (18.65)。在此培养基中培养 20 d

后可见明显的丛芽生长 (图 2-A); 30 d 后丛苗生长健壮, 节上休眠芽不断萌发 (图 2-B); 40 d 后可形成粗壮的簇生丛苗 (图 2-C); 60 d 后可获得粗壮大为改善的复壮苗 (图 2-D)。

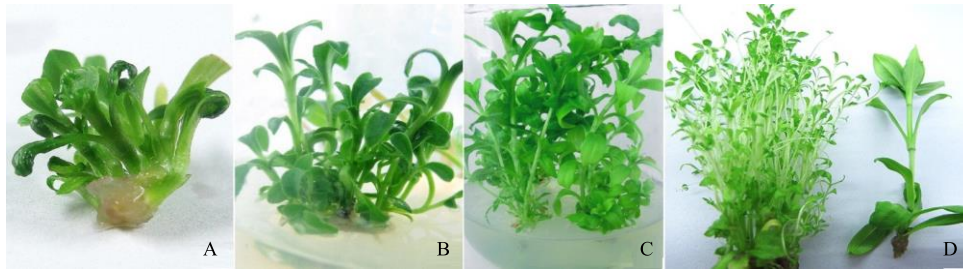
表 5 复壮培养结果

Table 5 Result of rejuvenation culture

编号	培养基	PP ₃₃₃ /(mg·L ⁻¹)	接种数*	增殖系数	生长状况
S01	C17	5	25	23.38 a	多愈伤, 丛苗分化量较大; 腋芽生长量较大; 苗较纤细
S02	C17	10	30	18.65 a	较多愈伤, 丛苗分化量大; 腋芽生长量大; 苗较粗壮
S03	C17	15	20	11.33 ab	较多愈伤, 丛苗分化量小; 腋芽生长量小; 苗粗壮
S04	C17	20	30	3.25 d	少愈伤, 无从苗分化; 腋芽生长缓慢; 苗生长缓慢、发黄
S05	C18	5	15	10.75 b	较多愈伤, 丛苗分化量小; 腋芽生长量较大; 苗瘦弱纤细
S06	C18	10	30	6.58 c	较多愈伤, 丛苗分化量较小; 腋芽生长量大; 苗较粗壮
S07	C18	15	25	5.32 c	少愈伤, 丛苗分化量较小; 腋芽生长量小; 苗粗壮
S08	C18	20	25	1.67 e	较少愈伤, 无从苗分化; 腋芽生长量较小; 苗生长极缓慢

*除去污染数的实际外植体数; 同列不同小写字母表示差异显著 (P<0.05), 表 6 同

*Excepting the numbers of pollution. Different lowercase letters in the same column indicated the significant difference at P<0.05, same as Table 6



A-培养 20 d 后的生长情况 B-培养 30 d 后丛芽生长为健壮的丛苗 C-培养 40 d 后形成粗壮的簇生丛苗 D-增殖苗 (左) 与复壮苗 (右)
A-growth after 20 d culture; B-multiple-buds grow into vigorous multiple-shoots after 30 d C-robust clustered-shoots after 40 d D-multiplication shoots (left) and rejuvenation shoot (right)

图 2 在 S02 培养基上的复壮培养

Fig. 2 Rejuvenation culture on S02 medium

3.3 生根培养及炼苗移栽

根据预试验结果, 以 1/2 MS 为基本培养基, 添加不同质量浓度 6-BA (0.1、0.5、1.0 mg/L) 和 NAA (0.5、1.0、2.0 mg/L) 进行完全组合实验, 45 d 后培养结果见表 6。

试管苗瓶内生根结果显示, 低质量浓度的细胞分裂素配合高质量浓度的细胞生长素使用宜于滇龙胆试管苗的生根培养。在 6-BA 质量浓度一定的情况下, 随着 NAA 质量浓度的增加, 根和苗的粗壮度呈现正比增长, 生根率也随之上升; 而 6-BA 质量浓度升高时, 试管苗基部出现愈伤组织, 再分化出不定根, 不定根细且韧性下降。实验表明, 适宜生根的培养基为 1/2 MS+6-BA 0.1 mg/L+NAA 2.0 mg/L, 经复壮培养后的试管苗在此培养基中, 15 d 基部切口处即有不定根发生 (图 3-A), 25 d 后可见不定根具明显生长量 (图 3-B), 45 d 后可获得根系粗壮发且生长健壮的生根苗 (图 3-C、D); 炼苗后移栽

表 6 不同质量浓度 6-BA 和 NAA 对试管苗生根培养的影响
Table 6 Effects of 6-BA and NAA at different concentration on rooting of plantlets

编号	6-BA/(mg·L ⁻¹)	NAA/(mg·L ⁻¹)	接种数*	生根率/%
对照	0.0	0.0	20	25.00 e
R01	0.1	0.5	45	46.67 d
R02	0.1	1.0	50	82.00 ab
R03	0.1	2.0	50	100.00 a
R04	0.5	0.5	40	47.50 d
R05	0.5	1.0	45	77.78 bc
R06	0.5	2.0	45	88.89 ab
R07	1.0	0.5	50	22.00 e
R08	1.0	1.0	45	33.33 de
R09	1.0	2.0	40	62.50 c

至腐殖质土壤中, 30 d 后即有新叶长出 (图 3-E), 成活率达 95%以上。



A-培养 15 d 后, 切口处直接产生不定根 B-25 d 后的不定根 C、D-45 d 后试管苗根系 E-移栽苗
A-adventitious root directly generated from the incision after 15 d B-adventitious root after 25 d C, D-root system of plantlet after 45 d E-transplanting plantlets

图 3 试管苗在 R03 培养基上的生根及生根苗移栽

Fig. 3 Plantlets maintained on R03 medium to rooting and transplanting of rooting plantlets

4 讨论

4.1 外植体类型对滇龙胆体外快繁的影响

在植物组织培养过程中, 由于植物细胞全能性, 从理论上说任何具有完整细胞核的植物细胞, 都拥有形成一个完整植株的潜力。但由于遗传和生理背景的差异, 不同植物、甚至同一植物不同器官、组织和细胞的分化及形态发生和构建能力各不相同。因此, 外植体的选择是植物组织培养成功与否的关键技术之一^[10]。在龙胆属组织培养已有的报道中选用的外植体有茎段^[11]、顶芽及腋芽^[8,12]和根^[13]。本研究选用的 4 种外植体中, 带芽茎段为滇龙胆最适宜的外植体材料, 其次为带叶茎尖; 叶片和根则不适合作为外植体。带芽茎段在培养过程中除了间接器官发生, 即基部产生再分化能力极强的愈伤组织, 继而在短时间内分化出大量芽丛外, 还具直接器官发生, 即可由节上休眠芽的萌发生长以“微扦插”方式进行繁殖; 带芽茎段可同时经间接器官发生和直接器官发生这 2 条途径进行增殖, 一个培养周期其增殖系数可达 63.58, 远远超过已有的报道^[7-9]。带叶茎尖在培养过程中尽管其愈伤组织量少, 芽丛发生率亦较低, 但亦可由“微扦插”形成簇状多枝多芽系统, 可作为直接器官发生的适宜材料。此外, 与一些具“芽繁芽”现象的物种不同^[14-16], 这些物种在芽丛生长为丛苗过程中, 基部愈伤组织不断增殖和分化, 重复重复进行“愈伤组织-丛芽-愈伤组织-丛芽”, 即所谓的“芽繁芽”过程。而滇龙胆无论是带芽茎段或带叶茎尖培养时, 最靠近培养基的 1 或 2 个节会膨大而陆续萌发出若干休眠芽, 产生类似“芽繁芽”的现象。

另一值得注意的现象是, 采用带芽茎段为外植体时, 节上腋芽萌发 10 d 左右其基部开始出现质地紧密、浅绿色具强再分化能力的愈伤组织, 产生 5 d

后随即分化出绿色丛芽, 这种现象说明滇龙胆带芽茎段愈伤组织诱导与其节上腋芽的萌发关系密切。推测滇龙胆幼嫩腋芽尖具合成愈伤组织发生所需的如内源生长素或其他生长调节物质的能力, 由于形态学上的向基性而导致比器官培养, 如茎尖培养, 更易于愈伤组织的产生。类似的现象在地皮消 *Pararuellia delavayana* (Baill.) E. Hossain^[17]、青叶胆 *Swertia mileensis* T. N. Ho & W. L. Shi^[18]、金铁锁 *Psammosilene tunicoides* W. C. Wu et C. Y. Wu 等物种中也存在。

4.2 PP₃₃₃ 与滇龙胆的复壮培养

滇龙胆增殖培养后的试管苗纤弱、瘦长, 严重影响其后的生根培养。本研究在马蹄莲体外快繁研究^[19]和相关文献报道^[20-22]的基础上, 在最适增殖培养基中添加不同质量浓度 PP₃₃₃ 进行滇龙胆的复壮培养。PP₃₃₃ 又名多效唑, 是常用的植物生长延缓剂 (growth retardant), 可抑制多种植物纵向生长并促进植物横向生长, 同时还能提高植株的抗逆性, 其作用方式主要通过抑制对贝壳杉烯酶活性的抑制而阻断赤霉素 GA 的生物合成, 从而使节间组织生长受抑制^[20-21]。

加入 PP₃₃₃ 进行滇龙胆的复壮培养后, 无论使用的质量浓度如何, 均可使试管苗株型矮化、叶片增厚、茎加粗, 但明显抑制了试管苗的生长速度, 且增殖系数大幅下降。2 种最佳增殖培养基相比, PP₃₃₃ 与较高质量浓度 6-BA 配合使用效果最好, 其质量浓度在 5~10 mg/L 内, 试管苗粗壮度在随浓度的升高而增大的同时, 尽管与未添加 PP₃₃₃ 的增殖培养相比繁殖系数明显下降, 但能保持满足工厂化育苗的增殖系数; 超过 15 mg/L 时, 愈伤组织增殖变缓、白色疏松化明显, 芽丛分化率降低, 丛苗生长缓慢、叶片发黄, 可能与 PP₃₃₃ 影响了植物体内生长素的含量有关。复壮培养结

果表明,在 C17 号培养基中添加 10 mg/L PP₃₃₃ 可使滇龙胆试管苗叶片变宽、茎变粗壮、株高降低,彻底改变了增殖后细长、瘦弱的株型,同时又保持了可以接受的增殖系数。PP₃₃₃ 的添加在滇龙胆的体外快繁中,对于促进试管苗健壮、提高生根率和移栽成活率等具有明显效果,亦可为滇龙胆试管苗的有序生产提供有效的化学调控措施。

4.3 滇龙胆无性快繁在其人工栽培及种质资源保存中的作用

目前,滇龙胆药源主要依靠其野生资源,其人工栽培国内刚起步,主要利用种子进行繁殖。而滇龙胆种子在自然条件下萌发,存在耗种量大、萌发率和幼苗成活率低等问题^[23-24],同时由于种子基因型不同导致出苗不整齐、成苗后有效成分含量参差不齐,因而在其人工驯化与规范化栽培上进展比较缓慢^[25-26]。已有的研究表明,滇龙胆表型形态多样性与其遗传多样性间存在较强的相关性,为其优良种质资源筛选提供便利^[27]。本研究利用植物组织培养技术对滇龙胆进行体外无性快繁,可利用其优良形态指标进行离体培养、保存,为实现滇龙胆野生优良种质资源可持续利用提供实验基础。同时,在筛选出优良高产的滇龙胆种质资源基础上,本研究结果在短时间内可提供大量基因型背景一致的优良种苗,从种质资源源头上保障其规范化种植,亦能解决目前因滇龙胆资源短缺和过度采挖造成的相关产业的生产瓶颈和生态环境破坏。

参考文献

- [1] 中国植物科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第 62 卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1988.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [3] Wang Y M, Xu M, Wang D, *et al.* Review on “Long-Dan”, one of the traditional Chinese medicinal herbs recorded in Chinese pharmacopoeia [J]. *Nat Prod Biopros*, 2012, 2(1): 1-10.
- [4] 张 勇, 蒋家雄, 李文明. 龙胆苦甙药理研究进展 [J]. *云南医药*, 1991, 12(5): 304-306.
- [5] 唐荣平, 苏汉林, 王建光, 等. 滇龙胆资源调查及繁殖特性研究 [J]. *山地农业生物学报*, 2012, 31(5): 460-463.
- [6] 张金渝, 沈 涛, 杨维泽, 等. 云南道地药材滇龙胆资源调查与评价 [J]. *植物遗传资源学报*, 2012, 13(5): 890-895.
- [7] 朱宏涛, 陈可可, 张颖君, 等. 坚龙胆的快速繁殖 [J]. *天然产物与开发*, 2004, 16(3): 222-224.
- [8] 罗春梅, 邱 路, 刘爱民. 不同激素组合对诱导滇龙胆顶芽及腋芽产生不定芽的研究 [J]. *楚雄师范学院学报*, 2005, 20(3): 49-52.
- [9] 赵志莲, 李海峰, 张德全, 等. 滇龙胆种质资源筛选及离体培养的初步研究 [J]. *北方园艺*, 2013, (8): 168-172.
- [10] 李浚明. 植物组织培养教程 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1996.
- [11] 孙天国, 沙 伟. 东北龙胆茎段组织培养的研究 [J]. *北方园艺*, 2010(5): 148-150.
- [12] 张 洁, 刘红美. 贵州产紫龙胆组织培养体系的建立 [J]. *湖北农业科学*, 2013, 52(17): 4250-4252.
- [13] 张彩霞, 李凤珍. 线叶龙胆组织培养研究 [J]. *现代园艺*, 2015(8): 7-9.
- [14] 丁 伟, 张立红, 潘晟昊, 等. 水半夏组培快繁体系的建立 [J]. *中草药*, 2011, 42(3): 585-588.
- [15] 黄衡宇, 王美蓉. 紫背金盘愈伤组织诱导与再生体系的建立 [J]. *中草药*, 2014, 45(9): 1313-1318.
- [16] 李 鹏, 龙 华, 高 洁, 等. 珊瑚樱丛芽高效诱导体系及植株再生研究 [J]. *中草药*, 2015, 46(9): 1360-1367.
- [17] 吕美萍, 王元忠, 黄衡宇. 地皮消愈伤组织诱导及植株高效再生体系的建立 [J]. *植物学报*, 2016, 51(1): 89-97.
- [18] 黄衡宇, 黄 骥, 王美蓉, 等. 青叶胆组织培养条件优化及不同交配方式子代植株再生能力比较研究 [J]. *中草药*, 2016, 47(3): 480-487.
- [19] 黄衡宇, 李 鹏. 彩色马蹄莲的组织培养 [J]. *西北植物学报*, 2010, 30(5): 1050-1056.
- [20] 黎建玲, 詹源庆, 蒋 波. 多效唑对金钗石斛试管苗生长的影响 [J]. *广西植物*, 2006, 26(5): 513-515.
- [21] 高凤菊, 汤忠梅, 王晓理, 等. PP₃₃₃ 在植物组织培养上的应用进展 [J]. *农业与技术*, 2002, 22(2): 66-69.
- [22] 翟宇瑶, 郭宝林, 程 明. 植物生长延缓剂在药用植物栽培中的应用 [J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(17): 2739-2744.
- [23] 杨美权, 杨维泽, 赵振玲, 等. 滇龙胆种子萌发特性研究 [J]. *中国中药杂志*, 2011, 36(5): 556-558.
- [24] 唐荣平, 苏汉林, 王先宏. 滇龙胆草种子萌发及育苗研究 [J]. *种子*, 2012, 31(11): 31-33.
- [25] 李智敏, 刘 莉, 李晚谊, 等. 滇龙胆的药用资源研究与开发进展 [J]. *云南大学学报: 自然科学版*, 2009, 31(S1): 485-487.
- [26] 杨美权, 杨 涛, 杨天梅, 等. 滇龙胆种子质量分级标准研究 [J]. *江苏农业科学*, 2011, 39(2): 363-364.
- [27] 杨 雁, 邵爱娟, 金 航, 等. 云贵高原滇龙胆不同居群形态特征变异研究 [J]. *中草药*, 2012, 43(8): 1604-1610.