

不同培养条件及方法对组培暗紫贝母生长的影响

蔡朝晖 高山林 徐德然 朱丹妮

(中药研究所)

关键词 暗紫贝母; 鳞茎培养; 生物碱

暗紫贝母 (*Fritillaria unibracteata* Hisao et K. C. Hsia) 是百合科植物, 其鳞茎为川贝来源之一, 具有清热润肺、化痰止咳、散结等功效。但由于它喜寒凉气候, 为高山、高原特有植物, 只能野生生长在 3000~3500 m 的高山上, 栽培很难成活^[1]。为了弥补野生资源的不足, 探讨药材生产新途径, 本文在文献^[2,3]研究的基础上, 拟对暗紫贝母培养的温度、光照及培养方法进行研究, 找出最佳的培养条件和方法, 从而得到生长迅速、生物碱含量高的暗紫贝母培养鳞茎。

1 材料和方法

1.1 材料

取自四川省阿坝地区红原县山区, 经我校生药学教研室徐国钧教授、李萍博士鉴定。

1.2 方法

1.2.1 无菌材料的获得 材料在流水下冲洗 30 min 后, 取鳞茎用 2% 次氯酸钠消毒 20 min, 无菌水冲洗 5 次, 切成直径为 0.5 cm 的小块接种到附加 6 BA 1 mg/L, IAA 1 mg/L 的 MS 培养基上, 蔗糖 3%, pH 5.8, 每天光照 12h, 获得无菌的小鳞茎。50 d 后进行继代繁殖。

1.2.2 不同培养条件的试验 在尽量保持继代培养的贝母丛生小鳞茎形状的情况下, 分切成约 0.5 cm 直径的小块接种到预先称重的附加激素的 MS 固体培养基上 (40 ml

培养基/瓶), 蔗糖 3%, pH 5.8, 再称重后分别置于 a. 15℃ 光照; b. 15℃ 黑暗; c. 20℃ 光照; d. 20℃ 黑暗; e. 25℃ 光照; f. 25℃ 黑暗条件下培养。其中光照培养强度为 600 Lux, 每天光照 12 h。

1.2.3 培养方法试验 进行三种方法试验: a. 固体培养; b. 摇床液体培养 (110 r/min); c. 转床液体培养 (9 r/min)。接种方法及培养基同前。接种后材料分别置于静置、摇床、转床上, 在 20℃ 光照条件下培养。

以上两个试验均在培养 50 d 后, 计算接种量、收获量、生长率、可增鲜重/升、折干率、可增干重/升, 生物碱含量、可产生物碱/升。计算方法见文献^[2]。生物碱含量的测定见文献^[3]。

对接种量、收获量、生长率均计算平均值和标准差 ($\bar{x} \pm SE$), 并对生长率进行方差分析, 比较各种处理间的差异。

2 试验结果

2.1 不同培养条件的试验

培养 15 d 左右即可看到原有的鳞茎长大, 并开始表面或边缘出现数个白色的小突起, 逐渐长成小鳞茎 (见图 1)。30 d 后进入快速生长期。暗培养材料比光培养材料的颜色略白。光培养条件下部分鳞茎长出带绿色茎、叶的完整植株 (见图 2)。材料培养 50 d 后收获, 结果见表 1。

对生长率进行了方差分析, 结果见表 2。

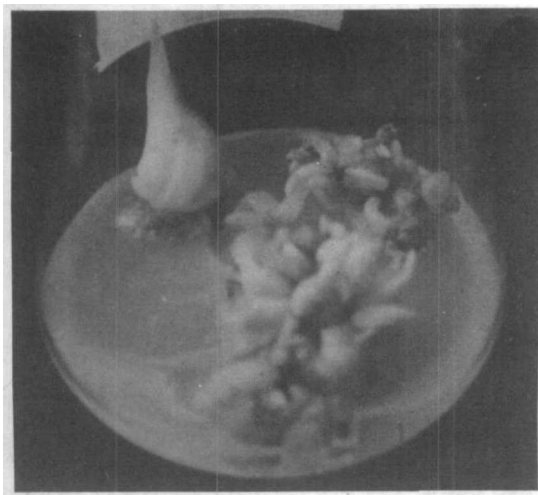


Fig 1. Cultured Bulbs derived from explant.

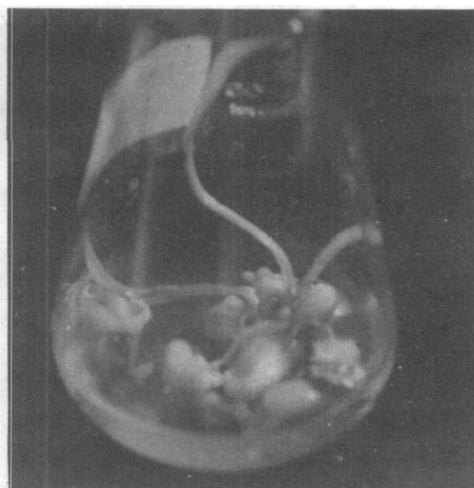


Fig 2. Plantlet derived from explant under light.

Tab 1. Experimental results of temperature and light

Condition	15℃ Dark	15℃ Light	20℃ Dark	20℃ Light	25℃ Dark	25℃ Light
n	14	16	16	24	17	14
Inoculated weight(g)	0.709±0.033	0.539±0.036	0.674±0.058	0.616±0.043	0.598±0.029	0.606±0.048
Harvested weight(g)	1.791±0.077	1.649±0.182	2.458±0.326	2.246±0.189	2.016±0.176	1.981±0.187
Growth rate ($\bar{x} \pm SE$)	2.579±0.142	2.996±0.196	3.588±0.247	3.638±0.210	3.456±0.324	3.351±0.254
Yield of fresh drug(g/L)	39.48	49.90	64.70	65.95	61.40	58.78
Rate of dry/fresh(g)	13.50	13.56	13.57	13.95	14.78	14.27
Yield of dry drug(g/L)	5.329	6.766	8.780	9.200	9.075	8.387
Content of alkaloid(%)	0.06326	0.05132	0.06327	0.06685	0.03495	0.02867
Yield of alkaloid(mg/L)	3.371	3.473	5.555	6.150	3.172	2.405

Tab 2. SSR test for growth rate among six combinations of temperature and light

Condition	Growth rate	Significance of difference	
		0.05	0.01
20℃ Light	3.638	a	A
20℃ Dark	3.588	a	A
25℃ Dark	3.456	a	AB
25℃ Light	3.351	a	AB
15℃ Light	2.996	ab	AB
15℃ Dark	2.579	b	B

表1、表2表明:20℃条件下的平均生长率为3.613,25℃条件下的平均生长率为3.404。无论是光培养还是暗培养,25℃条件下的生长率略低于20℃条件下的生长率,但差异不大,这与显著性测定结果相一致。在15℃低温条件下,生长率明显降低,光培养和暗培养的平均生长率仅为2.788,比20℃条件下下降23%。生长率显著性测定中,15℃光培养接近显著差异,15℃暗培养达到

极显著差异。光照和黑暗条件下生长率的差异不明显。表1中生物碱含量20℃时最高,平均为0.06506%,15℃时次之,平均为0.05729%,25℃时最低,平均仅为0.03181%,比20℃时下降51%,说明25℃条件下对生物碱累积影响不利,而15℃时光照或黑暗培养对生物碱累积影响不大。每升培养基可产生生物碱数量以20℃时最高,平均为5.853 mg,15℃和25℃时都较低,分别为3.422 mg和2.789 mg。20℃条件下分别比15℃和25℃条件下增加71%和110%,差别悬殊。因此20℃是贝母鳞茎培养最适当温度,其中光培养又略优于暗培养。

2.2 不同培养方法试验

培养条件为20℃光培养,接种方法及生长情况同前,所得结果见表3。生长率显著性测定结果见表4。

Tab 3. Experimental results of different cultural methods

Method	Solid culture	Rotation culture	Shake culture
n	24	21	18
Inoculated weight(g)	0.616±0.043	0.695±0.042	0.630±0.028
Harvested weight(g)	2.246±0.189	2.333±0.225	2.913±0.146
Growth rate ($\bar{x} \pm SE$)	3.638±0.210	3.311±0.195	4.769±0.312
Yield of fresh drug(g/L)	65.95	57.78	94.23
Rate of dry/fresh(%)	13.95	11.93	12.58
Yield of dry drug(g/L)	9.200	6.893	11.854
Content of alkaloid(%)	0.06685	0.05025	0.06753
Yield of alkaloid(mg/L)	6.15	3.464	8.005

Tab 4. SSR test for growth rate among different cultural methods

Method	Growth rate	Significance of difference	
		0.05	0.01
Shake culture	4.769	a	A
Solid culture	3.638	b	B
Rotation culture	3.311	b	B

表3表明:摇床上培养材料生长得最快,固体培养次之,转床上生长得最慢。表4表明固体和转床之间的差异不显著,但它们与摇床间的差异极显著。生物碱含量以摇床最高,为0.06753%;固体培养次之,为0.06685%;转床上的最低,为0.05025%。按每升培养基计算生物碱也以摇床最高,为8.005 mg,比固体培养基(6.150 mg)上的高30%,比转床上(3.464 mg)的高131%。综上所述,摇床培养无论是生长率还是生物碱含量均高于固体培养和转床培养。

3 讨论

暗紫贝母自然生长在高海拔冷凉山区,

其正常生长发育需要较低的温度^[1]。组织培养虽然可以人为地控制植物的生长,但同样也存在植物本身生长习性的影响。从本实验结果看,20℃是最佳培养温度,比一般组织培养要求的温度偏低,而且尽管15℃时鳞茎生长得最慢,但其生物碱含量并不低,因此每升生物碱数量比25℃条件下还略高。而在25℃时,虽然生长率高,但生物碱含量很低。由此看来,20℃以及较低的温度条件下有利于生物碱的积累。

参考文献

- 1 四川省中药学校栽培教研组. 药用作物栽培学. 1981, 323-331.
- 2 高山林,朱丹妮,蔡朝晖等. 暗紫贝母鳞茎器官培养生长特征和生物碱累积的研究. 中国药科大学学报, 1992, 23(3):144
- 3 朱丹妮,蒋莹,陈 婷等. 组织培养川贝母化学成分和药理作用的研究. 中国药科大学学报, 1992, 23(2): 118

Effect of Different Cultural Conditions and Methods on the Growth of Cultured Bulb of *Fritillaria unibracteata* Hsiao et. K. C. Hsia

Cai Zhaohui, Gao Shanlin, Xu Deran and Zhu Danni

Traditional Chinese Pharmacy Institute

The paper reports the growth rates and alkaloid contents of *Fritillaria unibracteata* Hsiao et. K. C. Hsia in tissue culture by 3 temperatures, 2 lightings and 3 cultural methods experiments. The results show that the highest growth rate and alkaloid content of cultured bulb is in shake culture at 20℃. There is no significant difference between light and dark culture.

Key words *Fritillaria unibracteata* Hsiao et. K. C. Hsia; Bulb culture; Alkaloid