

当归愈伤组织的增殖与分化培养

杨 宁, 马瑞君*, 赵庆芳, 陈学林, 雒晓芳

(西北师范大学生命科学学院, 甘肃 兰州 730070)

当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 是三年生药用植物, 药用部位肉质直根具有补血、和血、调经止痛等作用^[1,2], 主产于甘肃东南部, 是甘肃的特色药产, 长期以来, 生产中存在早期抽苔和开荒育苗等不利因素, 严重影响其优质高产和对天然植被的破坏, 另外, 还存在着严重的病虫害现象, 其原因尚未定论^[3]。目前, 有关当归的组织培养研究虽已开展多年^[4-9], 但均未达到工厂化生产试管苗的标准, 因此, 以漳县当年的当归种子经萌发而得到的幼嫩水培苗为材料, 进行了愈伤组织的诱导^[9], 在此基础上, 本实验又探讨了当归愈伤组织的增殖、再分化以及生根情况, 以期探索用离体快繁的方式来获得性状稳定的当归苗, 解决其药量不足的问题, 并为工厂化生产提供理论依据, 同时, 有助于解决早期抽苔, 抛弃传统的生态破坏型育苗方式, 保护当归种植区的植被和生态环境。

1 材料与方法

1.1 材料与方法: 由当归叶柄在 H+ 2,4-D 0.5 mol/L 固体培养基上诱导产生的疏松而无定形的愈伤组织, 经多次继代培养增殖后, 转移到分化培养基中分化绿芽, 再将绿芽转移到生根培养基上诱导其生根, 最终形成完整植株。

1.2 培养基类型: ①继代培养基: 用于疏松而无定形的愈伤组织继代增殖; ②分化培养基: 用于愈伤组织再分化绿芽; ③生根培养基: 用于诱导绿芽生根。

1.3 培养条件: 培养基 pH 值为 5.8, 琼脂 8 g/L, 光照强度 2 000 lx, 光照时间 10 h/d, 培养温度 (22±2) °C。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的继代培养

2.1.1 不同培养基对当归愈伤组织继代的影响: 从表 1 可知, 在 3 种基本培养基上, 选用相同质量浓度的萘乙酸和玉米素, 无论从褐化率角度还是生长状况来看, 当归愈伤组织在 MS 上继代均优于 H 和

B₅。可见, 当归愈伤组织的继代增殖对基本培养基选择性强, 这一点与张世瑜和郑国昌^[7]的结论不同, 也不同于张俊莲^[4], 这可能与材料本身有关联, 本实验所用的材料是经当归种子萌发后, 取其叶柄诱导出的愈伤组织, 而张世瑜和郑国昌以及张俊莲所用材料都是用实生苗的不同部位诱导出的愈伤组织, 外植体生理年龄明显不同, 可能诱导出的愈伤组织特性也有所不同, 这一现象还有待于进一步证实。

表 1 基本培养基对愈伤组织继代的影响

Table 1 Effect of basic media on callus subculture

基本培养基	NAA/ (mg·L ⁻¹)	ZT/ (mg·L ⁻¹)	增殖倍数	褐化率/%	生长状况
MS	0.05	0.5	2	30	++
H	0.05	0.5	1.2	43	+
B ₅	0.05	0.5	1.3	40	+

“+”表示可以生长和继代, “++”表示生长较好, 继代较好

“+” means that callus could grow and be subcultured; “++”

means that growth and subculture of callus are better

2.1.2 不同植物生长调节剂组合对当归愈伤组织增殖的影响: 由表 2 可知, 采用 MS 基本培养基进行愈伤组织的增殖, 在单独使用一种生长素的 C₁ 和 C₂ 培养基上, 愈伤组织增殖很不明显; 在只使用一种细胞分裂素的 C₃ 培养基上, 愈伤组织均不见增殖, 并且生长状况也不佳。但将二者合理搭配的 C₄ 和 C₅ 培养基上, 愈伤组织不仅增殖较明显, 而且生长状况较佳, 可见, 兼用生长素和 6-BA 增效作用较明显。同时, 在愈伤组织继代培养过程中, 一部分愈伤组织易变为黄褐色, 黄褐色愈伤组织生活力较弱, 不久将失去生活力而死去, 因此, 在继代转移时应将其剔除。

2.2 愈伤组织分化培养

2.2.1 愈伤组织类型不同, 分化能力也不同: 经继代培养后产生出颜色、质地和形态差异较大的愈伤组织团块, 经分离可得到白色水渍状的、淡黄色略致密的和紫红色疏松 3 种愈伤组织类型, 这 3 种愈伤

收稿日期: 2005-01-13

基金项目: 西北师范大学科技与创新工程资助项目(NWNU-KJXGC-02); 甘肃省环境保护科研项目(GH2001-12); 甘肃省自然科学基金项目(ZS021-A25-050-N)

作者简介: 杨 宁(1973—), 女, 讲师, 硕士, 主要研究方向为细胞与组织培养。

* 通讯作者 马瑞君 Tel: (0931)7972778 E-mail: rjma@nwnu.edu.cn

表2 不同植物生长调节剂组合对愈伤组织增殖的影响

Table 2 Effect of different phytohormones combination on callus proliferation

培养基 代号	调节因子/(mg·L ⁻¹) 2,4-D	NAA	6-BA	接种 块数	增殖 块数	褐化 块数	增殖 倍数	褐化率/ %	生长 状况
C ₁	2.0	0	0	20	8	8	0.3	40	+
C ₂	0	2.0	0	20	6	10	0.2	50	+
C ₃	0	0	2.0	20	2	18	0	90	+
C ₄	0.5	0	1	20	15	5	1.8	25	+++
C ₅	0	0.5	1	20	13	7	1.2	35	++

“+”表示基本可以生长;“++”表示生长较好,继代较好;“+++”表示继代最好

“+” means that callus could grow; “++” means that growth and subculture of callus are better; “+++” means that subculture of callus is best 组织在MS+NAA 0.05 mg/L+ZT 0.5 mg/L的培养基上均能稳定的生长,但在分化能力上有明显差异,白色水渍状的与淡黄色略致密的愈伤组织在F₁、F₂、F₃和F₄ 4种分化培养基上均无分化能力,而紫红色疏松的愈伤组织在F₁、F₂、F₃和F₄ 4种培养基上有产生不定芽的能力。紫红色疏松的愈伤组织在以上4种培养基上培养一个月后,愈伤组织表面紫红色加深,质地变得更加致密,并出现绿色芽点,其中,F₄培养基上芽点最多,平均每块愈伤组织上可产生20多个芽点。见表3。

表3 不同植物生长调节剂组合对愈伤组织分化的影响

Table 3 Effect of different phytohormones combination on callus redifferentiation

培养基 代号	调节剂/(mg·L ⁻¹)					分化率/%	生长状况
	IAA	NAA	KT	ZT	Ac		
F ₁	1.0		2.0		0.1%	20	++
F ₂	1.0		1.0	0.5	0.1%	56	++
F ₃		0.02	0.1		0.1%	68	+++
F ₄		0.02		0.1	0.1%	98	++++

“++”表示生长较好,可以分化;“+++”表示分化较好;

“++++”表示分化最好

“++” means that growth of callus is better and could be redifferentiated; “+++” means that redifferentiation of callus is better; “++++” means that redifferentiation of callus is best

2.2.2 继代天数对愈伤组织分化能力的影响:从表4可知,继代天数对愈伤组织的分化有显著影响,继代半个月,愈伤组织生长良好,但不见分化,表现为疏松状,褐化程度也较小,当继代到1个月,有80%的愈伤组织块上长出小突起,后变绿,长势较好;当继代一个半月后,每块愈伤组织上都长满小突起,长势很好,后期,每块组织上平均长20个丛芽,丛芽长大后,转移到生根培养基上。当继代2个月或3个月时,愈伤组织分化能力明显降低,伴随着褐化率的不断提高,长势也不好,由此可知,继代一个月对愈伤

表4 继代天数对愈伤组织分化能力的影响

Table 4 Effect of subcultural days on callus redifferentiation capacity

继代天数	接种块数	分化块数	分化率/%	褐化率/%	生长状况
15	20	0	0	6	+
30	20	16	80	10	+++
45	20	20	100	10	++++
60	20	8	40	28	++
90	20	2	10	30	++

“+”表示可以生长;“++”表示生长较好,可以分化;“+++”表示分化较好;“++++”表示分化最好

“+” means that callus could grow; “++” means that growth of callus is better and could be redifferentiated; “+++” means that redifferentiation of callus is better; “++++” means that redifferentiation of callus is best

组织分化最有利。

2.3 根的诱导:当归愈伤组织块上长出的绿芽,先转移到壮苗培养基MS+IAA 1.0 mg+6-BA 2.0 mg+LH 150 mg/L上,培养半个月后,再转移到生根培养基1/2MS+IAA 1.0 mg/L+LH 300 mg/L上,生根较容易,2周后,平均每株生根4条,生根率达100%,苗长势好,未见玻璃化或病态苗出现。

3 讨论

当归初代愈伤组织是由颜色、质地和形态无明显差异的细胞团块形成,经继代后产生白色水渍状、淡黄色略致密型和紫红色疏松型3种愈伤组织类型,3种愈伤组织继代培养均能稳定生长,但愈伤组织的这种多态性不仅表现在外部形态特征上,更重要的是在分化能力上有明显差异,白色和淡黄色愈伤组织无分化能力,紫红色愈伤组织具有分化能力,这种愈伤组织多态性表现在分化能力上的差异与陈发菊^[10]关于水母雪莲愈伤组织的多态性研究结果相似。

植物生长调节剂在愈伤组织增殖与分化中起关键作用,生长素与细胞分裂素组合使用优于单一生长调节剂;继代培养时间对当归愈伤组织分化能力有较明显的影响,随着继代时间的延长,分化频率逐渐下降。Gautheret^[11]认为分化是受特殊物质决定的,分化能力的丧失是由于在培养过程中耗尽了原有母体组织中存在的与分化有关的物质。也有研究者认为继代过程中分化能力的逐渐丧失,是遗传潜能表现的丧失,植物生长调节剂在分化中有着明显的调节作用,它们以直接或间接的方式影响基因的活性。分析当归愈伤组织分化能力随着继代时间的延长而降低,可能与使用外源植物生长调节剂种类和浓度有关,同时外源植物生长调节剂的使用引起内源激素的变化也可

能直接影响到愈伤组织的分化。

References:

- [1] Tsay H S, Huang H L. Somatic embryo formation and germination from immature embryo-derived suspension-cultured cells of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels [J]. *Plant Cell Report*, 1998, 17: 670-674.
- [2] Zhang S Y, Cheng K C. *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels in vitro culture regeneration, and the production of medicinal compounds [A]. In: Bajji YPS (ed). *Biotechnology in Agriculture and Forestry Vol 7. Medicinal and Aromatic Plants* [M]. New York: Springer, 1989.
- [3] Zhang J L, Mi S H E, Yi W J. Analyze factors effecting on callus production of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels [J]. *Gansu Agric Sci and Technol* (甘肃农业科技), 1995(11): 8-10.
- [4] Zhang J L. Callus redifferentiation and plant regeneration of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels [J]. *J Gansu Agric Univ* (甘肃农业大学学报), 1995, 30(4): 293-297.
- [5] Gu J W. Studies on tissue culture on *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1982, 17(2): 131-138.
- [6] Huang H L, Chen C C, Chen U C, et al. Studies on tissue culture of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels I. Induction and growth of embryogenesis callus from immature embryo [J]. *J Agric Res China*, 1996, 45: 156-163.
- [7] Zhang S Y, Cheng K C. Callus induction and plantlet regeneration from several organs of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1982, 24(6): 512-518.
- [8] Zhang S Y, Zheng G C. Induction of embryogenic callus and histocytological study on embryoid development of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1986, 28(3): 241-244.
- [9] Luo X F, Yang N, Chen X L, et al. Study on tissue culture of the plantlet germinated from seed of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels [J]. *J Northwest Normal Univ: Nat Sci* (西北师范大学学报: 自然科学版), 2004(4): 77-80.
- [10] Cheng F J, Zhao D X, Yang Y G, et al. Studies on the multi-types of callus *Saussurea medusa* and its re-differentiation conditions [J]. *J Central China Normal Univ: Nat Sci* (华中师范大学学报: 自然科学版), 2000, 34(3): 331-335.
- [11] Gautheret R J. In: Cell differentiation and morphogenesis [J]. *North Holland Publ. Co Amsterdam*, 1966(3): 66-75.

杯鞘石斛组培苗接种菌根真菌和细菌肥的研究

陈瑞蕊¹, 施亚琴¹, 林先贵^{1*}, 张 宁², 汤卫国²

(1. 中国科学院南京土壤研究所, 江苏 南京 210008; 2. 云南金陵植物药业股份有限公司, 云南 思茅 665000)

石斛属 *Dendrobium* Sw. 中的许多种是名贵的中药材, 以新鲜和干燥的茎入药, 具有强阴益精、平胃气、长肌肉、益智除惊、健身延年的功效, 被誉为“中华九仙草”之首。由于长期采挖, 近年来石斛自然资源接近枯竭, 因此被国家列为重点保护的野生药材品种^[1]。许多研究者已经意识到了这个问题, 纷纷开展了石斛组培及集约化栽培技术的研究。但是采用组培方法繁殖, 试管苗出瓶后存活率低, 在栽培条件下生长缓慢^[2], 难以满足市场的需求。

石斛属兰科植物, 与兰科菌根真菌形成典型的共生关系^[3], 真菌菌丝可以侵入到根系细胞内, 将获得的碳水化合物和氮磷等营养物质, 提供给石斛, 促进其生长。鉴于石斛与兰科菌根真菌的特殊关系, 开展了石斛组培苗接种菌根真菌和细菌菌肥的研究。先从野生石斛根系中分离、纯化, 获得菌根真菌和根际有益细菌, 再尝试对杯鞘石斛组培苗进行接种, 通过盆栽试验和田间小区试验组培苗生长情况的观察, 寻找合适的菌根真菌和菌肥, 希望能够改善石斛组培苗的根际环境, 促进组培苗的生长, 提高产量。

1 材料与方法

1.1 盆栽试验

1.1.1 材料: 杯鞘石斛 *D. gratiosissimum* Rchb. f., 由中国科学院昆明植物研究所刘芳媛研究员鉴定。杯鞘石斛组培苗, 由云南金陵植物药业股份有限公司组培中心提供。组培苗出瓶后炼苗6个月, 然后从云南思茅空运到南京, 栽培一个月后按株型大小, 均匀搭配, 留待接种。

1.1.2 试验设计: 盆栽试验共设7种处理, 分别是不接种(CK); 接种混合菌肥1号(由固氮菌 N01, 磷细菌 P22, 钾细菌 K25 组成); 混合菌肥2号(由 N06, P22, K25 组成); 混合菌肥3号(由 N02, P05, K02 组成); 接种兰科菌根真菌 Dt5、Dt6 和 Dt8, 每一处理重复3次, 共21杯。

1.1.3 试验方法: 液体振荡培养, 分别获得 N01、N02、N06、K02、K25、P05、P22、Dt5、Dt6 和 Dt8 的菌悬液。固氮菌、磷细菌和钾细菌的菌液稀释1倍后, 按3:1:2的比例混合制成混合菌肥。挖开根系周围的基质, 将混合菌肥或真菌菌液直接接到根系

收稿日期: 2005-02-17

基金项目: 云南省科技厅科技合作项目(2003YKS-01)

作者简介: 陈瑞蕊(1978—), 女, 江苏南京人, 主要从事菌根方面研究。 Tel: (025)86881345 E-mail: rrcchen@issas.ac.cn

* 通讯作者 林先贵 Tel: (025)86881589 E-mail: xglin@issas.ac.cn