

药用植物决明的愈伤组织诱导与生长增殖的培养条件研究

浙江工业大学轻工系(杭州 310004) 王 轶* 宋家祥 付群英

摘 要 本实验成功地以决明的胚轴、子叶诱导出愈伤组织。实验表明,MS 比 B₅ 更利于愈伤组织诱导。正交试验表明,添加 1mg/L 的 IAA、6-BA、GA₃ 可明显促进愈伤组织的生长;添加 1mg/L 的 NAA、2,4-D 可抑制其生长;添加 1mg/L 的 6-BA、2,4-D 对抑制愈伤组织的分化有明显的效应。适合愈伤组织生长及维持分化率低水平的蔗糖浓度为 2%~3%。愈伤组织的诱导及生长周期为 30d 左右。

关键词 决明 组织培养 愈伤组织

决明 *Cassia obtusifolia* L. 含多种蒽醌类物质,并含多种蛋白质和人体必需的微量元素。有清肝、明目、通便作用;并能有效地降血压及降血脂。其多种营养保健成分能有效地预防心脑血管疾病,增强机体活力,延缓衰老,具有良好的开发前景^[1]。本文报道决明愈伤组织诱导及生长增殖的培养条件研究,为其进一步大规模组织培养奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料:决明 *Cassia obtusifolia* L. 种子由浙江农业大学植物园提供,在本实验室经萌发成幼苗供试验用。

1.2 培养基:基本培养基为 B₅、MS,琼脂含量 0.8%,再按实验方案加一定量的蔗糖和生长调节物质,培养基的 pH 用 NaOH 溶液调至 5.6,121℃ 高温蒸汽灭菌 20min。

1.3 方法:取幼嫩材料经洗洁精溶液浸泡 2~5 min,自来水洗净。选用 70% 酒精溶液浸泡 40s,用 HgCl₂ 溶液(0.25%)浸泡 10 min,最后用无菌水冲洗 5 次后接种、培养。培养温度为 25℃±1℃,光照 10 h/d,光强 3000 lx。

1.4 愈伤率、分化率、生长率、愈伤得率的统计方法

$$\text{愈伤率} = \frac{\text{愈伤块数}}{\text{接种块数}} \times 100\%$$

(污染不计入)

$$\text{分化率} = \frac{\text{分化块数}}{\text{愈伤块数}} \times 100\%$$

$$\text{生长率} = \frac{\text{愈伤鲜重} - \text{接种鲜重}}{\text{接种鲜重}} \times 100\%$$

$$\text{愈伤得率(g/mL)} = \frac{\text{愈伤鲜重(g)}}{\text{培养基体积(mL)}} \times 100\%$$

2 结果

2.1 基本培养基的选择:以 B₅、MS 为基本培养基,分别加入生长调节剂 IAA、6-BA 1 mg/L,接种决明子叶,经一个月的诱导,结果见表 1。MS 明显比 B₅ 更利于愈伤组织的诱导及生长。

表 1 基本培养基 B₅ 与 MS 的诱导愈伤比较

基本培养基	愈伤生长率(%)	分化率(%)	愈伤颜色
B ₅	15.30	0	淡绿
MS	36.79	8.5	绿褐

2.2 决明不同器官来源的外植体诱导愈伤组织的比较:为选择合适的器官作为外植体诱导愈伤组织,选取了决明的胚根、胚轴、子叶接种于 MS 基本培养基,附加生长调节剂 IAA、6-BA 1mg/L,诱导一个月后的结果见表 2。结果表明,子叶明显优于其他外植体,可作为进一步研究的材料。

2.3 影响决明外植体愈伤化的生长调节剂:生长调节剂是植物组织生长发育的重要调节物质,它们在植物组织培养中起着十分重要的作用,但对这些物质的要求因植物种类的

* Address: Wang Pu, Department of Light Industry, Zhejiang University of Technology, Hangzhou

不同而变化很多。为考察对决明影响较大的生长调节的种类,以 MS 为基本培养基,选择 6 种生长调节剂作为附加成分,并选用六因素二水平正交试验 $L_{(8)}2^7$, 每批试验材料为 100 个子叶块,一个月后统计结果(表 3、表 4)。

表 2 决明不同器官诱导愈伤比较

器官 (接种块数)	愈伤诱导率 (%)	愈伤得率 (g/mL)	愈伤生长率(%)
胚根 137	0	0	0
胚轴 152	2.8	1.27	3.28
子叶 260	97.8	8.35	30.2

表 3 因素水平表

水平	IAA (mg/L)	NAA (mg/L)	2,4-D (mg/L)	6-BA (mg/L)	Kinetin (mg/L)	GA ₃ (mg/L)
1	0	0	0	0	0	0
2	1	1	1	1	1	1

表 4 生长调节影响正交试验表

试 验 号	因 子						愈伤 生长率 (%)
	IAA	NAA	2,4-D	6-BA	Kinetin	GA ₃	
水 平 (mg/L)							
1	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	1	1	1	1	4.5
3	1	1	0	0	1	1	7.1
4	1	1	1	1	0	0	7.2
5	0	1	0	1	0	1	31.7
6	0	1	1	0	1	0	9.2
7	1	0	0	1	1	0	49.5
8	1	0	1	0	0	1	40.5
I	45.4	94.5	88.3	56.8	79.4	65.9	
II	104.3	55.2	61.4	92.9	70.3	83.8	
K ₁	11.35	23.62	22.07	14.20	19.85	16.47	
K ₂	26.07	13.80	15.35	23.22	17.57	20.95	
R	14.72	9.82	6.72	9.02	2.28	4.48	

结果表明,影响决明愈伤组织诱导及生长的主要生长调节剂为 IAA、NAA、2,4-D、6-BA、GA₃。其中添加 1mg/L 的 IAA、6-BA、GA₃ 可明显促进其愈伤组织的生长,影响效果依次为 IAA、NAA > 6-BA > GA₃; 添加 NAA、2,4-D 可抑制其愈伤组织的生长,NAA 的影响效果比 2,4-D 明显。Kinetin 也产生较轻微的抑制作用。

2.4 生长调节剂对细胞分化的影响:在上述

正交试验中,决明愈伤组织出现分化根,并且分化情况在各批次中表现出较大的差异。正交试验的分化情况见表 5。

表 5 正交试验的分化情况表

试 验 号	因 子						愈伤 分化率 (%)
	IAA	NAA	2,4-D	6-BA	Kinetin	GA ₃	
水 平 (mg/L)							
1	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	1	1	1	1	0
3	1	1	0	0	1	1	22.2
4	1	1	1	1	0	0	0
5	0	1	0	1	0	1	0
6	0	1	1	0	1	0	6.3
7	1	0	0	1	1	0	16.6
8	1	0	1	0	0	1	12.8
I (%)	6.3	39.4	38.4	41.3	12.8	22.9	
II (%)	51.6	28.5	19.1	16.6	45.1	35.0	
K ₁ (%)	1.57	9.85	9.7	10.32	3.22	5.72	
K ₂ (%)	12.9	7.12	4.77	4.15	11.27	8.75	
R (%)	11.33	2.73	4.93	6.17	8.07	3.03	

结果显示,IAA、Kinetin、GA₃ 对决明愈伤组织的分化有较明显的促进作用,而 6-BA、2,4-D 则能明显抑制决明细胞的分化。由于本研究的着眼点不是获得再生植株,而是获得大量植物细胞的增殖,故要尽量抑制其分化。在本实验中加入一定量的 6-BA、2,4-D 于培养基中,将会有利于细胞增殖,这对进一步的细胞大规模悬浮培养是必要的。

2.5 蔗糖浓度的影响:除生长调节剂外,蔗糖浓度也是影响植物组织培养的重要因素。一方面蔗糖作用为培养物的可得用碳源,对细胞的生长有重要的作用;另一方面,蔗糖浓度也是影响培养基渗透压的主要因素。蔗糖浓度对决明的愈伤组织生长、分化影响结果示于图 1 与图 2。

从图 1、图 2 可以发现,蔗糖浓度为 2% ~ 5% 时,愈伤细胞的生物量差别不大,而 1% 则难以满足决明组织培养物对蔗糖的需要,限制了愈伤组织的诱导及生长,2% 以上的蔗糖浓度可以为其提供足够的碳源。随着蔗糖浓度的提高,决明愈伤组织的分化率也有增长的趋势,特别是在蔗糖浓度为 5% 时,分化根大量出现,分化率明显提高。实验中还

发现,随着蔗糖浓度的提高决明愈伤组织的颜色也加深,质地愈致密。蔗糖浓度为2%时,愈伤组织为淡绿色,而蔗糖浓度为5%时,其颜色显黑褐色,分化根大量出现,暗示分化与愈伤组织的不利生长环境有关,并有愈伤细胞颜色愈深,分化也愈突出的趋向。本实验中,为抑制愈伤分化,合适的蔗糖浓度应为2%~5%。

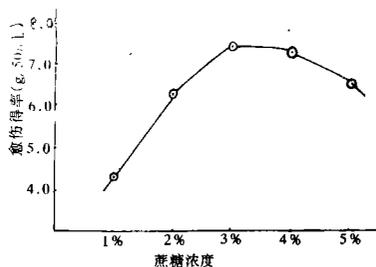


图1 蔗糖浓度对愈伤组织生长的影响

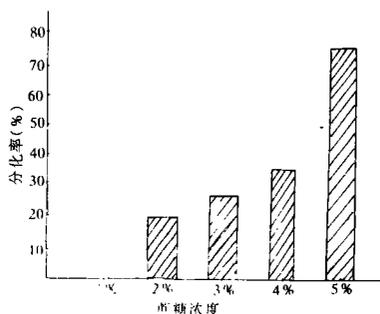


图2 蔗糖浓度对决明愈伤组织分化的影响

2.6 正交试验结果的验证:综合考虑生长调节物质对愈伤组织诱导和愈伤细胞分化的影响,选择明显促进愈伤组织生长的 IAA、6-BA、GA₃ 和抑制其分化的 2,4-D,浓度均为 1 mg/L,蔗糖浓度为 2.5%,基本培养基为 MS。经一个月的培养,结果表明,其愈伤得率达 8.35 g/50 mL,生长率为 51.3%,且无一分化,达到了预期的效果。

2.7 愈伤组织的诱导及生长周期:决明在接种后,经过 5~7d 开始发生愈伤化,然后愈伤组织开始生长、增殖,约于 25d 左右开始出现褐变,生长迟缓。30d 后,愈伤生长几乎停滞,出现老化。

3 讨论

植物愈伤组织诱导的基础培养基可分为 3 大类:总无机盐含量高的培养基、个别盐类含量较高的培养基及有机物丰富的培养基,其中 MS、B₅ 是最常用的。MS 的各类无机盐含量较高,而 B₅ 则 KNO₃ 含量高。实验结果表明,MS 更有利于决明愈伤组织的诱导,暗示较高的盐浓度可能有利于愈伤组织的诱导及生长,这种现象也见于北美短叶松下胚轴和子叶的愈伤组织的诱导^[2],但在太平洋红豆杉的愈伤组织诱导中则正好相反^[3,4]。

生长调节物质对决明的愈伤组织诱导有非常重要的影响。正交试验结果表明:不添加任何生长调节剂,愈伤组织未见形成;添加不同的生长调节剂,诱导结果差别很大。本实验选出了有利于决明愈伤组织生长而抑制其分化的生长调节剂种类,继续深入探讨其浓度与交互作用效果是有必要的。

碳源也是影响愈伤组织生长的重要因素,目前的研究认为培养基中添加蔗糖或葡萄糖是细胞生长最好的碳源^[5,6],在大多数情况下蔗糖更有利于细胞中次级代谢物的形成^[7]。甘烦远对红花的愈伤组织诱导报道也是如此^[6]。本实验结果表明,不同浓度的蔗糖,不仅影响决明愈伤组织的生长,也影响其质地、致密度、颜色及分化。蔗糖浓度 2% 以上时可为其提供足够的碳源,但浓度愈大,分化率也提高。

决明愈伤组织的继代及发酵培养研究本实验室将另文报道。

参考文献

- 1 华海清. 中国中药杂志, 1995, 20(9): 564
- 2 Tuskan GA, et al. Plant Cell Tiss Org Cult. 1990. 20
- 3 Arthur G. Fett-Neto, Bio/Technology, 1993. 11
- 4 Gibson DM, et al. Plant Cell Reports. 1993. 12
- 5 Kurz WGM. Critical Rev Biotech. 1985. 2
- 6 甘烦远, 等. 植物学报, 1991, 33(7): 516
- 7 Khouri HE, RK, et al. Plant Cell Reports. 1986. 5

(1996-10-22 收稿)

1997-03-28 修回)

Studies on Induction and Growth of Calluses of Jueming (*Cassia obtusifolia*)

Wang Pu, Song Jiexiang

Calluses of *Cassia obtusifolia* L. were successfully induced in different media. Calluses were induced better in MS than in B₅. Adding 1mg/L IAA, 1mg/L 6-BA and 1mg/L GA₃ could improve the growth of calluses noticeably. However, NAA and 2,4-D could depress the growth of calluses. 6-BA and 2,4-D showed apparent depressive effects on the differentiation of calluses. Suitable concentration of sucrose for improving the growth of calluses and lowering the differentiation of calluses was 2%~3%. The growth cycle of calluses was about 30 days.

甘肃省中药材复杂品种及质量的调查研究[△]

IV. 中药材栽培(养殖)现状及分析

甘肃省药品检验所(兰州 730060) 宋平顺* 张伯崇 宋玉成 卫玉玲

摘要 通过实地调查,甘肃的家种(养殖)药材共 141 种,约 110 种可不同程度提供商品;35 种为大宗商品,并对栽培中存在的主要问题进行讨论。

关键词 甘肃 中药材 栽培 状况调查

甘肃是我国中药材主产区之一,药材产量居全国第四位^[1],而产量中以家种(养)药材占绝大部分,据 1986 年全省中草药资源普查记载,主要的家种(养)药材有 66 种,掌握得不够全面与系统,近年我们开展了甘肃中药材复杂品种质量的调查研究课题,将中药材的栽培(养殖)列为主要的技术指标,对目前的栽培(养殖)生产现状进行了较全面的深入调查,现将其整理成文,以阐明甘肃目前栽培(养殖)现状、规模、应用情况,指出存在的主要问题,并提出今后发展的建议,供有关方面参考、希望对我省制定中药材生产、发展规划起到积极的作用。

1 栽培(养殖)状况

经我们调查统计,截止 1995 年底甘肃 31 种试种、家种家养的药用动、植物共有 141 种,其中动物药 11 种,植物药 130 种;可不同程度提供商品的有 110 种,占地产收购品种的 36.2%(目前全省共有 304 种地产收购药材),其中大宗商品约有 35 种。

在家种(养)的 141 种药材中,按提供商品不同分类,纯属药材的有 68 种,与农业交叉 20 种,与林业交叉 11 种。与副业交叉 15 种,绿化观赏共 14 种,养殖 13 种。从品种分类,属《中国药典》品种的有 126 种,属地方习用药材有 11 种,民间药及原料药共 4 种。

2 存在的主要问题

2.1 某些药材的盲目引种:适宜的气候,土壤等环境条件是动、植物赖以生存的先决条件,如不顾其生态条件,盲目引种,势必导致劣质药材,或失败。如陇南、陇东个别地方引种的当归及甘谷、康县、庆阳引种的白术干瘪瘦小;陇东某些地方栽培的牡丹皮气味淡薄,武威部分地方引种的射干缺乏苦辛味,产生甜味。这些劣质药材通常无销路,但往往通过个体药贩流入医疗单位。

2.2 药材栽培中忽视了科研工作:近年国内普遍开展了药材的家种(养)科学研究,从其生物学特性,栽培加工技术、生药、化学成分、药理药效等一系列工作,阐明栽培品种的质

* Address: Song Pingshun, Gansu Provincial Institute for Control Drug, Lanzhou

[△]甘肃省自然科学基金资助项目(ZR-95-095)