

· 药材 ·

药用植物莪术的组织培养快速繁殖与植株再生的研究[△]

辽宁省植物生物工程重点实验室 (大连 116029)

李春斌*

辽宁师范大学生物工程研究所

方宏筠 王关林

摘 要 通过茎尖培养实现了中药莪术试管苗的快速繁殖并从试管苗基部诱导出了愈伤组织。实验表明:以 MS 培养基为基本培养基,附加 ZT 4.0 mg/L+ IAA 0.5~1.0 mg/L 适于丛生芽的诱导与增殖;附加 2,4-D 1.0 mg/L + KT 4.0~6.0 mg/L 适于愈伤组织的诱导;附加 2,4-D 1.0~2.0 mg/L+ KT 0.2~0.5 mg/L 适于愈伤组织的继代培养;附加 KT 4.0 mg/L+ NAA 0.2 mg/L 适于愈伤组织的分化。

关键词 莪术 组织培养 快速繁殖 愈伤组织 再生

Studies on Plantlet Regeneration and Propagation of *Curcuma zedoaria*

Plant-Biology Engineering Key Laboratory of Liaoning Province (Dalian 116029) Li Chunbin

Biology Engineering Institute of Liaoning Normal University Fang Hongjun and Wang Guanlin

Abstract Aseptic seedling of the traditional Chinese medicinal plant, *Curcuma zedoaria* (Christm.) Rosc. was successfully propagated by means of shoot culture, and calli were induced from the base of aseptic seedling. MS medium with 4.0 mg/L ZT and 0.5~1.0 mg/L IAA was suitable for the induction and proliferation of fascicular gemma. MS medium with 1.0 mg/L 2,4-D and 4.0~6.0 mg/L KT was suitable for the induction of calli. MS medium with 1.0~2.0 mg/L 2,4-D and 0.2~0.5 mg/L KT was suitable for the subculture of calli. MS medium with 4.0 mg/L KT and 0.2 mg/L NAA was suitable for the differentiation of calli.

Key words *Curcuma zedoaria* (Christm.) Rosc. tissue culture rapid propagation callus regeneration

莪术 *Curcuma zedoaria* (Christm.) Rosc. 为姜科姜黄属多年生草本植物^[1]。中药莪术已具有上千年的历史,在医学上应用非常广泛。唐《药性论》及李时珍《本草纲目》均有记载,莪术具有行气破血、消食化积之功效,被称为血中之气药。应用莪术治疗肿瘤是我国医药工作者首先报道的^[2]。

莪术的药用部位主要是根茎和块根,主要含挥发油类和姜黄素类成分,此外还有树脂类和糖类^[3]。在栽培生产上以根茎进行营养繁殖,耗种量大,且病毒化严重,品质下降。为了解决莪术生产上存在的问题,我们采用生物技术手段复壮莪术优良新品种,并为莪术优良品种的快速繁殖打下基础。莪术的组织培养工作国内外尚未见报道。

1 材料和方法

1.1 材料:植物材料取自大连市药物科学研究所,由该所刘玉兴研究员鉴定。外植体为莪术根茎上的芽长成的试管苗。

1.2 方法

1.2.1 无菌外植体的获得:洗净莪术根茎,将莪术根茎上大约 0.5 cm 的芽切下,于 75% 乙醇中浸泡 45 s,再于 0.1% 升汞中消毒 8 min,无菌水冲洗 5 次,然后接种于 MS+BA 0.5 mg/L+IAA 0.1 mg/L 的培养基中培养。培养条件为 MS 培养基附加 0.5% 琼脂, pH 5.8,培养温度 (25±2)℃;光照 10~12 h/d,光强 2 000 lx,蔗糖浓度为 30 g/L。

1.2.2 丛生芽的诱导与增殖:剪取莪术试管苗基部约 1 cm 长接种于附加不同激素配比的 MS 培养基中,筛选出适于丛生芽诱导与增殖的培养基。

1.2.3 愈伤组织的诱导、继代与分化:选取较幼嫩的莪术试管苗的不同部位接入附加不同激素配比的愈伤组织诱导培养基中进行愈伤组织的诱导。将诱导出的愈伤组织于愈伤组织继代培养基上每 25~30 d 继代一次。选取继代了 2~3 次生长旺盛、质地致密、表面有细颗粒状结构、颜色鲜黄的愈伤组织转

* Address: Li Chunbin, Plant-Biology Engineering Key Laboratory of Liaoning Province, Dalian

大连理工大学化工学院九七级博士研究生

△辽宁省教委资助的科研攻关项目

入愈伤组织分化培养基中进行愈伤组织的分化培养。

1. 2. 4 芽的伸长与生根培养: 将在愈伤组织分化培养基中生长健壮的再生芽及在芽增殖培养基中生长了约一个月的丛生芽分成 3~ 4个为一小簇转入到芽伸长培养基中进行芽的伸长培养。 将在芽伸长培养基中生长了约一个月的芽再转入到芽生根培养基中进行生根培养。

1. 2. 5 试管苗的移栽: 将在生根培养基中生长了约一个月的生长健壮的试管苗在移栽前 3~ 5 d将瓶口打开, 注入少量清水淹没培养基表面, 于室内自然光下散射。 移栽时将试管苗从瓶中取出, 用清水将根表面的培养基冲净, 然后移入经多次冲洗的较粗河沙中, 于温室内培养。

2 结果与分析

2. 1 激素对丛生芽诱导与增殖的影响: 细胞分裂素和生长素是芽诱导与增殖过程中最关键的因子, 本实验研究了多种细胞分裂素和生长素的不同浓度的配比组合, 其中以 ZT和 IAA 的组合最佳。 ZT与 IAA对芽诱导与增殖的影响见表 1。

表 1 ZT与 IAA对莪术试管苗丛生芽诱导与增殖的影响

ZT (mg/L)	IAA (mg/L)	产生芽时间 (d)	增殖倍数	芽生长状况
3. 0	0. 5	11~ 13	3. 2	芽健壮, 饱满, 生长迅速
3. 0	1. 0	11~ 13	2. 8	
4. 0	0. 5	7~ 8	4. 8	
4. 0	1. 0	7~ 8	4. 5	芽弱小, 生长 缓慢
5. 0	0. 5	9~ 10	3. 3	
5. 0	1. 0	9~ 10	2. 9	

由表 1可见 ZT 4. 0 mg/L+ IAA 0. 5~ 1. 0 mg/L最适于丛生芽的诱导与增殖(图 1), ZT浓度超过 4. 0时对芽的分化与增殖又产生了抑制作用。

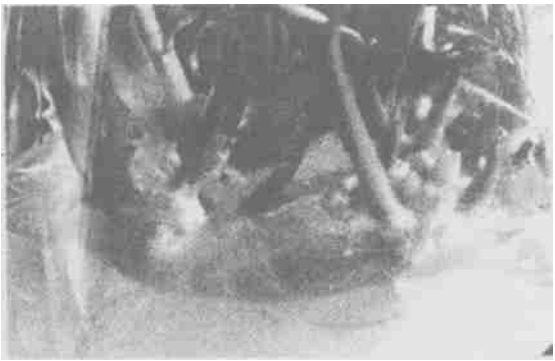


图 1 茎尖诱导出的丛生芽

2. 2 影响莪术外植体愈伤组织诱导、继代和分化的因素

2. 2. 1 生长素对愈伤组织诱导、继代和分化的影响: 以 MS培养基为基本培养基分别附加不同浓度

的 IAA NAA 2, 4-D对莪术试管苗基部进行愈伤组织的诱导, 培养一个月后观察, 结果见表 2。

表 2 生长素对愈伤组织诱导的影响

IAA (mg/L)	NAA (mg/L)	2, 4-D (mg/L)	产生愈伤组织 时间(d)	诱导率 (%)
0. 5	0. 0	0. 0	无愈伤组织产生	无愈伤组织产生
1. 0	0. 0	0. 0		
0. 0	0. 5	0. 0		
0. 0	1. 0	0. 0	27~ 28	82~ 84
0. 0	0. 0	0. 5		
0. 0	0. 0	1. 0		
0. 0	0. 0	1. 0	24~ 25	95~ 96

由表 2可见, 2, 4-D对莪术试管苗有很强的诱导愈伤组织的作用, 而 IAA和 NAA不能诱导出愈伤组织。

但进一步的试验发现 2, 4-D对愈伤组织的分化有很强的抑制作用。 选取继代了 2~ 3次状态基本相同的愈伤组织分别转入含有 2, 4-D 0. 5 mg/L和不含 2, 4-D的愈伤组织分化培养基中, 一个月后观察, 结果发现不含 2, 4-D的愈伤组织分化培养基中出现了大量的绿芽, 而含有 2, 4-D的培养基中则没有绿芽的产生。

2. 2. 2 KT对愈伤组织诱导、继代和分化的影响: 实验中发现单独使用 2, 4-D即可诱导出愈伤组织, 但诱导出的愈伤组织生长缓慢且不能分化。 因此本实验在诱导愈伤组织过程中除了使用 2, 4-D外, 还附加了不同浓度的 KT。 结果发现高浓度的 KT有利于状态良好的愈伤组织的产生。 在 MS+ 2, 4-D 1. 0 mg/L+ KT 4. 0~ 6. 0 mg/L的培养基中诱导产生的愈伤组织在继代培养中生长旺盛, 而且易于分化。 虽然高浓度的 KT利于诱导产生状态良好的愈伤组织, 但在继代培养中却应降低 KT的浓度, 否则很难保证愈伤组织的稳定性。 以 MS+ 2, 4-D 1. 0 ~ 2. 0 mg/L+ KT 0. 2~ 0. 5 mg/L进行愈伤组织的继代培养较为适宜(图 2)。 KT对愈伤组织的分化也有很大的影响, 结果见表 3。



图 2 从外植体诱导愈伤组织

由表 3可见 KT 4. 0~ 6. 0 mg/L愈伤组织都能分化出较多的芽(图 3), 但 KT 4. 0 mg/L既有利

表 3 KT对愈伤组织分化的影响

KT (mg/L)	产生芽 时间(d)	诱导率 (%)	再生芽数目 (个/块)	再生芽生长状态
0.5	—	—	—	—
2.0	25~27	82	4~5	芽生长状态良好,易成苗
4.0	19~21	96	10~12	芽生长状态良好,易成苗
6.0	19~21	96	12~14	芽生长较弱,不易成苗

于愈伤组织的分化,又有利于再生芽的成苗(成苗率70%以上)。当采用MS+KT 4.0 mg/L+ NAA 0.2 mg/L培养基进行愈伤组织的分化培养时,再生芽成苗率可较MS+KT 4.0 mg/L培养基提高10%以上(成苗率82%~84%),而且每块愈伤组织也可多分化出2~3个芽。



图 3 愈伤组织开始分化出芽

2.2.3 外植体部位对愈伤组织诱导、继代和分化的影响: 实验中发现外植体部位对愈伤组织诱导具有极其重要的影响。本实验只是从莖术试管苗基部诱导出了可以继代和分化的愈伤组织。对莖术叶片进行了上百次试验,但未能诱导出愈伤组织及实现分化。从叶鞘部位偶而诱导出了愈伤组织,但产生的全是白色小颗粒状的愈伤组织,很难进行继代培养,不能实现分化。对根部诱导出了愈伤组织但只是局限于根尖部位,在继代培养中生长缓慢,未能实现分化。因此,本实验采用莖术试管苗基部进行愈伤组织的诱导,莖术愈伤组织诱导培养基为MS+2,4-D 1.0 mg/L+KT 4.0~6.0 mg/L;愈伤组织继代培养基为MS+2,4-D 1.0~2.0 mg/L+KT 0.2~0.5 mg/L;愈伤组织分化培养基为MS+KT 4.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L。

2.3 影响莖术试管苗成活率的主要因素

2.3.1 GA对再生芽伸长的影响: 在莖术再生芽的伸长培养中,不需要高浓度的细胞分裂素和生长素,附加一定浓度的GA时对莖术再生芽的伸长有明显的促进作用。在MS+KT 0.5 mg/L+IAA 0.2 mg/L的培养基中附加GA 0.1 mg/L时,30 d后即可较未加GA的对照组芽高1倍左右,但附加GA 0.1 mg/L的芽明显较对照组的芽细弱。实验中

采用MS+KT 0.5 mg/L+IAA 0.2 mg/L+GA 0.02 mg/L进行再生芽的伸长培养,取得了良好的效果,既能保证再生芽的快速生长,又能保证其健壮而不弱小(图4)。



图 4 再生芽伸长培养

2.3.2 IAA对试管苗生根的影响: 实验中发现IAA即能使试管苗正常生长,又能诱导出良好的根系。在试管苗生根培养过程中还发现在IAA浓度相同的条件下,使用1/2 MS培养基更有利于根的形成,可较MS全量培养基提前5~6 d多生出1~2条根。本实验采用1/2 MS+KT 0.5 mg/L+IAA 1.0 mg/L+蔗糖 15 g/L的培养基作为莖术试管苗的生根培养基,并取得了良好的效果,一周左右即可出4~5条根,生根率可达98%,并获得了生长极健壮的试管苗。

2.3.3 温度、光照和水分对试管苗移栽的影响: 莖术试管苗在生根培养基中生长一个月后便可以进行移栽。由于莖术是热带植物,所以移栽后要保证适宜的温度、光照和水分,莖术试管苗移栽时温度不能低于22℃,也不宜过高,否则易引起试管苗徒长。移栽初期试管苗不能接受阳光的直射,最好是散射光或遮阴。莖术试管苗移栽后对缺水十分敏感,每2~3 d就应浇透一次水,相对湿度应保持在85%以上。

试管苗移栽8~10 d以后可适当提高光照强度和温度,再经过约2周的培养,移栽的试管苗便已长出了1片新叶,并生出大量的须根,当户外温度稳定在20℃以上时便可移栽入大田。

3 讨论

3.1 细胞分裂素和生长素之间的比例关系对莖术组织培养的影响: 在莖术丛生芽的诱导、增殖和愈伤组织的分化过程中,高浓度的细胞分裂素是必需的,而且同时应配合一定低浓度的生长素。不含生长素或生长素浓度过低时产生的芽生长势弱,数目也少;崔徵^[4]1952年指出细胞分裂素类物质腺嘌呤与生长素IAA之间的比例关系非常主要,可以有效地控制植物组织培养中芽和根的发生,这一比例高时有

利于芽的分化,比例低时有利于根的分化。本实验结果与上述观点相符。

在莖术愈伤组织的诱导过程中也使用了高浓度的细胞分裂素 KT 4.0~6.0 mg/L 并配合 2,4-D 1.0 mg/L 进行愈伤组织的诱导。虽然细胞分裂素对莖术愈伤组织的诱导不是必需的,但是配合高浓度的细胞分裂素却有利于莖术产生高质量的易于继代和分化的愈伤组织。这可能是由于莖术试管苗具有较高的内源生长素的原因。同时也提示我们,如果一种植物在愈伤组织的诱导过程中细胞分裂素对其愈伤组织的诱导没有抑制作用,那么我们可以试着采用高浓度的细胞分裂素配合生长素来进行愈伤组织的诱导,这样获得的愈伤组织很可能容易进行高频的分化和再生。

3.2 细胞分化程度与莖术脱分化的关系:在莖术组织培养的快速繁殖和愈伤组织诱导过程中,发现正确的选择外植体的部位极其重要。莖术试管苗丛生芽的诱导、增殖和愈伤组织的诱导都是在相同的部位产生的,都是在试管苗基部茎尖生长点处。是因为该处分生细胞较多,细胞比较幼嫩,分化程度低的原因。本实验曾试图从莖术叶片、叶鞘等其它部位诱导产生不定芽和愈伤组织,但未能成功。在愈伤组织诱

导过程中曾将外植体以竖放、横放和倒放的方式接入愈伤组织诱导培养基中培养,结果竖放的外植体周围距培养基 1 cm 范围内都能产生大量的愈伤组织;而横放的愈伤组织只是在靠近基部约 0.5 cm 的范围内产生了一些愈伤组织;倒放的外植体只是在上端(原形态学下端,试管苗基部)产生了少量的愈伤组织,而接触培养基的部位却未能产生出愈伤组织,这证明了细胞的分化程度对莖术试管苗的脱分化有极其重要的影响。应该选择细胞分化程度低的部位进行莖术的脱分化研究。

在莖术愈伤组织的诱导中从根尖部位也诱导出了愈伤组织,根尖部位也是分生细胞和幼嫩细胞较多、细胞分化程度较低的部位。但该部位诱导出的愈伤组织却不能进行分化,可见即使都是分化程度较低的细胞,但因部位的不同,它们的生理特性也不相同。

参考文献

- 1 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编. 上册. 北京: 人民卫生出版社, 1979 685
- 2 旅大市妇产医院肿瘤防治小组. 中草药, 1972, 2 15
- 3 肖小河, 苏中武, 乔传卓, 等. 中草药, 1997, 2 114
- 4 崔 徵. 植物学报, 1952, 2 152

(1999-12-14收稿)

几种化学药物对银杏种子发芽力的影响

仲恺农业技术学院观赏植物研究中心(广州 510225)
广州中医药大学中药学院
仲恺农业技术学院园艺系

蒋 林*
丁 平
蔡冬梅 罗伟中 陈伟光 谭小勇

摘 要 通过不同浓度的 CaCl_2 、 KNO_3 、 GA_3 溶液对银杏 *Ginkgo biloba* L. 种子浸种, 研究其种子的发芽力。结果表明: CaCl_2 、 KNO_3 、 GA_3 在不同程度上提高银杏种子的发芽率和发芽势。三者浸种的最适浓度分别为 25 mmol/L、0.4 mol/L 和 500 mg/L。其中以 GA_3 的处理效果最好, 用 500 mg/L 浓度处理时可使银杏种子发芽率和发芽势分别提高 33.3%、24.9%, 而且幼苗生长健壮。同时用这 3 种化学药物浸种还能降低烂种率、提早发芽。

关键词 银杏种子 发芽力 化学药物

Studies on the Effect of Soaking with Several Chemicals on the Germination of Seed of *Ginkgo biloba*

Institute of Botany, Zhongkai Agrotechnical College (Guangzhou 510225) Jiang Lin

College of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of TCM Ding Ping

Department of Horticulture, Zhongkai Agrotechnical College Cai Dongmei, Luo Weizhong, Chen Weiguang and Tan Xiaoyong

* Address: Jiang Lin, Zhongkai Agrotechnical College, Guangzhou

蒋 林 男, 1963年6月出生, 汉族, 副研究员。主要从事植物资源的研究和开发。近年来先后承担国家自然科学基金和省部级研究基金5项, 分别获得中国科学院自然科学奖二等奖和广东省自然科学奖二等奖各1项, 发表学术论文30余篇。