

当归愈伤组织培养研究

蔡子平^{1,3}, 王国祥^{1,2,3}, 王宏霞^{1,3}

(1. 甘肃省农业科学院中药材研究所, 甘肃 兰州 730070; 2. 甘肃农业大学农学院, 甘肃 兰州 730070; 3. 甘肃省中药材种质改良与质量控制工程实验室, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 以当年产当归种子为材料, 分别对种子进行去翅和不去翅处理, 观察其无菌苗培养条件及愈伤组织诱导、继代培养情况。结果表明, 当归种子去翅后, 在 1/2 MS 培养基上有利于获得无菌苗, 发芽率达 55.4%, 污染率仅为 6.5%。叶柄为当归愈伤组织诱导的最佳外植体, H 培养基为当归诱导愈伤组织的适宜基本培养基。诱导愈伤组织培养基为 H+0.5 mg/L 2,4-D 时, 出愈率达 90% 以上; 继代增殖培养基为 H+0.5 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L IAA 时, 增殖效果较好。

关键词: 当归; 无菌苗; 愈伤组织; 诱导; 研究

中图分类号: S567.23 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1463(2014)12-0025-03

doi: 10.3969/j.issn.1001-1463.2014.12.009

Study on Callus Induction of *Angelica sinensis*

CAI Zi-ping^{1,3}, WANG Guo-xiang^{1,2,3}, WANG Hong-xia^{1,3}

(1. Institute of Chinese Herbal Medicines, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou Gansu 730070, China; 2. college of Agronomy, Gansu Agricultural University, Lanzhou Gansu 730070, China; 3. Gansu Provincial Engineering Laboratory for Genetic Improvement and Quality Control of Chinese herbal medicine, Lanzhou Gansu 730070, China)

Abstract: The seeds peeled and non-peeled of *Angelica sinensis* are used to study the influence of different hormone combinations and media on callus induction and plant regeneration. The result shows that seeds peeled on 1/2 MS culture medium to cultivate, germination rate is 55.4%, and the pollution rate is only 6.5%; Petiole are the optimal explant, and H medium are the optimal medium; the optimal medium for callus induction is H+0.5mg/L 2,4-D, and the callus forming rate could reach to 90%; the optimal medium for induction of subculture is H+0.5 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L IAA, and the effect of proliferation is better.

Key words: *Angelica sinensis*; Aseptic seedling; Callus; Induction; Study

当归[*Angelica sinensis* (Oliv.) Diels]为伞形科多年生草本植物, 以干燥根入药, 具有补血活血、调经止痛、润肠通便等功效, 素有“十方九归”之称^[1]。其主产于甘肃、云南、四川、陕西、青海等省, 尤以甘肃岷县当归为最佳^[2]。近年来, 随着中药产业的发展, 当归已在美容保健、饮品、调味品等行业中广泛应用, 市场需求量也越来越大, 种植当归已成为甘肃当归主产区的支柱产业

之一^[3]。

当归是一种适宜高海拔育苗、低海拔引种移栽的特殊植物。长期以来, 利用传统开垦生地育苗的方法, 既破坏天然植被, 造成严重的水土流失, 导致环境恶化, 又因当归种子的生产周期长, 繁殖系数低, 育苗成本高。加之近年来由于气温升高, 原适宜区的适宜性下降, 其育苗所需的高海拔荒地也越来越少, 优质当归种苗已成为限制

收稿日期: 2014-10-23

基金项目: 甘肃省农业科技创新专项 (2011GAAS06-8、2012GAAS05-1、2013GAAS03-2、2013GAAS03-2); 甘肃省农业生物技术研究与应用开发项目(GNSW-2011-06)

作者简介: 蔡子平(1982—), 男, 甘肃永昌人, 助理研究员, 主要从事甘肃省道地中药材规范化栽培及良种选育工作。联系电话: (0)13649319808; (0931)7613319。E-mail: gscaizp@163.com

- 期对小秦艽种子萌发特性的影响[J]. 浙江农业科学, 2014(5): 661-663.
- [8] 彭云霞, 王宏霞, 蔡子平, 等. 不同成熟度秦艽种子发芽特性研究[J]. 浙江农业科学, 2013 (8): 956-957.
- [9] 张华瑜, 潘永东. NaHCO₃ 胁迫对 2 个啤酒大麦品种萌发期的影响[J]. 甘肃农业科技, 2014(9): 33-35.
- [10] 王金鹏, 李旻, 赵磊, 等. 中药材种子质量与检验的研究进展[J]. 贵州农业科学, 2012(10): 160-164.
- [11] 袁秀英. 小粒蔬菜种子不同发芽床的发芽试验[J]. 中国种业, 2005(11): 52.

(本文责编: 陈 伟)

当归生产的瓶颈^{4]}。目前,生产中由于品种混杂严重,种苗质量良莠不齐,导致早期抽苔现象严重,影响到当归的产量和品质。随着生物技术的发展,组织培养技术在作物品种改良方面发挥了突出的作用,也为解决当归种子、种苗质量提供了一条新途径^[5-8]。

1 材料与方法

1.1 材料

当归无菌苗培养材料为甘肃岷县茶埠乡当年采集的新鲜种子,分去翅和不去翅两种。

1.2 方法

1.2.1 种子预处理 先将作为培养材料的去翅和不去翅的当归种子用自来水冲洗 1 遍,再加入洗涤剂清洗,然后用自来水冲洗干净,在超净工作台上用 75%乙醇浸泡 10 s,用无菌水冲洗 2~3 遍,再用 1 g/kg 的升汞溶液浸泡 6 min,最后用无菌水冲洗 3~4 次备用。

1.2.2 无菌苗培养 在无菌条件下,将经消毒处理的两种当归种子分别接种于 MS、1/2MS 和自制琼脂培养基(琼脂与水比例为 1:200)3 种培养基中培养。每处理 20 瓶,每瓶 4 粒。每天进行观察,20 d 后统计种子发芽率及污染率。

1.2.3 愈伤组织诱导及外植体筛选 种子培养 20 d,待苗长到真叶抽出后,分别以子叶、真叶、叶柄及根为外植体,在无菌条件下,分别将子叶、真叶、叶柄及根切成 0.5~1.0 cm 的小块,接种于 H+0.5 mg/L 2,4-D 培养基中进行愈伤组织诱导,筛选最佳外植体。每处理 24 瓶,每瓶 3 块。每天观察生长情况,20 d 后统计诱导率。

1.2.4 初代培养 将筛选出的最佳外植体转接到以 H、MS 和 1/2MS 为基本培养基,并添加 0.5 mg/L 2,4-D 的培养基上进行愈伤组织诱导。每处理 16 瓶,每瓶 3 块。每天观察生长情况,20 d 后统计诱导率。

1.2.5 继代培养 15 d 后将初代培养诱导出的愈伤组织再切成小块,转接到以 H 为基本培养基,分别添加 0.5、1.0、2.0 mg/L 2,4-D 和 0、0.5、1.0 mg/L IAA 的继代培养基中培养,以便获得更多的愈伤组织。每处理 16 瓶,每瓶 3 块。每天观察统计生长情况。

1.3 培养条件

培养室温度为 (25±2)℃,光照强度为 1 500~1 800 Lx,光照 12 h/d。

1.4 统计分析方法

有关的试验数据均采用 DPS 和 Excel 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同培养基对无菌苗培养的影响

从表 1 可以看出,去翅种子和不去翅种子的发芽率均以自制琼脂培养基中最高,分别为 79.0% 和 87.5%,但其污染率也分别达到最高值 76.3% 和 85.0%;其次是在 1/2 MS 培养基中,发芽率分别为 55.4% 和 68.6%,且污染率均最低,分别为 6.5% 和 11.6%;在 MS 培养基中的发芽率相对较低,分别为 29.1% 和 40.5%,但污染率均较高,分别为 13.2% 和 14.3%。可见,在同一培养基中,不去翅种子的发芽率明显高于去翅种子,但其污染率也相应较高。综合来看,当归无菌苗培养时,以去翅种子在 1/2 MS 培养基中的培养效果最好。

表 1 不同培养基中当归种子的发芽率及污染率

培养基	培养材料	接种瓶数 (瓶)	发芽率 (%)	污染率 (%)
MS	去翅种子	20	29.1	13.2
	不去翅种子	20	40.5	14.3
1/2MS	去翅种子	20	55.4	6.5
	不去翅种子	20	68.6	11.6
水+琼脂	去翅种子	20	79.0	76.3
	不去翅种子	20	87.5	85.0

2.2 不同外植体对愈伤组织诱导的影响

观察结果表明,接种 5 d 后,子叶、叶柄的边缘均开始膨胀。随着培养时间的延长,叶柄的周围开始出现大量颗粒状、白色愈伤组织,且生长旺盛;子叶膨大明显,在其周围伤口处出现少量颗粒状愈伤组织,但容易褐化;叶片膨大不明显,伤口处慢慢褐化,直至最后叶片全部黄化;根基本没有变化。从表 2 可以看出,叶柄的诱导率最高,达 91.32%,且愈伤组织生长旺盛,色泽亮;子叶诱导率虽在 80% 以上,但容易老化、褐变;叶片的诱导率仅为 18.06%。因此,当归愈伤组织诱导时,以叶柄作为外植体最适宜。

表 2 不同外植体的愈伤组织诱导率

诱导部位	接种块数 (块)	诱导率 (%)	生长情况
子叶	72	84.72±6.36	容易褐化
叶片	72	18.06±16.84	容易褐化
叶柄	72	91.32±8.67	生长旺盛
根	72	0	

2.3 不同培养基对叶柄愈伤组织诱导的影响

从表 3 可以看出,各处理均能较好的对叶柄诱导愈伤组织,其中以 H+0.5 mg/L 2,4-D 培养基的诱导率最高,达 89.58%±13.01%,且愈伤组织数量多,颜色淡黄,生长旺盛;MS+0.5 mg/L

表 4 继代培养诱导效果

基本培养基	激素配比		接种块数 (块)	出愈率 (%)	形态及增殖情况
	2,4-D	IAA			
H	0.5	0	48	97.92 ± 3.61 a	黄白色,疏松团块状,无增殖
H	1.0	0	48	87.50 ± 10.83 ab	黄白偏褐,疏松团块状,无增殖
H	2.0	0	48	68.75 ± 16.53 abc	容易褐化,无增殖
H	0.5	0.5	48	72.92 ± 3.61 abc	黄白色,疏松团块状,增殖明显
H	1.0	0.5	48	56.25 ± 28.64 bc	黄白偏褐,疏松团块状,增殖明显
H	2.0	0.5	48	43.75 ± 21.65 c	容易褐化,无增殖
H	0.5	1.0	48	56.25 ± 18.75 bc	黄色,疏松团块状,增殖明显
H	1.0	1.0	48	64.58 ± 20.09 bc	黄白偏褐,疏松团块状,无增殖
H	2.0	1.0	48	56.25 ± 25.00 bc	容易褐化,无增殖

2,4-D 培养基虽能诱导出愈伤组织,但愈伤组织极褐化严重;1/2 MS+0.5 mg/L 2,4-D 培养基的诱导率相对较低,诱导效果次于 H+0.5 mg/L 2,4-D 培养基。即 H 培养基为当归诱导愈伤组织的适宜基本培养基,H+0.5 mg/L 2,4-D 的诱导效果较好。

表 3 不同培养基对叶柄愈伤组织的诱导效果

培养基	接种块数 (块)	诱导率 (%)	褐化程度
H+0.5 mg/L 2,4-D	48	89.58 ± 13.01	逐渐褐化
MS+0.5 mg/L 2,4-D	48	72.92 ± 9.55	褐化严重
1/2MS+0.5 mg/L 2,4-D	48	79.17 ± 9.55	逐渐褐化

2.4 植物生长调节剂对继代培养的影响

由表 4 可以看出,在 H 培养基中仅添加 2,4-D 时,随着 2,4-D 浓度的增加,出愈率逐渐降低,愈伤组织均无增殖现象;2,4-D 浓度为 0.5 mg/L 时出愈率最高,达 97.92%;2,4-D 浓度为 2.0 mg/L 时诱导出的愈伤组织极容易褐化。同时添加 2,4-D 和 IAA 时,在 IAA 浓度为 0.5 mg/L 条件下,随着 2,4-D 浓度的增加,出愈率逐渐降低,以 2,4-D 浓度为 0.5、1.0 mg/L 时的愈伤组织均增殖明显,生长旺盛;在 IAA 浓度为 1.0 mg/L 条件下,随着 2,4-D 浓度的增加,出愈率呈先增加再降低趋势,以 2,4-D 浓度为 0.5 mg/L 时的愈伤组织均增殖明显,生长旺盛。由此可见,只有低浓度的 2,4-D 配合较高浓度的 IAA 才可产生大量的颗粒状愈伤组织,而高浓度的 2,4-D 对愈伤组织的增殖有抑制作用。以 H+0.5 mg/L 2,4-D 诱导愈伤组织效果最好,出愈率达 90% 以上;以 H+0.5 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L IAA 增殖效果最好。

3 小结与讨论

1) 试验结果表明,种子去翅后在 1/2 MS 培养基上培养是获得当归无菌苗的最佳条件,此时发芽率达 55.4%,污染率仅为 6.5%。叶柄为当归愈伤组织诱导的最佳外植体,H 培养基为当归诱导愈伤组织的适宜基本培养基。诱导愈伤组织培养基为 H+0.5 mg/L 2,4-D 时,出愈率达 90% 以上;继代

增殖培养基为 H+0.5 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L IAA 的增殖效果较好。

2) 当归种子去翅后灭菌更彻底,可极大地降低污染率。选择无菌苗培养基时,在水+琼脂培养基上当归种子萌发率较高,但污染率也很高,其原因有待于进一步研究。组织培养中通常以茎尖或茎段作为外植体进行愈伤组织的诱导,但从当归愈伤组织诱导结果来看,叶柄是最好的诱导材料,这与张俊莲的结论相似,且材料易得,培养效率也较高^[9]。实验中发现,当归愈伤组织在培养过程中极易出现褐化,可能与选用的激素及培养的时间有关,所以在后续的研究中应继续优化激素配比,在继代增殖的过程中要勤转接,尽量减少在同一瓶培养基中的培养时间。

参考文献:

- [1] 国家药典编委会. 中华人民共和国药典(2010版一部)[M]. 中国医药科技出版社, 2010: 124-125.
- [2] 孔令武, 孙海峰. 现代实用中药栽培养殖技术[M]. 人民卫生出版社, 2000: 202-205.
- [3] 鱼亚琼, 邱黛玉, 蔺海明, 等. 外源激素和种苗大小对当归成药期生理变化的影响[J]. 湖南农业科学, 2011(9): 41-44.
- [4] 武延安, 刘效瑞, 曹占凤, 等. 日光温室冬季育苗抑制当归早期抽薹的效应研究[J]. 中国中药杂志, 2005, 35(3): 283-284.
- [5] 张世瑜, 郑国昌. 当归愈伤组织诱导和植株再生[J]. 植物学报, 1982, 24(6): 512-518.
- [6] 张顺培, 贾敬芬, 李浩日, 等. 当归原生质体的分离培养和愈伤组织的形成[J]. 科学通报, 1985 (18): 1 423-1 425.
- [7] 张世瑜, 郑国昌. 当归胚性愈伤组织的诱导及胚状体发生的组织细胞学研究[J]. 植物学报, 1986, 28 (3): 241-244.
- [8] 张俊莲, 米受恩, 栾文举. 当归愈伤组织产生的影响因素分析[J]. 甘肃农业科技, 1995 (11): 8-10.
- [9] 张俊莲. 当归愈伤组织的再分化及植株再生[J]. 甘肃农业大学学报, 1995, 12(3): 293-297.

(本文责编: 王建连)