

培养基对当归愈伤组织的诱导及分化影响研究

王宏霞^{1,3}, 王国祥^{1,2,3}, 蔡子平^{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: 以当归种子为材料, 研究激素组合、培养基对当归愈伤组织的诱导及植株再生的影响。结果表明: 适宜当归愈伤组织的诱导培养基为 H+0.5 mg/L 2,4-D, 出愈率达到 97.92%。继代增殖最佳培养基为 H+0.5 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L IAA。诱导丛生芽的最佳培养基为 1/2MS+0.5 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA+0.5 mg/L ZT, 最高诱导率为 90.3%。适合无根苗生根的培养基为 1/2MS+0.5 mg/L IAA, 生根率达 35.5%。

关键词: 当归; 组织培养; 再生体系; 培养基

中图分类号: S567.23; Q813.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1463(2015)01-0031-03

doi: 10.3969/j.issn.1001-1463.2015.01.012

Study on the Effect of Medium on Induction and Differentiation of Callus of *Angelica sinensis*

WANG Hong-xia^{1,3}, WANG Guo-xiang^{1,2,3}, CAIZi-ping^{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 Engineering Laboratory for Genetic Improvement and Quality Control of Chinese Herbal Medicine, Lanzhou Gansu 730070, China)

Abstract: The seeds 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 the optimal medium for callus induction is H+0.5 mg/L 2,4-D, and on it, the callus forming rate could reach to 97.92%; the optimal medium for induction of adventitious buds is 1/2 MS+0.5 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA+0.5 mg/L ZT, and the highest induction rate is 90.3%; 1/2 MS+0.5 mg/L IAA is the best for rooting, and the rooting rate could reach to 35.5%.

Key words: *Angelica sinensis*; Tissue culture; Regeneration system; Medium

当归 [*Angelica sinensis* (Oliv.) Diels] 为伞形科多年生草本植物, 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], 主产于甘肃省东南部, 是甘肃的特色中药材。

虽然当归的组织培养研究已开展多年^[3-4], 但有关当归组织培养器官发生的文献报道较少^[5-8]。进行当归无菌苗培养和愈伤组织诱导研究, 优化培养条件, 提高诱导增殖率, 利用离体快繁的方式来获得性状稳定的种苗, 有助于替代传统的育苗方式, 解决早期抽苔, 保护当归种植区的植被

和生态环境, 并为当归种苗工厂化生产奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

培养材料为甘肃岷县茶埠乡当年采集的新鲜种子。

1.2 方法

1.2.1 外植体建立 以当年产新鲜种子为材料, 按组培要求接种于 1/2 MS 培养基中进行无菌苗的培养。真叶抽出生长 7 d 后, 在无菌条件下将叶柄切成 0.5 ~ 1.0 cm 的小块, 接种于诱导培养基。

收稿日期: 2014-10-30

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: 王宏霞 (1980—), 女, 甘肃秦安人, 助理研究员, 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)13619327620; (0931)7613319。E-mail: 313535864@qq.com

的研究[J]. 中国农业科学, 2002, 35(4): 359-364.
[14] 宋健民, 戴双, 李蒙圣, 等. 山东省近年来审定小麦品种农艺和品质性状演变分析[J]. 中国农业科学, 2013, 46(6): 1114-1126.

[15] 马小乐, 师桂英, 慕平, 等. 甘肃省 57 个春小麦品种品质性状分析[J]. 甘肃农业大学学报, 2006, 41(1): 43-47.

(本文责编: 杨杰)

1.2.2 诱导培养 诱导培养基以 H 培养基为基本培养基, 分别添加 0.25、0.50、1.00、2.00 mg/L 2,4-D, 观察记载愈伤组织生长、形态变化情况, 20 d 后统计诱导率。

1.2.3 继代培养 诱导培养 15 d 后, 将初诱导出的愈伤组织切成小块, 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。每处理 16 瓶, 每瓶 3 块。每天观察统计生长情况, 20 d 后统计出愈率。

1.2.4 分化培养 挑选质量好的愈伤组织, 经过 2~3 次继代培养后, 接种到以 MS 和 1/2MS 为基本培养基, 并添加了 0.5、1.0 mg/L 6-BA 和 1.0、1.5 mg/L IAA 及 0、0.5 mg/L ZT 的分化培养基上进行分化培养。每天观察统计生长情况, 30 d 后统计分化率。

1.2.5 生根培养 将分化出的绿芽转接到用 MS 和 1/2MS 作为基本培养基, 添加 0、0.5 mg/L KT 和 0.5 mg/L IAA 两种激素的生根培养基上进行培养, 观察统计生长情况, 20 d 后统计生根率。

1.3 培养条件

培养室温度为(25±2)℃, 光照强度为 1500~1800 Lx, 光照 12 h/d。

1.4 统计分析方法

对有关的试验数据采用 DPS 和 Excel 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 诱导培养基对愈伤组织诱导的影响

从表 1 可以看出, 各种诱导培养基均能较好的诱导出愈伤组织。随着 2,4-D 浓度的增大, 愈伤组织的诱导率先升高后下降, 且愈伤组织褐化逐渐严重, 2.00 mg/L 时褐化程度最大。2,4-D 浓度为 0.25 mg/L 和 0.50 mg/L 时, 诱导出的愈伤组织颜色鲜亮, 呈黄白色、疏松团块状, 生长旺盛, 以 0.50 mg/L 诱导率最高。可见, H+0.50 mg/L

2,4-D 培养基为当归适宜诱导培养基。

表 1 不同诱导培养基愈伤组织的诱导率

诱导培养基	接种数 (块)	诱导率 (%)	愈伤组织形态
H+0.25 mg/L 2,4-D	48	92.00	黄白色, 疏松团块状
H+0.50 mg/L 2,4-D	48	97.92	黄白色, 疏松团块状
H+1.00 mg/L 2,4-D	48	87.50	黄白偏褐, 疏松团块状
H+2.00 mg/L 2,4-D	48	68.75	黄白容易褐化

2.2 继代培养基对愈伤组织出愈率的影响

观察发现, 当归愈伤组织多呈疏松团块状, 淡黄白色。由表 2 可以看出, 在 H 培养基中仅添加 2,4-D 时, 愈伤组织均无增殖现象, 且随着 2,4-D 浓度的增加出愈率逐渐降低。2,4-D 浓度在 0.50 mg/L 时出愈率最高, 为 97.92%; 2,4-D 浓度为 2.00 mg/L 时诱导出的愈伤组织极容易褐化。2,4-D 和 IAA 同时使用, 低浓度的 2,4-D 配合较高浓度的 IAA 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+0.50 mg/L 2,4-D 诱导愈伤组织效果最好, 出愈率达 90% 以上。以 H+0.50 mg/L 2,4-D+1.00 mg/L IAA 增殖效果最好。

2.3 分化培养基对愈伤组织分化培养的影响

质量好的愈伤组织, 经过 2~3 次继代培养后, 接种到分化培养基上。7 d 后部分分化出结构较致密而光滑、颜色多为黄绿色的突起, 15 d 后可以看见绿色的芽点, 30 d 左右有丛生芽生成。由表 3 看出, 不同种类基本培养基和不同浓度的激素组合成的分化培养基, 对丛生芽的诱导有很大影响, 在 6-BA 和 NAA 浓度一定的情况下, 以 1/2MS 为基本培养基的丛生芽诱导率明显高于 MS。以 MS 为基本培养基时, 芽分化率明显降低, 并且芽颜色偏白, 脆弱, 生长缓慢, 玻璃化程度高。在同等 6-BA 和 NAA 条件下, 当添加 ZT 时, 愈伤组织分化成苗的几率明显增加, 且分化的丛生芽色呈黄绿色, 生长健壮。综合分析, 1/2 MS+0.5

表 2 不同继代培养基的愈伤组织出愈率

继代培养基	接种数 (块)	出愈率 (%)	形态及增殖情况
H+0.5 mg/L 2,4-D	48	97.92 ± 3.61	黄白色, 疏松团块状, 无增殖
H+0.5 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L IAA	48	72.92 ± 3.61	黄白色, 疏松团块状, 增殖明显
H+0.5 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L IAA	48	56.25 ± 18.75	黄色, 疏松团块状, 增殖明显
H+1.0 mg/L 2,4-D	48	87.50 ± 10.83	黄白偏褐, 疏松团块状, 无增殖
H+1.0 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L IAA	48	56.25 ± 28.64	黄白偏褐, 疏松团块状, 增殖明显
H+1.0 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L IAA	48	64.58 ± 20.09	黄白偏褐, 疏松团块状, 无增殖
H+2.0 mg/L 2,4-D	48	68.75 ± 16.53	容易褐化, 无增殖
H+2.0 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L IAA	48	43.75 ± 21.65	容易褐化, 无增殖
H+2.0 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L IAA	48	56.25 ± 25.00	容易褐化, 无增殖

表 3 不同分化培养基的愈伤组织分化率

分化培养基	接种数 (块)	分化率 (%)	生长情况
MS+0.5 mg/L 6-BA+1 mg/L NAA	50	10.00±6.93	色发白,数量少
MS+1.0 mg/L 6-BA+1.5 mg/L NAA	48	17.33±6.00	黄绿,分化数量少
MS+0.5 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA+0.5 mg/L ZT	50	22.67±15.53	色发白,苗脆弱
MS+1.0 mg/L 6-BA+1.5 mg/L NAA+0.5 mg/L ZT	50	54.00±5.29	黄绿,苗脆弱
1/2 MS+0.5 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA+0.5 mg/L ZT	48	77.10±3.64	黄绿色,生长速度快
1/2 MS+0.5 mg/L 6-BA+1.5 mg/L NAA+0.5 mg/L ZT	60	31.67±8.84	黄绿色,矮小,部分褐化
1/2 MS+1.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA+0.5 mg/L ZT	52	78.83±6.91	黄绿色,但褐化严重
1/2 MS+1.0 mg/L 6-BA+1.5 mg/L NAA+0.5 mg/L ZT	48	90.27±6.37	黄绿色,生长缓慢

表 4 不同生根培养基对生根率的影响

生根培养基	生根率 (%)	生长情况
MS+0.5 mg/L IAA+0.5 mg/L KT	0	丛生芽增殖明显,色呈黄绿色
MS+0.5 mg/L IAA	32.5	根呈簇状,粗短
1/2MS+0.5 mg/L IAA+0.5 mg/L KT	0	丛生芽增殖明显,色呈黄绿色
1/2MS+0.5 mg/L IAA	35.5	根呈簇状,细长

mg/L 6-BA +1.0 mg/L NAA+0.5 mg/L ZT 为诱导丛生芽的最佳分化培养基。

2.4 生根培养基对生根率的影响

由表 4 可以看出,丛生芽在不同培养基上生根情况不同,单独使用 IAA 均能长出簇状根,配合使用 KT 时,丛生芽增殖明显,但未见有生根现象,说明 KT 对当归根的诱导无促进作用,对丛生芽的增殖有明显的促进作用。综合分析,适合当归无根苗生根的培养基为 1/2 MS+0.5 mg/L IAA。

3 小结与讨论

1) 试验结果表明,适宜当归诱导愈伤组织培养基为 H+0.5 mg/L 2,4-D, 出愈率达到 97.92%。继代增殖最佳培养基为 H+0.5 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L IAA。诱导丛生芽的最佳培养基为 1/2 MS+0.5 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA+0.5 mg/L ZT, 最高诱导率为 90.3%。适合无根苗生根的培养基为 1/2MS+0.5 mg/L IAA, 生根率达 35.5%。

2) 植物细胞脱分化是一个复杂的生理生化过程,植物激素在其中发挥着重要作用,不同种类、不同质量浓度的植物激素组合对愈伤组织的诱导和继代培养影响不同^[9]。在植物材料的组织培养中,愈伤组织的分化是最为关键的一步,其主要受外植体本身、培养基等因素的调控^[10]。在相关组织培养的报道中,对愈伤组织的诱导多选用 2,4-D 质量浓度为 1~5 mg/L^[11]。在本试验中,高浓度的 2,4-D 对当归愈伤组织的生长及其形态有不利影响,单独使用 2,4-D 0.5mg/L 可获得较高的愈伤率,这与张俊莲、曲同宝等的结论一致^[12-13]。

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, 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] 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.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 刘颖, 魏景芳, 李冬杰. 甘草愈伤组织培养中激素优化组合的研究[J]. 中草药, 2006, 37(6): 931-933.
- [10] 颜昌敬. 植物组织培养手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1990: 201-206.
- [11] 潘瑞炽. 植物组织培养[J]. 广州: 广东高等教育出版社, 2001.
- [12] 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.
- [13] 曲同宝, 王丕武, 关淑艳, 等. 羊草组织培养及再生系统的建立[J]. 草业学报, 2004, 13(5): 91-94.

(本文责编: 陈 珩)