

川芎的组织培养技术研究

蒋卫东¹, 唐琳¹, 陈鹏¹, 马逾英², 蒋桂华², 陈放¹

(1. 四川大学生命科学院, 四川成都 610064; 2. 成都中医药大学药学院, 四川成都 611137)

摘要 探索川芎的不同组培条件, 优化其诱导和分化培养基。以川芎根、茎段和叶片作外植体进行组织培养, 获得了大量的组培苗, 建立了相应的植株再生系统。川芎根诱导愈伤组织的最佳培养基为 MS+6-BA 0.8 mg/L+ NAA 1.2 mg/L; 茎段及叶片诱导愈伤组织的最佳培养基均为 MS+6-BA 0.5 mg/L+ NAA 1.5 mg/L; 根愈伤组织分化不定芽的最佳培养基为 MS+6-BA 2.2 mg/L+ IAA 0.3 mg/L; 茎段及叶片愈伤组织分化不定芽的最佳培养基为 MS+KT 2.0 mg/L+ IAA 0.5 mg/L。根外植体在愈伤组织、分化不定芽和生根方面的诱导率分别为 84%、86% 和 87%; 茎段和叶片愈伤组织的诱导率达到 92% 和 96%, 其不定芽分化率为 98%, 生根率为 93%。经炼苗后, 获得的组培苗的移栽成活率达 98%。提出了优化激素搭配的培养基, 得到了高效的诱导率、分化率和生根率。

关键词 川芎; 根; 壮苗培养; 组织培养; 植株再生

中图分类号 Q943.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2007)27-08448-03

Study on the Tissue Culture Technique of *Ligusticum chuanxiong* Hort.

JIANG Wei-dong et al (College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610064)

Abstract The study aimed to explore different tissue culture conditions of *L. chuanxiong* and optimize its induction and differentiation medium. In tissue culture with the root, stem segments and leaf of *L. chuanxiong* as explants, a lot of plantlets were obtained and the corresponding plant regeneration system was established. The optimum medium for inducing callus with *L. chuanxiong* root was MS+6-BA 0.8 mg/L+ NAA 1.2 mg/L and that with *L. chuanxiong* stem segments and leaf was MS+6-BA 0.5 mg/L+ NAA 1.5 mg/L. The optimum medium for differentiating adventitious buds from root callus was MS+6-BA 2.2 mg/L+ IAA 0.3 mg/L and that from stem segments and leaf was MS+KT 2.0 mg/L+ IAA 0.5 mg/L. The callus, differentiating adventitious bud and rooting induction of root explants were 84%, 86% and 87% respectively. The callus induction rates of stem segments and leaf were 92% and 96% and their differentiation rate and rooting rate of adventitious bud were 98% and 93%. The transplanting survival rate of obtained plantlets was 98% seedling after-training. The medium with optimizing hormone combination was put forward and the high-effective induction rate, differentiation rate and rooting rate were obtained.

Key words *L. chuanxiong*; Root; Acclimatizing culture; Tissue culture; Plant regeneration

伞形科川芎 (*Ligusticum chuanxiong* Hort.) 是我国四川省著名的道地中药材。目前川芎均为栽培植物, 未见野生。生产上通常采用其地上茎节进行繁殖, 繁殖系数较低, 且易发生病虫害^[1]。贾勇炯等^[2]用长有 1~2 片真叶的川芎幼嫩茎段和叶片作外植体, 袁维纲等^[3]用川芎叶柄作外植体, 都是通过愈伤组织分化出再生植株。彭锐^[4]用川芎长有 1~2 片真叶的茎尖作外植体, 探讨了不同激素对比对茎尖分化不定芽的影响。因为川芎的药用有效成分主要在其根状茎中, 而在川芎的代用品研究中, 芮和恺等^[5]对川芎的根状茎与根中的挥发油成分进行了分析比较, 结果根中挥发油含量及有效成分与根状茎基本相同, 故以其根为外植体诱导生成的愈伤组织中很有可能积累了挥发油及其他有效成分等次生代谢产物, 在生产和临床上可能有一定的参考价值。

笔者以川芎根为外植体进行组织培养, 诱导其产生愈伤组织并建立植株再生系统; 同时以川芎茎段和叶片作外植体进行组织培养, 建立了相应的植株再生系统。因为在川芎组织培养过程中很容易出现黄化苗和玻璃苗, 故笔者在实验中筛选出壮苗培养基, 可使小苗在较短时间内 (14 d 左右) 成长健壮, 并且使黄化苗和玻璃苗的发生率大大降低。

1 材料与方

1.1 材料 川芎采自四川省都江堰市徐渡乡。

1.2 方法

1.2.1 外植体消毒。取川芎根、茎段和叶片, 在流水下冲洗 20 min, 在超净工作台上用 70% 酒精消毒 20 s, 无菌水冲

洗 3 次, 然后用饱和的 Ca(ClO)₂ 溶液消毒 4 min, 再用无菌水冲洗 5~6 次。最后用无菌滤纸吸干表面水分。

1.2.2 愈伤组织诱导培养基的筛选。将根及茎段切成 0.5~1.0 cm 长的小段, 叶片切成 0.5 cm × 0.5 cm 的小块, 接种在附加不同植物生长物质的 MS 培养基上培养。每处理接种 50 瓶, 每瓶接种外植体 4 块。培养基中加 3% 蔗糖, 测试琼脂 0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9% 的浓度梯度, pH 值 5.6、5.8、6.0 的梯度分别对川芎组织培养的影响。培养温度为 (25 ± 2) °C, 光照时间 12 h/d, 光强约为 40 μmol/(m²·s) (下同)。20 d 后观察统计。

1.2.3 不定芽分化培养基的筛选。将愈伤组织块切成约 1.0 cm² 小块接入各分化培养基, 10 d 后统计芽的分化情况。

1.2.4 壮苗培养基的筛选。待丛生芽长到约 2 cm 时, 切下粗壮芽条, 转接到壮苗培养基。20 d 后统计苗的长势情况。

1.2.5 生根培养基的筛选。待苗长到 6~8 cm 时, 转入生根培养基, 14 d 后统计生根情况。

1.2.6 组培苗驯化与移栽。组培苗生根后, 自然光下驯化 2 d, 打开封口膜, 炼苗 2~3 d 后, 用清水洗去根部培养基, 并剔除异常苗, 移栽到沙和蛭石各半混合成的基质中, 置于半阴处, 适当浇水。待小苗生长健壮后, 定植于大田。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的产生及形态 所有愈伤组织分为两种: 一种质地柔软疏松, 半透明, 淡黄色或乳白色, 生长迅速; 另一种质地坚实紧密, 颗粒细小, 不透明, 黄绿色, 生长缓慢。由表 1 可见, 叶片愈伤组织产生时间早于茎段, 茎段愈伤组织产生时间早于根。茎段和叶片在供试培养基的组合中都能诱导产生愈伤组织, 而根在单独使用 2,4-D、NAA 以及二者的组合中不能诱导产生愈伤组织; 单独使用 6-BA 可诱导产生

基金项目 国家科技攻关计划“十五”攻关课题(2004BA721A31)。

作者简介 蒋卫东(1982-), 男, 河南洛阳人, 硕士研究生, 研究方向: 植物发育生物学与生物技术。

收稿日期 2007-03-03

愈伤组织,但易使叶片黄化,玻璃化;单独使用 2,4-D、NAA 或二者的组合虽能诱导茎段和叶片产生愈伤组织,但 7 d 后就分化毛状根,且二者同时使用时毛状根生长旺盛。以上所产生的愈伤组织都为第一种愈伤组织。6-BA 与 NAA 的组合既能诱导根,又能诱导茎段和叶片产生愈伤组织,并且两种愈

伤组织都有。13 种培养基中,以幼根为外植体、MS + 6-BA 0.8 mg/L + NAA 1.2 mg/L 为培养基,以幼茎段及叶片为外植体、MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 1.5 mg/L 为培养基,愈伤组织的诱导率及生长速度均较理想,诱导率分别达 84%、92% 和 96%,适宜于川芎愈伤组织的诱导。

表 1 川芎愈伤组织诱导与植物生长物质

植物生长物质//mg/L			时间//d			根		茎段		叶片	
2,4-D	NAA	6-BA	根	茎段	叶片	成愈数	诱导率//%	成愈数	诱导率//%	成愈数	诱导率//%
1.5			-	30	31	-	-	172	86	176	88
2.0		0.5	32	29	28	156	78	176	88	180	90
1.5		0.5	33	28	27	160	80	180	90	184	92
1.0		0.5	31	28	27	164	82	180	90	188	94
0.5		0.5	32	28	27	164	82	176	88	188	94
	1.5		-	29	29	-	-	176	88	184	92
	1.5	0.5	29	25	22	164	82	184	92	192	96
	1.2	0.8	26	27	27	168	84	180	90	188	94
	1.0	0.8	28	28	28	164	82	180	90	184	92
	1.0	0.5	31	28	28	160	80	180	90	188	94
	0.5	0.5	31	28	28	160	80	176	88	184	92
		1.2	33	30	29	152	76	172	86	180	90
0.5	1.5		-	30	29	-	-	176	88	180	90

2.2 不定芽的诱导 在表 2 中,将根的愈伤组织、茎段及叶片的愈伤组织转入不定芽诱导的培养基中,实验对比发现,MS + 6-BA 2.2 mg/L + IAA 0.3 mg/L 是根愈伤组织诱导不定芽的最适培养基,MS + KT 2.0 mg/L + IAA 0.5 mg/L 是茎段及叶片愈伤组织诱导不定芽的最适培养基。第一次继代培养过程中,原淡黄色或乳白色愈伤组织逐渐变绿,在绿色愈伤组织上又长出新的浅绿色较致密的愈伤组织块。这种愈伤组织经进一步继代培养 11 d 后在其切口处开始陆续出现不定芽。新的可产生不定芽的愈伤组织再转移到原来诱导愈伤组织的培养基上进一步继代培养又可产生疏松状的愈伤组织,二者可互相转化。将川芎根、茎段及叶片接入 MS + 6-BA(0.5~1.2)mg/L + NAA(0.5~1.5)mg/L 的培养基上都能长出两种愈伤组织,继代培养后,未见有芽点分化。而在根愈伤组织诱导不定芽的培养基 MS + 6-BA 2.2 mg/L + IAA 0.3 mg/L 及茎段及叶片愈伤组织诱导不定芽的培养基 MS + KT 2.0 mg/L + IAA 0.5 mg/L 中,不仅能诱导愈伤组织发生,而且能诱导其分化出小芽点,并长大为无根苗。芽的分化率约为 86%(外植体为根)和 98%(外植体为茎段和叶)。

2.3 继代培养及壮苗培养 由表 2 可知,川芎在各种培养基上均可生长,由根诱导的愈伤组织在 MS + 6-BA 2.2 mg/L + IAA 0.3 mg/L 的培养基上 11 d 后开始出现不定芽,由茎段及叶诱导的愈伤组织在 MS + KT 2.0 mg/L + IAA 0.5 mg/L 的培养基上 10 d 后开始出现不定芽。此时可无需特殊培养基,不定芽丛即可在原瓶继续分化增殖,但在原瓶易生长拥挤造成分化不良和玻璃化。将不定芽切下,分别用原来的诱导不定芽的最佳培养基继代,即可继续增殖。待苗长到约 2 cm 时,将其转入壮苗培养基中(表 2),经实验对比,MS + GA₃ 1.2 mg/L + 6-BA 1.8 mg/L + IAA 0.3 mg/L 为最适壮苗培养基,转入其中约 14 d 后,小苗可长到 6~8 cm。在壮苗培养基中苗的长势很好,健壮、叶色正常。

2.4 根的分化及植株再生 将长至 6~8 cm 的小苗转入表 2

中的生根培养基中,经筛选和观察对比,最适的生根培养基分别为 1/2 MS + IBA 1.0 mg/L + NAA 0.7 mg/L(外植体为根)和 1/2 MS + IBA 0.7 + NAA 0.4(外植体为茎段和叶)。这些无根苗 10 d 时开始分化出根的生长点,14 d 时开始长出粗壮的幼根。23 d 后的生根率分别约为 87% 和 93%,平均根数为 8,平均根长为 6 cm。

表 2 培养基成分与川芎的生长状况

用途	基本培 培养基	植物生长物质//mg/L					生长状况
		6-BA	KT	NAA	IAA	IBA	
根愈伤组织 诱导不定芽	MS	2.2		0.3			不定芽多,健壮,生长快
	MS	2.0					不定芽较多,但易玻璃化
	MS	1.5		0.5			不定芽较多,较健壮,生长慢
	MS	2.0		0.5			不定芽多,但易玻璃化
	MS	2.0		0.5			不定芽较多,健壮,生长较快
	MS	2.0					不定芽多,但易玻璃化
	MS	2.0		0.5			不定芽较多,但易玻璃化
茎段及叶片 愈伤组织诱 导不定芽	MS		2.0		0.5		不定芽多,健壮,生长快
	MS		2.0				不定芽多,但易玻璃化
	MS		2.0				不定芽较多,但易玻璃化
	MS	2.0		0.5			不定芽较多,健壮,生长慢
	MS	2.0		0.5			不定芽较多,健壮,生长慢
壮苗培养	MS	1.8		0.3		1.2	苗生长快,叶色正常,健壮
	MS	1.8					苗生长较快,叶片黄化,玻璃化
	MS	1.8		0.3			苗生长缓慢,叶色正常,健壮
根分化 (外植体为根)	MS					2.0	苗生长较快,叶片玻璃化
	1/2 MS						根数少,根细,生长较慢
	1/2 MS		0.7		1.0		根数多,根粗,生长快
	1/2 MS				1.0		根数多,根粗,生长较快
根分化 (外植体为 茎段和叶)	MS						根数少,根细,生长较慢
	1/2 MS						根数少,根细,生长较快
	1/2 MS		0.4		0.7		根数多,根粗,生长快
	1/2 MS				0.7		根数多,根粗,生长较快

2.5 pH 值和琼脂浓度的诱导效应 以叶片为外植体研究了 pH 值和琼脂浓度对川芎组织培养结果的影响,结果(表 3、4)表明:培养基的 pH 值和琼脂浓度不合适,叶片黄化、玻璃

化。诱导愈伤组织、不定芽及生根,均选用 pH 值 5.8,琼脂 0.6%~0.7%。

表3 pH值与诱导结果

pH值	愈伤组织诱导	不定芽诱导	根诱导
5.6	叶片黄化、玻璃化	不产生不定芽	不生根
5.8	产生愈伤组织	产生不定芽	生根
6.0	叶片黄化、玻璃化	不产生不定芽	生根慢、根数少

表4 琼脂浓度与诱导结果

琼脂浓度//%	愈伤组织诱导	不定芽诱导	根诱导
0.5	叶片黄化、玻璃化	不产生不定芽	不生根
0.6	产生愈伤组织	产生不定芽	生根
0.7	产生愈伤组织	产生不定芽	生根
0.8	叶片黄化、玻璃化	不产生不定芽	生根慢、根数少
0.9	叶片黄化、玻璃化	不产生不定芽	生根慢、根数少

2.6 生长素对川芎组培苗生根的影响 川芎组培苗接种在含有不同浓度 2,4-D 的培养基中,经 10 d 左右培养,其基部切口处产生大量淡黄色或乳白色疏松易碎状愈伤组织,未见不定根发生。浓度较低(0.2 mg/L)时,才有少量组培苗可以生根,但根均较细,不及对照的根粗壮,且数目均较对照少。表现出 2,4-D 对不定根的生长具有明显的抑制作用。

在含有 IBA 或 NAA 的培养基中,组培苗接种 5 d 后苗基部开始有少许膨大,14 d 后开始产生不定根,且生根率、生根条数及根长均比对照高,表现出 IBA 和 NAA 对组培苗不定根的发生及发育具有促进作用。当培养基中同时含有 IBA 和 NAA 且二者比例适当时,在生根率、生根条数及根长上都比单独使用 IBA 或 NAA 一种激素的作用明显,表现出 IBA 和 NAA 同时使用时对组培苗不定根的发生及发育具有协同促进作用。将组培苗接种在含有 IAA 的培养基中,15 d 后组培苗基部先形成愈伤组织,进而由愈伤组织分化出不定根,但不定根与茎连接疏松,移栽时易脱落。

2.7 组培苗移栽 因为川芎组培苗的移栽成活较易,用常规炼苗法即可,组培苗的移栽成活率可达 98% 以上。

3 小结与讨论

川芎茎段和叶片外植体在诱导愈伤组织时所需的培养基基本一致,均为 MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 1.5 mg/L;在分化不定芽时所需的培养基基本一致,均为 MS + KT 2.0 mg/L + IAA 0.5 mg/L;在生根培养基方面也基本一致,都为 1/2 MS + IBA 0.7 mg/L + NAA 0.4 mg/L。可见在川芎组织培养过程中茎段和叶片所需的植物生长调节物质和其他营养物质基本一致。而川芎根在诱导愈伤组织、分化不定芽和生根方面所需的培养基分别为:MS + 6-BA 0.8 mg/L + NAA 1.2 mg/L、MS + 6-BA 2.2 mg/L + IAA 0.3 mg/L 和 1/2 MS + IBA 1.0

mg/L + NAA 0.7 mg/L。可见,在组织培养和植株再生过程中,根和茎段、叶片之间在所需的植物生长调节物质方面存在较为明显的差异。

川芎不同器官诱导愈伤组织的能力为:叶片 > 茎段 > 根。川芎不同外植体在分化阶段不仅分化率较高,且芽条粗壮,生根情况也较理想。不定芽的分化能力与愈伤组织块的质量、培养基的植物生长物质种类和浓度有关。

根外植体在诱导愈伤组织、分化不定芽和生根方面的效率分别为:84%、86%和 87%,茎段和叶片诱导愈伤组织的效率分别达到 92%和 96%。茎段和叶片在形成愈伤组织后,在分化不定芽时的效率均约为 98%,可见二者在形成愈伤组织后,在分化不定芽方面的能力基本一致;二者的不定芽在生长发育成无根苗后,在生根方面的效率均约为 93%,可见二者的无根苗在生根方面的能力也基本一致。由此可见,川芎不同器官的愈伤组织在分化不定芽方面的能力为:叶片 ≈ 茎段 > 根;川芎不同器官愈伤组织在分化发育成为无根苗后,它们在生根方面的能力为:叶片 ≈ 茎段 > 根。

在壮苗阶段,川芎不同器官愈伤组织在分化出不定芽后,它们在使用壮苗培养基方面是基本一致的,均为:MS + GA₃ 1.2 mg/L + 6-BA 1.8 mg/L + IAA 0.3 mg/L。在壮苗过程中,向培养基中同时加入适当浓度的 GA₃、6-BA、IAA 可使小苗在短时间内伸长茎段和增加叶片面积,并可使小苗茎干粗壮。若向培养基中单独加入适当浓度的 GA₃、BA 或 IAA,小苗仍生长,但发育缓慢,在生长过程中仍易出现黄化苗和玻璃苗。可见在川芎组织培养壮苗过程中,激素的组合使用比单独使用某种激素起到了增效作用。应用壮苗培养基后,川芎组织培养过程中黄化苗和玻璃苗的出现率大大降低。

笔者以川芎根作外植体,诱导其产生愈伤组织。同时以茎段和叶片外植体为对照。三类外植体均产生两种愈伤组织:第一种质地柔软疏松,半透明,淡黄色或乳白色,生长迅速;第二种质地坚实紧密,颗粒细小,不透明,黄绿色,生长缓慢。在愈伤组织产生之初,第二种愈伤组织的数量和体积比起第一种都很微小,很容易被忽视。两种愈伤组织可通过变换不同培养基相互转化。以根作外植体诱导生成的愈伤组织中是否含有药用成分和含有药用成分的多少,仍需进一步的实验探索和验证。

参考文献

- [1] 万德光,彭成,赵军宁.四川道地中药材志[M].1版.成都:四川科学技术出版社,2005:7.
- [2] 贾勇炯,高国,张贡华.川芎的组织培养及植株再生[J].植物生理学通讯,1983(3):48.
- [3] 裴维纲,刘素珍,杨观梅.川芎叶柄愈伤组织的诱导和植株再生[J].植物生理学通讯,1983(5):43-44.
- [4] 彭锐.激素配比对川芎外植体不定芽分化的影响[J].中药材,2002(3):160-161.
- [5] 芮和恺,何清英,余秋妹,等.不同部位及不同产地川芎质量的比较[J].中国中药杂志,1982,7(5):13.

(上接第 8447 页)

泥炭土的成活率最高,分别为 97.3%和 96.1%。

参考文献

- [1] 潘瑞识.植物组织培养[M].广州:广东高等教育出版社,2003.

- [2] 沈惠娟.木本植物组织培养技术[M].北京:中国农业科技出版社,1992.
- [3] 陈正华.木本植物组织培养及其应用[M].北京:高等教育出版社,1986.