

甘草花药培养中愈伤组织诱导
和芽再生植株*

苟克俭 任 茜

(陕西中药研究所, 咸阳·712100)

5567-710.3

摘 要 用甘草单核靠边期花药离体培养, 在多种培养基上诱导出愈伤组织。高浓度蔗糖有利于雄核发育, 愈伤组织染色体数 8, 证明其为单倍体。经转代培养后分化出芽, 再生植株。

关键词 甘草, 花药培养, 愈伤组织, 单倍体, 芽, 再生植株

中图分类号 S567.710.353, S503.53

甘草是重要的常用中药, 也是轻工业原料。由于无计划采挖, 导致我国各主要产区均面临资源枯竭、质量下降的局面。为了提高质量和产量, 各主产省区已经陆续展开了甘草的大面积人工栽培。培育良种, 改良甘草品质则是提高生产效益从而促进甘草人工栽培事业持续发展的关键。

甘草生育期长, 5 年以上才开花结实, 因此育种难度很大。本文报道甘草由花药诱导形成花药愈伤组织并再生植株的研究结果。

1 材料和方法

1.1 供试材料

取野生甘草 (*Glycyrrhiza uralensis*) 不同发育阶段的花药进行涂片镜检, 以确定单核靠边期花粉相应的花药及花蕾外部形态指标, 保证接种材料在发育阶段上的相对一致^[1]。

1.2 试验方法

取花粉发育阶段处于单核靠边期(附图-1)的花蕾, 用 70% 酒精表面灭菌 3~5 s 后再移入 0.25% 氯化汞中 10 min。在无菌条件下剥取花药, 分别置于固体培养基表面培养和相同成份的液体培养基进行浅层培养^[2]。

诱导培养基分别采用 MS, N₆, Miller, Nitsch, Torrey。各培养基中均添加 CH1 g/L, peptone 1 g/L, BA₁₋₁₀ (mg/L 单位下同), NAA_{0.1-10}, IAA_{0.5}。将蔗糖浓度设置为 3%, 5%, 10%, 12%, 15%。用 0.7% 琼脂固化。于室内自然光下 25±1℃ 培养。

于不同时间分别取培养中的花药用 FAA 或卡诺 I 固定液固定。常规石蜡切片, 厚度 4~6 μm, 番红、固绿对染, 封片、观察、照像。

染色体观察时, 取花药愈伤组织用对二氯苯预处理 1.5~2 h, 卡诺 I 固定 18 h, 0.2 mol 盐酸水解 12 min, 石炭酸品红染色, 常规压片、观察、照像。

收稿日期: 1992-05-25

* 国家“七五”攻关项目

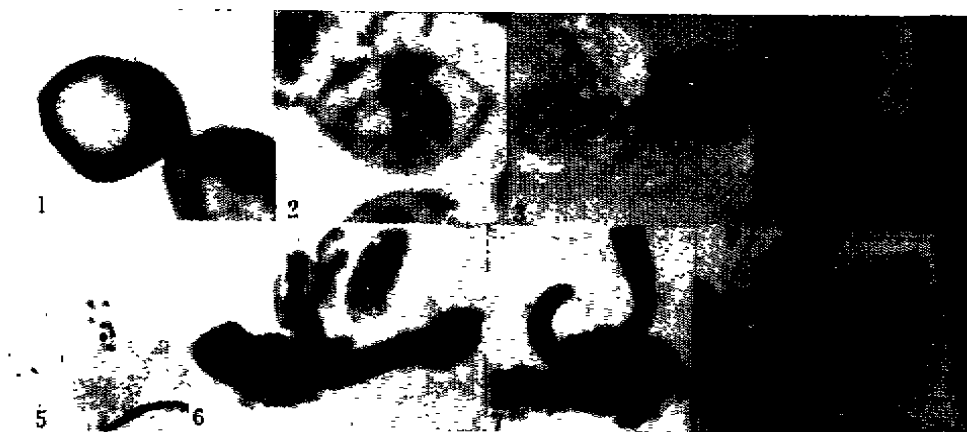
12091

分化培养基为 $1/2\text{ MS} + \text{BA}_{2.5} + \text{IAA}_{0.01}$, 分别附加 $\text{NAA}_{0.01}$, $\text{NAA}_{0.05}$, $\text{NAA}_{0.1}$ (浓度单位均为 mg/L), 日光灯照明 10 h/d , 光强约 1500 lx . 培养温度为 $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

2 结 果

2.1 愈伤组织的诱导

2.1.1 培养过程 经一周培养后, 一部分花丝疏松膨大, 呈去分化状态。花药壁失去光泽。培养至 20 d 左右, 大多数花药的外部形态看不出变化。另一些花药外表略有膨胀, 切片表明在这种花药的药室内形成一些多细胞的组织(附图-2)。培养 40 多天后, 可见淡黄色的愈伤组织突破花药壁, 体积约 1 mm^3 (附图-3)。继续培养, 愈伤组织逐渐变为淡绿色。



附图 甘草花药培养中的愈伤组织

1. 单核靠边期花粉 $\times 202$; 2. 多细胞花粉 $\times 202$; 3. 花药愈伤组织 $\times 3$;
4. 花药愈伤组织 $\times 4$; 5. 花药愈伤组织染色体数 $2n=x=68 \times 504$

2.1.2 培养基的影响 对 5 种培养基的诱导结果进行了比较, 如表 1 所示。MS, N_6 , Miller, Nitsch, Torrey 均能诱导形成甘草花药愈伤组织。其中以 $\text{MS} + \text{BA}_{2.5} + \text{IAA}_{0.5} + \text{NAA}_5$ 诱导率最高, 可达到 3.6% 。在相同的激素浓度条件下, 以 Torrey 培养基的诱导率较低, 为 0.6% 。

表 1 基本培养基对花药愈伤组织诱导率的影响

诱导培养基(mg/L)	接种花药数(枚)	获愈伤组织块数	诱导率($\%$)
$\text{MS} + \text{BA}_{2.5} + \text{IAA}_{0.5} + \text{NAA}_5$	2 500	90	3.6
$\text{N}_6 + \text{BA}_{2.5} + \text{IAA}_{0.5} + \text{NAA}_5$	2000	65	3.3
Miller + $\text{BA}_{2.5} + \text{IAA}_{0.5} + \text{NAA}_5$	2300	31	1.2
Nitsch + $\text{BA}_{2.5} + \text{IAA}_{0.5} + \text{NAA}_5$	1900	18	0.9
Torrey + $\text{BA}_{2.5} + \text{IAA}_{0.5} + \text{NAA}_5$	2200	14	0.6

2.1.3 蔗糖的作用 在甘草花药的离体培养中, 所诱导的愈伤组织的来源与蔗糖浓度有显著的关系。蔗糖浓度较低时, 有利于由花丝或由花丝的切口形成愈伤组织; 蔗糖的

浓度较高时,有利于由花药部位形成愈伤组织,如表 2 所示。当蔗糖浓度达到 15%时,只有花药部位形成愈伤组织(附图-4)。

表 2 蔗糖浓度对花丝和花药愈伤组织的影响

蔗糖浓度(%)	总愈伤组织数	花丝愈伤组织	花药愈伤组织	花药愈伤占(%)
3	35	35	0	0
5	29	29	0	0
10	52	43	9	17
12	65	37	28	43
15	45	0	45	100

注:基本培养基为 MS+BA_{2.5}+IAA_{0.5}+NAA₅。

2.1.4 培养基物理状态的影响 研究发现,当蔗糖浓度达到 15%时,在静置培养中,外植体能较长时间漂浮于培养基表面。由表 3 可以看出,在 MS+BA_{2.5}+IAA_{0.5}+NAA₅ 条件下,液体浅层静置培养能提高甘草花药愈伤组织的诱导率约 10%。

表 3 培养基物理状态对花药愈伤组织诱导率的影响

基本培养基(mg/L)	物理状态	接种花药数	获愈伤组织块数	诱导率(%)
MS+BA _{2.5} +IAA _{0.5} +NAA ₅	固体	2500	90	3.6
MS+BA _{2.5} +IAA _{0.5} +NAA ₅	液体	3200	128	4.0

2.2 染色体检查

甘草体细胞染色体为 $2n=16^{[3]}$ 。在甘草花药愈伤组织中观察的 27 个分裂细胞中, $n=8$ (附图-5)的单倍体细胞有 20 个,约占 74%,还有部分二倍体细胞和非整倍体细胞。总的来看,染色体观察表明,在甘草花药培养中所诱导的花药愈伤组织是来源于花粉的。

2.3 分化培养

把由各种诱导培养基上诱导形成的花药愈伤组织转移至分化培养基上。经近 2 个月的培养,分化出芽(附图-6,7)。由表 4 看出,在甘草花药愈伤组织分化培养中:将诱导培养过程中高浓度生长素减至较低的浓度(0.02~0.05 mg/L)、保持 0.01~0.05 mg/L 的 NAA 是必要的条件。

表 4 花药愈伤组织分化情况

NAA 浓度(mg/L)	转入愈伤组织块数	得芽数	分化率(%)
1/2MS+BA _{2.5} +IAA _{0.01} +NAA ₀	45	0	0
1/2MS+BA _{2.5} +IAA _{0.01} +NAA _{0.01}	76	1	1.3
1/2MS+BA _{0.05} +IAA _{0.01} +NAA _{0.01}	80	3	3.7
1/2MS+BA _{0.1} +IAA _{0.01} +NAA _{0.01}	53	0	0

2.4 成苗培养

把在分化培养基上形成的芽切下后,移入 1/2 MS₀ 培养基上,经近一个月的培养后,逐渐发育成小苗(附图-8)。

3 讨 论

1)本研究已从甘草的花药诱导出花粉愈伤组织,进而诱导出苗。结果表明,甘草花药对基本培养基的适应面较广,其中以 MS 附加 BA_{2.5}+IAA_{0.5}+NAA₅ 的诱导率较高。

2)研究了诱导培养基中蔗糖浓度对外植体的影响,表明在 $MS+BA_{2.5}+IAA_{0.5}+NAA_5$ 的条件下,较高浓度的蔗糖有利于甘草花药愈伤组织的诱导。这与小孢子胚胎发生有相同之处^[4]。

3)研究了培养基物理状态对花药愈伤组织诱导率的影响。结果表明,液体浅层静置培养(少量培养液加一片无菌滤纸)优于固体培养。与固化培养相比,这与外植体既有较多的表面积接触培养基,其有害的代谢产物又比较容易扩散开去等原因有关。

4)甘草花药愈伤组织的诱导率和分化率均很低,还有待于进一步研究。

参 考 文 献

- 1 陶自荣,刘敏颂,祝仲纯.马铃薯未传粉子房离体培养诱导双单倍体植株.遗传学报,1988;15(5):329~334
- 2 傅毓华,王玉琴.植物组织培养技术的两点改进.植物生理学通讯,1987(1):36~37
- 3 马兴华,覃若林,邢文斌.新疆20种药用植物的染色体观察.西北植物学报,1985;5(2):149~154
- 4 张大卫,陈正华,李文彬.初始培养条件对定兴芥小孢子胚胎发生的影响.实验生物学报,1989;22(1):19~22

Calli Induction and Plantlet Regeneration in Anther Culture of *Glycyrrhiza uralensis*

Gou Kejian Ren Qian

(Shannxi Institute of Traditional Chinese Medicine, Xianyang, Shaanxi, China, 712100)

Abstract Pollen calli were induced by sorts of medium from vitroculture of anther in which microspores were in latter stage. High concentration of sucrose is favourable for the male nuclear development. There were 8 chromosome in the calli cells, proving to be monoploid. Then, regeneration bud and plantlet were formed by successive transfer culture.

Key words *Glycyrrhiza uralensis*, Anther culture, Calli, monoploid, bud, regeneration plantlet