

丽江山慈姑愈伤组织的诱导 和植株再生的研究*

张政铨 聂开印 胡尤敏

(中国科学院武汉植物研究所)

提 要

本文初次报道了含秋水仙碱植物——丽江山慈姑(*Iphegenia indica* Knuth)愈伤组织的诱导和植株再生的研究工作。从而解决了这种临危稀少植物的繁殖再生问题。丽江山慈姑愈伤组织的诱导需在弱光下进行,苗的分化需在较强的光下培养。NAA既影响愈伤组织的生长,又影响出苗。诱导愈伤组织的pH值为5.8,诱导苗的pH值为5.4。

关键词: 丽江山慈姑; 含秋水仙碱器官; 愈伤组织; 植株再生

丽江山慈姑(*Iphegenia indica* Knuth)属百合科,野生,分布于我国云南的丽江、大理和四川南部等地区,资源很少。更因其鳞茎和种子中含有秋水仙碱(Colchicine)[3],前几年人们曾大量挖掘,导致该种植物有灭绝的可能性。

秋水仙碱能用于治疗痛风等疾病;科研上可用于染色体的加倍;最近发现它还是一种特殊的微管抑制剂[5],与细胞松弛素共用可使细胞核和胞质分开[1]。秋水仙碱价格昂贵,长期以来我国一直依赖进口。另外由于丽江山慈姑的种皮无透性,种子发育不良,极难发芽。用鳞茎繁殖,一个老鳞茎只长一个新鳞茎(保持原种,并不增殖)。如果用野生资源在大田繁殖,经济上又很不合算。因此我们试图通过组织培养产生试管苗和愈伤组织,以保持种源不致灭绝,并可作为生产秋水仙碱的原料。

我们用鳞茎、鳞片、子房和种子等作外植体,从30多种培养基中筛选出较合适的培养基,从而得到了愈伤组织,并分化出了试管苗。

材料和方法

取丽江山慈姑鳞茎、鳞片、子房和蒴果等用自来水冲洗干净,晾干,放入75%酒精中,表面灭菌1分钟,再放入0.1%升汞灭菌10分钟,最后用无菌水冲洗4—5次,用

本文于1985年1月24日收到。

* 本文图片由本所刘茵茵同志摄制。

灭菌刀将以上外植体切成3—5毫米大小的切块,用无菌镊子从蒴果剥出种子,接种在装有固体培养基的50毫升三角瓶中,其中的培养基均按不同配方组成, pH值为5.8。

接种后的三角瓶放在25°C左右散射弱光下培养。30多天后,在15号培养基上(MS培养基加2.4—D 1—2mg/l、玉米素0.5—2mg/l),出现了3—5毫米大小浅黄色的愈伤组织(见图版I—1,2)。

将这些愈伤组织继代培养在MS培养基(其中2.4—D 0.5mg/l、甘氨酸1mg/l、IAA 0.5mg/l、L—苯丙氨酸0.5—1mg/l、pH值5.8)上,仍在25°C左右散射弱光下,15—20天左右,愈伤组织增长25—30倍。继代培养长出的愈伤组织(见图版I—3)。测定愈伤组织增殖的方法是:先将装有培养基未接种的三角形瓶称重,接种后再称重,15—20天后,收集愈伤组织称重,计算增长的倍数。

试管苗的分化:用继代1—2次的愈伤组织作诱导分化的材料,以MS培养基的大量和微量元素为基础,附加2.4—D 0.1mg/l, 6—BA 1mg/l, pH值5.4,培养在25°C、40瓦日光灯下,光照10小时,20天左右愈伤组织由疏松浅黄色变成较坚硬的浅绿色间有少许白色。将这种愈伤组织转到附加有IAA 0.5—2mg/l,激动素1—2mg/l, pH值为5.4的MS培养基上,15天左右便出现了带根的深绿色小苗(见图版I—4)。再将小苗转到二分之一的MS培养基的大量和微量元素上,温度和光照不变,小苗生长更加健壮,30天左右便长出了许多小鳞茎(见图版I—5)。

结果和讨论

丽江山慈姑的鳞茎、鳞片、子房和幼嫩的种子均可在稍加改变的MS培养基上(15号培养基),于合适的光、温条件下诱导出愈伤组织,也能很快增殖,并不随继代时间的增加而减低增殖速度(1980年诱导出的愈伤组织到1984年已4年多了,增殖速度仍未降低)。但是地上茎和叶片却始终未能诱导出愈伤组织。根据国内外学者对含秋水仙碱植物的分析资料来看,大多数都在鳞茎和种子中含有秋水仙碱^[5],我们所用的丽江山慈姑材料,据分析含秋水仙碱的部位也是鳞茎和种子^[3]。在本试验中,含秋水仙碱的部位都诱导出了愈伤组织,不含秋水仙碱的地上茎和叶片却未诱导出来。这似乎是一个奇怪的现象,是否在产秋水仙碱植物而富含秋水仙碱的器官中,有一种对秋水仙碱的调节系统。因此,在诱导愈伤组织或继代培养时未表现出对细胞分裂的影响,其中的机制又是什么,还值得进一步探讨。

继代的愈伤组织,在24—26°C下生长极快,但若培养在20°C以下或30°C以上时,生长慢,几乎不能增殖。几种愈伤组织均能在20°C以下不经转管保持半年以上,有的可保持8个多月不老化,仍很新鲜,色浅黄,一转入新鲜培养基并给予合适的温度又能迅速地增殖。

从愈伤组织上分化出苗,我们以MS培养基的大量和微量元素为基础,改变生长素和细胞分裂素的种类和比例,作了不少个组合,结果在附加2.4—D 0.1mg/l和6—BA 1mg/l的培养基上,由散射弱光增强为40瓦日光灯,光照10小时,愈伤组织很快便由浅黄变为浅绿间有白色,质地也由原来的疏松变得较为坚硬。将2.4—D换成IAA, 6—BA换

成激动素, pH值由5.8降到5.4, 光照仍为40瓦, 10小时, 在这个条件下, 质地较硬的浅绿色愈伤组织, 很快便出现了深绿色的小苗。再转入降低大量、微量元素并去掉生长素和细胞分裂素, pH值仍为5.4的培养基上, 小苗生长很壮, 出现了成丛状的小鳞茎(见图版 I—5)。从生长培养基上移入分化培养基, 我们采取逐步减少生长素, 并更换生长素和细胞分裂素的种类和比例。在较短的时间内促使其出苗。

在诱导分化过程中, 我们曾将2.4—D换成NAA, 并配合其他的细胞分裂素, 试图诱导带根的幼苗, 但未能成功, 无论哪一部位诱导出的愈伤组织, 一转入带有NAA成分的培养基中便立即老化变坏。只有在生长素换成了IAA的培养基上, 配合一定比例的细胞分裂素才能启动分化。

关于生长素和细胞分裂素组成的比例对促进愈伤组织的分化已有不少报道^[8-10], 一般规律是2.4—D的一定浓度对诱导愈伤组织有促进作用, IAA和激动素与6—BA的适当比例, 对分化有促进作用, 我们的试验结果也符合这一规律。

用百合科植物作组培材料, 前人已作了不少工作, 有几十种植物由不同来源的外植体得到了愈伤组织和再生植株, 有的也得到了小鳞茎, 但还未见到由丽江山慈姑诱导愈伤组织和分化出苗的报道。其他药用植物如: 芹叶黄连、罗芙藤、人参、柴胡等器官分化后有效成分仍然存在^[11]。丽江山慈姑的愈伤组织和再生植株中是否含有秋水仙碱尚需进一步探索。

参考文献

- (1) 沈鼎武等, 1980: 微管蛋白聚合抑制剂与细胞排核。实验生物学报, 13(4)。
- (2) 沈鼎武等, 1980: CB和秋水仙素对细胞运动影响的比较研究。实验生物学报, 13(4)。
- (3) 周俊等, 1977: 嘉蓝和丽江山慈姑的化学成分。云南植物研究, 第二期, p.62-67。
- (4) 郭江莲, 1975: 药用丽江山慈姑的栽培技术。中草药通讯, 第一期。
- (5) Gasic, O., M. Popovic, L. J. Igvic, 1981: Alkaloids of *colchicum visiani*. *Planta Medica*, 41(1), 51.
- (6) K. H. Overton, in W. Barz, E. Reinhard and M. H. Zenk (BDS), 1977: *Plant tissue culture and its biotechnological application*. Springer Verlag, p.66.
- (7) Reinert, J. 1972: *Plant growth substances*. p.686-694.
- (8) Skoog, F. 1970: *Les culture de tissus de plantes*. p.115-135.
- (9) Tran Thanh Van, M. 1973: *Planta*, 115: 87-92.
- (10) V. H. Mathews and P. S. Rao (Bombay, India), 1980: *In vitro* multiplication of vanda hybrids through tissue culture technique. *Plant Science Letters*, 17: 339-344.
- (11) W. Barz, E. Reinhard, H. H. Zenk, 1977: *Plant tissue culture and its biotechnological application*. p. 17-25.

INDUCTION OF CALLI AND REGENERATION OF PLANTLETS FROM *IPHIGENIA INDICA*

Zhang Zhengquan, Nie Kaiying and Hu Youmin

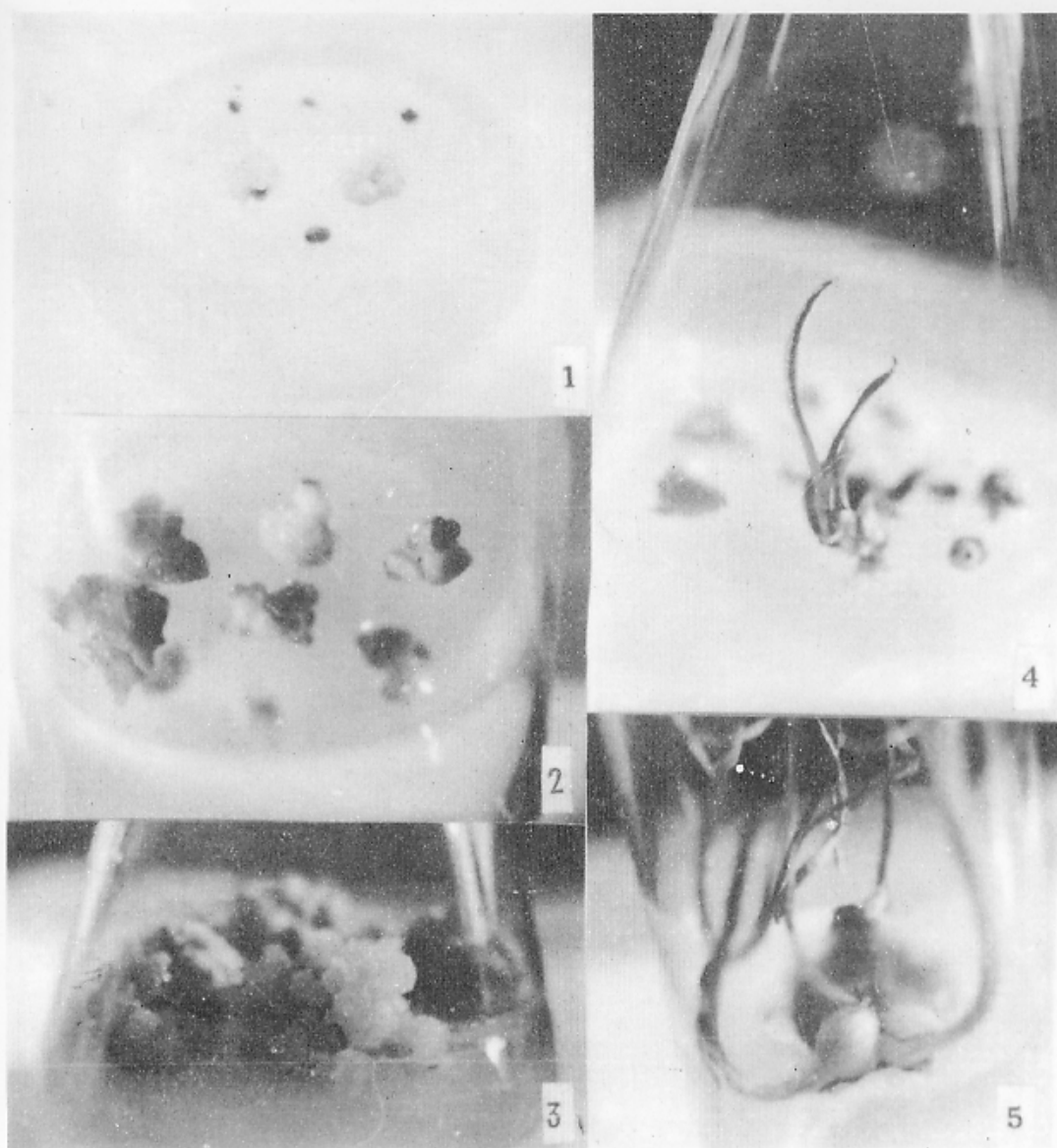
(Wuhan Institute of Botany, Academia Sinica)

Abstract

It is the first time to describe the induction of calli, regeneration of plantlets and bulbs from *Iphigenia indica* Knuth—the plant containing colchicine (particularly from the organ containing colchicine). It may offer a way for rescuing this extincting plant.

We found that in the weak light calli could be induced, in the strong light plantlets regenerated from calli. NAA prevented growth and differentiation of calli. The pH 5.8 and pH 5.4 were correspondingly suitable for induction of calli and regeneration of plantlets.

Key words: *Iphigenia indica* Knuth; Organ of containing colchicine; Callus; Plantlet



1. 种子外植体产生的愈伤组织; 2. 球茎外植体产生的愈伤组织; 3. 继代培养的愈伤组织;
4. 从分化培养基上产生的小植株; 5. 具鳞茎的再生植株
1. Seed explant producing callus; 2. Bulb explant producing callus; 3. Substitute producing callus;
4. Plantlets from callus on differential medium; 5. Regenerated plants with bulbs