

黄连体细胞胚胎发生及植株再生

侯嵩生 柯善强 吴玉兰 李洪林

(中国科学院武汉植物研究所, 武汉 430074)

桂耀林 郭仲琛

(中国科学院植物研究所, 北京 100044)

PLANT REGENERATION AND SOMATIC EMBRYOGENESIS OF COPTIS CHINENSIS F.

Hou Songsheng, Ke Shanqiang, Wu Yulan, Li Honglin

(Wuhan Institute of Botany, Academia Sinica, Wuhan 430074)

Gui Yaolin, Guo Zhongchen

(Institute of Botany, Academia Sinica, Beijing 100044)

关键词 黄连; 体胚发生

Key words *Coptis chinensis*; Somatic embryogenesis

黄连 (*Coptis chinensis* F.) 是我国著名常用中药, 具有清热燥湿, 凉血解毒的功用^[1,2]。长期以来由于过量的采挖, 造成野生资源亏缺。在人工栽培中, 由于黄连种子小, 休眠期长, 出苗不整齐, 生长缓慢, 要6—7年才能收获, 因而限制了黄连的生产。对黄连的研究, 过去主要集中于黄连的有效成份分析及药理学方面^[2,5,6,9]。近年来日本 T. Furuya 等开展了应用黄连细胞大量培养技术生产黄连素的研究^[8]。Kohji 等^[7]以日本黄连 *C. japonica* 的花茎为材料, 诱导产生了胚状体。我们曾报道过中国黄连体胚发生过程中组织细胞学观察^[4]。本文则报道黄连高频率体胚发生及植株再生的实验结果。

材料与方法

黄连 (*Coptis chinensis* F.) 采自武汉植物园药圃。将黄连叶片经0.1%升汞消毒5分钟后, 以无菌水冲洗5次, 然后剪成3—4 mm²的碎片, 放在MS基本培养基上, 补加各种激素(2,4-D, NAA, KT)不同浓度和组合, 及2%蔗糖, 0.8%琼脂(经常规方法消毒灭菌), 置于24℃±2℃黑暗条件下诱导愈伤组织。所得愈伤组织为黄色。每隔6周转移一次, 经半年继代培养, 再转置NAA+6-BA的MS培养基上进行体胚诱导培养。

结果与讨论

(1) 愈伤组织的诱导 黄连叶片外植体培养在不同激素浓度和组合的MS培养基上一周后叶片膨大, 部分叶片表面产生一些突起。经20—30天培养, 在叶片切口处出现愈伤组织, 颜色淡

黄、半透明,零星分布或连成片。诱导率依激素种类不同而异。在含有 $1\text{ mg/L } 2,4\text{-D} + 0.1\text{ mg/L KT}$ 的条件下,诱导率达20%。长期继代在 $2,4\text{-D}$ 培养基上,发现愈伤组织由黄色逐渐变为淡黄至灰白色。这可能是黄连小檗碱的合成受 $2,4\text{-D}$ 的抑制所致。将其愈伤组织转至含有 $6\text{-BA} + \text{NAA}$ 的 MS 培养基中,继代2—3次,愈伤组织的颜色又逐渐变成黄色。这可能是小檗碱合成的抑制被解除并得到恢复的结果。

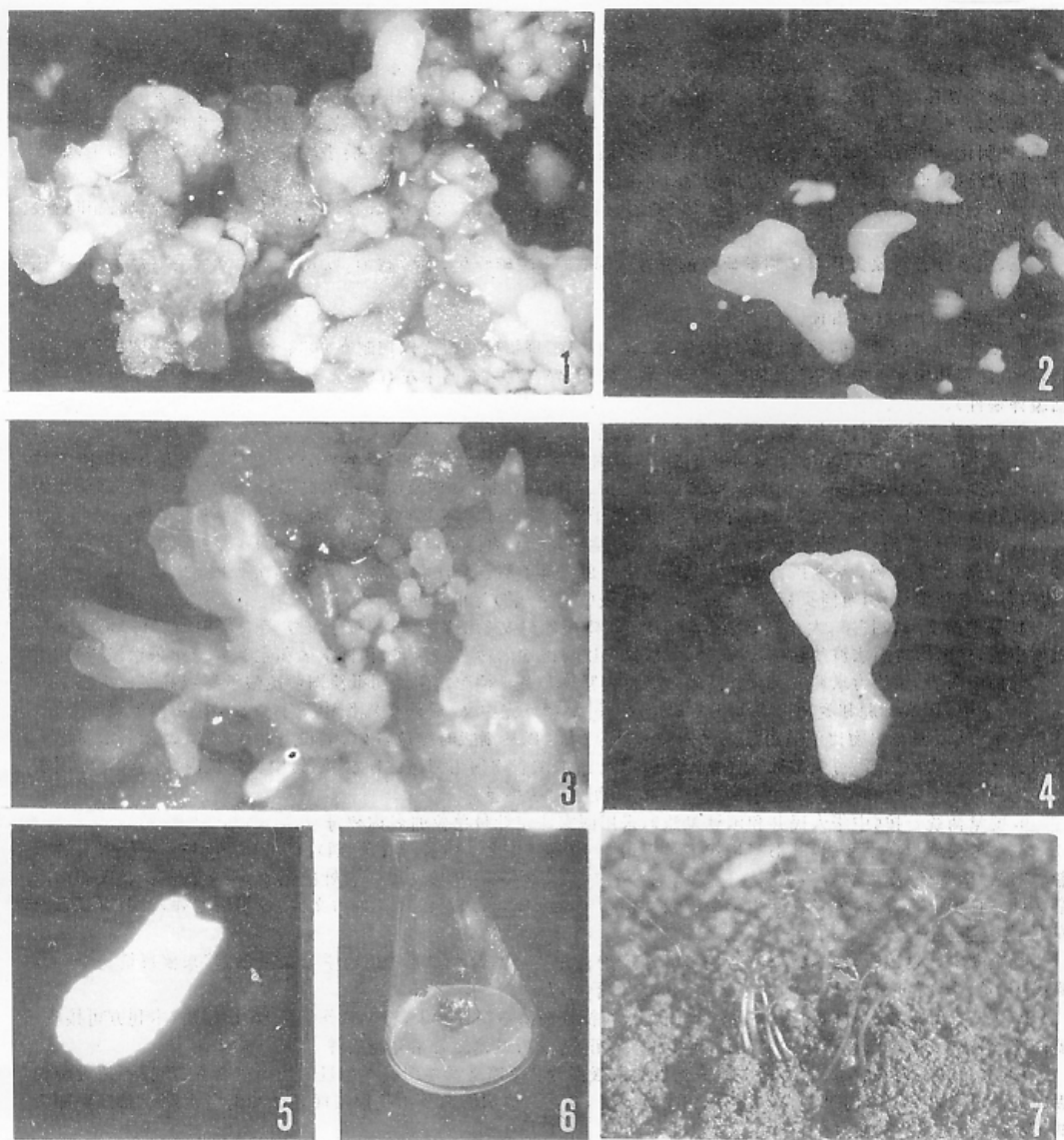
(2) 体胚的形成 黄连愈伤组织转移至含有 $0.5\text{ mg/L } 6\text{-BA} + 0.2\text{ mg/L NAA}$ 的 MS 培养基中进行6—8代的暗培养,形成许多比较疏松、圆球形、表面呈颗粒状的愈伤组织。有少量组织可分化产生根。这些颗粒状愈伤组织逐渐分化发育成不同阶段的体细胞胚(图版 I : 1),并可进一步转化成完整植株(图版 I : 6)。体胚发生率达85%。黄连愈伤组织体胚的产生与大多数植物体胚发生一样,是不同步的,因此,在一块愈伤组织上可看到不同时期的体胚,这些不同阶段的体胚很容易从愈伤组织上分离下来(图版 I : 2, 4, 5)。原因是黄连的体胚柄不明显,体胚的基部埋藏在愈伤组织内,它们与愈伤组织之间未形成所谓的“边缘细胞层”而使体胚与周围组织隔开,这时稍加振动,体胚很容易分离并从愈伤组织上脱落而成为单个的体胚(图版 I : 2, 5)。有关体胚发生过程的组织学观察,我们已另文报道^[4]。

(3) 体胚的保持培养 黄连的体胚分别继代培养在 $1\text{ mg/L } 6\text{-BA} + 0.2\text{ mg/L NAA}$ 或 $0.5\text{ mg/L } 2,4\text{-D} + 0.1\text{ mg/L NAA}$ 的 MS 基本培养基上,暗光培养达三年之久,体胚仍然不断增殖并产生新的体胚,而且不愈伤组织化(图版 I : 3)。黄连体胚能在黑暗条件下长期继代培养而不降低体胚发生率,利用这一特性用生物反应器来大量生产黄连体胚是非常重要的,也是人工种子研究中的一个重要课题^[3]。

(4) 根的诱导和植株再生 黄连成熟的体胚虽胚根不明显^[4],但体胚的双极性仍然存在。将一些具子叶、发育正常的体胚(图版 I : 4)转入 MS 基本培养基上附加 $\text{IBA } 0.5\text{ mg/L} + \text{GA}_3 \text{ } 0.5\text{ mg/L}$ 进行照光培养,两星期后体胚即变绿并进一步发育成具芽及根的小植株(图版 I : 6, 7)。植株再生率在试管内可达90%以上。黄连体胚这种高频率为人工种子研究提供了一个很有实验指导意义的模式材料。有关黄连人工种子的研究我们将另文报道^[3]。

参 考 文 献

- 1 丁葆祖. 中草药, 1984; 15(2): 28—29
- 2 王宽楷. 药学报, 1964; 11(6): 389—392
- 3 郭仲琛等. 植物体细胞胚胎发生和人工种子, 科学出版社, 1990: 35—42
- 4 桂耀林等. 植物学报, 1989; 31(12): 923—927
- 5 章育中等. 药学报, 1962; 9(7): 418—423
- 6 Akira I. *Phytochemistry*, 1975; 14: 1209—1210
- 7 Kohji N et al. In: *Plant Tissue Culture* (F Akio ed), 1982: 701—702
- 8 Tsutomu F. *Phytochemistry*, 1972; 11: 175
- 9 Yamamoto H. 生薬学雑誌, 1981; 35(1): 1—6



1. 不同发育阶段的体胚; 2, 4, 5. 分离的单个体胚, 4 为成熟胚, 5 为鱼雷型胚; 3. 长期继代培养的体胚; 6. 体胚植株再生; 7. 移栽的小植株。

1. Somatic embryos at different developmental stages; 2, 4, 5. Individual somatic embryos derived from sub-cultured somatic embryos; 4. mature somatic embryo, 5. torpedo shaped somatic embryo; 3. Somatic embryos of long term sub-culture; 6. Plants regenerated from somatic embryos; 7. Plants transferred to soil.