

三七试管苗繁殖技术的研究

陈伟荣 简玉瑜
(农学系) (实验中心)

摘要 以三七 4 种外植体为材料, 研究愈伤组织的诱导、植株的分化、壮苗及生根的情况。探讨获得高分化率的试管苗再生途径。结果表明以 MS 为基本培养基, 选用幼嫩花序为外植体, 愈伤组织诱导率及试管苗分化率高; 在加入 2, 4-D 的诱导培养基暗条件下可直接诱导出胚状体, 愈伤组织在光下分化培养也可发生不定芽; 通过胚状体发生途径分化成苗率高。成苗过程中, GA₃ 与 MET 分别起到促进胚状体成熟与生根作用。1989 年初首次获得试管苗, 现共获得植株 2 214 株, 为建立三七试管苗工厂生产研究打下基础。

关键词 三七; 组织培养; 胚状体发生; 不定芽; 植株再生

三七 (*Panax notoginseng* F. H. Chen) 又称田七, 属五加科人参属, 主要以块根入药, 具有止血、补血、治疗跌打的医疗作用, 是原产于我国云南、广西等地的名贵药材。广东南雄、信宜等地亦有人工栽植。广东三七要发展, 种苗来源较困难, 为了不依赖从广西、云南外购种苗, 降低生产用苗成本, 我们于 1988 年起开展三七试管苗繁殖技术的研究, 为建立我省试管苗工厂化生产服务。郑光植等在 1978 年利用三七根茎诱导出愈伤组织^[1], 重点在次级代谢物皂甙的工业化生产研究。我们于 1989 年初在国内外首次获得三七试管苗。1991 年刘瑞驹等亦获得三七试管苗^[2], 但未见详细报道。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料“文山三七”由南雄县科委和信宜县大成镇提供。

1.2 方法

1.2.1 培养基 试验了不同培养基的效果, 选用 MS^[3] 为基本培养基; 附加蔗糖 3%、琼脂 0.8%, pH5.8。培养基用常规方法消毒灭菌, 各培养基的附加激素配比如下: (1) 脱分化诱导愈伤组织培养基: a. 2, 4-D 0.5 (单位 mg/L, 下同); b. 2, 4-D 1.0; c. 2, 4-D 0.5+6BA 1.0; d. 6BA 1.0 (分别简称为 MS_a, MS_b, MS_c, MS_d, 下同)。(2) 分化培养基: e. 2, 4-D 0.2+6BA 1.0+NAA 2.0; f. 2, 4-D 0.2+6BA 2.0+NAA 0.5; g. 6BA 1.0+KT 0.5+Ad 0.5+GA₃ 2.0 (GA₃ 抽滤灭菌, 在培养基消毒灭菌后加入, MS_i 相同)。(3) 生根培养基: h. IAA 0.5+IBA 0.5 (1/2MS, 蔗糖 1.5%); i. 6BA 1.0+KT 0.5+Ad 0.5+GA₃ 2.0+MET 2.0 [MET (Multi-Effect Triazole) 称为多效唑]; j. NAA 0.5+6BA 2.0+MET 2.5 (蔗糖 2%+活性炭 0.25%)。

1.2.2 培养条件 愈伤组织的诱导和继代在黑暗条件下进行, 分化和生根培养在 1 000~1 500 Lx 的光照条件下进行, 每天光照 10 h, 温度 27±2℃。

1.2.3 外植体 外植体选用生活力旺盛的组织, 4 种外植体分别是: 去胚乳的幼胚; 叶刚

1991-12-24 收稿

平展的幼苗；一年生和二年生的休眠芽（地下根茎）；二年生的未开花的伞形花序（包括花托、花柄及花器等）。种子、休眠芽和花序自采集后贮藏于 4℃ 冰箱内 5~30 天后接种。

1.2.4 接种及调查方法 先将外植体表面清洗，用 75% 酒精消毒后，经 0.2% 氯化汞 1 次或再经 1% 次氯酸钠 2 次消毒，吸干水后，用刀片切开外植体接种，每瓶接种材料 8 块，每处理 10~20 瓶，每 1~2 月继代转移 1 次。1988 年 1 月至 1990 年 8 月共接种材料 15 批，调查愈伤组织诱导率，研究试管苗再生途径，计算成苗率。

2 结果与分析

进行 15 次接种，接种 462 瓶共 3 696 块，至 1991 年 8 月统计获 3 批试管苗共 2 214 株，现将结果分述如下：

2.1 不同消毒方法污染率对比

表 1 不同消毒处理污染率及其愈伤组织诱导率比较

处理	消毒时间			接种块数	污染块数(%)	产生愈伤组织块数(%)
	75%酒精	0.2%氯化汞	1%次氯酸钠			
1	20"	20'	0	192	192(100)	0(0)
2	1'30"	30'	0	128	16(12.5)	0(0)
3	1'	20'	5'	1104	120(10.87)	480(43.4)
4	1'	18'	4'	496	120(24.19)	264(53.32)
5	1'	15'	4'	1576	424(26.9)	569(36.04)
6	1'	11'	4'	200	40(20)	72(36)

从表 1 可见，处理 1、2 为一次消毒，其余为 2 次消毒。1 次消毒均无愈伤组织产生。处理 1 消毒不彻底，全部污染；处理 2 在氯化汞中消毒时间较长，污染率较低，但毒害大，无愈伤组织产生。2 次消毒减少氯化汞的处理时间，但增加了次氯酸钠处理：污染率较低，毒害减少，愈伤组织诱导率高。其中处理 3 污染率最低，愈伤组织诱导率较高。所以 2 次消毒方法较好。

2.2 不同外植体愈伤组织诱导率比较

表 2 四种外植体污染率与愈伤组织诱导率比较

外植体部位	接种块数	污染块数(%)	产生愈伤组织块数(%)	成苗数
种胚	224	112(50)	0(0)	0
幼苗	712	72(10.11)	320(50)	3
休眠芽	496	168(33.87)	128(39.02)	1
花序	2264	560(24.73)	856(50.23)	2210

·此项百分比为减除污染块数后的比例

表 2 结果表明，花序与幼苗污染率低而愈伤组织诱导率高，其中花序的分化成苗数最多，占总数的 99.28%。花序是最合适的外植体。

2.3 不同诱导培养基愈伤组织诱导率比较

在 MS₁、MS₂、MS₃ 和 MS₄ 四种诱导培养基上接种数分别为 1480、540、1016 和 352 块，愈伤组织诱导率(%) 依次为 MS₁(13.87) > MS₂(40.94) > MS₃(34.29) > MS₄(15.91)。1990 年 12 月曾调查花序外植体在 3 种培养基上生长 150 天的净增长量(每处理 24 瓶)，诱导率依次为 MS₁(02.5) > MS₂(37.5) > MS₃(20.83)，与上述结果相同。但愈伤组织平均

每瓶增长量(单位 g/瓶)却依次为 MS₂ (2.45) > MS₁ (1.61) > MS₃ (0.95)。这些结果表明 2, 4-D 0.5 mg/L 时诱导率最高; 6BA 与 2, 4-D 配合使用时对愈伤组织增重有一定的促进作用。

2.4 不同诱导培养基所产生愈伤组织的性质

附加 2, 4-D 的 MS₂ 与 MS₃ 诱导的愈伤组织外形差别不大, 颜色较浅, 顶部带白色, 边缘部分透明, 偏浅黄色, 较松散。附加 2, 4-D 和 6BA 的 MS₂ 诱导愈伤组织生长量大, 颜色偏浅灰色, 较结实。单独使用 6BA 的 MS₂ 诱导率低, 愈伤组织容易转为褐色而死亡。

不同来源的愈伤组织分化途径有所不同: MS₂, MS₃ 来源的愈伤组织在黑暗条件下可直接产生胚体或经 MS₂ 诱导再经 MS₂ 或 MS₃ 分化培养则产生不定芽, 这两种途径均能获得试管苗; 而 MS₁, MS₃ 来源的均未见有分化。

2.5 不定芽发生与胚状体发生两种分化途径成苗率对比。

诱导培养基与分化培养基相互作用。能通过不定芽发生或胚状体发生途径培育成苗。

表 3 不同诱导培养基与分化培养基相互作用的结果

诱导培养基	分化培养基	愈伤组织块数	有分化的块数	是否使用 MS ₂	成苗数
a	e	464	32	+	5
	f	480	104	+	21
	—	648	192	+	1257
b	e	224	0	—	0
	f	200	0	—	0
	—	288	16	+	929
c	e	184	0	—	0
	f	200	0	—	0
	—	416	0	—	0
d	e	120	0	—	0
	f	120	0	—	0
	—	56	0	—	0

不定芽发生是经 MS₂ 诱导, 2 个月后产生的愈伤组织转入分化培养基 MS₂e 或 MS₂f 上, 3~4 个月后有芽与叶的分化(见图版 1), 这种不定芽较结实地与母体愈伤组织相连, 叶片较厚, 头部较大, 少根或无根, 经 MS₂ 培养可抽茎成苗(见图版 2), 但成苗率低, 我们试验各种增殖的培养基, 但未见芽的增殖与芽丛的产生。从表 3 数据见, 136 块(17 瓶)愈伤组织分化仅获试管苗 26 株。

胚状体发生(见图版 3, 4, 5, 6)是经 MS₂ 或 MS₃ 暗培养 5 个月, 亦有个别继代 16 个月后的愈伤组织直接分化出胚状体。胚状体产生于与培养基接触的边缘带浅黄色的松散愈伤组织。在解剖镜下, 可见有完整的胚状体, 有明显的二极性即有根端与芽端的分化, 胚状体与母体组织容易分离, 符合胚状体发生的两个主要特点^[4]。胚状体在 MS₂ 上迅速成熟, 有芽、叶和根的分化, 说明 MS₂ 适合胚状体的发育, 其中 GA₃ 起促进长叶成苗的作用。在直接诱导出胚状体的 208 块(26 瓶)愈伤组织共获得试管苗 2 186 株, 占总数的 99.18%。其中 1990 年 8 月接种在 1991 年分化的 6 瓶愈伤组织分化率最高, 共获得 2 140 株试管苗, 占总数的 96.66%, 其中 3 瓶最高的分别获得 907, 738 和 442 株。这些都说明通过胚状体发生途径有获得大量植株的潜力, 可以达到快速繁殖的目的。

另一方面, 有一部分胚状体发育畸形或生活力弱而不能发育成完整苗。1991 年 8 月统

计的2140株试管苗中,减除污染苗113株和一部分死亡和或为仅有叶或仅有根的不完整苗,最终获得完整试管苗506株。所以提高完整苗比例是以后研究重点之一。

2.6 MET对生根壮苗的作用

1989,1990年在含IAA和IBA的生根培养基MS_h上培养试管苗74株,经4~5个月未能诱导生根,而且生长势衰落,部分叶片枯萎,这些情况与三七多年生草本植物每年春萌发,至秋后地上部分枯萎的生长习性有关。1991年在生根培养基中加入生长调节剂MET见到生根壮苗的效果。1991年8月在出苗8个半月后统计在各培养基上的完整植株的生长情况(见表4)。

表4 不同培养基中,试管苗生长情况的比较

培养基	总苗数	存活数(%)	有叶苗数(%)	完整植株数(%)
j	821	652 (83.59)	609 (93.40)	378 (57.97)
i	143	72 (50.356)	69 (95.83)	36 (50)
g	1176	565 (48.04)	325 (57.52)	92 (16.28)
h*	74	30 (40.54)	55 (74.32)	16 (21.62)
总计	2214	1319 (59.58)	1058 (80.21)	522 (39.58)

*为1989,1990年统计出苗8个月后数据

表4说明:MS_j上存活率与完整苗率最高;MS_i其次;MS_g上培养时间最长(自分化后一直留在MS_g上),存活率较低,完整苗率最低;MS_h上存活率最低,成苗率也较低;MS_j与MS_g二种培养基比较仅是前者比后者多加MET,而存活率、有叶率及完整苗率却大为提高;MS_j与MS_i比较因前者无GA₃,与MET无抵触作用,完整苗率高于后者;在图版7,8,9见试管苗在含MET的生根培养基上生长良好,复叶完整,根系发达。这些都表明MET起到促进生根与壮苗作用。

2.7 试管苗移栽及植株成活率

1991年9~11月在3次移栽试验中,由于试管苗处于生长状态,不是在育苗季节,另外空气湿度与土壤含水量不易控制,成活率较低。统计在移苗15天后共62株苗的成活率为29.03%,但仍然表现出从MS_j中移栽的苗较好,成活率(%)依次为MS_j(42.86) > MS_g(12.5) > MS_i(9.1)。进一步应把试管苗移至产区,寻找合适的季节与生长条件。

3 讨论

我们于1989年初获三七试管苗9株,属国内外首次,1990年获65株,1991年获2140株。从这几年的研究中明确了以下几个问题:

3.1 幼嫩花序是试管苗较合适的外植体

未开花的幼嫩花序外植体污染率较低而愈伤组织诱导率高,愈伤组织继代时间长,生长势稳定,可直接诱导出胚状体,分化成苗率最高。并且取材时不影响田间生长,容易一次取到大量的外植体。适合作为试管苗的外植体。

3.2 诱导培养基中,2,4-D关键因素

在含2,4-D 0.5和1.0(mg/L)的诱导培养基中,愈伤组织诱导率高,可以直接诱导出胚状体,分化成苗率高。经2,4-D 0.5mg/L时诱导的愈伤组织也可经分化培养产生不定芽而成苗。所以认为诱导培养基中2,4-D是关键因素。

3.3 寻找胚状体产生的条件,以达到快速繁殖的目的

胚状体产生的条件初步探索可能与培养基的成分^[4,6,7]黑暗长期培养条件^[6]、外植体来源及前处理、培养基渗透压等有关。

当培养基的外源激素 2, 4-D 与内源激素达到相对平衡时,是分化胚状体的必要条件。黑暗条件是诱导胚状体的主要条件,黑暗培养 5 个月后才见胚状体的产生,继代 16 个月仍有分化能力。花序与幼苗两种外植体在同样培养条件下只有花序诱导出胚状体,除与花序外植体来源不同外,还可能与花序曾经冷藏处理有关,而刘瑞驹等却从幼苗外植体诱导出胚状体^[1]。试验中还观察到长期停留在培养基的愈伤组织产生胚状体的频率较高,这可能因培养基水分减少,较高的渗透压利于胚状体的诱导形成。

所以寻找胚状体产生的最佳条件,并获得大量的、健壮的胚状体是获得大量试管苗的关键。

3.4 形成植株的过程要成苗与促根并进

分化培养基 MS₂ 中, GA₃ 对促进胚状体成熟与成苗起关键作用,使之有根与叶的初步分化。生根培养基 MS₃ 或 MS₄ 含 MET, 促进壮苗与生根,植株上部不会太繁茂早衰,植株变矮壮,根系加强。所以试管苗初步分化后,要立即转入生根培养基。

MET 是一种良好的植物生长延缓剂,对水稻等多种作物再生苗壮苗与生根有促进作用^[2,5],在本试验中 MET 对三七壮苗生根的效应亦是明显的。

3.5 三七试管苗繁殖的主要技术和程序

通过 1988~1991 年的研究,三七试管苗繁殖技术主要包括:外植体的选择,胚状体的诱导,生根壮苗等关键步骤。由于受生长季节的限制,整个周期约需一年半左右的时间,控制试管苗的壮苗生根和持续旺盛生长,使用 MET 是实现一次性供苗的关键。

为建立试管苗工厂化生产研究打下基础,主要程序总结如下:第 1 年 7~8 月采用幼嫩花序接种在 MS₂ 或 MS₃ 培养基上;愈伤组织继代至第 2 年 1 月份后陆续产生胚状体;1~5 月将胚状体转至 MS₂ 上成熟分化出根和叶;3~7 月转移至 MS₃ 或 MS₄ 上生根壮苗;在第 3 年春 1~2 月进行苗床移栽;2~3 月间移入大田生长。

参 考 文 献

- 1 刘瑞驹,蒙爱东,李春霞等.三七的胚状体发生和植株再生.植物生理学通讯,1991,27(3),210
- 2 吴光南.多效唑的开发及其应用前景.江苏农业科学,1987,多效唑试验专辑:1~2
- 3 郑光植,梁铮.三七组织培养.植物学报,1987,20(4):373~375
- 4 周俊彦.植物体细胞在组织培养中产生胚状体.植物生理学报,1982,8(1)91~99
- 5 赵成章,郑康东,戚秀芳.多效唑对水稻未成熟胚愈伤组织诱导分化和壮苗培养的影响.植物学报,1990,32(5):407~409
- 6 桂耀林,郭仲琛等.西洋参组织培养中的胚胎发生.植物学报,1987,29(2):223~224
- 7 Litz R E, R E Conover. *In vitro* somatic embryogenesis and plant regeneration from *Carica papaya* L. ovular callus. Plant Sci. Lett. 1982, 26: 153~158
- 8 Murashige and Skoog. Physiol plant. 1962, 15: 473~497

STUDIES ON A TECHNIQUE FOR PROPAGATION OF *PANAX NOTOGINSENG*

Chen Weirong
(Agronomy Department)

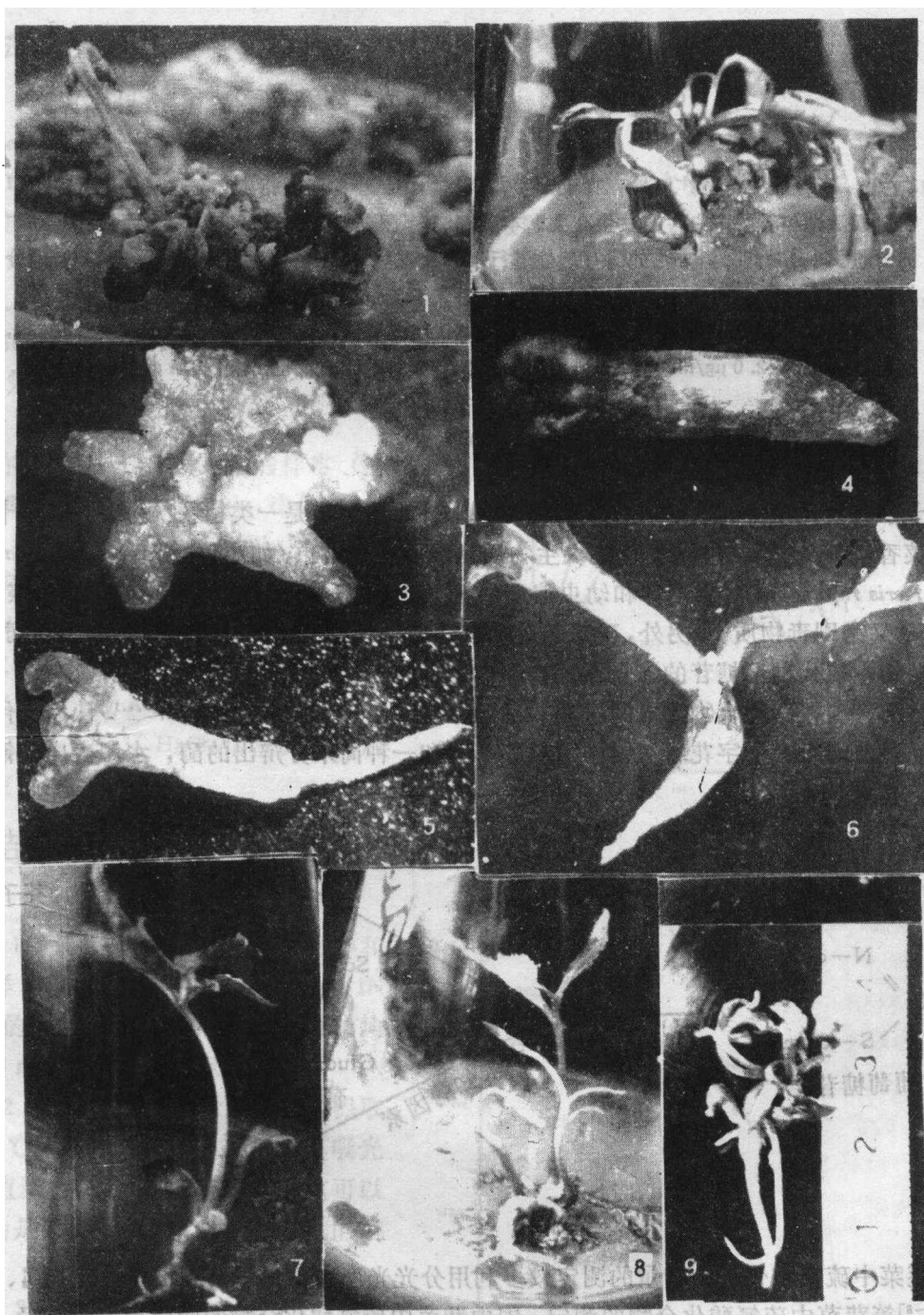
Jian Yuyu
(Experimental Center)

Abstract Four types of explants of *Panax notoginseng* were used, in order to study induction of callus, differentiation of plantlets, hardening of regenerated plantlets and formation of roots. Experimental approach to find a suitable pathway of differentiation, has been referred to the method for producing large numbers of plants.

The results showed that explants sterilized with both $HgCl_2$ and $NaOCl$ had low contamination rate. Cultured on MS based nutrient medium, young inflorescences were the best explants, which had highest frequency of callus formation and plant differentiation. In MS supplemented with 2, 4-D medium, calli could directly initiate a large number of embryoids under dark condition and could initiate adventitious buds under lighting. Plant regeneration of embryoids and adventitious buds could be achieved by use of GA_3 in the regeneration medium. Root formation was induced with MET. Complete plants were developed. Approximately 2 214 plants have been obtained.

The plantlets were first successfully developed by *in vitro* method in 1989. From 1990 to 1991, a series of technique of obtaining high propagation were founded.

Key words *Panax notoginseng*; Tissue culture; Somatic embryogenesis; Adventitious bud; Plantlet regeneration



图版 1. 在 MSf 上分化培养 3 个月后的不定芽 2. 经 MSg 培养 3 个月后的不定芽抽茎成苗 3. 在 MSa 上暗培养 5 个月产生的一团胚状体 4. 5. 见胚状体有根端与芽端的分化 6. 胚状体在 MSg 上初步分化出根和叶 7. 8. 9. 在 MSg 上培养 4 个月, 见复叶与根系的产生。