

# 白花丹参组织培养技术的研究

亓翠英<sup>1</sup>, 李绪霞<sup>1</sup>, 王 宁<sup>2</sup>, 王峰祥<sup>1</sup>, 张福鑫<sup>1</sup>

(1. 莱芜职业技术学院 生物技术研究, 山东 莱芜 271100; 2. 莱芜市林业局, 山东 莱芜 271100)

**摘 要:**以白花丹参叶为外植体,研究了外植体种类、激素比例、琼脂浓度、活性炭等培养条件对组培快繁的影响。结果表明:培养基 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L+琼脂 7%适宜 2 种愈伤组织诱导;培养基 MS+KT 1.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L+琼脂 8%+活性炭 0.3%能有效预防玻璃苗,适宜健壮芽苗增殖;培养基 1/2MS+IBA 0.2 mg/L+琼脂 8%(或同时添加 0.3%活性炭)有利于试管苗根系的生长,生根率达到 100%。试管苗移栽成活率达到 95%。

**关键词:**白花丹参;愈伤组织;玻璃苗防治;生根

**中图分类号:**S 567.5<sup>+</sup>3 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2012)06-0108-03

白花丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bge. f. alba C. Y. Wuet H. Wü)为唇形科鼠尾草属丹参的变型<sup>[1]</sup>,主要分布于山东莱芜及泰山周边地区,属珍稀濒危药用植物<sup>[2]</sup>。研究证明,白花丹参具有显著的扩张冠状血管及周围血管的作用,对治疗血栓闭塞性脉管炎有独特疗效<sup>[3]</sup>。目前白花丹参栽培种分化类型多,品种退化不一,抗性差,存在严重的重茬障碍,利用抗性较强的野生种进行良种选育,选择具备特异性、稳定性和一致性的新品种极有必要<sup>[4]</sup>。除此以外,丹参的传统分根或芦头繁殖法,不仅繁殖速度慢,而且品质容易退化、产量下

降。建立丹参无性繁殖体系,可以快速大量繁殖优良的白花丹参种苗,可望从根本上解决白花丹参种植过程中的品种分化和质量控制问题。关于白花丹参组织培养研究现已见报道<sup>[5-7]</sup>。在参照前人对白花丹参研究的基础上,就组织培养过程的几个关键问题进行了研究,对培养条件进行了摸索,提出了更为简便易行的提高愈伤组织诱导率、防治试管苗玻璃苗、促进生根的措施,筛选出了适宜的分化、继代、生根培养基。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验于 2010 年 8 月至 2011 年 5 月进行,以采自山东省莱芜市九龙山的野生白花丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bge. f. alba C. Y. Wuet H. Wü)及于山东省莱芜市苗山镇紫光生态园白花丹参栽培过程中发现的不育变异品种(*Salvia miltiorrhiza* Bge. f. alba C. Y. Wuet H. Wü, 'buyu')

**第一作者简介:**亓翠英(1976-),女,山东莱芜人,硕士,讲师,研究方向为植物分子细胞遗传学。E-mail:qcuiying@163.com。

**基金项目:**山东省自然科学基金资助项目(Y2008D14);莱芜职业技术学院科研基金资助项目。

**收稿日期:**2011-12-21

[13] 乐锦华,Read P E,杨国臣. BA 和激素对试管苗番茄愈伤组织形态发生的影响[J]. 园艺学报,1991,18(1):44-48.

[14] 何秀霞,陆一鸣. 番茄组织培养体系的建立及其影响因素的研究[J].

内蒙古民族大学学报(自然科学版),2003,18(1):30-33.

[15] 魏琴,周黎军,周锦霞,等. 激素对樱桃番茄两种外植体诱导再生植株的影响[J]. 广西植物,2002,22(5):441-443.

## A Preliminary Study on Callus Induction of Tomato

MA Yi-yong<sup>1</sup>, YAN Xue-fen<sup>2</sup>, LIU Si-yan<sup>2</sup>, MA Hong-dan<sup>2</sup>, LIU-Qiang<sup>2</sup>, GUAN Shu-yan<sup>2</sup>

(1. College of Agronomy, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118; 2. College of Life Sciences, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118)

**Abstract:** With four tomato cultivars as materials, the highest germination rate of species was French pink roses was screened out, the effects of different explant types and hormones constitutions on callus formation were preliminary established. The results showed that optimum callus inducing medium was MS+2.0 mg/L BA+1.0 mg/L 2,4-D for cotyledon and MS+2.0 mg/L BA+0.5 mg/L 2,4-D for stem.

**Key words:** tomato; callus; optimum medium

为试材。

1.2 试验方法

1.2.1 诱导分化 新鲜带叶柄叶片清洗、消毒后,将叶片分成叶顶、不带叶柄叶基部、带叶柄叶基部 3 个部位取材,按无菌操作要求剪切成 0.5~1.0 cm<sup>2</sup> 小块,参照梁宏伟等<sup>[5]</sup>的方法,接种至培养基 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L+琼脂 7%,接种时注意叶片下表面接触培养基。于 25℃、光照 12 h/d (日光灯,光照强度 2 000 lx)的条

件下培养 4 周,观察愈伤组织诱导情况。

1.2.2 继代培养 选取健康无菌的诱导分化丛生芽转接至培养基:MS+KT 1.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L+琼脂 7%,继代培养过程中发现大面积的玻璃化现象后,调整培养基配方,以 KT/NAA 浓度比例、琼脂浓度、活性炭为试验因子,设 4 组对照培养基,由表 1 可知,每个处理接种 20 株苗,3 次重复。每日光照 12 h,提高光照度至 2 500 lx,培养 45 d 后,观察组培苗玻璃化率缓解的状况。

表 1 继代培养基

| 编号  | 培养基配方  | 编号  | 培养基配方                                      |
|-----|--|-----|--|
| J1A | MS+KT 1.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L+琼脂 7% (正常继代培养基)  | J1B | MS+KT 1.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L+琼脂 8%+活性炭 0.3% |
| J2A | MS+KT 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L+琼脂 8% (KT/NAA=5) | J2B | MS+KT 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L+琼脂 8%+活性炭 0.3% |
| J3A | MS+KT 1.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L+琼脂 8% (KT/NAA=3) | J3B | MS+KT 1.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L+琼脂 8%+活性炭 0.3% |
| J4A | MS+KT 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L+琼脂 8% (KT/NAA=1) | J4B | MS+KT 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L+琼脂 8%+活性炭 0.3% |

1.2.3 生根、练苗、移栽 为研究活性炭对白花丹参生根的影响,设计 2 种生根培养基:G1:1/2MS+IBA 0.2 mg/L+8%琼脂;G2:1/2MS+IBA 0.2 mg/L+8%琼脂+活性炭 0.3%,将继代培养中的无玻璃化现象的健壮芽苗转接至生根培养基,观察记录 2 种培养基的生根效果。待生根试管苗长出 5 cm 左右健壮根系时,开盖移至温室练苗 3 d,取出试管苗,用自来水洗去琼脂,移栽至消毒的基质(松针土:细沙=2:1)中,搭小拱棚保持一定湿度,适当遮阴通风。15 d 后移栽至大田。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织诱导与苗增殖玻璃化现象统计

叶片接种大约 5 d 后开始由绿变褐,皱缩变厚,10 d 后在与培养基表面接触处开始出现米粒状绿色愈伤组织,15 d 后愈伤组织大量发生,25 d 后形成瘤状或莲座状愈伤组织块,进一步观察愈伤组织颜色、质地呈现 2 种类型:黄绿色致密与黄白色疏松愈伤组织(图 1A、B 所示)。按以下公式计算愈伤组织诱导率:诱导率=(长出愈伤组织的外植体数/总接种外植体的块数)×100%。同时观察后续继代培养中试管苗的生长,及时记录继代培养中出现的玻璃化现象,按以下公式计算玻璃化率:玻璃化率=(产生玻璃化的芽数/接种总芽数)×100%,结果见表 2。

表 2 外植体品种和来源对愈伤组织诱导率、种类及继代培养玻璃化率影响

| 外植体来源   | 野生品种           |                      |            | 不育品种           |            |            |
|---------|----------------|----------------------|------------|----------------|------------|------------|
|         | 愈伤组织诱导率/%      | 愈伤组织描述               | 继代培养玻璃化率/% | 愈伤组织诱导率/%      | 愈伤组织描述     | 继代培养玻璃化率/% |
| 叶顶      | 幼叶:92<br>老叶:72 | 黄绿色,有光泽,致密(图 1-A 所示) | 28         | 幼叶:75<br>老叶:42 | 黄绿色,有光泽,致密 | 40         |
| 不带叶柄叶基部 | 幼叶:90<br>老叶:68 | 黄绿色,有光泽,致密           | 32         | 幼叶:72<br>老叶:50 | 黄绿色,有光泽,致密 | 45         |
| 带叶柄叶基部  | 幼叶:75<br>老叶:62 | 黄白色,有光泽,疏松(图 1-B 所示) | 12         | 幼叶:64<br>老叶:48 | 黄白色,有光泽,疏松 | 32         |

2.2 继代培养玻璃化防治情况

在 J1A 培养基上培养时,发现大量的呈现玻璃化的试管苗,2 个品种试管苗平均玻璃化率达到 54.2%,愈伤组织呈鲜嫩水渍状,部分愈伤组织分化停滞,叶、嫩梢呈半透明状,植株矮小肿胀,叶片皱缩成纵向卷曲,脆弱易碎。同时产生大量同样呈现玻璃化状态的不定根(图 1-C)。添加活性炭后,试管苗玻璃化率降低明显。比较几种培养基发现,在 J3B 培养基中培养的试管苗生长情况最好,叶宽,植株平均高度 3.5 cm,增殖倍数达到 12,茎秆粗细一致,颜色近正常的深绿,玻璃化现象基本消除;同时有少量生根现象(图 1-D)。同时后续研究的统计发现,2 种愈伤组织(黄绿色致密愈伤组织和黄白色疏松愈伤组织)分化的试管苗玻璃化率差异显著,后者玻璃化率显著低于前者。

2.3 生根、练苗、移栽

试管苗在 G1 与 G2 2 种培养基上做生根培养,40 d 后生根情况见图 1-E,在 2 种培养基上中,试管苗的根分化率都在 100%,但呈现不同的特点:在 G1 培养基中试管苗不定根萌发早,平均 5 d 根开始萌发,生长快,但不定根数及须根少,根系不发达;在 G2 培养基中不定根萌发晚,平均 7 d 后不定根开始萌发,生长慢,但不定根数多、须根发达。2 种根系的试管苗练苗成功率相差不大,都在 95%以上(图 1-F),移栽大田后生长情况良好。

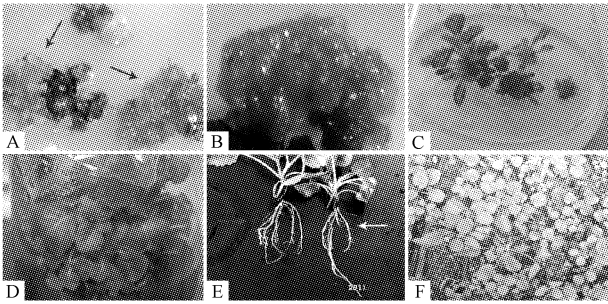


图 1 白花丹参试管苗在不同培养时期的生长情况

注:A:诱导分化阶段黄绿色致密愈伤组织;B:黄白色疏松愈伤组织;C:苗增殖初期玻璃化苗;D:J3B 培养基中生长的健壮试管苗;E:诱导生根,白箭头示 G1 诱导根系,红箭头示 G2 诱导根系;F:温室练苗。

### 3 讨论与结论

#### 3.1 外植体品种和取材部位对愈伤组织诱导的影响

该试验结果表明,外植体品种不同,愈伤组织诱导率差异显著,该研究所涉及的2种品种,野生品种较不育品种更适于进行组织培养,表现出愈伤组织诱导率高、生长旺盛、玻璃化率较低的特点。此外,与前人研究成果相似,三叶期幼叶的愈伤组织诱导率高显著高于老叶<sup>[8]</sup>。脱分化得到的2种愈伤组织都属于非胚性愈伤,较容易诱导生芽,主要由带叶柄叶基部诱导得到的黄白色愈伤组织在以后的继代培养中表现出明显的玻璃化率较低的特点。在查阅丹参组织培养文献时未发现有愈伤组织种类的报道,关于2种愈伤组织细胞内容物特点将进行进一步研究。

#### 3.2 防治白花丹参试管苗玻璃化的措施

激素浓度增加尤其是细胞分裂素浓度提高,或细胞分裂素与生长素比例高,易导致玻璃化苗的产生<sup>[9]</sup>。从该试验结果来看,玻璃化现象产生后,单纯降低分裂素KT添加量或提高生长素NAA比例,对缓解玻璃化现象效果均不明显,而适当提高生长素NAA添加量,使KT/NAA比例保持在3时,玻璃化现象的缓解最明显,且试管苗生长情况良好,移栽成活率高。活性炭加入培养基中的目的主要是利用其吸附能力,减少一些有害物质的影响<sup>[10]</sup>,从试验结果来看,培养基中添加3 g/L活性炭可有效地减少试管苗的玻璃化现象。卜学贤等<sup>[11]</sup>的研究认为,活性炭的加入同时也对生长调节剂起吸附作用,使不定芽的分化受到影响。在该试验中,添加活性炭后,试管苗增殖芽数和芽的分化速率都有显著提高,与沈宁东等<sup>[12]</sup>对香石竹试管苗研究的结果一致。从该试验结果来看,培养基中琼脂浓度低时玻璃化苗比例增加,水浸状严重,随着琼脂浓度增加,玻璃化苗比例减少,琼脂浓度在8%对于继代苗生长有利。同时,适当增加光照强度也能起到一定的防治玻璃化的作用。

#### 3.3 活性炭对试管苗生根的影响

从试验结果看,添加活性炭有利于试管苗根数的增加及须根的生长,但同时根的伸长速度降低。2种根系的炼苗成功率相差不大,但其对田间成苗根系的形态及丹参酮、丹酚酸成分的影响有待进一步研究。

综上,以白花丹参三叶期嫩叶为外植体,培养基MS+6-BA 2 mg/L+NAA 1.0 mg/L+琼脂7%适宜愈伤诱导,培养基MS+KT 1.5 g/L+NAA 0.5 mg/L+琼脂8%+活性炭0.3%,适宜健壮芽苗增殖,有效预防试管苗的玻璃化现象,1/2MS+IBA 0.2 mg/L+琼脂8%(或同时添加0.3%活性炭)有利于试管苗根系的生长。组织培养对白花丹参体细胞变异及药用成分的影响有待进一步研究。

#### 参考文献

- [1] 肖小河,方清茂,夏文娟,等.药用鼠尾草数值分类与丹参药材道地性[J].植物资源与环境,1997,6(2):17-21.
- [2] 周凤琴,李建秀,张照荣.山东珍稀濒危野生药用植物的调查研究[J].中草药,1998,29(1):461.
- [3] 李志田,杨保津,马广恩.白花丹参化学成分的研究[J].药学学报,1991,2(3):2091.
- [4] 王峰祥,闫永亮,毛淑敏,等.白花丹参野生资源濒危保护和开发利用研究[J].中国现代中药,2009(8):17-18.
- [5] 梁宏伟,王峰祥,崔秀伟.白花丹参的组织培养和植株再生[J].安徽农业科学,2009,37(21):9876-9904.
- [6] 孙立彦,刘振亮,郝岗平,等.白花丹参愈伤组织诱导与快速繁殖的研究[J].山东农业大学学报(自然科学版),2008,39(1):11-14.
- [7] 陈力,李秀兰.白花丹参同源四倍体的诱导与鉴定[J].中草药,2009,40(12):1995-1997.
- [8] 蔡朝晖,高山林,徐德然.丹参组织培养快速繁殖技术的研究[J].中国药科大学学报,1991,22(2):65-68.
- [9] 王清连.植物组织培养[M].北京:中国农业出版社,2002:20-29.
- [10] 刘用生,李友勇.植物组织培养中活性炭的使用[J].植物生理学通讯,1994(3):214-217.
- [11] 卜学贤,陈维伦.活性炭在组织培养中的作用[J].植物生理学报,1988,14(4):401-405,409.
- [12] 沈宁东,郭辉,韦梅琴.活性炭对香石竹试管苗继代培养的影响[J].安徽农业科学,2009,37(3):979-980.

## Study of Tissue Culture Technique of *Salvia miltiorrhiza* f. *alba*

QI Cui-ying<sup>1</sup>, LI Xu-xia<sup>1</sup>, WANG Ning<sup>2</sup>, WANG Feng-xiang<sup>1</sup>, ZHANG Fu-xin<sup>1</sup>

(1. Institute of Biotechnology, Laiwu Vocational and Technical College, Laiwu, Shandong 271100; 2. Laiwu Forestry Bureau, Laiwu, Shandong 271100)

**Abstract:** Leaves of *Salvia miltiorrhiza* f. *alba* were used as explant, the effects of the explants variations, ratio of steroids, concentration of agar and active carbon on tissue culture and propagation were studied. The results indicated that the media of MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L+agar 7% fit the inducing of two types of calli, the MS+KT 1.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L+agar 8%+active carbon medium was most suitable for decreasing vitrification of plantlets and fit to grow up strong seedlings, the 1/2MS+IBA 0.2 mg/L medium(or 0.3% active carbon simultaneously) was better for root generation with rooting rate of 100%. The survival rate of transplantation of test-tube seedling could reach a high level at 95%.

**Key words:** *Salvia miltiorrhiza* f. *alba*; callus; vitrification preventing; root