

狭叶番泻不定芽直接诱导和植株再生初探

黄 浩, 韦 莹, 蒙爱东

(广西壮族自治区药用植物园, 广西 南宁 530023)

摘 要:以狭叶番泻枝条为试材, 采用组织培养的方法, 研究不同培养基对狭叶番泻不定芽诱导、增殖、生根诱导以及移栽基质对移栽存活率高低的影响。结果表明:以 MS 为基本培养基, 添加 2.0 mg/L TDZ+0.1 mg/L NAA 对不定芽的诱导效果较佳, 添加 2.0 mg/L 6-BA+0.05 mg/L NAA 对不定芽的增殖效果最佳, 每外植体长出不定芽(12.6±0.64)个;而生根诱导以 1/2MS+2.0 mg/L IBA+1%(w/v)活性碳的效果最好, 生根诱导率达 58.5%。以黄土和泥炭土为基质, 移栽成活率为 73.7%, 移栽苗与种子苗在田间生长表现无明显差异。该研究为狭叶番泻植株扩繁提供了理论基础。

关键词:药用植物;狭叶番泻;组织培养;植株再生

中图分类号:S 567 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)16-0098-04

狭叶番泻(*Cassia angustifolia* Vahl.)属蝶形花科植物,原产于印度,主要分布于巴基斯坦、阿尔及利亚、利比亚、埃及、苏丹、索马里共和国等。因叶片具有较好的泻热导滞,通便功效,而以“番泻叶”药材闻名。狭叶番泻叶片主要含番泻苷 A、B、C、D,山柰酚、蒽醌、精油、异鼠李素、大黄素等化学成分^[1-2]。在印度古医“阿优吠陀(Ayurvedo)”和“Unani”医学经书,就有番泻叶和豆类用于治疗食积、热结便秘、退热、贫血、伤寒、霍乱、黄疸、风湿、肿瘤、支气管炎以及皮肤病等病症的记录。

由于狭叶番泻种子自然萌发率低、存活力较弱,加上狭叶番泻具有较好的药用功效,人们对狭叶番泻需求增加,过度的乱挖滥采导致野生资源日益减少,不仅无法满足人们的用药需求,对生态系统的生物多样性也产生了影响。目前,尚无狭叶番泻嫁接、扦插等无性繁殖的研究报道。

植物组织培养在药用植物上的应用越来越广泛,并在许多药用植物上取得成功^[3-5],特别是在自然繁殖能力低的药用植物上倍受人们青睐^[6-10]。该试验通过技术成熟的组织培养手段,进行狭叶番泻不定芽直接再生和植株繁殖的研究,不仅可为人工栽培提供优质种苗,满足人们用药需求,也可为进一步的生物技术研究如基因工程提供理论基础。

第一作者简介:黄浩(1972-),男,硕士,助理研究员,现主要从事药用植物育种和栽培等研究工作。E-mail:hmouse@163.com.

责任作者:蒙爱东(1962-),女,本科,主任技师,现主要从事药用植物育种和组织培养等研究工作。

基金项目:广西医疗卫生重点科研课题资助项目(重 200907)。

收稿日期:2015-01-30

1 材料与方法

1.1 试验材料

狭叶番泻采自广西药用植物园种质资源圃,以当年生带萌动芽的枝条为试验材料。

1.2 试验方法

1.2.1 材料的消毒处理 用清水洗净材料表面脏物,再用 0.1%洗洁净浸泡 10 min、脱脂棉轻轻擦洗、自来水冲洗 20 min,吸干水分。在超净工作台上,将上述枝条避开萌动芽切成约 2 cm 长的材料,在浓度体积比为 75%的乙醇溶液中表面灭菌 10 s,接着在质量体积比为 0.1%的 HgCl₂ 溶液中灭菌 5 min,最后用无菌水充分冲洗 5 次,用无菌吸水纸吸干外植体表面水分,剪去带萌动芽枝条的两端旧切口,将萌动芽向上、枝条与培养基垂直直接到不含任何激素的 MS 培养基中培养。1 周后将不污染的材料挑出,备用。

1.2.2 不定芽诱导培养 将不污染的材料分别转接到含细胞分裂素 TDZ 和生长素 NAA 的 MS 培养基中进行诱导培养,TDZ 设置 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mg/L 5 个水平,NAA 设置 0.1 mg/L 1 个水平(表 1)。接种 40 d 后统计不定芽诱导率。

1.2.3 增殖培养 当外植体在诱导培养基中长出愈伤和芽点后,转接到含 6-BA 和 NAA 组合的增殖培养基中进行增殖培养。增殖培养基以 MS 为基本培养基,6-BA 设置 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mg/L 5 个水平,NAA 设置 0.05 mg/L 1 个水平(表 2)。培养 40 d 后统计增殖情况。

1.2.4 生根培养 剪取由增殖培养得到的健壮单芽(高约 3 cm)作为生根试验材料,以 1/2MS 为基本培养基,

分别添加不同浓度的 IBA 和 1%(w/v)的活性碳进行生根诱导,培养 2 周后,转接到含 1/2MS 液体培养基的湿润滤纸上培养 2 周(在培养瓶底中放置 1~2 层中性滤纸,再用 1/2MS 液体培养基湿润)。IBA 浓度设置 0、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 mg/L 6 个水平(表 3)。

1.2.5 培养基和培养条件 试验中,MS 和 1/2MS 培养基均添加 3% (w/v) 蔗糖和 0.56% (w/v)琼脂,培养基配好后,用 1 mol/L 的 NaOH 将 pH 值调整为 5.8,然后在 121℃ 高温高压下灭菌 20 min,培养室光照强度为 2 500 lx,温度为(25±2)℃。

1.2.6 练苗和移栽 当组培苗的根长达 2 cm 左右,将生根组培瓶苗置于温室大棚中练苗 1 周,再洗净组培苗根部的液体培养基,移至体积混合比为 2:1 的泥碳土和黄土基质中。在移栽 7 d 内,保持相对湿度 80%左右,温度 20~30℃,光照强度 1 000 lx;之后,按需喷水,正常管护。

1.3 数据分析

所有试验均为完全随机设计,每处理重复 3 次,每处理最小 10 个外植体。数据采用 Excel 2003 软件整理,采用 SPSS 19.0 软件进行多重比较分析。

2 结果与分析

2.1 不同浓度的 TDZ 对不定芽诱导分化的影响

不同浓度 TDZ 和 0.1 mg/L NAA 组合对不定芽诱导分化的情况见表 1。在不定芽分化率、每外植体分化出的芽个数、芽长 3 个测定指标中,处理间的差异均达显著水平。不定芽分化率和每个外植体分化出的芽个数随着 TDZ 浓度的增大呈先增加后下降的趋势,在 TDZ 浓度为 2.0 mg/L 达到最大值,分别为 100.0%和 4.3 个;而芽长则随着 TDZ 浓度增加而减少,当 TDZ 浓度为 2.5 mg/L 时,芽长仅为 0.2 cm。在观察中也发现,在含高浓度 TDZ 的培养基,不定芽的生长明显受到抑制,不定芽和叶片的形状畸形,茎的节间较短甚至芽点无法形成芽,生长的叶片内卷不伸展。综合来说,MS+2.0 mg/L

表 1 不同激素比对不定芽诱导的影响

Table 1 Effect of adventitious bud differentiation under different ratio of hormones

TDZ 浓度 TDZ concentration /(mg·L ⁻¹)	NAA 浓度 NAA concentration /(mg·L ⁻¹)	不定芽分化率 Percent of adventitious buds differentiation/%	每外植体平均芽个数 Average number of bud per explant/个	芽长 Bud length /cm
0.5	0.1	33.3±2.13d	1.3±0.55d	0.5±0.23a
1.0	0.1	76.0±1.68c	1.5±1.12d	0.5±0.19a
1.5	0.1	81.0±1.11b	2.6±0.63c	0.3±0.25b
2.0	0.1	100.0±0.00a	4.3±0.74a	0.2±0.26b
2.5	0.1	72.0±1.53c	3.2±0.94b	0.2±0.21b

注:数值为平均值±SE,平均值后同一列的相同小写字母表示邓肯多重比较不具有显著差异(P=0.05)。下同。

Note: Data in table are means±SE. Data followed by lowercase letters in the same column presents multi-comparison with the method of Duncan at 0.05 level. The same below.

TDZ+0.1 mg/L NAA 培养基对不定芽的诱导分化效果最佳。

2.2 不同浓度的 6-BA 对增殖培养的影响

由于 TDZ 对不定芽的生长具有抑制作用,因此,在分化诱导培养 MS+2.0 mg/L TDZ+0.1 mg/L NAA 培养 40 d 后,将外植体转移到含不同浓度 6-BA 的 MS 培养基中进行增殖培养。从表 2 可知,每外植体的不定芽个数和芽长也是随着 6-BA 浓度的增加呈先增大后降低的趋势,当 6-BA 浓度为 2.0 mg/L 时,每外植体的平均芽个数最多、芽长最好,分别 12.6 个、2.1 cm,芽的生长状况较好,茎的节间距适中,叶片正常伸展且呈浓绿色。另外,在所有 6-BA 与 NAA 组合的处理中,从转接外植体中长出芽均较壮,叶片正常伸展,并呈浓绿色。因此,选用 MS+2.0 mg/L 6-BA+0.05 mg/L NAA 作为增殖培养基较佳。

表 2 不同激素比对不定芽增殖的影响

Table 2 Effect of bud seedling multiplication under different ratio of hormones

6-BA 浓度 6-BA concentration /(mg·L ⁻¹)	NAA 浓度 NAA concentration /(mg·L ⁻¹)	每外植体平均芽个数 Average number of bud per explant	芽长 Bud length /cm
0.5	0.05	2.3±0.25c	1.1±0.23c
1.0	0.05	2.8±0.29c	1.1±0.19c
1.5	0.05	6.8±0.36b	1.3±0.25c
2.0	0.05	12.6±0.64a	2.1±0.26a
2.5	0.05	7.6±0.52b	1.5±0.21bc

2.3 不同浓度 IBA 对生根诱导的影响

从表 3 可知,生根率、生根数和根长均随着 IBA 浓度的增加而增大,当没有添加 IBA 或 IBA 浓度为 0.5 mg/L 时,各处理均无法诱导生根,当浓度为 1.0 mg/L 时,无菌苗对 IBA 的生根诱导产生了反应,生根率、生根数和根长分别为 27.4%、1.9 条和 1.6 cm;当 IBA 浓度为 2.0 mg/L 时,生根率、生根数和根长分别达到最大值,分别为 58.5%、2.8 条、3.2 cm;之后,随着 IBA 浓度的增加,生根率、生根数和根长均逐渐下降。因此,较好的前期生根培养基为 1/2MS+2.0 mg/L IBA+1%(w/v)活性碳。

表 3 不同浓度的 IBA 对生根诱导的影响

Table 3 Effect of root induction under different IBA concentrations

IBA 浓度 IBA concentration /(mg·L ⁻¹)	生根率 Rooting percentage /%	生根数 Number of roots/条	根长 Root length /cm
0	—	—	—
0.5	—	—	—
1.0	27.4±2.15c	1.9±0.28b	1.6±0.25c
2.0	58.5±2.56a	2.8±0.20a	3.2±0.23a
3.0	45.1±1.36b	2.5±0.31a	2.7±0.18b
4.0	22.8±2.11c	1.7±0.24b	1.5±0.20c

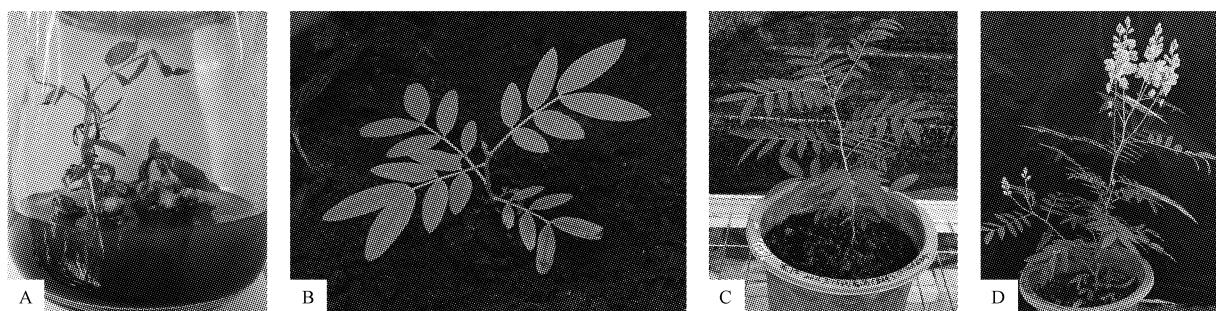
注:“—”表示无反应。

Note: “—” shows no response.

2.4 练苗和移栽

经练苗后移栽到黄土和泥炭土的基质上,成活率可高达 73.7%(试验数据没列出),40 d 后即可移至大田种植,

移栽后长成的植株与种子播种的植株在形态上无明显差异,均能正常开花结果(图 1)。



注:A. 不定芽诱导,B. 移栽 15 d 后,C. 组培苗在温室正常生长,D. 组培苗开花。

Note: A. adventitious bud induction, B. after transplanted 15 d, C. grew in greenhouse, D. flowering in pot.

图 1 狭叶番泻不定芽诱导和在大棚生长状况

Fig. 1 Status of adventitious bud induction and grow in greenhouse

3 结论与讨论

在自然繁殖过程中,狭叶番泻主要通过种子繁殖,由于种子数量少、种子萌发率低,因此,成苗率较低。该试验以带芽枝条为材料,通过不同激素组合配比,进行不定芽诱导、无菌苗增殖和生根诱导试验,再经过练苗、移栽,最后成功获得再生植株;由于使用带芽的枝条为试验材料,不受季节约束,增殖倍数高,种苗繁殖速度快,移栽成活率高,生产成本相对较低,便于大规模工厂化生产,具有较强的实用性。该试验结果对狭叶番泻种质资源保护、满足用药需求和提高药农经济收入,具有十分重要的意义。

试验发现,TDZ 对不定芽的形成具有明显的抑制作用,但是可以通过更换细胞分裂素如 6-BA 获得较好的芽形成和增殖效果,这与 *Neolamarckia cadamba*^[11]、*Primulina tabacum*^[12]、*Cenchrus ciliaris*^[13]、*Pumpkin ash*^[14]、*Pinus*^[15]、*Limonium perigrinum*^[16]、草莓^[17]、番木瓜^[18]等植物使用 TDZ 的研究相似,即 TDZ 对上述植物的不定芽形成和生长有一定抑制作用。另外,无论是在不定芽诱导分化、增殖还是生根诱导阶段,外植体褐化严重,分泌出的褐色物质严重抑制各个阶段的生长,特别是对生根阶段的影响较大。尽管在生根培养过程中,通过添加活性炭和滤纸培养的方法减少分泌物对生根诱导的抑制,但生根诱导率仍然偏低,仅为 58.5%。因此,在下一步工作中,尚需对抑制褐化和提高生根诱导率进行深入的研究。

参考文献

- [1] PARVEEN S, SHAHZAD A. Encapsulation of nodal segments of *Cassia angustifolia* Vahl. for short-term storage and germplasm exchange [J]. *Acta Physiol Plant*, 2014, 36(3): 635-640.
- [2] SIDDIQUE I, BIN JAVED S, AL-OTHMAN M R, et al. Stimulation of *in vitro* organogenesis from epicotyl explants and successive micropropagation round in *Cassia angustifolia* Vahl.: an important source of sennosides [J]. *Agroforest Syst*, 2013, 87(3): 583-590.

- [3] 客绍英. 菝葜组培快繁体系的建立及四倍体株系选育和品质鉴定 [D]. 北京: 北京林业大学, 2010.
- [4] 胡凤荣. 百合种质资源鉴定与组培快繁技术体系研究 [D]. 南京: 南京林业大学, 2007.
- [5] 樊金会. 风信子离体花器官再生系统中激素诱导响应基因的分离和表达 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2002.
- [6] 耿钰, 王俊丽, 杜建芳. 杜仲愈伤组织培养研究 [J]. *经济林研究*, 1996, 14(4): 34-35.
- [7] 杨礼香, 周诗毅. 南方红豆杉组织培养和紫杉醇含量测定 [J]. *华中师范大学学报(自然科学版)*, 2001, 35(4): 453-455.
- [8] 秦卫东, 高明侠, 吕兆启. 银杏愈伤组织培养及其黄酮生物合成的初步探讨 [J]. *食品科学*, 2002, 23(11): 38-41.
- [9] 刘非, 彭克勤, 彭志红, 等. 喜树细胞悬浮培养体系的建立 [J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2010, 36(5): 528-530.
- [10] 孙立炜. 九节龙化学成分和组织培养研究 [D]. 西安: 西北大学, 2008.
- [11] HUANG H, LI J C, OUYANG K X, et al. Direct adventitious shoot organogenesis and plant regeneration from cotyledon explants in *Neolamarckia cadamba* [J]. *Plant Biotechnology*, 2014, 31(2): 115-121.
- [12] YANG X Y, LYU J F, SILVA A, et al. Somatic embryogenesis and shoot organogenesis from leaf explants of *Primulina tabacum* [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2012, 109(2): 213-221.
- [13] KUMAR S, BHAT V. High-frequency direct plant regeneration via multiple shoot induction in the apomictic forage grass *Cenchrus ciliaris* L. [J]. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 2012, 48(2): 241-248.
- [14] STEVENS M E, PIJUT P M. Hypocotyl derived *in vitro* regeneration of pumpkin ash (*Fraxinus profunda*) [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2012, 108(1): 129-135.
- [15] HUMANEZ A, BLASCO M, BRISA C, et al. Thidiazuron enhances axillary and adventitious shoot proliferation in juvenile explants of *Mediterranean provenances* of maritime pine *Pinus pinaster* [J]. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 2011, 47(5): 569-577.
- [16] SEELYE J F, MADDOCKS D J, BURGE G K, et al. Shoot regeneration from leaf discs of *Limonium perigrinum* using thidiazuron [J]. *New Zeal J Crop Hort*, 1994, 22(1): 23-29.
- [17] 尹淑萍, 金万梅, 王萍, 等. Thidiazuron 对草莓外植体再生不定芽的影响 [J]. *农业生物技术学报*, 2003, 11(4): 379-382.
- [18] 周俊彦, COLLET G F. Thidiazuron 的细胞分裂素活性研究 I 对番木瓜 (*Carica pentagona*) 愈伤组织诱导及芽生长的作用 [J]. *西北植物学报*, 1989, 9(4): 203-211.

以鳞茎片为外植体构建 大蒜微繁技术体系

任春雪, 王 珍, 范宝莉, 刘晓颖, 王振英, 彭永康

(天津师范大学 生命科学学院, 天津 300387)

摘 要:以大蒜鳞茎片为外植体,利用植物组织培养技术,构建了一个新的大蒜微繁技术体系。结果表明:以 MS+1.5 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L KT 为愈伤组织诱导和继代培养基,以 MS+5 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA 为诱导不定芽分化培养基,增加以 MS+1.0 mg/L KT+1.0 mg/L GA+0.2 mg/L NAA+2.0 mg/L 6-BA 为壮芽培养基的壮芽培养过程,以基础 MS 培养基为生根培养基的试管苗培养体系;试管苗经过室内和田间拱棚中 2 次练苗,越冬前移栽到土壤中。翌年在 T0 代收获分蘖率高达 94%再生地下鳞茎。该技术体系为脱毒蒜种扩繁提供重要保障。

关键词:大蒜微繁技术体系;愈伤组织;壮芽培养

中图分类号:S 633.403.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)16-0101-06

大蒜品种资源丰富,但由于长期的取向性选择,使得大蒜的繁殖主要靠营养体,极少数的品种能够开花结

籽,多以无性繁殖为主。大蒜无性繁殖主要是用头年收获的大蒜蒜瓣作为种蒜进行种植,这样有 2 个问题困扰生产者:一是蒜种投资大,繁殖系数低,生产成本低;二是长期的无性繁殖造成品种退化,病毒积累严重,使大蒜减产,品质变差。研究者用生物技术手段在大蒜的脱毒、快繁、遗传改良等方面进行了大量的探索性工作,用大蒜幼叶^[1]、全展叶^[2]、根尖^[3-4]、茎尖^[5]、花序轴^[6]等为外植体构建大蒜组织培养体系;张昌伟等^[7]通过大蒜根

第一作者简介:任春雪(1990-),女,硕士研究生,研究方向为细胞遗传学。E-mail:skywangzy@mail.tjnu.edu.cn.

责任作者:王振英(1965-),女,博士,教授,研究方向为植物抗性分子生物学。E-mail:skywangzy@mail.tjnu.edu.cn.

基金项目:天津市农委重点资助项目(201302030);天津师范大学应用开发研究基金资助项目(52XK1210)。

收稿日期:2015-03-15

Preliminary Study on Adventitious Bud Induction and Plant Regeneration of *Cassia angustifolia*

HUANG Hao, WEI Ying, MENG Aidong

(Guangxi Botanical Garden of Medicine Plant, Nanning, Guangxi 530023)

Abstract: Adventitious bud differentiation, bud seedling multiplication, root induction from mature brunch of *Cassia angustifolia*, and transplanting substrate of tissue culture-raised plantlets transplantation were studied by tissue culture method. The results showed that the efficient adventitious bud differentiation was cultured on MS media supplemented with 2.0 mg/L TDZ + 0.1 mg/L NAA. The highest number of adventitious buds (12.6 ± 0.64) per explant were observed in MS media supplemented with 2.0 mg/L 6-BA + 0.05 mg/L NAA. The highest rooting percentage (58.5%) and survival were achieved using 1/2MS media with 2.0 mg/L IBA and 1% (w/v) active carbon. The 73.7% plantlets survived acclimatization in the greenhouse, and producing healthy plants on the field. The current investigation showed efficient *in vitro* regeneration capabilities of *Cassia angustifolia* from brunch explants.

Keywords: medicinal plants; *Cassia angustifolia*; tissue culture; plant regeneration