

不同植物生长调节剂对丹参组培快繁的影响

孟 倩, 孔祥生, 张改娜

(河南科技大学 农学院, 河南 洛阳 471003)

摘 要:以丹参无菌苗叶片为外植体,以 MS 为基本培养基,研究了不同种类和浓度的植物生长调节剂对丹参叶片愈伤组织诱导、芽诱导及根诱导的影响。结果表明:MS+0.5 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L 6-BA 利于丹参叶片诱导愈伤;诱导愈伤分化为芽的最适培养基为 MS+0.5 mg/L NAA+1.5 mg/L 6-BA;诱导生根的最适培养基为 1/2MS+0.5 mg/L NAA。该试验为丹参的工厂化生产奠定了理论基础。

关键词:丹参;组织培养;无菌体系;愈伤组织;植物生长调节剂

中图分类号:S 567.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)09-0102-04

丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bge)属唇形科(Labiatae)鼠尾草属植物,又名赤参、紫丹参、血参、大红袍等,以干燥的根及根茎入药,始载于《神农本草经》,列为上品,是我国传统的中药^[1]。具有祛瘀止痛、活血通经、清心除烦等功效^[2],在抗癌、抗衰老等方面具有良好的效果^[3]。随着丹参药用价值的不断开发利用,市场需求量的增加,丹参野生资源已远远不能满足市场需求,而人工栽培由于药田生态环境生物群落多样性差,丰富度低,病虫害的发生以及只种不选的生产模式大大降低了丹参的品质,也进一步促使丹参的组培快繁成为人们研究的热点^[4]。

该试验在构建丹参无菌体系的基础上,以无菌苗叶片为外植体,研究了不同种类和浓度的植物生长调节剂对叶片诱导愈伤、愈伤诱导芽以及生根的影响,旨在选择出适宜的植物生长调节剂,为丹参快速繁殖、提高丹参产量奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试多年生丹参采自洛阳市隋唐植物园。

1.2 试验方法

1.2.1 无菌体系的建立 取丹参带腋芽的幼嫩茎段,先用自来水冲洗 10 min,然后将茎段转至超净工作台,用 75%乙醇溶液表面消毒 1 min,再用 0.1%升汞溶液灭菌 1 min 后,用无菌水冲洗 3~4 次(以上操作均需要轻轻摇动)。按无菌操作要求将外植体接种于附加 0.5 mg/L

NAA 和 1.0 mg/L 6-BA 的 MS 培养基^[5]中获得无菌苗。

1.2.2 不同生长调节剂对叶片愈伤组织诱导的影响

取无菌苗的幼嫩叶片,剪成 0.5 cm×0.5 cm 的小块,分别接种到附加不同种类和浓度配比生长调节剂的 MS 固体培养基上(A1~A6:0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mg/L 6-BA, B1~B6:0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mg/L 2,4-D, C1:0.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L 2,4-D, C2:1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L 2,4-D, C3:1.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L 2,4-D, C4:2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L 2,4-D)进行培养。观察外植体的生长情况,记录愈伤组织的质地、颜色,于接种后 20 d 统计诱导出愈伤组织的数量,并计算诱导率。诱导率=(长出愈伤组织的外植体数/总接种外植体数)×100%。

1.2.3 不同生长调节剂对芽诱导的影响 将愈伤组织继代后,挑选质地、颜色相似长势较好的愈伤组织,切成 0.5 cm³的小块,接种于附加不同浓度 6-BA 和 NAA 的 MS 固体培养基上(D1~D4:0.5、1.0、2.0、3.0 mg/L 6-BA, E1:0.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA, E2:1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA, E3:1.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA, E4:2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA)进行培养。记录最早出芽时间、愈伤及芽的长势,20 d 后统计愈伤组织的出芽数并计算出芽率。出芽率=(长出芽的愈伤组织数/接种的愈伤组织数)×100%。

1.2.4 NAA 对根诱导的影响 挑选长势较好、高约 2~3 cm 的苗转接至添加不同浓度 NAA(F1~F7:0.1、0.2、0.4、0.5、0.6、0.8、1.0 mg/L)的 1/2MS 生根培养基上进行培养。记录最早开始生根时间、根及植株的生长情况,35 d 后统计生根植株的数目并计算生根率。生根率=(生根的植株数/总接种数)×100%。

1.2.5 培养条件 培养基中附加蔗糖 30 g/L,琼脂

第一作者简介:孟倩(1987-),女,河南郑州人,硕士,研究方向为植物学。E-mail:damengqian@163.com。

责任作者:孔祥生(1956-),男,硕士,教授,研究方向为植物生理学与植物细胞工程。E-mail:kxsh55@163.com。

收稿日期:2013-01-08

0.65%, pH 值调节到 5.8, 培养温度(25±2)℃, 光照强度 2 000 lx, 光照时间 15 h/d。

2 结果与分析

2.1 不同生长调节剂对愈伤组织诱导的影响

由表 1 可知, 叶片在不添加任何激素的 MS 培养基中逐渐变黄, 最终褐化死亡。单独添加 6-BA, 愈伤组织诱导率最高的仅为 72.5%, 愈伤组织质地疏松, 仅限于叶缘。18 d 左右有芽点长出, 有的芽点甚至不经过愈伤组织而是直接由叶片分化出芽, 后期玻璃化现象严重。6-BA 浓度低于 3.0 mg/L 时, 随 6-BA 浓度的增加愈伤诱导率先升高后降低, 并伴随有大量芽的发生, 可见单独使用 6-BA 不适宜用作诱导愈伤。单独使用 2,4-D, 愈伤诱导率达 100%, 最早 6 d 左右叶片边缘开始出愈, 愈伤组织浅黄绿色或浅黄色, 疏松, 但后期观察发现, 2,4-D 诱导的愈伤组织团状易碎, 长势较慢, 愈伤组织色泽逐渐变暗, 愈伤处分化出半透明的不定根。可见单独使用 2,4-D, 不利于愈伤组织的生长。向 6-BA 中添加浓度为 0.5 mg/L 的 2,4-D 配合使用效果较单独使用好。当 6-BA 浓度为 0.5 mg/L 时, 愈伤组织浅绿色较紧密, 但后期有半透明不定根产生。6-BA 浓度高于 1.0 mg/L 时, 绿色愈伤组织上有少量白色愈伤, 当 6-BA 浓度为 2.0 mg/L 时还会伴随有芽点的出现。只有 6-BA 浓度为 1.0 mg/L 时, 叶片最早出愈时间短(8 d), 14 d 时出愈率达 100%, 愈伤绿色, 量较多, 质地紧密, 且没有分化为芽或根。综合考虑, MS+0.5 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L 6-BA 可作为愈伤诱导的最佳培养基。

表 1 不同生长调节剂对丹参愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effect of different growth regulators on callus induction of *Salvia miltiorrhiza*

序号	最早出愈时间/d	出愈率/%	愈伤组织生长情况
0		0	
A1	15	47.5	浅黄绿色, 团状, 疏松, 个别有芽点
A2	11	60.0	浅绿色, 团状, 疏松, 有少量芽点
A3	10	65.0	浅绿色, 团状, 疏松, 有大量芽点
A4	10	72.5	浅绿色, 团状, 疏松, 有大量芽点
A5	13	52.5	浅黄绿色, 团状, 疏松, 有大量芽点
A6	14	37.5	浅黄色, 团状, 疏松, 有少量芽点
B1	8	100	浅黄绿色, 团状, 疏松, 有半透明根
B2	6	100	浅黄绿色, 团状, 疏松
B3	7	100	浅黄绿色, 团状, 较紧密
B4	7	100	浅黄绿色, 团状, 疏松
B5	8	100	浅黄色, 团状, 疏松
B6	8	100	浅黄色, 团状, 疏松
C1	10	100	浅绿色, 团状, 较紧密, 有半透明根
C2	8	100	绿色, 团状, 紧密
C3	9	100	绿色, 少量白色, 团状, 较紧密
C4	9	100	绿色, 少量白色, 团状, 疏松, 有芽点

2.2 不同生长调节剂对芽诱导的影响

由表 2 可知, 单独使用 6-BA 时, 随着 6-BA 浓度的增加, 出芽率先升高后降低, 当 6-BA 浓度为 1.0 mg/L 时出芽率最高, 为 75%, 愈伤浅黄色或半透明, 平均每块

愈伤分化的芽数约为 15~20 个, 芽较小, 全展叶少, 多卷曲, 半透明水渍状。向 6-BA 中添加 0.5 mg/L NAA 后, 愈伤出芽率明显高于不添加。随 6-BA 浓度的增加, 愈伤的出芽率随之提高, 当 6-BA 浓度为 1.5~2.0 mg/L 时, 愈伤的出芽率最高(90%), 愈伤浅绿色。试验结果表明, 6-BA 浓度低于 1.0 mg/L 愈伤分化的芽较小, 多半展叶, 芽后期生长缓慢, 仅有 2~3 株芽可成苗。6-BA 浓度较高(2.0 mg/L)时, 愈伤分化的芽长势较快但芽较小, 全展叶少。只有 6-BA 浓度为 1.5 mg/L 时, 愈伤 7 d 开始分化为芽, 芽的长势较稳定, 每个芽丛约有 25~30 个芽, 芽丛莲座状, 多全展叶, 后期每个芽丛约有 6~10 个芽长成高约 2~3 cm 的小苗。综合考虑, MS+0.5 mg/L NAA+1.5 mg/L 6-BA 培养基可作为愈伤分化为芽的最佳培养基。

表 2 不同生长调节剂对芽诱导的影响

Table 2 Effect of different growth regulators on bud induction of *Salvia miltiorrhiza*

序号	最早出芽时间/d	出芽率/%	生长势
D1	10	50	愈伤浅黄色, 芽小, 全展叶少, 水状半透明
D2	8	75	同 D1, 芽点较 D1 多, 叶展开或卷曲
D3	9	50	愈伤浅黄色或半透明, 芽水渍状, 多全展叶
D4	9	30	愈伤半透明, 芽少, 水渍状半透明, 叶卷曲
E1	8	60	愈伤黄绿色, 芽多, 较小, 多半展叶
E2	7	85	愈伤浅绿色, 芽丛莲座状, 多半展叶
E3	7	90	愈伤浅绿色, 芽丛莲座状, 多全展叶
E4	8	90	愈伤浅绿色, 芽多, 较小, 全展叶少

2.3 不同浓度 NAA 对根诱导的影响

由表 3 可知, NAA 浓度高于 0.6 mg/L 时, 根的诱导率及平均根长都呈下降的趋势, 根多为从愈伤处出现分化的半透明不定根, 叶片边缘紫色且有枯萎的现象。NAA 浓度低于 0.4 mg/L 时, 平均每株有 2~3 条根, 根细长, 根系不发达, 后期植株长势较慢。只有 NAA 浓度为 0.5 mg/L 时, 试管苗 8 d 开始生根, 生根率为 100%, 根短粗, 根数较多(平均生根数为 3.81), 主根上有大量根毛, 根系发达, 叶片颜色翠绿, 植株长势较好。综合考虑, 1/2MS+0.5 mg/L NAA 适宜诱导生根。

表 3 不同浓度 NAA 对根诱导的影响

Table 3 Effect of different concentrations of NAA on rooting of *Salvia miltiorrhiza*

序号	外植体数	最早生根时间/d	生根率/%	平均根数	平均根长/cm	植株长势
F1	20	7	80	2.41	2.94	++
F2	20	10	100	2.67	3.22	+++
F3	20	10	100	3.22	3.01	+++
F4	20	8	100	3.81	2.07	+++
F5	20	9	90	2.07	1.95	+++
F6	20	10	75	3.11	1.06	++
F7	20	9	70	3.23	2.20	+

注: +, 一般; ++, 较好; +++, 旺盛。

2.4 练苗移栽

待试管苗根长至 5~6 cm 时移栽。移栽前, 将生根

试管苗的瓶口打开,练苗 10 d,使瓶苗逐渐适应外界环境。移栽时,将试管苗小心取出,清水洗去根部残余的

培养基,植入营养土:蛭石=1:1 的盆中,置于自然条件下生长,每天浇水,以保持湿度,成活率达75%~85%。

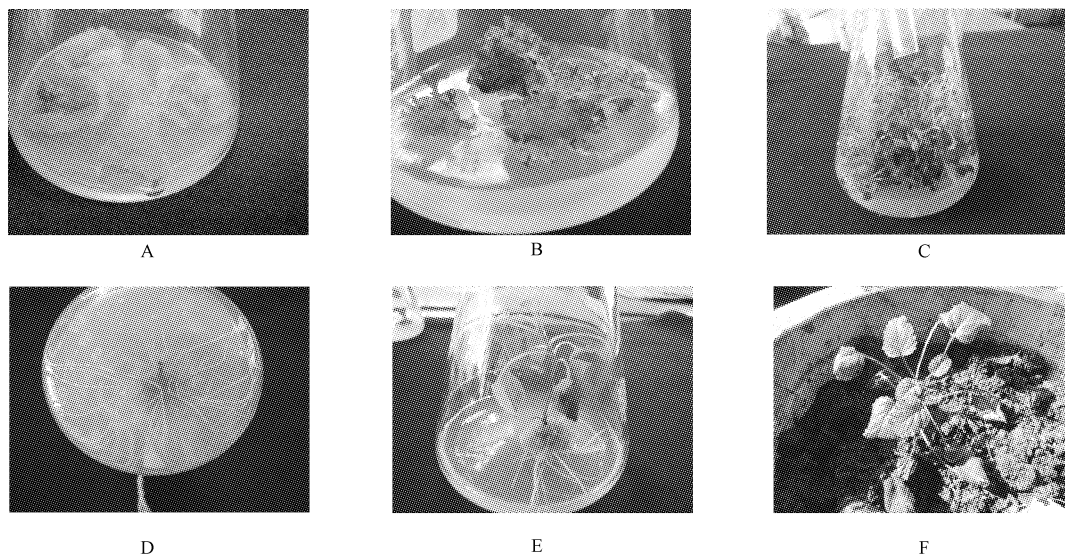


图1 丹参组织培养

注:A:愈伤组织;B:愈伤生芽(14 d);C:愈伤生芽(28 d);D:诱导生根;E:生根苗;F:移栽成活植株。

Fig. 1 Tissue culture of *Salvia miltiorrhiza*

Note: A: Callus; B: Callus differentiation buds (14 d); C: Callus differentiation buds (28 d); D: Induced roots; E: Rooting seedlings; F: Survival plant after transplanted.

3 讨论

该试验是在建立无菌体系的基础上进行,无菌体系的建立可有效防止外植体在消毒过程中细胞结构破损促使多酚氧化酶将酚氧化成醌类物质从而导致褐变的发生。在培养中,为了达到快速繁殖的目的,通常需要在培养基中添加一定质量浓度的植物生长调节剂,然而,植物生长调节剂种类或浓度不适合也会导致培养材料的异常生长,如玻璃化、褐化等。柳福智等^[6]研究表明,在不添加任何激素的MS培养基上,叶片最终死亡,使用单一植物生长调节剂的效果不及细胞分裂素与生长素的配比使用。以叶片为外植体诱导愈伤组织,0.5 mg/L 2,4-D与1.0 mg/L 6-BA配合使用的诱导效果最好,可能是由于所选材料不同,该试验筛选的最佳愈伤诱导培养基与已有文献报道不同^[7-9]。赵东利等^[5]研究证明,诱导愈伤产生再生芽的最佳激素组合是6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L,芽发生率达到85%。梁宏伟等^[10]以白花丹参为试验材料,结果表明MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L和MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L培养基上均能诱导分化大量丛生芽。而该试验以继代后的愈伤组织为材料,选择出最佳的芽分化培养基是MS+0.5 mg/L NAA+1.5 mg/L 6-BA,与赵东利等^[5]和梁宏伟等^[10]的研究结果不一致,这可能是由于试验材料品种不一样,或者是所取试验材料的来源地不同,材料的生长环境及习性的改变导致试验结果不一致,也可能是因为所用

愈伤继代时间不同,具体原因有待进一步探究。在诱导生根试验中发现,NAA虽能有效的诱导生根,但其接触培养基的部分均有不同程度的愈伤化,NAA浓度越高愈伤化程度越严重,越不利于根的生长。该研究还发现,经过愈伤组织分化出的芽,其出芽时间短,7 d愈伤开始分化出芽,16 d左右即可形成莲座状芽丛。另外,国内外对丹参原生质体培养研究较少,目前仍未见有相关报道,若能直接从愈伤组织中分离得到原生质体进行培养,将具有重大意义。

参考文献

- [1] 肖培根. 新编中药志[S]. 北京:化学工业出版社,2001:212.
- [2] 中国药典[S]. 卷 I,2005.
- [3] Liu J, Shen H M, Namong C. *Salvia miltiorrhiza* inhibits cell growth and induces apoptosis in human hepatoma HepG2 cells[J]. Cancer Lett, 2000, 153:85-93.
- [4] 单成钢,王志芬,苏学合,等. 丹参组织培养研究进展[J]. 现代中药研究与实践, 2007, 33(2):54-57.
- [5] 赵东利,曹雪梅,邱桂佳,等. 丹参的组织培养及植株再生[J]. 北京农学院学报, 2010, 25(2):5-7.
- [6] 柳福智,董娟娥,梁宗锁. 不同生长调节物质对丹参愈伤组织的诱导效应[J]. 中国农学通报, 2005, 21(11):202-204, 275.
- [7] 杨精华,刘曦,张乐,等. 崖白菜的愈伤组织诱导及植株再生[J]. 植物生理学报, 2012, 48(7):664-668.
- [8] 全妙华,欧立军,贺安娜,等. 天门冬组培快繁体系研究[J]. 中草药, 2012, 43(8):1599-1603.
- [9] 陈书安,王晓东,欧阳杰,等. 藏红花球茎愈伤组织快速诱导的研究[J]. 中国药理学杂志, 2003, 38(4):254-256.
- [10] 梁宏伟,王锋祥,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.

黑果腺肋花楸组培苗生根培养及驯化的研究

高晔华, 郭朋伟, 高 日, 吴荣哲

(延边大学 农学院, 吉林 延吉 133002)

摘 要:以黑果腺肋花楸组培苗为试材,研究了 MS 培养基浓度、IBA 浓度、 $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ 及活性炭浓度比例对生根的影响,并在不同栽培基质上进行驯化筛选。结果表明:适宜黑果腺肋花楸组培苗生根的培养基为 1/2MS(改良)+0.6 mg/L IBA+1.5 g/L 活性炭+30 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂;培养基浓度为 1/2MS 时适宜其生根,根长达到 3.2 cm,根数目达到 3.1;生长素 IBA 浓度为 0.6 mg/L 时,植株生长健壮,根长为 3.4 cm; $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ 为 3:3 时,根数目达 4.3 条,生根率为 100.0%。加入活性炭浓度为 1.5 g/L 时,植株直立健壮、须根多且为白绿色,叶片舒展。腐质土:沙土=1:1 为适宜黑果腺肋花楸移植苗的基质。室外自然条件下驯化,移植苗已适应了延吉地区气候。

关键词:激素; $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ 比例;活性炭;栽培基质

中图分类号:S 685.99 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)09-0105-04

黑果腺肋花楸(*Aronia melanocarpa*)属蔷薇科腺肋花楸属落叶灌木,根系属浅根性,水平根发达,树型小而美观,具有四季皆宜的观赏效果。耐荫喜光,抗寒、抗旱性强,可在年降水量 400 mm 以上,极限低温 -40°C 以上的气候正常生长发育^[1]。果实及其提取物对心脏病、高血压等心脑血管疾病具有特殊疗效^[2]。在我国,此树种仍属开发阶段,规模化种植较少,系统研究也较少,多为传统的扦插繁殖,且存在生根困难、生根率较低的问题^[3-4]。组织培养可以缩短育种时间,便于进行规模化

和商业生产。但目前仅有生长调节物质对其增殖影响的少数报道^[5-6]。该试验以黑果腺肋花楸组培苗为试材,研究影响其生根的因素及驯化条件,以期大量扩繁提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试植物材料为延边大学农学院园艺学栽培实验室生长健壮的黑果腺肋花楸组培苗。

1.2 试验方法

1.2.1 MS 培养基浓度对黑果腺肋花楸生根的影响

无菌条件下,将组培苗切成约 1.5 cm,分别接种在 1/4MS、1/2MS、3/4MS、MS 培养基,30 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂,pH 调节为 5.8。消毒灭菌冷凝后,每瓶接入 4 根茎段。培养温度 $(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$,相对湿度 70%,光照 1 600 lx,

第一作者简介:高晔华(1987-),女,在读硕士,研究方向为园艺植物生物技术及栽培生理。

责任作者:吴荣哲(1966-),男,博士,副教授,现主要从事生物工程及栽培生理等研究工作。E-mail:wurzh@ybu.edu.cn.

收稿日期:2012-12-18

Effect of Different Growth Regulators on Tissue Culture and Rapid Propagation of *Salvia miltiorrhiza*

MENG Qian, KONG Xiang-sheng, ZHANG Gai-na

(College of Agronomy, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003)

Abstract: Taking the leaves of aseptic seedling as explants, using MS as basic medium, the effect of different kinds and concentrations of plant growth regulators on tissue culture of blade callus, bud and root induction of *Salvia miltiorrhiza* were studied. The results showed that MS+0.5 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L 6-BA culture medium was suitable for blade of *Salvia miltiorrhiza* induce callus. MS+0.5 mg/L NAA+1.5 mg/L 6-BA medium was the optimum medium for callus differentiate bud. 1/2MS+0.5 mg/L NAA was the optimum medium for root induction. It provided a theoretical basis for its industrial production.

Key words: *Salvia miltiorrhiza*; tissue culture; aseptic system; callus; plant growth regulator