

丹参组培快繁技术研究

房师梅, 雷世俊, 王洪波, 王 裕, 丁雪珍

(潍坊职业学院, 山东 潍坊 261041)

摘 要:以紫花丹参茎尖、茎段、叶片、花蕾为试材,采用随机排列的试验设计,研究了不同灭菌时间、不同激素水平对丹参愈伤组织形成、丛生芽分化、试管苗生根、试管苗驯化移栽的影响。结果表明:茎段用 0.1% HgCl_2 溶液灭菌 10 min 效果最好,成活率最高可达 90%以上;丹参小苗顶芽在 $\text{MS}+6\text{-BA } 1.0 \text{ mg/L}+\text{NAA } 0.1 \text{ mg/L}$ 中诱导丛生芽效果最好;试管苗生根以 $1/2\text{MS}+\text{NAA } 0.4 \text{ mg/L}$ 生根效果最好,生根率最高可达 95%以上;试管苗的驯化移栽以蛭石+珍珠岩的组合既保水又透气,最有利于丹参的生根,成活率可达 98%。

关键词:丹参;组织培养;快速繁殖

中图分类号:S 567.5+3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)21-0123-04

丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bunge)属唇形科鼠尾草属多年生草本植物,是我国传统大宗药材,以干燥根及根茎入药,临床上主要用于治疗心绞痛、冠心病、心肌梗塞等心血管疾病。由于野生丹参资源迅速减少,不能满足人们需求,临床上常以人工栽培丹参替代野生丹参。长期以来人工栽培生产只种不选,使得品种退化,混杂严重,药材产量和质量下降。品种提纯复壮、新品种推广等均需要在短时间内提供大量苗木。植物组织培养繁殖速度快,繁殖系数高,可以快速繁育苗木,降低育苗成本,在短期内实现大规模工厂化生产,培育出优质、健壮、无病毒的种苗,从而进行大面积优质、安全、无污染的优质商品丹参生产。为此,该试验进行了丹参组织培养快速繁殖技术研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为紫花丹参茎尖、茎段、叶片、花蕾。选用 MS 培养基为基本培养基,不同处理附加不同种类、不同浓度的植物生长调节剂。培养基分装采用 100~150 mL 的三角瓶,2 层封口膜加 2 层玻璃纸封口。外植体接种后放在光照培养架上培养,温度 $(25\pm 2)^\circ\text{C}$,湿度 75%~80%以上,每个培养架层安装 2 支 40 W 日光灯,光照时间 12 h/d。

1.2 试验方法

试验在潍坊职业学院组织培养中心进行。

第一作者简介:房师梅(1967-),女,本科,副教授,现主要从事植物组织培养工作。E-mail:fangshimei@126.com。

基金项目:山东省星火计划资助项目(2009XH048)。

收稿日期:2013-05-17

1.2.1 不同灭菌时间对外植体灭菌效果的影响 分别选取丹参茎段(长 2.5 cm 左右,带 1 个饱满腋芽)、叶片、叶柄、花蕾等外植体,置于盛有洗洁精水的三角瓶内,不断摇晃清洗 15 min,后用清水反复冲洗干净,再用 75% 的酒精消毒 0.5 min 后,用 0.1% 的 HgCl_2 (升汞)溶液分别消毒 5、10、15 min。最后用无菌水冲洗 4 次,每次不少于 1 min。消毒后的外植体每瓶接种 1 个,每处理 30 瓶,3 次重复,共 90 瓶。培养 2 周后观察灭菌效果。

1.2.2 丹参芽在不同培养基上的生长情况 将丹参新芽切下后,分别接种在 MS 培养基附加 6-BA、NAA(1.0、0.5、0.8、0.4、0.6、0.3、0.4、0.2、0.2、0.1、0.0、0.0)。每个处理的茎段数为 10 个,每个三角瓶装 1 个,每处理设 3 次重复,共 30 瓶,每天观察记录生长情况,20 d 后调查试验结果。

1.2.3 不同生长调节剂组合对愈伤组织形成的影响 选取丹参的幼嫩叶片,用自来水冲洗干净,在超净工作台上先用 75% 的酒精浸泡 30 s,后用 0.1% 的 HgCl_2 常规灭菌 10 min,无菌水冲洗 4 次,每次不少于 1 min;茎切成 1.5~2.0 cm 的小段,灭菌方法同上,灭菌时间 10 min;未开放的花,去除花萼,灭菌方法同上,灭菌 10 min。接种时,在超净工作台上将叶片切成 0.5 cm×0.5 cm 的小块,花药从花蕾中剥离,接种于附加不同植物生长调节剂的 MS 培养基上,共 8 个处理,每处理的外植体数为 10 个,每个三角瓶装 1 个,每处理设 3 次重复,共 30 瓶,每天观察记录生长情况。20 d 后统计诱导出愈伤组织的外植体数量。愈伤组织的诱导率(%)=产生愈伤组织的外植体数量/接种的外植体数量×100%。

1.2.4 不同生长调节剂组合对丛生芽诱导的影响 将丹参小苗的顶芽茎段接种在 MS 附加 6-BA 1.0 mg/L+

NAA 0.1 mg/L; 6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L; 6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L 的培养基上, 每处理接种 10 个, 3 次重复共 30 个。

1.2.5 不同生长调节剂组合对试管苗生根的影响 将丛生芽切下后, 分别接种在设置 1/2MS+NAA(0.5、0.4、0.3、0.2、0.1、0.0) 的培养基上。每处理的茎段数为 10 个, 每个三角瓶装 1 个, 每处理设 3 次重复, 共 30 瓶。20 d 后调查试验结果。

1.2.6 试管苗的驯化移栽 当试管苗高 4~6 cm, 根长 1 cm 以上时便可进行驯化移栽。移栽前在室温下打开瓶口, 从培养瓶中取出小苗, 洗净苗根上的培养基; 在培养基质中掺入 75% 的百菌清可湿性粉剂 200~500 倍液进行消毒灭菌, 分别移栽到消毒的不同基质中。设置不同基质、光照、温度、湿度、施肥水平处理进行对比试验研究。不同基质对丹参组培苗练苗的影响: 分别用细砂、蛭石、珍珠岩、细砂 1/2+蛭石 1/2、细砂 1/2+珍珠岩 1/2、蛭石 1/2+珍珠岩 1/2, 每处理栽植 50 株。并在畦上搭建小拱棚, 湿度保持 90% 以上, 每天早晨浇 1 次水。初期搭建遮阳网遮阴, 后期逐渐通风见光。随时观察生长状况, 30 d 后统计成活情况, 以筛选丹参驯化培养的最佳基质。不同光照条件对丹参组培苗练苗的影响: 试验设置 2 个处理, 每处理 50 株, 移栽后 5~7 d, 撤除小拱棚后, 分别进行全光照和加遮阳网处理, 随时观察生长状况, 20 d 后统计成活情况。不同温度条件对丹参组培苗练苗的影响: 温度是影响组培苗移栽成活的主要因素之一。试验设置 15~19℃、20~25℃、26~30℃ 3 个处理, 每处理 50 株, 移栽后 5~7 d, 撤除小拱棚后, 分别进行全光照和加遮阳网处理, 随时观察生长状况, 20 d 后统计成活情况。不同湿度条件对丹参组培苗练苗的影响: 试验设置 3 个处理, 即在移栽前对基质浇透水的基础上, 分别 1 d 浇 1 次水、5 d 浇 1 次水、10 d 浇 1 次水。每处理 50 株, 移栽后 5~7 d, 撤除小拱棚后, 分别进行全光照和加遮阳网处理, 随时观察生长状况, 20 d 后统计成活情况。不同施肥水平对丹参组培苗练苗的影响: 丹参小苗的光合能力极低, 基本为异养生活。练苗室中采用的基质只能提供少量的营养元素, 不能自给部分需要人工补充, 故采用 1/2MS 大量元素的水溶液作追肥。试验设 3 个处理, 即在移栽之前对基质浇水时施肥、移栽 7 d 后再施肥、不施肥。随时观察生长状况, 20 d 后统计成活情况。

2 结果与分析

2.1 不同灭菌时间对外植体灭菌效果的影响

由表 1 可知, 供试几种外植体(茎段、叶片、叶柄、花蕾)经 HgCl₂ 处理 5 min, 均不同程度发生污染, 说明杀菌不彻底; 处理 10 min 后无污染, 成活率较高, 为适宜的

处理时间; 处理 15 min, 外植体溃烂或死亡, 说明 HgCl₂ 在杀死植物组织内各种菌类的同时, 对幼嫩组织破坏性很大。不同外植体, 茎段用 0.1% HgCl₂ 溶液灭菌 10 min, 成活率最高, 为 90% 以上; 叶片、叶柄、花蕾等幼嫩组织成活率均较低, 分别为 60% 和 70% 以上。

表 1 不同灭菌时间对外植体灭菌效果的影响

| 外植体 | 灭菌时间/min | 2 周后成活情况 |
|-------|----------|-----------------|
| 茎段 | 5 | 部分发生污染, 成活率 70% |
| | 10 | 成活率 90% 以上 |
| | 15 | 部分溃烂, 成活率 50% |
| 叶片、叶柄 | 5 | 部分污染, 成活率 40% |
| | 10 | 成活率 60% 以上 |
| | 15 | 全部死亡 |
| 花蕾 | 5 | 部分污染, 成活率 60% |
| | 10 | 成活率 70% 以上 |
| | 15 | 全部死亡 |

2.2 丹参芽在不同培养基上的生长情况

由表 2 可知, 丹参小苗顶端芽在 MS+6-BA 0.4 mg/L+NAA 0.2 mg/L 的培养基中诱导的腋芽萌发出的小苗健壮, 茎节明显, 新叶展开生长正常, 叶色翠绿, 并无愈伤组织的形成, 无玻璃化、褐化的产生, 为生长状态较好的无菌苗, 7 d 后即可达到转接要求。将无菌苗的茎切成带节的小段, 接种于分化培养基中可获得大量无菌苗。

表 2 丹参芽在不同培养基上的生长情况

| 培养基 | 芽的生长状态 |
|-------------------------------|--------|
| MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L | 无愈伤组织 |
| MS+6-BA 0.8 mg/L+NAA 0.4 mg/L | 无愈伤组织 |
| MS+6-BA 0.6 mg/L+NAA 0.3 mg/L | 无愈伤组织 |
| MS+6-BA 0.4 mg/L+NAA 0.2 mg/L | 丛生芽多 |
| MS+6-BA 0.2 mg/L+NAA 0.1 mg/L | 丛生芽较少 |
| MS | 无丛生芽 |

2.3 不同生长调节剂组合对愈伤组织形成的影响

由表 3 可知, 丹参愈伤组织的产生受植物生长调节剂配比的影响。茎段接种在 8 种培养基上, 3 d 左右末端开始膨大, 10 d 后整段逐渐形成黄绿色的愈伤组织, 生长旺盛。在 6-BA 和 NAA 的培养基组合上, 愈伤组织产生的量少; 在 2,4-D 与 6-BA 组合的培养基上, 随 2,4-D 浓度的增加, 愈伤组织的产生量有所增加。但叶片几乎只在 2,4-D 与 6-BA 组合的培养基上诱导出了愈伤组织, 首先是在刀口处周围形成愈伤组织, 随后叶脉处易形成愈伤组织, 之后整个外植体形成愈伤组织。总体来说, 2,4-D 诱导丹参愈伤组织的效果好于 NAA。

丹参有节茎段最易诱导形成愈伤组织, 而且诱导出来的愈伤组织较大, 生长迅速, 质地疏松, 颜色浅绿, 这

种愈伤组织有利于迅速分化出芽;由丹参的叶诱导出的愈伤组织,品质低于茎段诱导出来的,并且生长速度较慢,质地较茎段诱导出的要紧实;花药的诱导受技术条件的影响,其生长状况较差,不适宜进行组织培养快繁生产。

表3 不同生长调节剂组合对愈伤组织形成的影响

| 培养基 | 外植体/个 | | | 愈伤组织数/个 | | | 诱导率/% | | |
|---------------------------------|-------|----|----|---------|----|----|-------|-----|-----|
| | 茎 | 叶 | 花药 | 茎 | 叶 | 花药 | 茎 | 叶 | 花药 |
| MS+NAA 0.5 mg/L+6-BA 1.0 mg/L | 10 | 10 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| MS+NAA 1.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L | 10 | 10 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| MS+NAA 1.5 mg/L+6-BA 1.0 mg/L | 10 | 10 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| MS+NAA 2.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L | 10 | 10 | 10 | 7 | 5 | 6 | 70 | 50 | 60 |
| MS+2,4-D 0.5 mg/L+6-BA 1.0 mg/L | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 9 | 100 | 100 | 90 |
| MS+2,4-D 1.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 100 | 100 | 100 |
| MS+2,4-D 1.5 mg/L+6-BA 1.0 mg/L | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 100 | 100 | 100 |
| MS+2,4-D 2.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 100 | 100 | 100 |

2.4 不同生长调节剂组合对丛生芽诱导的影响

由表4可知,15 d后培养基上都可形成大量的芽丛,其中最适培养基为6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L。随着6-BA浓度的升高,玻璃化苗的数量增多,说明了高浓度的6-BA容易诱导玻璃化苗的产生。

将丹参的叶片接种在不加激素的MS培养基上,丹参的叶片不分化出芽,逐渐变黄死亡;在单独附加6-BA或6-BA与NAA配比的培养基上,可以形成大量的丛生芽,并且随着6-BA浓度的升高,芽丛越密集,芽也越小,不适合丹参进行组培快繁。

表4 不同生长调节剂组合对丛生芽诱导的影响

| 培养基 | 丛生芽的生长状态 |
|-------------------------------|------------------|
| MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L | 丛生芽数量适中,生长健壮 |
| MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L | 丛生芽数量较多,生长瘦弱 |
| MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L | 丛生芽数量过多,有玻璃化现象 |
| MS | 没有丛生芽分化,叶片逐渐变黄死亡 |

2.5 不同生长调节剂组合对试管苗生根的影响

由表5可知,1/2MS+NAA 0.4 mg/L生根效果最好。丹参在此生根培养基中培养10 d左右,即有大量须根生出,在2周后,每株丹参都会有1~2条较粗壮的根,且根上有大量侧根,植株生长良好,试管苗驯化成活率最高。

表5 不同生长调节剂组合对试管苗生根的影响

| 培养基 | 生根率/% | 平均生根数/条 | 平均根长/cm |
|--------------------|-------|---------|---------|
| 1/2MS | 67 | 2.6 | 0.47 |
| 1/2MS+NAA 0.1 mg/L | 89 | 3.6 | 0.83 |
| 1/2MS+NAA 0.2 mg/L | 94 | 3.4 | 1.32 |
| 1/2MS+NAA 0.3 mg/L | 94 | 4.5 | 1.47 |
| 1/2MS+NAA 0.4 mg/L | 100 | 4.6 | 0.96 |
| 1/2MS+NAA 0.5 mg/L | 100 | 4.4 | 0.85 |

2.6 不同基质对丹参组培苗练苗的影响

由表6可知,适合于驯化丹参的基质要具备透气性、保湿性和一定的肥力,容易灭菌处理,并不利于杂菌滋生的特点。细砂保水性差,透气性好,不利于丹参成活;珍珠岩保水性差且无营养,易使试管苗缺水、缺营养而死亡;蛭石保水性太强,不透气且无营养,易导致试管苗根部腐烂而死亡;蛭石+珍珠岩的组合既保水又透气,最有利于丹参的生根,成活率可达98%。

表6 不同基质处理对丹参组培苗练苗的影响

| 基质 | 移栽数/个 | 成活数/个 | 成活率/% | 生长状况 |
|--------|-------|-------|-------|------------------|
| 细砂 | 50 | 32 | 64 | 叶片枯萎变黄,部分小苗腐烂 |
| 蛭石 | 50 | 42 | 84 | 大部分小苗能长出新叶和新根 |
| 珍珠岩 | 50 | 30 | 60 | 叶片枯萎,部分小苗有新根,无新叶 |
| 细砂+蛭石 | 50 | 43 | 86 | 叶片枯萎,部分小苗长出新叶和新根 |
| 细砂+珍珠岩 | 50 | 39 | 78 | 叶片枯萎,部分小苗腐烂 |
| 蛭石+珍珠岩 | 50 | 49 | 98 | 小苗长出新叶和新根 |

2.7 不同光照条件对丹参组培苗练苗的影响

由表7可知,移栽早期光照对丹参组培苗有较大的影响。由于培养基中糖的作用,使试管苗的叶片光合作用能力极低,基本为异养生活。移栽前应逐步加强光照,使叶片恢复光合作用能力。但不宜长时间强光强射,以免损伤叶肉组织,致使小苗随着蒸腾失水而萎蔫。遮阳是最适用的调节手段,它既可调节光合作用,又可通过温、湿度的调控,对植株产生间接的作用。遮阳网处理的成活率最高为92%。

表7 不同光照处理对丹参组培苗练苗的影响

| 处理 | 移栽数/个 | 成活数/个 | 成活率/% | 生长状况 |
|-----|-------|-------|-------|----------------|
| 全光照 | 50 | 27 | 54 | 叶片枯萎,叶色发黄 |
| 遮阳网 | 50 | 46 | 92 | 小苗生长正常,长出新叶、新根 |

2.8 不同温度条件对丹参组培苗练苗的影响

表8表明,如果温度太高,则相对湿度下降,植株蒸腾加速,呼吸消耗能量过大,养分积累减少,不仅影响成活率,还造成过渡苗生长细弱,影响成苗的质量;温度太低,则根系和植株生长缓慢,若其它栽培管理措施不到位,将会形成僵苗。故驯化过程中如果温度太高,可以适当通风;如果温度太低可以加草帘子保温。丹参组培苗生长的最适温度为20~25℃。

表8 不同温度处理对丹参组培苗练苗的影响

| 温度/℃ | 移栽数/个 | 成活数/个 | 成活率/% | 生长状况 |
|-------|-------|-------|-------|---------------|
| 15~19 | 50 | 10 | 20 | 叶片干枯,小苗无新叶长出 |
| 20~25 | 50 | 47 | 94 | 小苗长出新叶和新根 |
| 26~30 | 50 | 35 | 70 | 叶片发黄,小苗有新叶和新根 |

2.9 不同湿度条件对丹参组培苗练苗的影响

表9表明,组培苗从基质中吸收水分的能力较差,要随时注意保持基质的水分,以利于组培苗的根系发

育,提高成活率;也可以通过加盖塑料薄膜的方法保水,但也要注意水分过多会影响组培苗的生长甚至引起植株腐烂,特别是在高湿高温条件下,易引发病害的发生。故2次浇水适宜的间隔天数为5 d。

表9 不同湿度处理对丹参组培苗练苗的影响

| 浇水间隔天数/d | 移栽数/个 | 成活数/个 | 成活率/% | 生长状况 |
|----------|-------|-------|-------|-------------|
| 1 | 50 | 23 | 46 | 小苗腐烂 |
| 5 | 50 | 49 | 98 | 小苗长出新叶和新根 |
| 10 | 50 | 35 | 70 | 叶片枯萎,部分小苗干枯 |

2.10 不同施肥水平对丹参组培苗练苗的影响

表10表明,丹参是喜肥药用植物,在其生长期内,适宜施肥水平对丹参成活影响显著。此外,施肥后的丹参生长健壮,叶片浓绿。但移栽前与生长后期对丹参施肥影响不大,因前期小苗生根靠自身积累的养分,所以在移栽7 d后再施肥即可。

表10 不同施肥水平对丹参组培苗练苗的影响

| 处理 | 移栽数 /个 | 成活数 /个 | 成活率 /% | 生长状况 |
|----------|-----------|-----------|-----------|-------------------|
| 移栽前施肥 | 50 | 47 | 94 | 小苗长出新叶和新根,叶色浓绿,健壮 |
| 移栽7 d后施肥 | 50 | 48 | 96 | 小苗长出新叶和新根,健壮 |
| 不施肥 | 50 | 40 | 80 | 小苗长出新叶和新根,瘦弱 |

3 结论

该试验以丹参的茎段、叶片、叶柄、花蕾为外植体,探讨不同灭菌方法对丹参成活率的影响,及不同培养基对愈伤组织形态发生的影响,结果表明带腋芽的茎为最佳外植体;0.1%的升汞灭菌10 min效果最佳;丹参的

叶、茎、花药均可诱导愈伤组织,2,4-D对愈伤组织的诱导效果较好,并且生长速度也快;6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L组合有利于丛生芽的诱导;1/2MS+NAA 0.4 mg/L诱导生根效果好。6-BA可促进丹参的营养生长,但高浓度的6-BA会造成玻璃化苗;通过组织培养,建立了一种快速繁殖体系,可提供大量优质丹参组培苗,同时对丹参的优质、高产、高效生产具有一定的指导意义。

参考文献

- [1] 李建秀,孙秀霞,周凤芹,等. 山东丹参类药用植物新资源[J]. 山东中医药大学学报,1995,19(3):190-191.
- [2] 温春秀,谢晓亮,吴志明,等. 丹参脱病毒及组培快繁技术研究[J]. 中草药,2009(9):1058-1059.
- [3] 王维婷,单成钢,房翠萍,等. 丹参组织培养及再生体系的建立与优化[J]. 现代中药研究与实践,2011,25(4):21-23.
- [4] 谢晓红,李江辉,冯文龙,等. 丹参组培快繁技术研究[J]. 中药材,2004,27(7):474-475.
- [5] 张跃非,雷家容,代其林. 丹参的组织培养及快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2003,39(2):139.
- [6] 梁红,何宇清,赵洁. 生长调节物质对丹参叶片脱分化及根芽分化的效应[J]. 华中师范大学学报(自然科学版),1997,31(3):328.
- [7] 赵洁,陈志胜,万钧. 丹参叶片无性系快速繁殖及植株再生研究[J]. 华中师范大学学报(自然科学版),1999,33(1):108.
- [8] 蔡朝辉,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.
- [9] 朱蔚华,胡秋. 丹参组织培养研究[J]. 中药材,1994,17(4):3.
- [10] 田宇红,王吉之. 丹参组织培养及植株再生研究[J]. 陕西师范大学学报(自然科学版),2003,31(1):99.
- [11] 陶璐璐,袁静明. 丹参愈伤组织细胞固定化及其转化产物的特征[J]. 生物工程学报,1990,6(3):218.

Study on Tissue Culture and Rapid Propagation of *Salvia*

FANG Shi-mei, LEI Shi-jun, WANG Hong-bo, WANG Yu, DING Xue-zhen
(Weifang Vocational College, Weifang, Shandong 261041)

Abstract: Taking the explants of the stem tips, stem fragment, leaf, bud of *Salvia* as materials, the effect of different sterilizer time, different hormone levels on callus formation, buds differentiation, rooting, and plantlets acclimatization of *Salvia* were studied by random permutation test design method. The results showed that stems sterilized with 0.1% HgCl₂ solution for 10 min could reach the highest survival rate of more than 90%; *Salvia* seedlings buds in MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L could get the best effect; on 1/2MS+NAA 0.4 mg/L the plantlets had the best rooting rate of more than 95%; plantlets acclimatization to a combination of vermiculite and perlite both water and breathable was more favorable for *Salvia* rooting, the survival rate could up to 98%.

Key words: *Salvia*; tissue culture; rapid propagation