

甘西鼠尾草愈伤组织诱导、增殖及分化研究

王 萌¹, 张 丽¹, 谢显莉², 张 利^{1*}

1. 四川农业大学生命科学与理学院, 四川 雅安 625014

2. 四川省中江县农业局, 四川 德阳 618100

摘 要: **目的** 考察不同质量浓度激素组合对甘西鼠尾草愈伤组织诱导、增殖及分化的影响。**方法** 以甘西鼠尾草叶片为外植体, 采用正交试验研究 2,4-D、NAA、6-BA、KT 对愈伤组织诱导及增殖的影响, 并探讨适宜愈伤组织分化的培养条件。**结果** 以诱导率和相对生长速率为指标, 6-BA 和 2, 4-D 均对甘西鼠尾草细胞脱分化和细胞增殖具有显著影响, 愈伤组织诱导的最佳激素组合为 2,4-D 0.5 mg/L+NAA 1.0 mg/L+6-BA 0.5 mg/L, 增殖的最佳激素组合为 2,4-D 0.5 mg/L+6-BA 2.0 mg/L+KT 0.1 mg/L, MS+NAA 0.5 mg/L+6-BA 1.0 mg/L 的培养基有利于不定芽的分化, 而 1/2 MS+IBA 1.0 mg/L 的培养基则有利于不定根的分化。**结论** 本实验所建立的组织培养体系, 适宜甘西鼠尾草的植株再生。

关键词: 甘西鼠尾草; 愈伤组织; 正交试验; 激素; 分化

中图分类号: R282.21 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)06-1206-04

Induction, proliferation, and differentiation on callus culture of *Salvia przewalskii*

WANG Meng¹, ZHANG Li¹, XIE Xian-li², ZHANG Li¹

1. College of Biology and Science, Sichuan Agricultural University, Yaan 625014, China

2. Bureau of Agriculture in Zhongjiang County of Sichuan Province, Deyang 618100, China

Abstract: **Objective** To investigate the effects of different concentrations of hormonal combinations on induction, proliferation, and differentiation in *Salvia przewalskii* callus culture. **Methods** Using sterile leaves of *S. przewalskii* as explants, the different concentrations of 2, 4-D, NAA, 6-BA, and KT on induction, proliferation of callus were optimized by orthogonal test. Meanwhile the suitable hormonal combinations for differentiation of callus were studied. **Results** The results showed that taking the inductive rate and the relative growth rate as norms, 6-BA and 2, 4-D had the most significant effects on the growth of cell division in *S. przewalskii*; The best hormonal combination for induction in *S. przewalskii* callus was 2, 4-D 0.5 mg/L + NAA 1.0 mg/L + 6-BA 0.5 mg/L and the best hormonal combination for proliferation in *S. przewalskii* callus was 2, 4-D 0.5 mg/L + 6-BA 2.0 mg/L + KT 0.1 mg/L. The medium of MS + NAA 0.5 mg/L + 6-BA 1.0 mg/L was beneficial to the differentiation of adventitious buds, and 1/2 MS + IBA 1.0 mg/L was helpful for the differentiation of adventitious roots. **Conclusion** The system of organization culture which is established in this study is suitable for the regeneration of *S. przewalskii*.

Key words: *Salvia przewalskii* Maxim.; callus; orthogonal test; hormone; differentiation

甘西鼠尾草 *Salvia przewalskii* Maxim. 为唇形科鼠尾草属多年生草本植物, 主产于甘肃、云南、西藏、四川、青海等地, 又名甘肃丹参、滇丹参、红秦艽、高原丹参等^[1]。甘西鼠尾草为常用中药丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 的同属植物, 因其化学成分与正品丹参相近, 且有效成分原儿茶醛、丹参酮、挥发油等都高于丹参, 受到药学界的广泛重视^[2-3]。甘西鼠尾草作为区域性药材, 药用历史悠久, 在我

国 11 个省区作为正品丹参的替代品流通使用, 并有望发展成为正品主流丹参之一^[4]。近年来随着丹参制剂在国内、国际心血管药物市场占有量的不断提高, 以及新的药用价值不断被发现, 对丹参的需求和开发迅速扩大^[5], 具有与丹参相近化学成分的甘西鼠尾草开发利用不断扩大, 原料需求量逐步增加。由于生存环境的恶化和人类的乱采滥掘, 甘西鼠尾草的生存与繁殖受到严重威胁, 资源面临枯竭。人

收稿日期: 2010-11-26

基金项目: 四川省青年科技基金资助项目 (08ZQ026-034); 四川省科技厅资助项目 (07jy029-023); 四川省科技厅支撑项目 (2008FZ0148); 四川省科技厅产学研创新联盟合作项目 (2010Z00028)

作者简介: 王 萌 (1985—), 四川乐山人, 博士, 主要从事植物资源评价与利用研究。E-mail: wangmeng.728@163.com

工繁殖及栽培成了植物资源延续的关键,而传统无性根条繁殖方法增殖系数低,种苗带病毒的问题比较突出,因此研究其再生组织培养技术势在必行。目前有关甘西鼠尾草组织培养的研究国内外尚未见报道,本试验旨在探讨甘西鼠尾草再生组织培养条件,为该物种种质资源的保存和生产利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

甘西鼠尾草 *Salvia przewalskii* Maxim. 采自四川茂县,由四川农业大学周永红教授鉴定,栽种于四川农业大学生命科学与理学院植物园中。

1.2 方法

1.2.1 无菌材料的获得 从生长健壮、无病虫害的甘西鼠尾草植株上切取鲜嫩叶片,自来水冲洗 30 min,超净工作台上 70%乙醇表面消毒 30 s,无菌水冲洗 3 次,0.1% HgCl₂ 和 3~5 滴聚山梨酯-80 消毒 8 min,无菌水冲洗 5 次,小心将叶片剪切成 0.5 cm² 左右方块,接种到含不同激素配比的 MS 培养基中。各阶段所用培养基的 pH 值均为 5.8,蔗糖为 30 g/L,琼脂为 8.0 g/L。

1.2.2 愈伤组织的诱导及增殖培养 取甘西鼠尾草的无菌叶片接种于含不同激素配比的 MS 培养基上,30 d 后统计诱导愈伤组织的外植体数并计算诱导率。

诱导率 = (诱导愈伤组织的外植体块数/接种的外植体块数)。

筛选质地疏松、生长旺盛的优异愈伤组织进行继代增殖培养,30 d 后测定愈伤组织增殖后的鲜质量,计算愈伤组织相对生长速率。

$$\text{相对生长速率}^{[6]} = t^{-1} \ln \frac{W_1}{W_2}$$

W_1 为接种时愈伤组织鲜质量, W_2 为收获时愈伤组织鲜质量, t 为愈伤组织培养时间

采用 4 因素 4 水平正交设计法 L₁₆(4⁴) 考察植物激素对甘西鼠尾草愈伤组织诱导及增殖的影响因素水平见表 1,在 MS 基本培养基中添加 2,4-D(A)、NAA(B)、6-BA(C)、KT(D) 4 种不同质量浓度的激素。以上每个处理培养 10 瓶,每瓶接种 5~9 块,培养温度为 (25±2)℃,暗培养。

1.2.3 愈伤组织的分化培养 选择色泽黄亮、松散易碎的甘西鼠尾草愈伤组织转接到培养基中进行不定芽的分化培养,培养基为:MS+NAA 0.5 mg/L+6-BA 1.0 mg/L。当不定芽长到 3 cm 时,切取生长

表 1 愈伤组织诱导及增殖的因素水平表

Table 1 Factors and levels for induction and proliferation of callus

水平	因 素			
	A/(mg·L ⁻¹)	B/(mg·L ⁻¹)	C/(mg·L ⁻¹)	D/(mg·L ⁻¹)
1	0	0	0	0
2	0.5	0.5	0.5	0.1
3	1.0	1.0	1.0	0.3
4	2.0	2.0	2.0	0.5

健壮的植株转到生根培养基上,培养基为:1/2 MS+IBA 1.0 mg/L。以上每个处理培养 10 瓶,每瓶接种 3~4 块,培养条件为白天温度 (25±2)℃,夜间 (18±2)℃,光照时间 16 h/d,光照强度 3 000 lx。

2 结果与分析

2.1 不同激素对甘西鼠尾草愈伤组织的诱导与增殖效应

根据正交试验设计,以愈伤组织的诱导率和相对生长速率为指标,记录数据并对其进行极差分析,结果见表 2。表明无菌叶片接种于不同质量浓度激素的培养基中均能诱导产生愈伤组织(图 1),诱导率有所差异;在不同培养基中愈伤组织均能生长增殖,相对生长速率也有差异。

正交试验表明各种激素组合对甘西鼠尾草愈伤组织诱导和相对生长速率的影响差别较大。对实验结果直观分析,表明以诱导率为指标,4 种植物激素对甘西鼠尾草叶脱分化影响力大小依次是 6-BA>2, 4-D>NAA>KT,较好的组合为 6-BA 0.5 mg/L+2, 4-D 0.5 mg/L+NAA 1.0 mg/L+KT 0.1 mg/L。在继代增殖培养中,以相对生长速率为指标,4 种植物激素对甘西鼠尾草叶细胞生长分裂的影响依次为 2, 4-D>6-BA>KT>NAA,较好的组合为 2, 4-D 0.5 mg/L+6-BA 2.0 mg/L+KT 0.1 mg/L+NAA 0.5 mg/L。

为进一步反映各因素之间的差异,寻求最佳质量浓度的激素组合,对试验结果进行方差分析。由表 3 和表 4 方差分析结果可知,因素 2, 4-D(A) 和 6-BA(C) 对甘西鼠尾草愈伤组织诱导极显著 ($P<0.01$), NAA(B) 影响较显著 ($P<0.05$), KT(D) 因素影响不显著。而 2, 4-D(A) 和 6-BA(C) 两种因素对甘西鼠尾草愈伤组织相对生长速率有极显著的影响 ($P<0.01$), KT(D) 因素影响作用显著, NAA(B) 因素影响不显著。根据极差分析和方差分析的结果,以甘西鼠尾草愈伤组织诱导率为指标,得到最佳激

表 2 植物激素对愈伤组织诱导及其增殖影响的正交试验设计及结果

Table 2 Effect of phytohormones on callus induction and its proliferation of *S. przewalskii* in orthogonal design

编号	A	B	C	D	诱导率/%	相对生长速率
1	1	1	1	1	0	0
2	1	2	2	2	76.2	0.0584
3	1	3	3	3	64.7	0.0652
4	1	4	4	4	70.8	0.0684
5	2	1	2	3	91.2	0.0621
6	2	2	1	4	25.0	0.0611
7	2	3	4	1	93.3	0.0732
8	2	4	3	2	81.8	0.0722
9	3	1	3	4	25.0	0.0609
10	3	2	4	3	25.0	0.0656
11	3	3	1	2	38.5	0.0474
12	3	4	2	1	30.0	0.0453
13	4	1	4	2	25.0	0.0460
14	4	2	3	1	70.8	0.0360
15	4	3	2	4	76.2	0.0273
16	4	4	1	3	12.5	0.0277
K_1	211.7	141.2	76.00	194		
K_2	291.8	197.0	273.6	222		
K_3	118.5	271.7	242.3	193		
K_4	184.5	195.1	214.1	197		
R	173.3	130.5	197.6	28.1		
K_1	0.192	0.169	0.136	0.150		
K_2	0.269	0.221	0.202	0.224		
K_3	0.219	0.213	0.234	0.220		
K_4	0.137	0.214	0.253	0.217		
R	0.132	0.052	0.117	0.070		

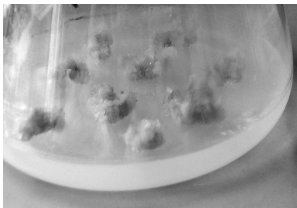


图 1 甘西鼠尾草愈伤组织
Fig. 1 Callus of *S. przewalskii*

素组合为 $A_2B_3C_2$; 以甘西鼠尾草愈伤组织相对生长速率为指标, 得到最佳的激素组合为 $A_2C_4D_2$ 。

2.2 甘西鼠尾草愈伤组织的分化

甘西鼠尾草外植体诱导出愈伤组织, 经过 1 次继代培养后, 转入分化培养基上, 30 d 后统计结果表明甘西鼠尾草愈伤组织在此培养基上能够分化成

表 3 方差分析 (诱导率)

Table 3 Analysis of variance (inducing rate)

方差来源	自由度	平方和	均方和	F 值	显著性
A	3	3 836.52	1 278.84	7.246 6	极显著
B	3	2 191.69	730.563	4.139 8	显著
C	3	5 693.02	1 897.67	10.753 2	极显著
D	3	135.155	45.051 7	0.255 3	
E	12	2 117.7	176.475		

$F_{0.05}(3, 16)=3.24$ $F_{0.01}(3, 16)=5.29$

芽, 分化率为 85% (图 2)。当分化出的不定芽长到 3~4 cm 时, 转至生根培养基中, 所有植株都能正常生长, 每株可长出 3~5 条不定根, 根长可达 4 cm, 生根率可达 90%。

表 4 方差分析 (相对生长速率)

Table 4 Analysis of variance (relative growth rate)

方差来源	自由度	平方和 ($\times 10^{-4}$)	均方和 ($\times 10^{-4}$)	F 值	显著性
A	3	22.592 6	7.530 9	13.1429	极显著
B	3	4.230 6	1.410 2	2.4611	
C	3	18.405 8	6.135 2	10.7073	极显著
D	3	8.283 4	2.761 1	4.8187	显著
E	12	6.876 0	0.573 0		

* $F_{0.05}(3, 16)=3.24$ ** $F_{0.01}(3, 16)=5.29$

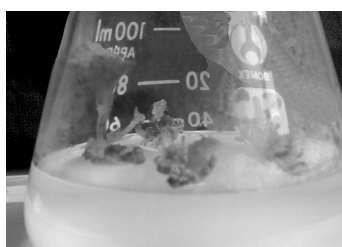


图 2 愈伤组织分化不定芽

Fig. 2 Adventitious buds from differentiation of callus

3 讨论

3.1 愈伤组织的诱导与增殖

在植物组织培养中, 植物细胞进行脱分化 (愈伤组织诱导) 受到包括生理、形态、生化等多因素的影响, 其中营养成分和植物激素是关键的限制因素^[7-8]。植物激素中细胞分裂素的主要作用是促进细胞分裂, 诱导愈伤组织^[9]。正交试验直观分析结果显示 4 种植物激素对甘西鼠尾草叶脱分化影响力大小依次是 6-BA>2,4-D>NAA>KT, 方差分析结果也表明细胞分裂素 6-BA 对甘西鼠尾草愈伤组织的诱导具有显著影响。另一方面, 外植体脱分化后, 长时间的植物激素刺激将进一步导致愈伤组织增殖或扩大^[10]。在愈伤组织的继代培养过程中, 需要附加外源生长素 2,4-D 来维持愈伤组织的增殖和生长, 2,4-D 进入愈伤组织的细胞后, 诱发一系列生理效应, 进而维持细胞在继代培养过程中正常的生理活动^[11]。正交试验直观分析结果显示 4 种植物激素对甘西鼠尾草叶细胞生长分裂的影响依次为 2,4-D>6-BA>KT>NAA, 方差分析结果也表明 2,4-D 对甘西鼠尾草愈伤组织的细胞生长分裂具有显著影响。

3.2 愈伤组织的分化

在植物组织培养过程中, 愈伤组织分化成根或芽是由细胞分裂素与生长素的比值决定的, 比值高时促进芽的形成, 反之则促进根的形成^[12]。本研究

设计不同的外源激素配比以促使甘西鼠尾草愈伤组织分化成不定芽或不定根, 试验结果表明在细胞分裂素与生长素的比值较高时通过继代培养愈伤组织可分化出不定芽, 而在该比值较低的培养条件下则分化出不定根, 且分化率较高, 得到的再生植株长势也较好, 表明所加的激素种类及相应质量浓度是较适合甘西鼠尾草愈伤组织进行分化的。

4 结论

愈伤组织诱导与增殖培养中植物激素的合理配比是细胞脱分化与生长的主要因素, 选择 2, 4-D 0.5 mg/L+NAA 1.0 mg/L+6-BA 0.5 mg/L 为甘西鼠尾草愈伤组织诱导的最佳激素组合, 选择 2, 4-D 0.5 mg/L+6-BA 2.0 mg/L+KT 0.1 mg/L 为甘西鼠尾草愈伤组织增殖的最佳激素组合。将诱导的愈伤组织转入 MS+NAA 0.5 mg/L+6-BA 1.0 mg/L 的培养基中能分化出不定芽, 而 1/2 MS+IBA 1.0 mg/L 的培养基能够分化出大量的不定根。本研究建立的甘西鼠尾草再生组织培养体系, 繁殖率高, 为甘西鼠尾草的繁育提供了新的途径。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1977.
- [2] 张凤琴, 吕培霖, 兰云. 甘西鼠尾的研究进展 [J]. 中国现代中药, 2008, 10(6): 13-14.
- [3] 赵文军, 吴雪萍, 高林, 等. 鼠尾草挥发油提取及成分分析 [J]. 中草药, 2007, 38(1): 28-30.
- [4] 藤艳芳, 王峥涛, 余国奠. 丹参的药用资源研究进展 [J]. 中国野生植物资源, 2003, 20(2): 1-3.
- [5] 冯玲玲, 范美兰, 周吉源. 丹参愈伤组织的诱导及增殖效应 [J]. 生物学杂志, 2004, 21(5): 25-27.
- [6] 刘颖, 魏景芳, 李冬杰. 甘草愈伤组织培养中激素优化组合的研究 [J]. 中草药, 2006, 37(6): 931-933.
- [7] 王友生, 王瑛, 李阳春. 三叶草愈伤组织诱导及分化的研究 [J]. 草业学报, 2009, 18(2): 212-215.
- [8] 张芳芳, 王鹏, 姬丹丹, 等. 南方红豆杉愈伤组织培养条件的优化及紫杉醇积累的基因表达效应分析 [J]. 中草药, 2010, 41(12): 2058-2062.
- [9] 邓秀新, 胡春根. 园艺植物生物技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2005.
- [10] Bingham E T, Hurley L V, Kaatz D M. Breeding alfalfa which regenerates from callus tissue in culture [J]. Crop Sci, 1975, 15(5): 719-721.
- [11] 舒庆艳, 徐凤侠, 金治平, 等. mRNA 差异显示技术分离羊草基因体外培养过程中特定基因及特性分析 [J]. 草业学报, 2007, 16(5): 113-120.
- [12] 李合生. 现代植物生理学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2002.