

- species grown under field conditions [J]. *Plant Cell Environ*, 1992, 15:25-35.
- [8] Lal A M, Ku S B, Edwards G E. Analysis of inhibition of photosynthesis due to water stress in the C_3 species *Hordeum vulgare* and *Vicia faba*: electron transport, CO_2 fixation and carboxylation capacity [J]. *Photosynth Res*, 1996, 49: 57-69.
- [9] 张岁岐, 山 仑. 植物水分利用效率及其研究进展 [J]. 干旱地区农业研究, 2002, 20(4):1-4.
- [10] 赵丽英, 邓西平, 山 仑. 不同水分处理下冬小麦旗叶叶绿素荧光参数的变化研究 [J]. 中国生态农业学报, 2007, 15:63-66.

裕丹参愈伤组织诱导、继代及植株再生的研究

李明军, 刘 杰, 周 娜, 张晓丽, 孙琳静, 涂荣涛

(河南师范大学生命科学学院, 河南 新乡 453007)

摘要:目的 建立裕丹参愈伤组织的诱导、继代及植株再生体系。方法 比较不同的外植体基本培养基及植物生长调节剂对裕丹参愈伤组织的诱导、继代及植株再生的影响。结果 $MS+6-BA\ 2\ mg/L+NAA\ 0.2\sim2\ mg/L$ 有利于叶柄和叶片愈伤组织的诱导, 其出愈率均为 100%, 但叶柄出愈量更大; $MS+6-BA\ 2\ mg/L$ 有利于叶片芽的分化, 其分化率达 55.6%, 并有直接成芽现象; $B_5+6-BA\ 1\ mg/L+2,4-D\ 1\ mg/L$ 是愈伤组织继代培养的最佳培养基。结论 愈伤组织诱导的最佳外植体为叶柄, 最佳培养基为 $MS+6-BA\ 2\ mg/L+NAA\ 0.2\sim2\ mg/L$; 诱导芽分化的最佳外植体为叶片, 最佳培养基为 $MS+6-BA\ 2\ mg/L$; 愈伤组织继代培养的最佳培养基为 $B_5+6-BA\ 1\ mg/L+2,4-D\ 1\ mg/L$ 。

关键词:裕丹参; 愈伤组织; 芽分化; 植物生长调节剂

中图分类号:R282.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2008)07-1078-04

Inducement, subculture, and plantlets regeneration of callus from *Salvia miltiorrhiza*

LI Ming-jun, LIU Jie, ZHOU Na, ZHANG Xiao-li, SUN Lin-jing, TU Rong-tao

(1. College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: **Objective** To establish the system of inducement, subculture, and plantlets regeneration of callus from *Salvia miltiorrhiza*. **Methods** Compared with the effect of different explants, basic media, and plant growth regulator on the inducement, subculture of callus, and the differentiation of buds. **Results** $MS+6-BA\ 2\ mg/L+NAA\ 0.2\sim2\ mg/L$ was propitious to the inducement of callus and the ratio of induced callus, for both the leafstalk and lamina, was 100%, but quantity of induced callus was more of The ratio of buds differentiation was 55.6% on the medium of $MS+6-BA\ 2\ mg/L$, and it could grown into buds directly. $B_5+6-BA\ 1\ mg/L+2,4-D\ 1\ mg/L$ was the better subculture medium of callus. **Conclusion** So for the callus inducement, the better explant and medium are leafstalk and $MS+6-BA\ 2\ mg/L+NAA\ 0.2\sim2\ mg/L$, respectively; For the buds differentiation, the better explant and medium are lamina and $MS+6-BA\ 2\ mg/L$, respectively; For the subculture of callus, $B_5+6-BA\ 1\ mg/L+2,4-D\ 1\ mg/L$ is better.

Key words: *Salvia miltiorrhiza* Bunge; callus; buds differentiation; plant growth regulator

裕丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 属唇形科多年生草本植物, 产于河南省方城县, 是我国传统的道地中药材。具有祛瘀止痛、活血通经、清心除烦等功效^[1], 在抗癌、抗衰老等方面具有良好的效果^[2], 经中国医学科学院、国家参茸产品质量检测中心等单位检测, 丹参酮 A_1 的量为《中国药典》规定标准的 3.25 倍, 居全国众多产地生产的丹参之首。近年来,

对裕丹参优良品种的脱毒快繁、脱分化和高频率植株再生等进行了系统的研究, 为其产量和质量的提高、新品种的选育和工厂化生产次生代谢物奠定了基础。本实验报告其中的部分内容。

1 材料与方法

1.1 材料: 裕丹参, 采自方城县丹参野生品种抚育基地, 由裕丹参科研所所长曹金斌鉴定。

收稿日期: 2007-10-27

基金项目: 河南省重点科技攻关项目(0623030700)

作者简介: 李明军(1962—), 男, 河南温县人, 教授, 博士, 硕士生导师, 长期从事植物生理学及药用植物生物技术的教学和研究工作。

Tel: (0373)3328189 E-mail: limingjun2002@263.net

1.2 方法

1.2.1 无菌体系的建立:参照相关文献将材料表面消毒^[3]后接入MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.02 mg/L中,30 d时获得无菌试管苗。

1.2.2 愈伤组织的诱导及芽分化:将叶片切成1 cm×1 cm,叶柄切成1 cm分别接种在表1的培养基中。每瓶接种叶7小片,叶柄7小段,叶片接种方式为背接(背面向上),叶柄接种方式为横接,每种培养基接种6瓶。30 d时统计叶片和叶柄的出愈率和芽分化率。

1.2.3 植物生长调节剂组合对愈伤组织继代培养的影响:将愈伤组织分别接种于(1)MS+6-BA 1 mg/L+NAA 1 mg/L,(2)MS+6-BA 1 mg/L+2,4-D 1 mg/L,(3)MS+6-BA 0.5 mg/L+2,4-D 2 mg/L上,每种培养基接7瓶,每瓶1.5 g(平均分为3份均匀地接于瓶中),30 d时称其鲜质量。

1.2.4 基本培养基对愈伤组织继代培养的影响:将愈伤组织接种于以MS、B₅、N₆、LS为基本培养基并附加1.2.3项筛选出的植物生长调节剂组合的培养基中,接种瓶数和方法同1.2.3项,25 d时称其鲜质量和干质量。

所用培养基均加入冷凝脂6 g/L、蔗糖30 g/L,pH调至5.8~6.0,在121 ℃,1.1 kg/cm²压力下灭菌20 min。培养条件均为:温度(25±2) ℃,光照14 h/d,光强2 000 lx。

1.2.5 试验数据处理:数据应用SPSS统计软件进行方差分析。采用LSD法进行多重比较检验,在P=0.01水平上差异达到显著。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的诱导及芽分化

2.1.1 不同外植体对裕丹参愈伤组织诱导的影响:1号培养基中,叶片和叶柄均在接种5 d后陆续褐化枯死;其他培养基中,叶柄在接种3~5 d时开始启动脱分化,两端膨大,颜色变白,6~9 d时膨大部位开始出现愈伤组织,呈浅黄绿色(2和3号培养基)或淡黄色(4号培养基),疏松且生长旺盛;叶片在接种5~7 d时开始启动脱分化,其边缘膨大、卷曲,9 d时边缘膨大处开始出现愈伤组织,呈黄绿色(2和3号培养基)或灰黄色(4号培养基),透明且增殖较慢。30 d时,不同外植体对裕丹参愈伤组织诱导的影响见表1。可知2号培养基上叶柄的出愈率高于叶片,但出愈率较低,3、4号培养基上叶片和叶柄的出愈率均为100%;从出愈量上看,叶柄(图1-3)明显好于叶片(图1-2)。

表1 不同外植体对裕丹参愈伤组织诱导及芽分化的影响

Table 1 Effect of different explants on callus induction and buds differentiation of *S. miltiorrhiza*

培养基编号	出愈率/%		出愈量		芽分化率/%	
	叶柄	叶片	叶柄	叶片	叶柄	叶片
1	0	0	—	—	0	0
2	55.6	16.7	++	+	4.8	55.6
3	100	100	+++	++	11.1	33.3
4	100	100	+++	++	0	0

1-MS 2-MS+6-BA 2 mg/L 3-MS+6-BA 2 mg/L+NAA 0.2 mg/L 4-MS+6-BA 2 mg/L+NAA 2 mg/L “—、+、++、+++”分别表示愈伤组织没有、少、多和最多

1-MS 2-MS+6-BA 2 mg/L 3-MS+6-BA 2 mg/L+NAA 0.2 mg/L 4-MS+6-BA 2 mg/L+NAA 2 mg/L “—、+、++、+++” mean callus are none, little, more, and most, respectively

2.1.2 不同外植体对裕丹参芽分化的影响:2号和3号培养基中,叶柄形成的愈伤组织在15~20 d时开始出现绿色芽点,25~28 d时芽点分化成芽,为丛生芽(图1-5),间接成芽;叶片在接种13~15 d时边缘处或愈伤组织上出现绿色芽点,20 d时芽点分化成芽,多数是从叶片边缘直接成芽,为单生芽(图1-6),少数是经愈伤组织再分化成芽,为丛生芽。30 d时,不同外植体对裕丹参芽分化的影响见表1。由表1可知,2、3号培养基上均有芽分化现象,且叶片的芽分化率高于叶柄,其中以2号培养基芽的分化率最高。

2.2 愈伤组织的继代培养

2.2.1 植物生长调节剂组合对愈伤组织继代培养的影响:3种不同培养基对裕丹参愈伤组织的增殖达到了极显著影响。愈伤组织在MS+6-BA 1 mg/L+NAA 1 mg/L上生长缓慢(30 d时增殖1.2倍),呈灰褐色,且易褐化死亡;在MS+6-BA 1 mg/L+2,4-D 1 mg/L和MS+6-BA 0.5 mg/L+2,4-D 2 mg/L上生长旺盛(前者30 d时增殖2.6倍,图1-4;后者30 d时增殖1.9倍),呈淡黄色且无分化。

2.2.2 基本培养基对愈伤组织继代培养的影响:由表2可知,B₅培养基在鲜质量、干质量和增殖倍数方面均与N₆培养基、LS培养基达到极显著差异,MS培养基在鲜质量和增殖倍数方面与N₆培养基、LS培养基达到极显著差异,而B₅和MS培养基对愈伤组织的生长没有显著差异。另外,愈伤组织在B₅培养基上从第10天起开始变为红褐色,可能是其中丹参酮的量较高所致。

3 讨论

3.1 外植体对愈伤组织诱导及芽分化的影响:不同植物以及同一植物的不同器官对诱导条件的反应是

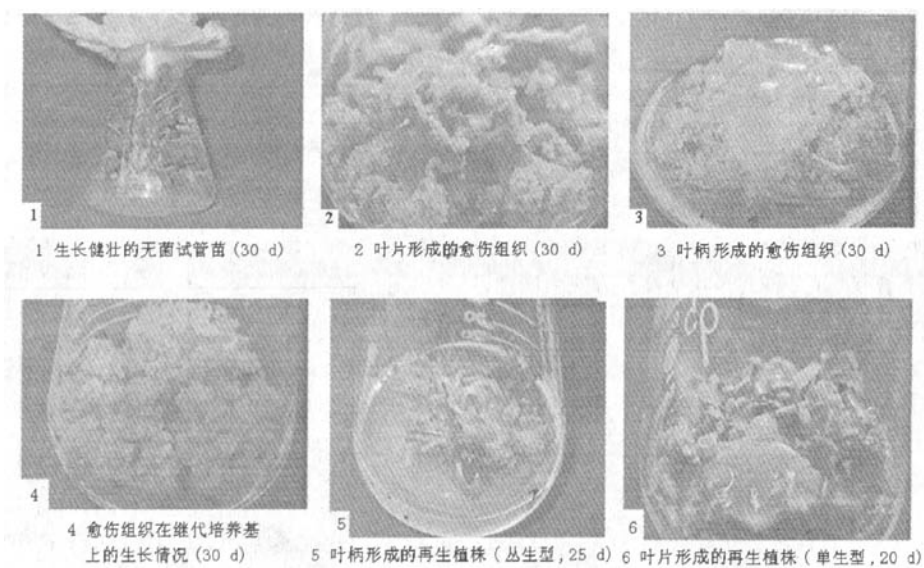


图 1 裕丹参愈伤组织的诱导、继代及植株再生

Fig. 1 Inducement, subculture, and plantlets regeneration of callus from *S. miltiorrhiza*

表 2 基本培养基对愈伤组织继代培养的影响 (25 d)

Table 2 Effect of basic media on subculture of callus (25 d)

基本培养基	鲜质量/g	干质量/g	愈伤组织增殖倍数	愈伤组织生长状况
MS	2.478±0.490 8 A	0.124±0.022 2 AB	4.96 A	浅黄绿色、生长旺盛
B ₅	2.601±0.493 9 A	0.151±0.017 7 A	5.20 A	红褐色、生长旺盛
N ₆	1.324±0.285 2 B	0.070±0.012 7 B	2.65 B	黄绿色、有褐化现象
LS	1.368±0.359 3 B	0.074±0.013 4 B	2.74 B	灰绿色、较旺盛

培养基中均添加 6-BA 1 mg/L+2,4-D 1mg/L;大写字母表示 $P=0.01$ 水平差异达显著

There are 6-BA 1 mg/L+2,4-D 1 mg/L in all media; Capital letters represent significant differences, $P=0.01$

不同的。在诱导丹参愈伤组织和植株再生的研究中,多数选用叶片为外植体^[4,5],也有用叶柄、茎段、根与叶片相比较的,但均无明显差异^[6,7]。本实验发现裕丹参叶片和叶柄均能诱导形成愈伤组织,但愈伤组织的出现时间、方式、形态、数量、出愈率及芽分化等方面均表现出很大的差异,诱导愈伤组织以叶柄为佳,诱导芽的分化以叶片为佳。

3.2 植物生长调节剂对裕丹参愈伤组织诱导及芽分化的影响:植物生长调节剂是诱导愈伤组织形成的重要因素。冯玲玲等^[7]发现,单独使用 5 种植物生长调节物质在一定质量浓度范围均可诱导丹参产生愈伤组织,但最佳组合的诱导培养基为 MS+2,4-D 0.5 mg/L+6-BA 1.0 mg/L;客绍英等^[3]研究表明,丹参茎段在 MS+2,4-D 5.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L+6-BA 1.0 mg/L 上易形成愈伤组织。本实验发现,裕丹参叶柄和叶片的脱分化需要植物生长调节剂,且 6-BA 与 NAA 配合使用的效果明显优于单独添加 6-BA,当 6-BA 质量浓度一定时,出愈量随 NAA(0~2 mg/L)的升高而增多;诱导愈伤组织再

分化的最佳外植体为叶片,最佳培养基为 MS+6-BA 2 mg/L,且可直接分化成芽,NAA 对叶片的芽分化具有一定抑制作用。

3.3 基本培养基对愈伤组织继代培养的影响:MS 培养基中的硝酸盐、钾和铵的量高,LS 培养基由 MS 演变而来;B₅ 培养基的主要特点是含有较低的铵和较高的烟酸;N₆ 培养基钾盐的量较高。Gamborg^[8]在研究中发现烟酸能够刺激愈伤组织的生长。铵可能对不少培养物的生长有抑制作用。本实验表明,裕丹参愈伤组织继代培养的最佳基本培养基为 B₅。因此,推测 B₅ 能够促进愈伤组织的增殖,可能与其含有较低浓度的铵和较高浓度的烟酸有关。

参考文献:

[1] 中国药典[S]. Vol. I. 2005.
[2] 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.
[3] 客绍英,石洪凌,马作东. 利用正交试验优化丹参愈伤组织培养[J]. 中药材, 2005, 28(2): 82-83.
[4] 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):

- 108-111.
- [5] 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): 228-231.
- [6] 强小利,何亚平,王喆之. 植物生长因子对丹参愈伤组织有效成分积累的影响[J]. 陕西师范大学学报:自然科学版, 2004, 32: 115-118.
- [7] 冯玲玲,范美华,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.
- [8] Gamborg O L, Murashige T, Thorpe T A. Plant tissue culture media [J]. *In Vitro Cell Develop Biol-Plant*, 1976, 12 (10): 473.

川贝母种子休眠及萌发特性的研究

于婧¹, 魏建和^{1*}, 陈士林¹, 代勇², 杨成民¹

(1. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193; 2. 成都恩威集团有限公司, 四川 成都 610041)

摘要:目的 了解川贝母种子休眠原因及层积处理打破种子休眠的作用。方法 浸种称重法测定种皮透水性; 生物鉴定法检测发芽抑制物; 解剖种子观察层积种子种胚发育; 光照培养箱发芽检测层积种子萌发温度。结果 浸种 8 h 后川贝母种子吸水率达 80% 以上; 种子浸提液显著抑制白菜种子的萌发和生长; 层积处理促进种胚后熟, 60 d 后胚率由处理前 12% 增至 43%; 层积种子 25 ℃ 发芽率显著高于其他发芽温度。结论 川贝母种皮无吸水障碍; 种子休眠的主要原因是胚形态后熟及存在发芽抑制物, 属于混合休眠类型; 层积处理可有效打破休眠, 25 ℃ 发芽适温。

关键词: 川贝母; 种子休眠; 胚后熟; 发芽抑制物

中图分类号: R282.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)07-1081-04

Dormancy and germination characteristics of *Fritillaria cirrhosa* seed

YU Jing¹, WEI Jian-he¹, CHEN Shi-lin¹, DAI Yong², YANG Cheng-min¹

(1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100094, China; 2. Chengdu Enwei Group Limited Company, Chengdu 610041, China)

Abstract: **Objective** To investigate the mechanism of the seed dormancy of *Fritillaria cirrhosa* and the stratification effect on seed dormancy. **Methods** The soaked seeds were used to test water permeability by weighting. The biological test was applied for detecting the germination inhibitor. Seed dissection was used to investigate the embryo development after stratification. The temperatures of seeds germination after stratification were determined by artificial climate chamber at different temperatures. **Results** The water absorption rate of *F. cirrhosa* seeds was more than 80% after soaking for 8 h. The extracts significantly inhibited both the germination of seed and the root growth of Chinese cabbage. The stratification could effectively accelerate the embryo afterripening and increase the embryo rate from 12% to 43% after 60 d. Germination rate of the seed after stratification in 25 ℃ was significantly higher than that in other temperatures. **Conclusion** There is no obstacle of water permeability on testa of *F. cirrhosa*. The seed embryo afterripening and the germination inhibitor are the main mechanism of seed dormancy of *F. cirrhosa*, whereas it is a type of mix-dormancy. The stratification is effective for seed dormancy relief and the optimum germination temperature is 25 ℃.

Key words: *Fritillaria cirrhosa* D. Don; seed dormancy; embryo afterripening; germination inhibitor

川贝母 *Fritillaria cirrhosa* D. Don 属百合科多年生草本植物, 分布于云南、四川、甘肃和西藏等海拔 3 500 m 以上的高原地区。鳞茎药用, 有清热润肺、止咳化痰的功效, 是一味常用大宗名贵药材。野

生资源已趋于濒危, 目前正在开展大规模野生抚育工作^[1]。生产上曾采用鳞茎繁殖, 但繁殖系数太低; 用种子繁殖, 繁殖系数高, 但种子地处高原, 不易采集, 休眠期长, 出苗率低, 整齐度不理想。已有研究指

收稿日期: 2007-11-07

基金项目: 国家高技术产业化专项(2005-1); 北京市科技新星计划项目(2004A60); 国家中医药管理局科技专项(2004ZX06-2); 国家中药材生产扶持资金项目(2005-1)

作者简介: 于婧(1981—), 女, 农学学士, 2005年毕业于北京农学院, 主要从事药用植物繁殖生物学、细胞生物学及育种研究。

Tel: (010)62895272 E-mail: yujing@implad.ac.cn

* 通讯作者 魏建和 Tel: (010)62818841 E-mail: wjianh@263.net

裕丹参愈伤组织诱导、继代及植株再生的研究

作者：[李明军](#), [刘杰](#), [周娜](#), [张晓丽](#), [孙琳静](#), [涂荣涛](#), [LI Ming-jun](#), [LIU Jie](#), [ZHOU Na](#), [ZHANG Xiao-li](#), [SUN Lin-jing](#), [TU Rong-tao](#)
作者单位：[河南师范大学生命科学学院, 河南新乡, 453007](#)
刊名：[中草药](#) **ISTIC** **PKU**
英文刊名：[CHINESE TRADITIONAL AND HERBAL DRUGS](#)
年, 卷(期): 2008, 39(7)

参考文献(8条)

1. [中华人民共和国药典\(一部\)](#) 2005
2. [Liu J;Shen H M;Namong C](#) [Salvia miltiorrhiza inhibits cell growth and induces apoptosis in human hepatoma HepG2 cells](#)[外文期刊] 2000
3. [客绍英;石洪凌;马作东](#) [利用正交试验优化丹参愈伤组织培养](#)[期刊论文]-[中药材](#) 2005(02)
4. [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](#) 1999(01)
5. [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](#) 1997(03)
6. [强小利;闫亚平;王喆之](#) [植物生长因子对丹参愈伤组织有效成分积累的影响](#) 2004
7. [冯玲玲;范美华;周吉源](#) [丹参愈伤组织的诱导及增殖效应](#)[期刊论文]-[生物学杂志](#) 2004(05)
8. [Gamburg O L;Murashige T;Thorpe T A](#) [Plant tissue culture media](#) 1976(10)

本文读者也读过(10条)

1. [信金娜. 韩烈保. 刘君. 罗莉. 李雪](#) [草地早熟禾愈伤组织诱导及植株再生](#)[期刊论文]-[中国草地](#)2004, 26(4)
2. [周忠泽. 曹薇. 许仁鑫. 李玉成](#) [葶苈子植物愈伤组织诱导及植株再生的研究](#)[期刊论文]-[安徽大学学报\(自然科学版\)](#)2001, 25(4)
3. [邱奉同. QIU Feng-Tong](#) [何首乌愈伤组织诱导和植株再生](#)[期刊论文]-[植物生理学通讯](#)2000, 36(4)
4. [马艳红. 于卓. 李小雷. 李造哲. MA Yan-hong. YU Zhuo. LI Xiao-lei. LI Zao-zhe](#) [加拿大披碱草与2种国产披碱草杂种F1愈伤组织诱导及植株再生研究](#)[期刊论文]-[西北植物学报](#)2006, 26(9)
5. [李德祥. 陈超. 王治伟. 吴印爱](#) [丹参对梗阻性左半结肠癌一期切除术后患者自由基水平的影响](#)[期刊论文]-[中国普通外科杂志](#)2008, 17(4)
6. [顾健. 韩乔燕. 薛永骥. 刘灵峰. 刘丹. Gu Jian. Han Qiaoyan. Xue Yongji. Liu Lingfeng. Liu Dan](#) [丹参影响CIA大鼠血清MMP-9水平与易栓关系](#)[期刊论文]-[医学研究杂志](#)2008, 37(10)
7. [翟彩霞. 温春秀. 王凯辉. 张彦才. 王丽英. 李巧云. 陈丽莉. ZHAI Cai-xia. WEN Chun-xiu. WANG Kai-hui. ZHANG Yan-cai. WANG Li-ying. LI Qiao-yun. CHEN Li-li](#) [氮、磷、钾肥对丹参根系生长及养分含量的影响](#)[期刊论文]-[华北农学报](#)2008, 23(z1)
8. [冯玲玲. 范美华. 周吉源](#) [丹参愈伤组织的诱导及增殖效应](#)[期刊论文]-[生物学杂志](#)2004, 21(5)
9. [姚振. 季静. 王萍. 王罡. YAO Zhen. JI Jing. WANG Ping. WANG Gang](#) [安祖花愈伤组织诱导和植株再生的研究](#)[期刊论文]-[吉林农业大学学报](#)2006, 28(1)
10. [李师翁. 范小峰. 卢东平](#) [大果良种沙棘愈伤组织诱导及植株再生的研究](#)[期刊论文]-[西北植物学报](#)2001, 21(2)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zcy200807042.aspx