

防风愈伤组织诱导及植株再生体系的建立

付航, 黄涵签, 王妍, 慧芳, 杨世海*

吉林农业大学中药材学院, 吉林 长春 130118

摘要:目的 建立防风 *Saposhnikovia divaricate* 再生体系。方法 研究不同外植体、温度、培养基、光照条件对诱导防风愈伤组织的影响, 采用响应面设计, 优化愈伤组织诱导及增殖的激素配比。结果 以防风的叶片为外植体, 诱导愈伤组织最适培养基为 MS+6-BA 0.90 mg/L+2,4-D 1.05 mg/L+KT 0.96 mg/L, 25 ℃ 恒温 12 h/d 光照培养; 最适增殖培养基为 MS+6-BA 0.56 mg/L+2,4-D 0.48 mg/L+KT 0.40 mg/L, 继代周期为 35 d; 诱导丛生芽最适培养基为 MS+NAA 0.6 mg/L+6-BA 1.0 mg/L; 最适生根培养基为 MS+NAA 0.4 mg/L+6-BA 0.1 mg/L。结论 成功诱导防风愈伤组织并建立稳定高效的植株再生体系。

关键词: 防风; 组织培养; 愈伤组织; 响应面设计; 植株再生

中图分类号: R282.21 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)13-3127-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.13.026

Callus induction and establishment of plant regeneration system of *Saposhnikovia divaricate*

FU Hang, HUANG Han-qian, WANG Yan, HUI Fang, YANG Shi-hai

College of Chinese Medicine Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

Abstract: Objective To establish the regeneration system of *Saposhnikovia divaricate* (Turcz.) Schischk. **Methods** The effects of different explants, temperature, medium, and illumination was studied on the induction of *S. divaricate*. Response surface test design was used to optimize the hormone ratio of callus induction and proliferation. **Results** The leaves of *S. divaricate* were used as the experimental materials, the optimal medium for the callus induction was MS + 6-BA 0.90 mg/L + 2,4-D 1.05 mg/L + KT 0.96 mg/L, with temperature of 25 ℃ and light of 12 h/d. The optimal medium for callus proliferation was MS + 6-BA 0.56 mg/L + 2,4-D 0.48 mg/L + KT 0.40 mg/L, and the subculture cycle was 35 d. The optimal medium for adventitious shoots was MS + NAA 0.6 mg/L + 6-BA 1.0 mg/L. The optimal medium for root growing was MS + NAA 0.4 mg/L + 6-BA 0.1 mg/L. **Conclusion** *S. divaricate* callus was successfully induced and a stable and efficient plant regeneration system was established.

Key words: *Saposhnikovia divaricate* (Turcz.) Schischk.; tissue cultures; callus; response surface test design; plant regeneration

防风为伞形科植物防风 *Saposhnikovia divaricate* (Turcz.) Schischk. 未抽花茎植物的干燥根, 味辛、甘, 微温; 归膀胱、肝、脾经; 有祛风解表、胜湿止痛, 止痉之功效^[1]。防风药用历史悠久, 《神农本草经》中列为上品^[2]。其主要含有挥发油类、色原酮类、香豆素类、多糖类、有机酸类、聚乙炔类、甘油酯类等成分, 具有解热、镇痛、镇静、抗炎、抗菌、抗肿瘤、提高机体免疫力、抗过敏、抗凝血等药理作用^[3]。

响应面分析法 (response surface methodology, RSM) 是近几年来药学工作者常用的实验设计和优化方法, 使用方便。此方法采用多元二次回归, 将多因子指标相互关系用多项式近似拟合, 通过分析, 能够精确地研究各因子与响应值之间的关系^[4-6]。响应面法有很多种, 本实验采用 Box-Behnken Design 设计方法筛选出诱导愈伤组织和愈伤组织增殖的最适培养基。

中药材是我国中医药产业赖以生存和可持续发

收稿日期: 2018-03-15

基金项目: 甘草等7种中药饮片标准化建设 (ZYBZH-Y-JL-25)

作者简介: 付航 (1993—), 女, 在读硕士, 研究方向为中药生物技术。Tel: 18744522972 E-mail: 905124300@qq.com

*通信作者 杨世海, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药生物技术、中药育种、药用植物栽培。Tel: 15568877267 E-mail: jlyangs@163.com

展的基础,随着人类医药事业快速发展,国际上兴起了回归自然、崇尚天然药物的热潮,对药用植物的需求量逐年上升,导致药用植物资源日渐匮乏^[7]。本研究利用植物组织培养技术,对防风愈伤组织诱导及植株再生影响因素进行研究,建立较完整的快繁体系。

1 材料

防风种子购自黑龙江省防风种植基地,经吉林农业大学中药材学院杨世海教授鉴定为防风 *Saposhnikovia divaricate* (Turcz.) Schischk. 的干燥成熟种子,保存于 4 ℃ 冰箱中。

2 方法

2.1 无菌苗的培养

选取当年采收成熟且饱满干燥的防风种子,先在蒸馏水中浸泡 24 h 后,置于超净工作台上,用无菌水冲洗 3 次,75%乙醇浸泡 30 s,倒去乙醇,再用无菌水冲洗 3 次,每次 30 s;再用 0.1%升汞浸泡不同时间灭菌,以种子污染率和发芽率确定灭菌时间。倒去升汞,用无菌水冲洗 5 次,每次 30 s,用无菌滤纸将种子表面的水吸干,接种到 MS 固体培养基上,置于光照强度 2 000 lx、光照条件 12 h/d、湿度 60%的 25 ℃ 恒温培养箱中培养,获得防风无菌苗,作为诱导愈伤组织的外植体备用。

种子污染率=污染的种子数/接种的种子数

种子发芽率=发芽的种子数/接种的种子数

2.2 防风再生体系的建立

2.2.1 诱导愈伤组织 取上述无菌苗,在超净工作台上,将叶片切成约 0.5 cm×0.5 cm 大小,根和茎均切成约 1.0 cm,然后接到诱导愈伤组织的培养基上。上述培养基均为不同种类基础培养基,其中蔗糖为 3%,琼脂为 0.6%,pH 值为 5.8~6.0,培养基在 121 ℃ 下灭菌 20 min,冷却后备用。置于不同温度及不同光照条件的培养箱中培养,30 d 后统计愈伤组织诱导率,同时记录愈伤组织的生长状况、光泽成度及颜色,并筛选出诱导愈伤组织最佳的培养基配方。愈伤组织诱导率按以下公式计算。

愈伤组织诱导率=长出愈伤的外植体数/接种外植体总数

植物生长调节剂能够调节细胞生长和分化,不同类型的植物生长调节剂诱导作用不同,细胞分裂素和生长素联合使用,促进愈伤组织的生长增殖和分化;生长素和激动素配合使用能更多地积累次生代谢产物^[8]。本实验选用 6-BA、2,4-D 和 KT 3 种激素对防风愈伤组织进行诱导。采用 Design-Expert

8.0.6 统计分析软件进行响应面设计实验,按照 Box-Behnken 试验设计,对诱导愈伤组织的激素进行筛选。基于前期单因素预试验,得知影响诱导防风愈伤组织的激素质量浓度均在 0~1.5 mg/L,以 6-BA、2,4-D 和 KT 3 种激素质量浓度为单因素,每个因素取 3 水平,以愈伤组织诱导率为响应值,设计 3 因素 3 水平的响应面试验(表 1)。

表 1 Box-Behnken 设计 3 因素 3 水平 (诱导愈伤组织)
Table 1 Designs three-factor levels of Box-Behnken (callus)

水平	因素/(mg·L ⁻¹)		
	6-BA	2,4-D	KT
1	0.00	0.00	0.00
2	0.75	0.75	0.75
3	1.50	1.50	1.50

2.2.2 愈伤组织继代培养 将上述生长良好的愈伤组织切成 0.5 g 的小块,转接到含有不同激素配比的继代培养基上继代培养,并考察不同激素配比及不同继代周期对愈伤组织增殖状况的影响,30 d 后统计愈伤组织增殖量。同样采用 Design-Expert 8.0.6 统计分析软件进行响应面设计实验,按照 Box-Behnken 试验设计。基于前期单因素预实验,影响防风愈伤组织增殖的激素质量浓度均在 0~1.0 mg/L。以愈伤组织增殖率为响应值,同样设计 3 因素 3 水平的响应面试验(表 2)。愈伤组织增殖倍数按以下公式计算。

愈伤组织增殖倍数=(增殖后愈伤组织质量-原愈伤组织质量)/原愈伤组织质量

2.2.3 诱导丛生芽 将愈伤组织转接到含有不同质量浓度 NAA 和 6-BA 的 MS 培养基上,其中蔗糖量为 3%,琼脂量为 0.6%,pH 值为 5.8~6.0。置于光照强度 2 000 lx、光照条件 12 h/d、湿度 60%的 25 ℃ 恒温培养箱中培养。每组试验重复 3 次,30 d 后统计丛生芽诱导率(丛生芽诱导率=生芽的愈伤组织数/接种愈伤组织的总数)。

表 2 Box-Behnken 设计 3 因素 3 水平 (愈伤组织继代培养)
Table 2 Designs three-factor levels of Box-Behnken (callus subculture)

水平	因素/(mg·L ⁻¹)		
	6-BA	2,4-D	KT
1	0.00	0.00	0.00
2	0.50	0.50	0.50
3	1.00	1.00	1.00

2.2.4 生根培养与移栽 当丛生苗长至 4 cm 左右, 将其切成单株, 转入到含有不同质量浓度 NAA 和 6-BA 的 MS 培养基中, 进行生根培养。置于光照强度 2 000 lx、光照条件 12 h/d、湿度 60% 的 25 ℃ 恒温培养箱中培养。每组试验重复 3 次, 30 d 后统计生根率。选择苗壮根粗的植株, 打开瓶盖置室内, 3 d 后取出, 洗净多余培养基, 将其移栽于腐殖土和蛭石 (5:2) 混合的土壤中。

3 结果与分析

3.1 种子灭菌方法

采用 75% 乙醇处理 30 s 后再用 0.1% 升汞对防风种子进行灭菌, 将灭菌后的种子接种到不添加任何激素的 MS 固体培养基上, 20 d 后统计结果, 见表 3。

表 3 不同处理方法对种子发芽率和污染率的影响
Table 3 Effects of different treatments on germination and contamination rates of seeds

灭菌时间/min	污染率/%	发芽率/%
0	100.0	2.7
2	98.3	11.9
4	62.8	13.3
8	10.1	46.1
12	0.4	25.3

由表 3 数据表明, 分别用 0.1% 升汞对种子处理 0、2、4、8、12 min 后, 随着处理时间逐渐增加, 污染率逐渐降低, 但发芽率也逐渐降低; 当处理 8 min 时发芽率最大可达到 46.1%, 污染率为 10.1%, 在处理 12 min 时污染率达到最低为 0.4%, 发芽率为 25.3%; 但根据无菌苗生长快慢情况, 处理 8 min 的无菌苗萌发较快且粗壮, 处理 12 min 的萌发较慢。因此, 用 75% 乙醇处理 30 s 后, 再用 0.1% 升汞处理 8 min 后接种到不添加任何激素 MS 固体培养基上, 可获得防风无菌苗。

3.2 愈伤组织的诱导

3.2.1 外植体的筛选 选取防风无菌苗叶片、茎段及主根作为外植体, 接种到 MS+6-BA 0.90 mg/L+2,4-D 1.05 mg/L+KT 0.96 mg/L 固体培养基上, 置于光照时间为 12 h/d, 25 ℃ 恒温培养箱中培养, 30 d 后统计愈伤组织诱导率, 结果见图 1。不同外植体对防风愈伤组织诱导有较大差异。叶片诱导率最大为 89.3%, 茎段诱导率为 40.9%, 而主根的诱导率仅为 7.4%, 因此叶片为诱导防风愈伤组织的最佳

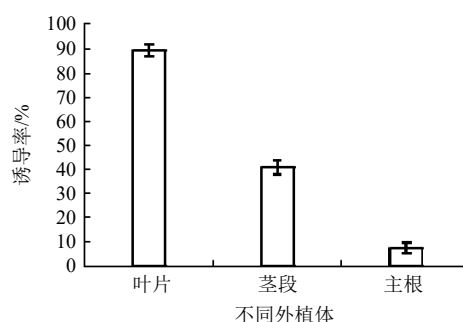


图 1 不同外植体对愈伤组织诱导的影响

Fig. 1 Effects of different explants on callus induction

外植体, 以下实验均以叶片作为外植体。

3.2.2 不同培养温度对愈伤组织诱导的影响 以防风叶片作为外植体, 接种在 MS+6-BA 0.90 mg/L+2,4-D 1.05 mg/L+KT 0.96 mg/L 固体培养基上, 并分别置于 15、20、25、30 ℃ 的恒温培养箱中培养, 光照时间为 12 h/d, 30 d 后统计愈伤组织诱导率, 结果见图 2。

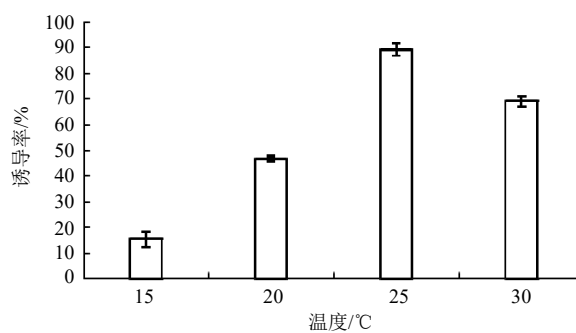


图 2 不同温度对愈伤组织诱导的影响

Fig. 2 Effect of different temperature on callus induction

防风愈伤组织诱导率随温度升高呈先上升后下降的趋势, 在 15 ℃ 时, 愈伤组织生长缓慢、数量较少, 诱导率为 15.41%; 在 15~25 ℃ 时, 愈伤组织诱导率逐渐增加, 在 25 ℃ 时, 诱导率达到最大值 83.22%; 在 30 ℃ 时, 愈伤组织诱导率降低到 69.19%, 颜色由黄绿色渐渐变成褐色, 甚至死亡。所以 25 ℃ 为诱导防风愈伤组织的最适宜温度。

3.2.3 光照对诱导愈伤组织的影响 以防风叶片作为外植体, 接种在 MS+6-BA 0.90 mg/L+2,4-D 1.05 mg/L+KT 0.96 mg/L 固体培养基上, 分别放到 24 h/d 光培养、12 h/d 光培养、24 h/d 全暗培养 3 种光照条件的恒温培养箱中培养, 培养温度为 25 ℃。每组试验重复 3 组, 30 d 后统计愈伤组织诱导率, 见图 3。

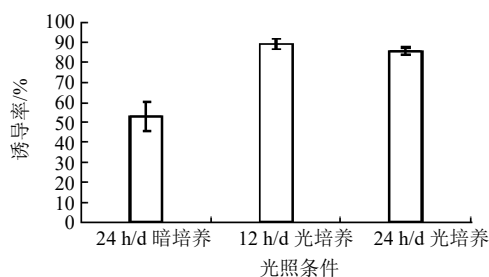


图 3 不同光照时间对愈伤组织诱导的影响

Fig. 3 Effect of different light time on callus induction

由图 3 可知, 24 h/d 暗培养无光照, 愈伤组织诱导率较低, 且愈伤组织大多为褐色; 24 h/d 光培养条件下, 愈伤组织诱导率较高, 但愈伤组织大多呈紫色且有玻璃化现象产生; 12 h/d 光培养条件下诱导率最高, 诱导出的愈伤组织呈黄绿色且质地较紧密。将 24 h/d 光培养的愈伤组织转移到 12 h/d 光照条件下, 紫色逐渐褪去, 转变成黄绿色, 玻璃化程度减轻。因此 12 h/d 光培养为诱导愈伤组织最适的光照条件。

3.2.4 不同培养基对愈伤组织诱导的影响 分别以 1/2 MS、MS、B5、N6、White 为诱导培养基 (其中蔗糖量为 3%, 琼脂量为 0.6%, pH 值为 5.8~6.0), 并添加 6-BA 0.90 mg/L+2,4-D 1.05 mg/L+KT 0.96 mg/L。每瓶接入 5 个外植体, 每组试验重复 3 次, 在光照时间为 12 h/d, 25 °C 恒温培养箱中培养, 30 d 后统计愈伤组织诱导率, 结果见图 4。

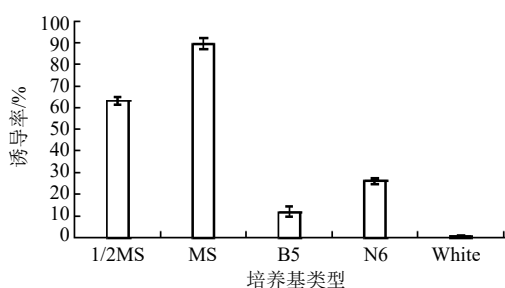


图 4 不同培养基对愈伤组织诱导的影响

Fig. 4 Effect of different media on callus induction of leaves

由图 4 知, 培养基的种类对诱导愈伤组织有较大的影响, MS>1/2 MS>N6>B5>White, MS 和 1/2 MS 培养基诱导出的愈伤组织生长状态良好, 诱导率分别为 89.3%和 63.3%; N6 培养基诱导率好于 B5 培养基, 诱导率分别为 25.9%和 11.8%; White

培养基几乎不能诱导出愈伤组织, 诱导率仅为 0.7%。因此最佳诱导愈伤组织培养基为 MS 培养基 (其中蔗糖量为 3%, 琼脂量为 0.6%, pH 值为 5.8~6.0)。

3.2.5 不同激素质量浓度对愈伤组织诱导的影响 诱导愈伤组织时植物生长调节剂一般以生长素类和细胞分裂素类配比使用。用于诱导愈伤组织的植物生长调节剂有 2,4-D、6-BA、KT、ZT、NAA 等^[9-10]。以 6-BA (A)、2,4-D (B)、KT (C) 质量浓度为因素, 采用 Box-Behnken 方法设计响应面分析试验, 试验设计及结果如表 4 所示。根据表 4 实验结果, 对试验数据进行分析, 其回归方程的显著性检验及方差分析见表 5。

二次模型中回归系数的显著性检验表明 6-BA、2,4-D、KT 对愈伤组织诱导的线性效应极显著 ($P < 0.01$), 因素 A^2 、 B^2 、 C^2 对愈伤组织诱导率的曲面效应极显著, 因素 AC 对愈伤组织诱导率的交互影响显著, AB、BC 对愈伤组织诱导率交互影响不显著。对试验数据进行多次拟合回归, 以诱导率 (Y) 为因变量, 6-BA (A)、2,4-D (B)、KT (C) 为自变量建立回归方程模型为 $Y = 42.82 + 28.63 A + 34.05 B + 24.54 C + 0.64 AB - 7.66 AC + 6.37 BC - 12.24 A^2 - 19.40 B^2 - 12.7 C^2$ 。

表 4 Box-Behnken 试验设计及结果

Table 4 Design and results of Box-Behnken test

编号	6-BA/(mg·L ⁻¹)	2,4-D/(mg·L ⁻¹)	KT/(mg·L ⁻¹)	诱导率/%
1	0.75	1.50	1.50	77.913
2	0.75	0.75	0.75	82.316
3	0.00	1.50	0.75	68.333
4	0.75	0.75	0.75	84.702
5	0.00	0.75	1.50	74.801
6	0.00	0.75	0.00	55.933
7	1.50	1.50	0.75	76.984
8	1.50	0.75	0.00	71.627
9	0.75	0.75	0.75	81.428
10	0.75	0.00	0.00	59.010
11	0.75	1.50	0.00	67.401
12	0.75	0.75	0.75	82.742
13	0.00	0.00	0.75	54.002
14	0.75	0.00	1.50	55.192
15	0.75	0.75	0.75	83.487
16	1.50	0.00	0.75	61.217
17	1.50	0.75	1.50	73.270

表 5 回归方程显著性检验及方差分析 (诱导愈伤组织)

Table 5 Regression equation significance test and analysis of variance (callus subculture)

项目	平方和	自由度	F 值	P 值
模型	1 816.17	9	46.35	<0.000 1
A	112.72	1	25.89	0.001 4
B	468.33	1	107.58	<0.000 1
C	92.51	1	21.25	0.002 5
AB	0.52	1	0.12	0.740 9
AC	74.18	1	17.04	0.004 4
BC	51.34	1	11.79	0.010 9
A ²	199.66	1	45.86	0.000 3
B ²	501.62	1	115.23	<0.000 1
C ²	214.72	1	49.32	0.000 2
残差	30.47	7		
失拟项	24.35	3	5.31	0.070 3
净误差	6.12	4		
总离差	1 846.64	16		

模型的回归 F 值为 46.35, $P < 0.01$, 表明该回归极显著, 模型对试验实际情况拟合较好。失拟项不显著 ($P > 0.05$), 相关系数 (r^2) = 0.986 7, 校正决定系数 (R^2_{adj}) = 0.962 3, 表明该模型与实际的试验拟合程度良好, 误差小, 模型选择合适, 可以用该模型对响应值进行分析和预测来确定最佳诱导愈伤组织的培养基配方。

根据回归方程, 绘制不同激素种类与愈伤组织诱导率的响应面分析图 (图 5)。通过 Design-Expert 8.0.6 统计分析软件优化, 获得诱导愈伤组织的培养基为 MS+6-BA 0.90 mg/L+2,4-D 1.05 mg/L+KT 0.96 mg/L, 预测防风愈伤组织诱导率为 85.306%。为检测结果的可靠性, 采用最佳诱导愈伤组织的培养基进行验证, 结果得出防风愈伤组织诱导率为 84.863%, 与预测值相差 0.443%, 因此验证了预测结果的正确性, 说明响应面分析法得到的激素质量浓度真实可靠。

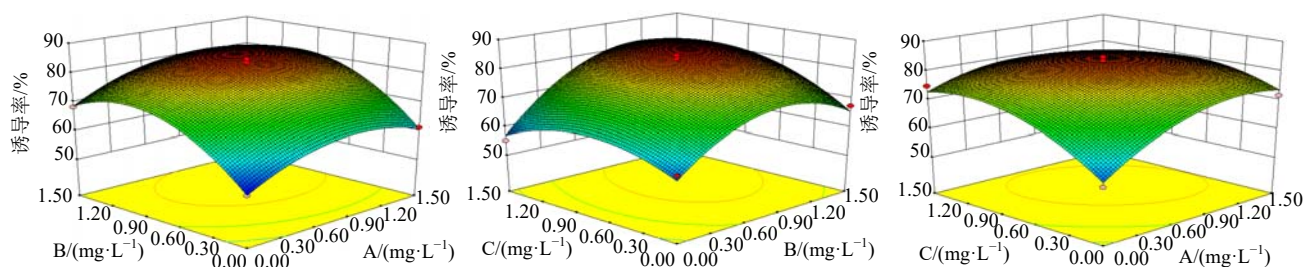


图 5 不同激素种类与愈伤组织诱导率的响应面分析

Fig. 5 Response surface analysis of different hormone types and callus induction rate

3.3 愈伤组织的增殖

3.3.1 植物生长调节剂对愈伤组织增殖的影响 采用 Box-Behnken 方法设计响应面分析试验, 试验设计及结果如表 6 所示。根据表 6 结果, 对试验数据进行分析, 其回归方程的显著性检验及方差分析见表 7。

二次模型中回归系数的显著性检验表明 6-BA、2,4-D、KT 对愈伤组织增殖倍数的线性效应极显著 ($P < 0.01$), 因素 A^2 、 B^2 、 C^2 对愈伤增殖倍数的曲面效应极显著, 因素 BC 对愈伤组织增殖倍数的交互影响显著, AB、AC 对愈伤增殖倍数交互影响不显著。对试验数据进行多次拟合回归, 以增殖倍数 (Y) 为因变量, A、B、C 为自变量建立回归方程模型为 $Y = 3.74 + 2.20 A + 5.17 B + 0.71 C - 0.42 AB + 0.35 AC - 0.94 BC - 1.92 A^2 - 4.75 B^2 - 0.57 C^2$

模型的回归 F 值为 166.08, $P < 0.01$, 表明该回归极显著, 模型对试验实际情况拟合较好。失拟

项不显著 ($P > 0.05$), $r^2 = 0.993 9$, $R^2_{adj} = 0.989 3$, 可用该模型对响应值进行分析和预测来确定最佳愈伤组织增殖的培养基配方。

根据回归方程, 不同激素种类与愈伤组织增殖倍数的响应面分析见图 6。通过 Design-Expert 8.0.6 统计分析软件优化, 获得最佳愈伤组织增殖的培养基为 MS+6-BA 0.56 mg/L+2,4-D 0.48 mg/L+KT 0.40 mg/L。预测防风愈伤组织增殖倍数为 5.738 08。实验结果为 5.734 07, 与预测值相差 0.07%, 因此验证了预测结果的可靠性。

3.3.2 继代周期对愈伤组织增殖的影响 为大量获得愈伤组织, 需将其进行继代培养, 因此继代周期需要严格把控。继代周期较长时, 有些植物愈伤组织容易分化成不定根^[11], 甚至会产生褐化现象。将愈伤组织接种到继代培养基上, 每 5 天称定质量 1 次, 继代周期与愈伤组织增长量的关系见图 7。

由图 7 可知 0~10 d 为迟缓期, 10~30 d 愈伤组

表 6 Box-Behnken 试验设计及结果 (愈伤组织增殖)
Table 6 Design and results of Box-Behnken test (callus proliferation)

序号	6-BA/(mg·L ⁻¹)	2,4-D/(mg·L ⁻¹)	KT/(mg·L ⁻¹)	增殖倍数
1	1.00	0.00	0.50	4.357
2	1.00	1.00	0.50	3.953
3	1.00	0.50	1.00	5.213
4	0.50	0.50	0.50	5.723
5	0.00	0.50	1.00	4.748
6	0.50	0.50	0.50	5.723
7	0.50	0.50	0.50	5.787
8	0.00	0.00	0.50	3.945
9	1.00	0.50	0.00	5.275
10	0.00	0.50	0.00	5.156
11	0.50	0.00	1.00	4.748
12	0.00	1.00	0.50	3.963
13	0.50	1.00	0.00	4.501
14	0.50	0.00	0.00	4.357
15	0.50	0.50	0.50	5.736
16	0.50	0.50	0.50	5.633
17	0.50	1.00	1.00	3.953

表 7 回归方程显著性检验及方差分析 (愈伤组织增殖)
Table 7 Regression equation significance test and analysis of variance (callus proliferation)

项目	平方和	自由度	F 值	P 值
模型	8.010	9	166.08	<0.000 1
A	0.120	1	22.69	0.002 1
B	0.130	1	25.09	0.001 5
C	0.049	1	9.17	0.019 1
AB	0.045	1	8.31	0.023 6
AC	0.030	1	5.59	0.050 1
BC	0.220	1	41.15	0.000 4
A ²	0.970	1	180.22	<0.000 1
B ²	5.930	1	1 107.66	<0.000 1
C ²	0.087	1	16.20	0.005 0
残差	0.037	7		
失拟项	0.025	3	2.72	0.179 0
净误差	0.012	4		
总离差	8.040	16		

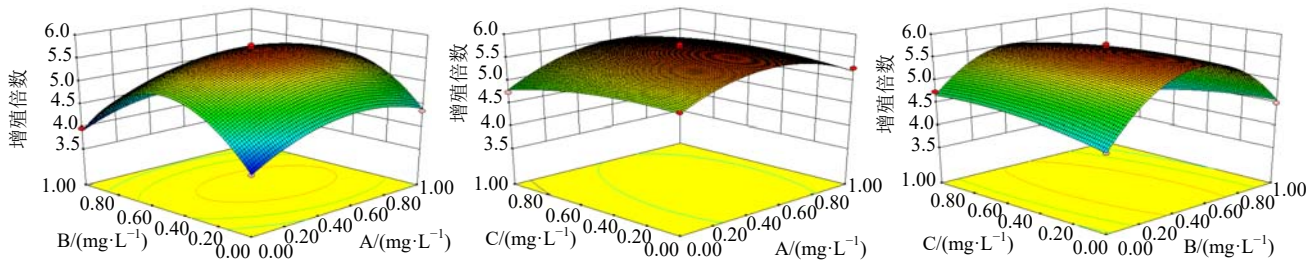


图 6 不同激素种类与愈伤组织增殖倍数的响应面分析图

Fig. 6 Response surface analysis of different hormone types and callus multiplication multiples

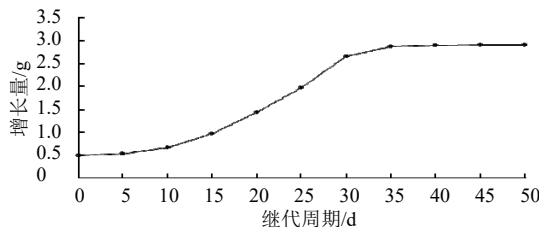


图 7 继代周期对防风愈伤组织增长量的影响

Fig. 7 Effects of different culture periods on callus proliferation

织生长迅速, 30~35 d 增长量仅为 0.22 g, 35 d 后愈伤组织增长量趋于平缓, 且愈伤组织有褐化现象产生, 因此 30 d 为愈伤组织增殖的最佳继代周期。

3.4 激素比对丛生芽诱导的影响

表 8 反映了不同质量浓度的 NAA 和 6-BA 比对愈伤组织诱导丛生芽的影响。丛生芽诱导率由大到小依次为 5 组>2 组>4 组>6 组>1 组>3 组>7 组>8 组>9 组。第 5 组和第 2 组诱导率较高分别为 78.53%、52.24%, 说明 1.0 mg/L 6-BA 有利于芽的分化; 后 3 组诱导率极低, 分别为 10.67%、8.04%、5.59%,

说明当生长素较高时不利于芽的分化; 第 2 组比第 4 组高 5.35%, 且比第 5 组低 26.29%, 说明 0.6 mg/L NAA 有利于芽的分化; 因此最适愈伤组织诱导丛生芽的培养基为 MS+NAA 0.6 mg/L+6-BA 1.0 mg/L。

3.5 生根培养

当生长素质量浓度大于细胞分裂素浓度时, 有利于根的分化。表 9 反映不同激素比对不定芽生根的影响, 当 NAA 质量浓度逐渐升高时, 生根率也随之增高, 当增加到 0.6 mg/L 时, 生根率降低至 35.60%, 因此最适生根培养基为 MS+NAA 0.4 mg/L+6-BA 0.1 mg/L。

4 讨论

建立防风植株再生体系, 首要任务是无菌苗的获取, 因此消毒剂的种类与时间需要严格把控, 消毒剂通常选用 75%乙醇、次氯酸钠和升汞^[12], 由于防风种子表面凹凸不平, 因此本实验采用 75%乙醇消毒 30 s 后再用 0.1%升汞消毒 8 min, 二者联合使用效果最好。本实验选取防风无菌苗叶片、茎段和根为诱导愈伤组织外植体, 实验结果表明, 叶片是

表8 不同激素对比对丛生芽诱导的影响

Table 8 Effects of different hormone ratios on adventitious shoots

组别	NAA/(mg·L ⁻¹)	6-BA/(mg·L ⁻¹)	诱导率/%
1	0.2	0.5	23.17
2	0.2	1.0	52.24
3	0.2	1.5	15.11
4	0.6	0.5	46.89
5	0.6	1.0	78.53
6	0.6	1.5	40.73
7	1.0	0.5	10.67
8	1.0	1.0	8.04
9	1.0	1.5	5.59

表9 不同激素对比对生根的影响

Table 9 Effects of different hormone ratios on root growing

组别	NAA/(mg·L ⁻¹)	6-BA/(mg·L ⁻¹)	生根率/%
1	0.2	0.1	42.25
2	0.4	0.1	71.06
3	0.6	0.1	35.60

诱导防风愈伤组织最佳外植体。同一基因型不同外植体分化出愈伤组织能力存在较大差异,可能是由于叶片相对面积较大,细胞排列疏松,在外界刺激条件下容易脱分化。培养温度不仅影响愈伤组织诱导率,还影响次生代谢产物的积累^[13]。当培养温度低于 25 ℃时,愈伤组织生长缓慢;培养温度为 25 ℃时,植物细胞生长速度快、分化能力强,有助于次生代谢产物的积累;但温度高于 25 ℃时,容易引起褐化现象。虽然光照条件不是诱导愈伤组织的必要条件,但适宜的光照条件有利于愈伤组织分化及次生代谢产物合成^[14]。24 h/d 暗培养,防风愈伤组织诱导率最低;24 h/d 光培养,愈伤组织诱导率较高,但愈伤组织大多呈紫色;12 h/d 光培养,愈伤组织生长状态良好,且均呈黄绿色。不同培养基类型所含营养成分不同^[15-16]。MS 培养基中无机盐浓度和硝酸盐浓度较高,为防风愈伤组织生长提供丰富营养,适宜次生代谢产物的合成与积累。

愈伤组织诱导的成败关键是植物生长调节剂的种类和浓度之间的配比^[17]。本实验利用 Design-Expert 8.0.6 软件对防风愈伤组织培养体系进行优化,得到优化后的最适诱导防风愈伤组织培养基为 MS+6-BA 0.90 mg/L+2,4-D 1.05 mg/L+KT 0.96 mg/L,最适防风愈伤组织增殖培养基为 MS+6-BA 0.56 mg/L+2,4-D 0.48 mg/L+KT 0.40 mg/L。生长素和细胞分裂素的比值低时,有利于芽的形成,生长素和细胞分裂素的比值高时,有利于根的形成^[18]。本实验选用 NAA 与 6-BA 组合对防风丛生

芽和根进行诱导,得到最适诱导丛生芽的培养基为 MS+NAA 0.6 mg/L+6-BA 1.0 mg/L,最适生根培养基为 MS+NAA 0.4 mg/L+6-BA 0.1 mg/L。

本实验建立了稳定的防风植株再生体系,可在较短时间内培育出大量的防风幼苗,从源头上解决防风资源匮乏及野生资源的破坏。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 森立之. 神农本草经 [M]. 上海: 群联出版社, 1995.
- [3] 窦红霞, 高玉兰. 防风的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中医药信息, 2009, 26(2): 15-17.
- [4] 李莉, 张赛, 何强, 等. 响应面法在试验设计与优化中的应用 [J]. 实验室研究与探索, 2015, 34(8): 41-45.
- [5] 王永香, 米慧娟, 张传力, 等. Box-Behnken 响应面法优化热毒宁注射液金银花和青蒿 (金青) 的醇沉工艺研究 [J]. 中草药, 2015, 46(5): 671-678.
- [6] 张儒, 张变玲, 谢涛, 等. 响应面法优化人参不定根中总皂苷的提取工艺 [J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27: 726-731.
- [7] 段金殿, 张伯礼, 宿树兰, 等. 基于循环经济理论的中药资源循环利用策略与模式探讨 [J]. 中草药, 2015, 46(12): 1715-1722.
- [8] 方慧勇, 朱虹, 丁海麦, 等. 影响愈伤组织中次生代谢产物含量的因素研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(15): 2846-2850.
- [9] 李俊强, 林利华, 张凯, 等. 早开堇菜组织培养及植株再生体系的建立 [J]. 草业学报, 2015, 24(11): 163-173.
- [10] 周宜君, 周生闯, 刘玉, 等. 植物生长调节剂对植物愈伤组织的诱导与分化的影响 [J]. 中央民族大学学报, 2007, 16(1): 23-28.
- [11] 周建辉, 张玉琼, 李明凯, 等. 石蒜愈伤组织的诱导及其继代培养 [J]. 植物生理学通讯, 2010, 46(12): 1215-1218.
- [12] 胡重怡, 郑少清, 陈兴江, 等. 烟草无菌苗培养前的种子消毒技术研究 [J]. 中国烟草科学, 2007, 28(2): 45-46.
- [13] 戴莹, 杨世海, 赵鸿峰, 等. 药用植物组织培养中褐化现象的研究进展 [J]. 中草药, 2016, 47(2): 344-351.
- [14] 王慧英. 影响植物愈伤组织形成的因素研究 [J]. 聊城大学学报, 2010, 23(2): 51-53.
- [15] 王思瑶, 李明阳, 邵占媛, 等. 不同培养基及激素处理下怪柳丛生芽总酚、三萜及黄酮物质的积累 [J]. 北京林业大学学报, 2014, 36(5): 74-81.
- [16] 幸福梅, 臧建成, 兰小中, 等. 波棱瓜愈伤组织诱导及植株再生研究 [J]. 中草药, 2012, 43(2): 360-363.
- [17] 唐佳佳, 尚旭岚, 狄香香. 黑荆树愈伤组织诱导、增殖与分化 [J]. 中南林业科技大学学报, 2014, 34(9): 38-34.
- [18] 王雪芳, 王春梅, 张金林, 等. 小花碱茅组织培养植株再生体系的建立 [J]. 草业学报, 2014, 23(6): 355-360.