

无花丹参叶盘组织培养再生体系的优化选择

夏静¹, 张大海¹, 宋艳波¹, 王玉庆², 牛颜冰¹

(1. 山西农业大学 生命科学院, 山西 太谷 030801; 2. 山西农业大学 农学院, 山西 太谷 030801)

摘要: 以丹参极品——无花丹参幼嫩叶片为外植体, 对丹参的组织培养及植株再生体系进行优化选择, 筛选出了能直接诱导芽再生的培养基 MS+6-BA 及直接诱导生根的培养基 1/2MS+IBA。结果表明, 该体系与通过愈伤组织获得的再生体系相比, 提高了其有效化学成分的含量, 为改良丹参品质及产量提供了技术支持。

关键词: 无花丹参; 叶盘; 再生体系

中图分类号: Q943.1 **文献标识码:** A

Optimization Selection of Tissue Culture Regeneration System from Leaves of *Salvia miltiorrhiza* Bge

XIA Jing et al.

(College of Life Science, Shanxi Agricultural University, Taigu Shanxi 030801, China)

Abstract: A genetic transformation regeneration system from aseptic seedling leaves of *Salvia miltiorrhiza* Bge was developed. Adventitious shoots were directly induced and regenerated from leaf explants of *Salvia miltiorrhiza* Bge, and the medium MS+6-BA, which could directly induce shoot regeneration, was used. Shoots were rooted on half-strength MS media with IBA. The results showed that compare with regeneration system mediated by callus, this system could increase the chemical composition and supply a new technology for improving quality of *Salvia miltiorrhiza* Bge.

Key words: *Salvia miltiorrhiza* Bge; Leaf disc; Regeneration system

丹参 (*Salvia miltiorrhiza* Bge) 为唇形科鼠尾草属植物, 以干燥根茎入药, 主要用于心血管系统疾病及慢性肝炎、早期肝硬化等的治疗, 市场需求量很大^[1]。现今丹参主要采用切根繁殖, 品种退化混杂严重, 药材产量和有效化学成分逐年下降, 质量得不到保证^[2], 如丹参酮 II A 的含量大部分只有 0.05%~0.15%, 远远低于国家药典规定的不能低于 0.2% 的要求。故从根本上解决丹参栽培中面临的资源和质量问题迫在眉睫。

我们在社会实践中偶然发现了几株丹参突变体——无花丹参, 田间生长旺盛, 整齐, 其丹参酮 II A 含量平均达到了 0.4%~0.6%, 达到了特级标准和高产优质的要求, 且种植后还能避免摘花的耗时、费力。故采用组织培养快繁技术, 繁殖出大量植株进行扩大栽培势在必行。

在叶盘再生体系的建立过程中, 一般是先设计诱导愈伤组织的培养基, 然后把外植体接种在培养基上, 诱导愈伤组织的发生。当愈伤组织生长到一定程度, 再配置诱导芽分化的培养基, 把带有愈伤组织块的外植体转接到分化培养基上, 经过脱分化和再分化, 诱导芽的再生^[3]。在此过程中, 不但操作繁琐、繁殖成本比较高, 而且在转接过程中容易受到污染, 造成浪费^[4]。为简化操作程序、节约费用, 本试验设计了几种不经过愈伤组织诱导和转接, 而直接诱导芽再生的培养基, 从中筛选出最佳的直接诱导芽再生的培养基。本研究旨在建立及优化无花丹参组织培养和植株再生体系, 为改良丹参品质、提高丹参产量、直接大规模生产丹参, 从而彻底解决丹参生产中面临的品种退化问题和控制丹参质量打

下基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

无花丹参采自山西芮城丰源药业有限公司丹参生产基地。

1.2 培养条件

基本培养基为 MS 培养基。

(1) 芽诱导培养基: MS 附加不同浓度的 6-BA。

(2) 生根培养基: 1/2 MS 附加不同浓度的 IBA。

1.3 材料处理

无菌叶片的获得: 从生长健壮、无病虫害的丹参植株上摘取成熟叶片, 先用自来水初洗 30 min, 以除去表面污垢, 取出后在超净工作台上用 70% 的酒精浸泡约 30 s, 再用 2% 的次氯酸钠 (NaClO) 溶液浸泡约 5 min, 最后用无菌水冲洗 3~5 次, 并用无菌纸吸干备用。

将上述无菌叶片切成约 0.5 cm×0.5 cm 左右的小块, 迅速接种到培养基 (1) 上, 培养温度为 25℃, 光照时间为 12 h, 强度为 3 000~5 000 lx。

2 结果分析

2.1 芽的诱导

外植体接种于培养基 (1) 上 25 d 后, 开始产生嫩芽并长出幼叶, 形成无根丛苗。此时, 观察统计长度在 1 cm 以上芽的数目, 并计算芽诱导率 (见表 1)。

收稿日期: 2005-11-14 修回日期: 2005-12-12

作者简介: 夏静 (1983-), 女 (汉), 天津人, 主要从事生物工程方面的研究。

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30571216); 山西农业大学大学生科技创新基金项目 (20050303)

表 1 激素对比对芽诱导的影响

Table 1 Effect of different concentrations of hormones on induction of shoot

培养基编号 Medium code	6-苄基腺嘌呤 6-BA (mg · L ⁻¹)	外植体接种数 No. of inoculated explant	芽诱导率 (%) Induction ratio of buds
CK	—	20	60
A	0.25	20	73
B	0.50	20	80
C	1.00	20	94
D	1.50	20	87
E	2.00	20	75

从试验结果可看出,当 6-BA 浓度从 0.25 mg · L⁻¹ 增加到 1 mg · L⁻¹ 时,繁殖系数呈现上升趋势,丛生芽逐渐密集;当 6-BA 浓度从 1 mg · L⁻¹ 增加到 2 mg · L⁻¹ 时,繁殖系数则呈下降趋势,长势减弱。其中以 6-BA 为 1 mg · L⁻¹ 的芽的诱导率最高,生长健壮,颜色嫩绿,再生频率高达 94%。且在不加激素的培养基中,叶片不分化或分化不明显,逐渐变黄,褐化死亡。说明当 6-BA 浓度在 1 mg · L⁻¹ 时,最适芽的诱导,但随着浓度的增大反而抑制芽的形成。

2.2 生根培养及移栽

生根培养以芽诱导培养获得的芽苗为实验材料,将生长健壮的芽苗分成单株,接种到含不同浓度 IBA 的 1/2MS 培养基中(试验因素与水平的设置见表 2),进行生根繁殖。小苗接种 10 d 后开始陆续长出白根,15 d 左右每株小苗基部即可长出 2 cm 长的白色肉质根,待长度达到 5~6 cm,置于室温,普通房间散射光下炼苗 2~3 d,之后打开瓶盖,以清水洗去基部的培养基,移栽于腐殖土中,温室培养,保持湿度,使其生长。

表 2 激素对比对生根的影响

Table 2 The effect of hormone on root induction

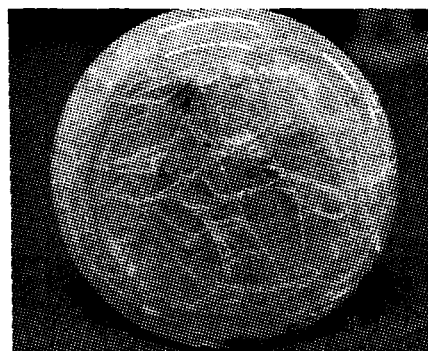
培养基编号 Medium code	吲哚乙酸 IBA (mg · L ⁻¹)	芽分化率 (%) Differentiation ratio of buds
1	1	80
2	2	97
3	3	82

在根的诱导中可以看出,随着 IBA 的浓度增大,生根率不断提高,当 IBA 浓度为 2 mg · L⁻¹ 对诱导芽生根效果最好,生根数量多,根短而粗(见图 1),把生根苗移栽到温室,成活率也高,达到 80%;但超过一定浓度后,生根率反而会降低。说明 IBA 2 mg · L⁻¹ 为生根最适浓度。



(a) 芽增殖产生的苗

(a) Seedlings derived from buds multiplication



(b) 丹参试管苗的生根

(b) Tube seedlings with roots

图 1 丹参组织培养及植株再生

Fig. 1 Tissue culture and plantlet regeneration of *Salvia moutan* Bge

3 小结

我们采用山西芮城丰源药业有限公司生产基地的丹参为材料,较系统地研究了植物激素及植物生长调节物质对丹参的诱导情况,以无花丹参叶盘为外植体进行培养,直接从叶盘上诱导芽的再生,建立起组织培养再生体系,获得了较高的芽诱导率,优选出诱导芽再生的最佳培养基为 MS+6-BA (1 mg · L⁻¹),生根最佳培养基为 MS+IBA (2 mg · L⁻¹),获得了一套完整的、系统的和高效的组织培养再生体系。对获得的小批量组培苗进行田间栽培,其叶厚浓绿,生长健壮,表现出明显的复壮特征,说明本技术具有一定的实用性,能够为改良丹参品质、提高其产量及无花丹参大规模生产提供技术支撑。

参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] 朱蔚华,胡秋,朱兆仪,等. 丹参组织培养研究 [J]. 中药材, 1994, 17 (4): 3-5.
- [3] 蔡朝晖,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): 65-68.
- [4] 刘军,赵兰勇,丰震,等. 菊花叶盘片转基因再生体系的优化选择 [J]. 植物学通报, 2004, 21 (5): 556-558.