

Tissue Culture and Plantlet Regeneration of *Veronica linariifolia* subsp. *dilatata*

LIU Fan¹, TANG Fu-yi², TIAN Meng-liang^{1**}, QIAO Xiao¹, GUAN Yu¹(1. College of Agriculture; 2. College of Forestry and Horticulture,
Sichuan Agricultural University, Yaan 625014, Sichuan, China)

Abstract: To establish a high efficiency plant regeneration system of *Veronica linariifolia*, callus, rosette buds, and roots were induced by different combinations of hormone from leaves, stem-tips and stems of *Veronica linariifolia*. The results showed that the medium of MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L was the best for callus induction, the medium of MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L was the best for bud differentiation, and the medium of 1/2 MS+IBA 0.5 mg/L was the best e for rooting.

Key words: *Veronica linariifolia*; tissue culture; plant regeneration

水蔓菁组织培养及植株再生研究^{*}

刘 帆¹, 汤福义², 田孟良^{1**}, 乔 晓¹, 官 宇¹

(四川农业大学 1. 农学院; 2. 林学院园艺学院, 四川 雅安 625014)

摘要: 采用组织培养方法, 设置不同激素配比的培养基对水蔓菁 (*Veronica linariifolia* subsp. *dilatata*) 不同外植体叶片、茎尖及茎段进行了研究。结果表明 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L 诱导愈伤组织效果最佳, 其中以茎尖的诱导效果优于其他外植体; MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L 诱导愈伤组织丛生芽的分化效果最佳; 1/2 MS+IBA 0.5 mg/L 诱导丛生芽的生根效果最佳。

关键词: 水蔓菁; 组织培养; 植株再生

中图分类号: S682.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-2650(2007)02-0117-04

水蔓菁 (*Veronica linariifolia* subsp. *dilatata*), 别名一支香、勒马回等, 为玄参科婆婆纳属多年生草本植物, 主要分布在我国华东、甘肃、云南等地区^[1,2]。作为一种国家保护药材, 水蔓菁全草入药, 具有清热润肺, 化痰止咳, 利尿通淋之功效, 其市场需求量巨大。近年来水蔓菁中化学活性物质的研究越来越受到人们的关注。虽然目前对玄参科植物的组织培养研究的报道较多, 但主要集中在园林、花卉植物等方面。药用植物方面对水蔓菁的研究主要在药品制剂方面, 对其组织培养及植株再生的研究在国内外还尚未见报道。本研究旨在通过组织培养方

法建立, 完善水蔓菁快速繁殖体系, 为利用生物技术实施有效成分的工厂化生产奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

材料从甘肃引种后种植于四川农业大学药用植物园, 经四川农业大学田孟良博士鉴定为 (*Veronica linariifolia* subsp. *dilatata*), 摘取叶片、茎尖、茎段为外植体, 经流水冲洗 1~2 h 后备用。

1.2 方 法

将冲洗好的外植体置于 75% 乙醇 15 s, 无菌水

* 收稿日期: 2007-03-30

基金项目: 四川农业大学青年科技创新基金。

** 通讯作者 (Corresponding author)。

冲洗 3 次,再用 0.1% 升汞溶液消毒 8 min,无菌水冲洗 6 次。将叶片切成 0.5 cm^2 的小块,茎尖和茎段均切成 0.3 cm 的小段,接种于愈伤组织诱导培养基中,每个激素组合接种 20 瓶,每瓶置入 2 个外植体,3 个重复。待诱导出愈伤组织后,将愈伤组织切成约 $0.5\text{ cm} \times 0.5\text{ cm}$ 的小块放入分化培养基中,每个激素组合接种 20 瓶,每瓶 1 块愈伤组织,进行分化和增殖培养,待幼苗长至 4~5 cm 时,再进行根的诱导。诱导生根时每个激素组合 10 瓶,每瓶 4 株幼苗。培养基为 MS 附加不同浓度的萘乙酸(α -naphthaleneacetic acid, NAA)和 6-糠氨基腺嘌呤(6-benzyladenine, 6-BA),蔗糖浓度 3%,琼脂粉 0.4%,pH 5.8。光照时间 12 h/d,光照度 1200 lx,温度 $(21 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。试管苗移栽到腐质土、珍珠岩(2:1)混合基质中炼苗后,移入室外栽培。27 d 后统计外植体愈伤组织的诱导率;20 d 后统计丛生芽的诱导率和生长情况;10 d 后调查生根率及平均根数。

1.2.1 诱导愈伤组织的培养基激素配比

A: 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L; B: 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L; C: 6-BA 4.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L; D: 6-BA 1.0 mg/L + NAA 1 mg/L; E: 6-BA 2 mg/L + NAA 1.0 mg/L; F: 6-BA 4.0 mg/L + NAA 1.0 mg/L; G: 6-BA 1.0 mg/L + NAA 2.0 mg/L; H: 6-BA 2.0 mg/L + NAA 2.0 mg/L; I: 6-BA 4.0 mg/L + NAA 2.0 mg/L。

1.2.3 诱导丛生芽的培养基激素配比

J: 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L; K: 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L; L: 6-BA 4.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L; M: 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.05 mg/L; N: 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L; O: 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L。

1.2.4 诱导生根的培养基激素配比

P: IBA 0.1 mg/L + NAA 0 mg/L; Q: IBA 0.5 mg/L + NAA 0 mg/L; R: IBA 0 mg/L + NAA 0.1 mg/L; S: IBA 0 mg/L + NAA 0.5 mg/L。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的诱导

由表 1 可知,茎尖愈伤组织的诱导率最高,达 100%,茎段其次,为 95%,叶片最低,为 7.5%;从激素组合来看,B 培养基明显优于其他组合,为最佳培养基。实验中发现,不同外植体在不同培养基的愈伤组织诱导和生长情况差异较大。叶片 5 d 后开始膨大卷曲,7 d 后切口边缘开始有极少数长出愈伤组

织,呈黄白色,10 d 后叶片边缘开始变褐,愈伤组织均死亡(图 1-a);茎尖培养 5 d 后,从切口基部开始膨大,9 d 后从膨大处长出少量黄绿色较致密的瘤状愈伤组织,27 d 后出现大量愈伤组织,个别愈伤组织上长出 1~2 个小芽(图 1-b);茎段培养 7 d 后切口初开始膨大,15 d 后长出少量黄绿色粒状愈伤组织,茎段中部变为褐色,27 d 后愈伤组织生长缓慢,部分愈伤组织变褐呈水渍状(图 1-c)。

表 1 不同浓度激素组合对不同外植体愈伤组织诱导率的影响

Table 1 Effect of hormone combinations of different concentration on callus induction

培养基 编号 Medium No.	愈伤组织数 Number of callus			诱导率 (%) Callus inductivity		
	叶片 Leaf	茎尖 Stem-tip	茎段 Stem	叶片 Leaf	茎尖 Stem-tip	茎段 Stem
A	0	32	24	0	80 ^b	60 ^b
B	3	40	38	7.5 ^a	100 ^a	95 ^a
C	1	35	21	2.5 ^b	87.5 ^b	52.5 ^b
D	0	25	19	0	62.5 ^c	47.5 ^b
E	1	37	23	2.5 ^b	92.5 ^{ab}	57.5 ^b
F	0	23	15	0	57.5 ^c	37.5 ^c
G	0	20	13	0	50 ^c	32.5 ^c
H	0	19	12	0	47.5 ^{cd}	30 ^c
I	0	15	11	0	37.5 ^d	27.5 ^c

注:表中小写字母表示诱导率在 5% 显著水平上的差异显著性。

Note: The letters indicate that the significance of inductivity difference at 0.05 level.

2.2 丛生芽的诱导增殖

将 B 培养基中茎尖和茎段产生的愈伤组织作为诱导芽分化的材料,分别接种于 3 种不同浓度组合的丛生芽诱导培养基中进行诱导,诱导效果见表 2,由不同外植体愈伤组织上分化出的丛生芽在不同培养基上的生长情况见表 3。

由表 2、表 3 可知,茎尖和茎段在含有不同激素组合的培养基中均能诱导出芽,但芽的生长存在一定的差异。当 6-BA 与 NAA 的比例在 2.0:0.05 时丛生芽生长最好(图 1-d);当 6-BA 浓度不变,

表 2 不同浓度激素组合对丛生芽诱导的影响

Table 2 Effect of hormone combinations of different concentration on rosette buds induction

培养基 编号 Medium No.	接种愈伤组织块数 Number of callus planted		丛生芽诱导率 (%) Percentage of rosette buds	
	茎尖 Stem tip	茎段 Stem	茎尖 Stem tip	茎段 Stem
J	40	40	87.5 ^b	60 ^b
K	40	40	100 ^a	95 ^a
L	40	40	80 ^b	52.5 ^b

表3 不同外植体丛生芽在不同浓度组合的培养基上的生长情况

Table 3 Growth state of rosette buds on different medium with different hormone combination

培养基编号 Medium No.	培养天数 Culture days (d)	丛生芽生长状况 Growth state of rosette buds	
		茎尖 Stem tip	茎段 Stem
M	20	每块诱导的丛生芽5~8个,小苗生长健壮,苗高1.7~2.0 cm。	每块诱导的丛生芽3~5个,小苗较弱,苗高1.7 cm左右。
N	20	每块诱导的丛生芽3~7个,小苗生长缓慢,苗高1.0~1.5 cm。	每块诱导的丛生芽3~5个,小苗纤细部分黄化苗,苗高1.0 cm左右。
O	20	每块诱导的丛生芽2~3个,且生长慢,苗高0.5~1.0 cm,基部有大量愈伤形成。	每块诱导的芽多为单芽,生长缓慢,基部有大量愈伤形成。

随着 NAA 浓度的增高,芽生长速度减慢,茎也变得较为纤细,并在芽的基部形成大量的愈伤组织(图1-e)。综合比较以 M 培养基对丛生芽诱导的效果最佳。

2.3 丛生芽诱导生根

将生长健壮、苗高 3~4 cm 的丛生芽切分成单芽,接种于 1/2 MS 的 4 种不同激素浓度的培养基中诱导生根,各处理生根情况见表 4。

表4 不同浓度激素对根发生率的影响

Table 4 Effect of different hormone combination on rooting

培养基编号 Medium No.	生根率(%) Rooting percentage		平均根数 Number of root	
	JJ	JD	JJ	JD
P	100 ^a	97 ^a	3.8	3.5
Q	100 ^a	100 ^a	4.7	4.6
R	93 ^b	91 ^b	2.1	2.7
S	97 ^a	95 ^a	3.6	3.3

注:JJ为茎尖愈伤组织诱导分化的丛生芽;JD为茎段愈伤组织诱导分化的丛生芽。

Notes: "JJ" represented rosette buds induced from callus of stem tip; "JD" represented cluster rosette buds induced from callus of stem.

由表4可知,各浓度处理间存在一定差异,浓度较高的 IBA 和 NAA 都能诱导较多的根(图1-f)。其中 IBA 诱导尤为明显,当 IBA 浓度为 0.5 mg/L 时,根诱导率达 100%,平均根数也最多。综合比较以 2 号培养基为最佳生根培养基。

2.4 试管苗的移栽

将根系生长良好的壮苗置于室内常温下,打开封口膜炼苗 3 d 后,取出小苗,用清水洗去根部培养基,栽植于腐质土+珍珠岩(2:1)的混合基质中,每日喷水 2 次,试管苗成活率可达 95% 左右,15 d 后移栽于室外,全部成活,小苗生长正常。



图1 水蔓菁组织培养与植株再生

Figure 1 a~f Tissue culture and plantlet regeneration of *Veronica Linariifolia*.

注:a.褐变后死亡的愈伤组织;b.带1~2个小芽的愈伤组织;c.水渍态的愈伤组织;d.6-BA和NAA比例为2.0:0.5时的丛生芽;e.NAA浓度增高时的丛生芽;f.诱导生根的再生苗。

Notes: a. died callus after browning; b. callus with 1~2 buds; c. water-like callus; d. rosette bud induced by the 6-BA and NAA with the rate of 2.0:0.5; e. rosette bud when NAA concentration raised; f. regenerated seedling.

3 讨 论

本研究采用水蔓菁的叶片、茎尖和茎段作为外植体进行了离体培养的研究,结果表明叶片的愈伤组织诱导率最低,仅为 7.5%,实验中观察到水蔓菁叶片所产生的愈伤组织呈黄白色水渍状,培养一段时间后逐渐老化变褐死亡。这与陈敏艳^[3]、施和平^[4]等进行的玄参科植物地黄、紫花洋地黄的组织培养和植株再生研究结果不一致,这可能是由于不同种植物对外源激素种类及浓度的反应不一致所致。在 MS 附加不同浓度组合的 6-BA 和 NAA 的培养基中,茎尖诱导愈伤组织的频率是所有供试外植体中最高的,9 d 后就能观察到愈伤组织的产生,并且愈伤组织的生长情况良好,有利于丛生芽的诱导。茎尖发生愈伤组织的时间明显短于叶片和茎段愈伤组织的发生,这与茎尖生长点含分生细胞多、生活力较强有关。

不同浓度的 6-BA 和 NAA 的激素组合均能从茎尖和茎段产生的愈伤组织中诱导出丛生芽,与孙国峰等^[5]对匍匐婆婆纳“霍尔特夫人”的组织培养和快速繁殖的报道基本一致。但在实验中发现,在 6-BA 与 NAA 的激素组合中,丛生芽诱导的难易程度却不同,生长速度也有明显的差异。这是因为茎尖和茎段中所含的内源激素水平不同而对外源激素种类及浓度的需求不一致^[6],从而导致细胞分裂、分化、伸长生长等一系列生理上的发生速度不同,当 6-BA 浓度的升高到 4.0 mg/L 时,部分丛生芽出现玻璃化现象,6-BA 浓度较低时,丛生芽生长良好。当 NAA 浓度较低时有利于丛生芽的诱导及生长,随着 NAA 浓度的增高反而抑制了丛生芽的诱导及生长,这与植物生长调节剂对植物生长所起的双重作用有关^[7]。

IBA 和 NAA 对根的诱导结果表明,IBA 和 NAA 对根的分化都起作用,但从诱导率及根长方面

比较,IBA 诱导效果优于 NAA。并且 NAA 随着浓度增大所诱导的根系为肥大的肉质根在移栽时不易成活,这与刘帆等^[8]提高卷叶贝母组织培养的植物再生率的研究报道相一致,其生理、生化机制有待进一步研究。

本研究为水蔓菁的无性繁殖提供了一种高效方法,有助于短期内提供大量的试管苗,通过人工栽培扩大资源,确保水蔓菁资源的可持续利用,同时也为利用生物技术进行水蔓菁有效成分的工厂化生产奠定了基础。

参考文献:

- [1] 中国植物志编委会. 中国植物志(第 67 卷)[M]. 北京: 高等教育出版社, 2004. 256.
- [2] 江苏新医学院. 中药大词典(上册)[M]. 上海: 科学技术出版社, 1994. 8.
- [3] 陈敏艳, 梁宗锁, 王喆之, 等. 地黄组织培养及植物再生的研究[J]. 西北植物学报, 2004, 24(6): 1083-1087.
Chen M Y, Liang Z S, Wang Z Z, et al. Tissue culture and plantlet regeneration of *Rehmannia glutinosa* [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 2004, 24(6): 1083-1087.
- [4] 施和平, 权 宏. 紫花洋地黄的组织培养和植株再生[J]. 中草药, 2004, 35(3): 327-328.
Shi H P, Quan H. Tissue culture and plantlet regeneration of *Digitalis purpurea* L. [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2004, 35(3): 327-328.
- [5] 孙国峰, 张金政. 匍匐婆婆纳“霍尔特夫人”的组织培养和快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2006, 42(4): 674.
Sun G F, Zhang J Z. Tissue culture and rapid propagation of *Veronica prostrata* L. 'Mrs. Holt' [J]. *Plant Physiology Communications*, 2006, 42(4): 674.
- [6] 王小菁, 李 玲. 植物生长调节剂在植物组织培养中的应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002. 47.
- [7] 王 忠. 植物生理学(第二版)[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002. 272.
- [8] 刘 帆, 倪 苏, 李方安. 提高卷叶贝母组织培养的植株再生率的研究[J]. 植物生理学通讯, 2006, 42(1): 170.
Liu F, Ni S, Li F A. Study on improving plant regeneration rate in tissue culture of *Fritillaria cirrhosa* D. Don [J]. *Plant Physiology Communications*, 2006, 42(1): 170.

(本文审稿: 王永清)