

高原野生濒危药材独一味的组培快繁技术研究

王慧春, 王 勃, 王思文, 王文颖 (青海师范大学生命与地理科学学院, 青海西宁 810008)

摘要 [目的]探究独一味组培快繁技术体系,保护并合理利用独一味资源。[方法]选取独一味无菌苗的子叶、嫩芽和幼根为外植体,采用不同类型的培养基和不同种类的植物生长调节剂进行组培快繁研究。[结果]独一味幼叶、嫩芽和幼根均可诱导出愈伤组织,其中幼根的愈伤组织诱导率最高,达93.5%,出愈时间为7 d,最适诱导培养基为MS+1.0 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA;丛生芽诱导的适宜培养基为MS+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA,诱导率达88.8%;生根的适宜培养基为1/2 MS+0.5 mg/L NAA,诱导率高达97.9%。[结论]利用组织培养技术能够实现独一味的快速繁殖,为独一味资源的可持续利用提供参考。

关键词 独一味 [*Lamiophlomis rotata* (Benth.) Kudo]; 组织培养; 愈伤组织; 植物生长调节剂

中图分类号 S567.239 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)19-06133-03

Research on the Tissue Culture of *Lamiophlomis rotata* (Benth.) Kudo

WANG Hui-chun et al (College of Life and Geography, Qinghai Normal University, Xining, Qinghai 810008)

Abstract [Objective] It is of significance to establish tissue culture system of *Lamiophlomis rotata* (Benth.) Kudo in order to rationally protect and utilize its resources. [Method] The cotyledons, tender shoots and tender roots of the aseptic seedling as explants were cultured in the media with different plant growth regulators to find out more reasonable medium formula for the induction of callus, cluster buds and rooting. [Results] The tender roots were the optimal explants with the highest callus induction rate (93.5%) and the shortest induction time (7 d), and the best medium for callus induction was MS + 1.0 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA; The optimal medium for cluster buds induction was MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA, induction rate was 88.8%; The optimal medium for rooting culture was 1/2 MS + 0.5 mg/L NAA, in which the frequency roots reached 97.9%. [Conclusion] This effective approach for rapid propagation would better ensure the sustainable use of *Lamiophlomis rotata* (Benth.) Kudo.

Key words *Lamiophlomis rotata* (Benth.) Kudo; Tissue culture; Callus; Plant growth regulator

独一味 [*Lamiophlomis rotata* (Benth.) Kudo] 为唇形科独一味属仅有的一种植物,是多年生草本植物,全草入药,是我国藏、蒙、纳西等民族民间常用草药之一,具有较高的药用价值与经济价值^[1-2]。独一味野生资源主要分布于青海、甘肃、四川、西藏等地,蕴藏量为3 713~6 896 t,年允收量为908~1 675 t,但年实际采收量为2 520 t;独一味采挖地上部分之后,恢复到药用价值的周期一般为4年,高海拔地区在5年以上,使该资源的利用变得不可持续^[3]。很多采挖过度的产地,植株极其矮小,加之草地退化与沙化,导致独一味资源种群退化相当严重,野生抚育尚存在诸多困难^[4]。2000年已将其列为一级濒危藏药品种^[5]。因此,为了满足人们对独一味药材日益增长的需求,在加强野生资源保护的前提下,应加强人工繁殖,组织培养则是当前最有效的繁殖手段^[6-7]。笔者初步探讨独一味组织培养条件,旨在为独一味的可持续利用奠定基础。

1 材料与与方法

1.1 材料 将采自青海果洛地区的野生独一味 [*Lamiophlomis rotata* (Benth.) Kudo] 种子用0.2%升汞灭菌8 min,用无菌水反复冲洗后,接种到MS无激素培养基上。培养3周后长出无菌幼苗。

1.2 方法

1.2.1 培养条件。培养基(pH 5.8)在121℃、131 kPa的条

件下灭菌20 min。光源为日光灯,光照强度设置为2 000~3 000 lx,光照16 h/d,培养温度为(25±1)℃,在RXZ智能人工气候箱内进行。

1.2.2 基本培养基和外植体对愈伤组织诱导的影响。在无菌条件下,将无菌苗幼叶切成约0.5 cm×0.5 cm的小块,嫩芽和幼根切成0.5 cm的切段,分别接种在附加有0.5 mg/L 6-BA, 1 mg/L 2,4-D, 0.5 mg/L NAA的MS、B₅、N₆和White的培养基上,每处理50个外植体,重复3次。观察各培养基上外植体产生愈伤组织情况,30 d后,统计愈伤组织诱导率(愈伤诱导率(%) = 愈伤组织数/接种后未污染的外植体数×100)。

1.2.3 植物生长调节剂对愈伤组织诱导的影响。将0.5 cm左右的幼根切段分别接种到附加不同质量浓度6-BA、NAA、2,4-D的MS基本培养基上,进行愈伤组织诱导培养。每处理50个外植体,重复3次。观察并记录愈伤组织产生情况,30 d后,统计诱导率。

1.2.4 丛生芽的诱导。选取生长状态良好的愈伤组织颗粒,分散后接种到附加有不同质量浓度的6-BA和NAA的MS培养基上,进行丛生芽诱导。每处理接种50个愈伤组织颗粒,重复3次。观察丛生芽诱导情况,30 d后,统计分化率(分化率(%) = 已分化的愈伤组织数/接种的愈伤组织总数×100)和分化不定芽的生长状况。

1.2.5 生根的诱导。将生长旺盛的丛生芽分割成单芽后转接到附加有不同质量浓度的6-BA或NAA的MS或1/2MS培养基上进行生根培养。每处理接种50个不定芽,重复3次。观察并统计生根情况(生根率(%) = 有生根现象数/原接种数×100)和生根系数(生根系数 = 生根条数/有生根现象数)。

基金项目 国家自然科学基金项目(31260127);教育部科学技术重点项目(209133);青海省科技厅国际合作项目(2010-H-809);青海师范大学科技创新项目(019040910);青海师范大学教学研究项目(20123626)。

作者简介 王慧春(1974-),女,青海海东人,副教授,博士,从事青藏高原药用植物资源的可持续利用研究。

收稿日期 2014-06-05

1.2.6 移栽驯化。将生根状态基本一致的试管苗,经过3 d开瓶炼苗后,洗净培养基,分别移栽到河沙、蛭石、腐殖土、腐殖土+蛭石(7:3)和腐殖土+河沙(7:3)5种栽培基质中,并保持基质相对湿度85%左右。每种基质移栽10株试管苗,3次重复。经过30 d栽培驯化后,观察并统计试管苗的生长状况及成活率(成活率(%)=成活数/炼苗株数×100),筛选出最佳移栽基质。

2 结果与分析

2.1 基本培养基和外植体对愈伤组织诱导的影响 由表1可知,幼根愈伤组织诱导率以MS培养基为最高,达93.5%,White培养基最低,仅53.6%。幼叶愈伤组织诱导率以B₅培养基为最高,达83.1%,MS培养基次之(80.9%),N₆培养基较差(41.6%),White的诱导率最低(29.4%)。嫩芽愈伤组织诱导率以MS培养基为最高,达84.8%,其次B₅培养基为79.8%,在White培养基上最低(39.7%);从愈伤组织的生长状况来看,MS培养基上生长最好,愈伤组织呈浅黄绿色,质地较疏松,White培养基上愈伤组织生长最缓慢,色暗且较硬;比较不同外植体的愈伤诱导率发现,幼根的愈伤诱导率最高,其次为嫩芽,幼叶的诱导率则较低。由此得出,MS作为诱导独一味愈伤组织诱导和培养的最佳基本培养基,幼根为最佳外植体。

表1 培养基和外植体对愈伤组织诱导的影响

培养基	幼根诱导率	幼叶诱导率	嫩芽诱导率	愈伤组织 生长状态
	%	%	%	
MS	93.5±0.2	80.9±0.5	84.8±1.2	***
B ₅	81.7±1.1	83.1±0.9	79.8±1.2	***
N ₆	73.8±0.3	41.6±1.4	72.7±2.3	**
White	53.6±2.4	29.4±0.7	39.7±0.7	*

2.2 植物生长调节剂对愈伤组织诱导的影响 以独一味无茵苗的幼根为外植体,分析不同质量浓度植物生长调节剂对诱导愈伤组织的影响。由表2可知,在MS+1.0 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA的培养条件下,外植体的愈伤诱导率最高,达93.5%,且出愈时间最短(7 d),愈伤组织呈淡黄且较疏松,生长速度快。因此,愈伤组织诱导和培养的最适培养基为MS+1.0 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA,pH 5.8。

表2 不同植物生长调节剂对愈伤组织诱导率的影响

培养基	植物激素//mg/L			诱导率 %	出愈时 间//d	愈伤组织 生长状况
	2,4-D	6-BA	NAA			
1	0.5	0.25	0.5	61.2±0.6	9	**
2	1.0	0.5	0.5	93.5±0.2	7	***
3	1.5	1.0	0.5	76.2±0.7	9	**
4	0.5	0.5	1.0	89.2±0.4	10	***
5	1.0	1.0	1.0	85.8±0.5	8	***
6	1.5	0.25	1.0	81.4±1.5	8	***
7	0.5	1.0	0.25	63.6±2.3	11	*
8	1.0	0.25	0.25	67.3±0.8	13	**
9	1.5	0.5	0.25	68.8±1.1	12	**

2.3 植物生长调节剂对丛生芽诱导的影响 将在MS+1.0

mg/L 2,4-D+0.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA培养基上生长状况良好的幼根愈伤组织进行丛生芽诱导。由表3可知,5号培养基上,第19天愈伤组织基部边缘出现绿色小芽点,培养30 d后,有大量较粗状、长势好的不定芽出现,诱导率达88.8%。2、7号培养基上,第23天有少量愈伤组织产生不定芽,且生长速度较快。1、4、8号培养基上的愈伤组织于第27天才开始出现不定芽,且芽较细弱,生长缓慢。3、6、9号培养基上的愈伤组织分别在第24、25、26天分化出丛生芽,但基部愈伤组织有褐化现象。通过比较不同培养基上的丛生芽诱导结果得出,丛生芽诱导的最适培养基为MS+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA。

表3 植物生长调节剂对丛生芽诱导的影响

培养基	植物激素//mg/L		化率 %	出芽时 间//d	愈伤组织 生长状况
	6-BA	NAA			
1	0.5	0.0	44.2±1.4	27	增长分化较慢
2	1.0	0.0	79.7±0.7	23	增长分化较快
3	1.5	0.0	63.5±1.5	25	后期易褐化死亡
4	0.5	0.5	49.4±1.0	27	增长分化较慢
5	1.0	0.5	88.8±0.4	19	增长分化最快
6	1.5	0.5	80.1±0.7	24	后期易褐化死亡
7	0.5	1.0	72.4±2.1	23	增长分化较快
8	1.0	1.0	63.3±1.4	27	增长分化较慢
9	1.5	1.0	56.4±0.8	26	后期易褐化死亡

2.4 组培苗生根的诱导 以1/2MS为基本培养基,附加0.5 mg/L NAA时,培养7 d就出现白根,30 d后组培苗的生根率和生根系数均达最高,分别为97.9%和7.5,根粗长且主根较发达;随着NAA和6-BA浓度的增加,出根时间逐渐延长,生根系数与生根率均逐渐减小,说明高浓度的NAA和6-BA对独一味生根有抑制作用;以MS为基本培养基,附加0.5 mg/L NAA或6-BA时,生根诱导率和生根系数无明显差异,但均低于1/2MS并附加同浓度NAA和6-BA体系的诱导率,且出根时间相对较长。由此可见,独一味生根诱导以1/2MS基本培养基为宜,且低浓度的NAA和6-BA促进生根。生根培养基的最适配方为:1/2MS+0.5 mg/L NAA(表4)。

2.5 移栽驯化 由表5可知,以腐殖土+蛭石(7:3)为移栽基质时,平均成活率高达90%,其次是腐殖土+河沙(7:3),平均成活率为80%,这2种基质上长大的苗枝干较粗壮。因此,建议优选腐殖土+蛭石(7:3)作为独一味试管苗移栽驯化的最佳培养基。

3 结论与讨论

植物组织培养中,愈伤组织的形成,乃是停止分裂活动的组织细胞产生一种“返老还童”的现象,并再次呈现分裂功能的过程^[8]。诱导愈伤组织是植物组织培养中的一个关键,影响愈伤组织诱导的因素很多,譬如培养基、植物生长调节剂、外植体类型等。不同外植体在不同培养基中的诱导状况通常不同。以独一味的幼根、幼叶和嫩芽为外植体诱导愈伤组织时,不同外植体在不同基本培养基上诱导率存在明显差异,其中幼根和嫩芽在MS基本培养基上愈伤组织诱导率最高,幼叶在B₅上诱导率最高。

表 4 培养基和生长素对生根的影响

培养基	基本培养基	生长素//mg/L		生根率 %	生根系数	生根时间 d	生根情况
		6-BA	NAA				
1	1/2MS	0.5	0	67.3 ± 2.1	6.2	9	根多且粗长,主根发达
2	1/2MS	1.0	0	64.2 ± 0.4	4.9	12	根多且细长,主根不发达
3	1/2MS	1.5	0	59.9 ± 1.5	4.3	15	根少且细长,主根不发达
4	1/2MS	0	0.5	97.9 ± 0.4	7.5	7	根多且粗长,主根发达
5	1/2MS	0	1.0	78.6 ± 1.2	5.7	8	根多且细长,主根不发达
6	1/2MS	0	1.5	61.3 ± 0.6	4.5	13	根少且细长,主根不发达
7	MS	0.5	0	60.6 ± 1.0	5.1	11	根少且细短,主根不发达
8	MS	0	0.5	59.5 ± 1.7	5.2	10	根少且细短,主根不发达

表 5 不同基质对独一味试管苗移栽成活率的影响

试验号	移栽基质	移栽株数	平均成活	成活率
			株数	%
1	蛭石	10	6	60 ± 2.5
2	河沙	10	5	50 ± 1.7
3	腐殖土	10	7	70 ± 1.4
4	腐殖土 + 蛭石(7:3)	10	9	90 ± 0.6
5	腐殖土 + 河沙(7:3)	10	8	80 ± 1.2

除了基本营养物质以外,为了促进愈伤组织的诱导率,通常有必要在培养基中加入一种或一种以上的植物生长调节物质,尤其是生长素和细胞分裂素^[9]。在诱导愈伤组织时,宜采用较高质量浓度的生长素,若生长素浓度过低,则表现为组织块不能生长,时间过长,植物组织会死亡;但在分化阶段,宜采用较低浓度的生长素,若生长素浓度过高,则表现为愈伤组织生长旺盛,细胞团过于松散,不利于分化出苗^[10]。一般情况下,细胞分裂素水平略高于生长素水平,但是过高水平的细胞分裂素倾向于诱导不定芽的形成,同时,促使侧芽增生加速,结果形成过于细密的不定芽,使嫩芽质量下降,不利于下一步的生根和种植^[11-12]。本研究结果也证明了这一点,当细胞分裂素 6-BA 与生长素 2,4-D、NAA 的质量浓度分别为 0.5、1.0、0.5 mg/L 时,诱导出的愈伤组织生长量多且呈浅黄绿色,当三者的浓度分别为 1.0、0.5、0.25 mg/L 时,愈伤组织诱导率显著较低,且愈伤组织较硬,生长缓慢。在分化阶段,当 6-BA 和 NAA 的浓度分别为 1.0、0.5 mg/L 时,不定芽的诱导率高,但在 NAA 浓度保持 0.5 mg/L 条件下,6-BA 浓度增至 1.5 mg/L 时,愈伤组织后期出现褐化现象,最后死亡,若 6-BA 浓度降至 0.5 mg/L 时,愈伤组织增长分化缓慢。

有学者认为,在植物组培快繁中,根的形成要经过根原基的诱导和根分化两个阶段,在第 1 阶段激素诱导是不可或缺的,另外,可适当使用低糖、低盐以刺激根原基的形成,提高生根率;第 2 阶段对激素是不敏感的,甚至持续在有激素的培养基上培养会影响根的分化及伸长,此阶段需要提供植物生长必需的营养成份如糖、无机盐等^[13-14]。本研究结果表明,在附加有同浓度的 6-BA 或 NAA 条件下,高盐浓度的 MS 培养基明显抑制了独一味组培苗的离体生根,当使用 1/2MS 培养基时生根效果较好,且生出的根较粗长,主根发

达,与自然根形态较接近,这不仅有利于水分及营养物质的吸收,还有利于植株营固着生活。另有研究报道,6-BA、NAA 对植物组织培养瓶苗生根均有一定的促进作用^[15]。试验结果表明,在 1/2MS 基本培养基上,低浓度的 6-BA 或 NAA 均有利于根的生成,而高浓度的 6-BA 或 NAA 均表现出一定的抑制作用,这可能是前期培养阶段所用激素水平影响了培养物的内源性激素差异,从而表现出对生根的抑制作用。

在独一味组培苗的移栽驯化过程中,选用适宜的培养基质是很关键的。当用单一的蛭石、河沙和腐殖土为培养基质时,腐殖土上移栽的组培苗的移栽成活率最高,其次是蛭石。这是因为腐殖土具有良好的水肥供应能力,能为独一味幼苗生长提供一个稳定持久的土壤环境;相对于河沙而言,蛭石是一种更为疏松的栽培基质,良好的透气性使其有利于幼苗弱小根系的生长、伸展。当腐殖土与蛭石按一定比例混合使用时,因兼具有保肥、保水、透气性好等特点,而更有利于幼苗的生长和发育,故幼苗成活率明显高于单一基质。

参考文献

- [1] 中华本草编委会. 中华本草. 第 7 册. 第 19 卷[M]. 上海:上海科技出版社,1999:56.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:245.
- [3] 孙辉,蒋舜媛,冯成强,等. 独一味 *Lamiophlomis rotata* 野生资源现状与存在的问题[J]. 中国中药杂志,2012,37(22):3500-3505.
- [4] 金兰,韩鸿萍,丁莉,等. 青海独一味在低海拔移栽地传粉及结实率的研究[J]. 种子,2012,31(9):41-47.
- [5] 李隆云,占堆,卫莹芳,等. 濒危藏药资源的保护[J]. 中国中药杂志,2002,27(8):562.
- [6] 钱子刚. 药用植物组织培养[M]. 北京:中国中医药出版社,2007.
- [7] 高文元,贾伟. 药用植物大规模组织培养[M]. 北京:化学工业出版社,2005.
- [8] 孙敬三. 植物细胞工程实验技术[M]. 北京:科学出版社,1995:67.
- [9] 周维燕. 植物细胞工程原理与技术[M]. 北京:中国农业大学出版社,2001.
- [10] 陈桂信,谢文龙,潘东明,等. 木奈幼胚胚性愈伤组织诱导的研究[J]. 江西农业大学学报,2006,28(1):44-49.
- [11] 韦三立,李丽虹. 球根花卉[M]. 北京:中国农业出版社,2000.
- [12] 刘云龙,王本昌. 组织培养中植物生长调节剂的调控[J]. 农业与技术,1996(2):23-25.
- [13] 陈穗云,陈永哲,任群. 石刁柏花药培养再生植株的生根研究[J]. 植物学报,1998,40(5):425-429.
- [14] 赵洁,程井辰. 生长调节物质对石刁柏愈伤诱导及其根芽分化的影响[J]. 植物生理学通讯,1991,27(4):253-255.
- [15] 李俊明. 植物组织培养教程[M]. 北京:北京农业大学出版社,1991:67-68.