

活血丹子叶无性系建立的研究

张 瑜, 柏彦伸, 孙靖靓, 宁淑香, 姜长阳

(辽宁师范大学 生命科学学院, 辽宁 大连 116029)

摘要:为保护资源和实现栽培,以活血丹的子叶为材料,采用组织培养的方法,进行了愈伤组织诱导与分化、试管苗生根、继代增殖、扦插和定植的研究,建立起无性系。结果表明:MS+KT $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +2,4-D $1.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 是愈伤组织诱导培养和继代增殖培养的理想培养基;1/2MS+AgNO₃ $0.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +ZT $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +NAA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 是愈伤组织分化培养的理想培养基;用浓度为 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ABT2 号溶液对不定芽进行 48 h 处理、N₆+IAA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 是不定芽生根培养的理想培养基;N₆+ABT2 号 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +IAA $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 是试管苗生根继代增殖培养的理想培养基;试管苗扦插成活率为 96.3%,定植成活率为 98.2%;定植的试管苗保持了活血丹的所有植物学性状。

关键词:活血丹;组织培养;无性系

中图分类号:S567.23⁺9

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2012)11-0021-04

活血丹(*Glechoma longituba*)又称佛耳草、金钱草、连钱草等,属于唇形科连钱草属多年生草本植物^[1],生长在林缘和溪边等环境中,在辽宁省的沈阳、大连、鞍山及抚顺等地也有分布^[2]。活血丹的茎叶含左旋松樟酮、对聚伞花素、异薄荷酮、柠檬烯等化学成分,作中草药用,具有利湿清热、散瘀消肿等功效,能治热淋石淋、湿热黄疸、暑热症、伤风咳嗽、胎咳、子肿、小儿疳积、疮痈肿痛、牙痛、跌打损伤等疾病^[3]。另外,活血丹也是一种人们常吃的山野菜^[4]。由于活血丹既有重要的药用价值,又具有一定的食用价值,长期以来,人们一直在大量的采集药用或食用,从而导致野生活血丹锐减,使大连地区的活血丹资源濒危。因此,有人试图进行栽培,但又难以得到栽种所需要的大量种子,无法实现栽培。为保护活血丹衍生资源,满足栽培对种苗的需求,研究者进行了野生活血丹子叶和下胚轴无性系建立的研究。虽然已有活血丹组织培养研究的报道^[5-7],但迄今未见活血丹子叶无性系建立研究的报道。

1 材料与方法

1.1 材料灭菌及无菌苗的获得

2009年9月,将生长于大连郊区山坡林缘的

活血丹种子采回实验室后,置于 100 mL 的磨口广口瓶中,用自来水洗涤 3 次后,用蒸馏水洗涤 3 次,再用 0.005% 的安利洗涤液洗涤 10 min。接着,用蒸馏水洗涤将安利液洗净,转移到超净工作台上,用 75% 的酒精灭菌约 15 s,迅速用蒸馏水漂洗 3 次。再用 0.05% 的 HgCl₃ 灭菌 15 min,然后用无菌水洗涤 5 次,将洗涤的无菌水倒净,把磨口的瓶盖盖严后,放到 25℃ 恒温箱中处理 24 h 后,再用 0.05% 的 HgCl₃ 灭菌 15 min,并洗涤 5 次,即可获得无菌种子。将无菌种子接种到 1/2 MS0+蔗糖 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基上,在 25℃ 的温箱中培养 10~15 d,即可获得活血丹的灭菌苗。

1.2 培养条件

培养基加蔗糖 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,培养基 pH6.2,动力强度为 $240 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-2}$ ^[8];在温度为 26℃,光照强度为 3 500 lx、12 h·d⁻¹ 的条件下培养^[9]。

1.3 方法

1.3.1 愈伤组织的培养 将无菌苗子叶剪成边长为 0.2 cm 左右的块状,将下胚轴切成长约 0.6 cm 的轴段后,接种到以 MS+KT $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 为基本培养基,附加浓度分别为 0.9、1.8、2.7 mg·L⁻¹ 的 IAA、NAA、2,4-D、IBA 的培养基上,进行愈伤组织的诱导培养,试验重复 3 次,每种处理接种 100 块材料。

1.3.2 愈伤组织分化的培养 把诱导的子叶愈伤组织经增殖培养的颗粒愈伤组织,在培养瓶内分成由 5~10 个颗粒组成的愈伤组织块后,接种到附加浓度不同的 NAA、IBA、IAA 的 1/2MS+AgNO₃ $0.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +ZT $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基上,进

收稿日期:2012-09-01

基金项目:辽宁省普通高等教育本科教学改革研究资助项目(201203041-4);辽宁省大学生创新创业训练资助项目(201203015011)

第一作者简介:张瑜(1992-),女,辽宁省沈阳市人,在读学士,从事植物组织培养研究。

通讯作者:姜长阳(1953-),男,辽宁省大连市人,学士,教授,从事植物技术研究。E-mail:changyangjiang@126.com。

行分化培养试验。分化试验重复 2 次,每种培养基接种 100 块材料。

1.3.3 不定芽的生根培养 向培养着丛生不定芽的培养瓶内加入 5 mL 浓度为 $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 ABT2 号溶液,将不定芽处理 48 h 后,把不定芽从基部切下,接种到附加 $0.4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IAA 的 1/4MS、White、 B_5 、 N_6 和 LS 五种培养基上,进行生根试验。试验重复 3 次,每种培养基接种 100 个材料。

1.3.4 试管苗的扦插和定植 将增殖培养的试管苗从瓶中拔取,放到底部有一层深 $0.5\sim 1.0\text{ cm}$ 的 ABT2 号溶液的塑料盘中,处理并炼苗 3 d,然后将试管苗根部剪掉,再把上部从中间剪开,形成两个茎段后,把每个茎段的下部叶剪掉,上部保留 $1\sim 2$ 个叶片,接着,把茎段下部插入已浇透水、上层为干净河沙、并事先打上小孔的温室营养钵中。扦插试验重复了 2 次,扦插的茎段数量分别为:980、1 050 段。扦插后前 12 d 内保持湿度 $90\%\sim 95\%$ 、温度 19°C 以上和无直射光的环境条件。5 月中旬,将在温室中扦插成活的试管苗定植到大连郊区的溪旁,共定植 1 940 株,定植后进行正常管理。

2 结果与分析

2.1 不同浓度生长素对子叶和下胚轴愈伤组织诱导培养的影响

由表 1 可见,培养到 50 d 时,在附加不同浓

表 1 不同浓度生长素对子叶和下胚轴愈伤组织诱导培养的影响

Table 1 Effects of auxins concentrations on the differentiation of callus of cotyledon and hypocotyl

生长素 Auxins	浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Concentration	诱导率/% Induction rate	愈伤组织色泽、形态及平均大小/cm Color, species and media of callus	长势 Growth
无	0	0	0	—
IAA	0.9	0	0	—
IAA	1.8	5	白色、松软、0.3	+
IAA	2.7	3	白色、松软、0.2	+
NAA	0.9	38	白黄相间、较硬、0.8	++
NAA	1.8	59	白黄浅绿相间、较硬、1.3	++
NAA	2.7	56	白黄浅绿相间、较硬、1.6	++
2,4-D	0.9	64	浅绿、表面较光滑、1.9	++
2,4-D	1.8	93	嫩绿色、表面颗粒状、1.9	+++
2,4-D	2.7	91	浅绿、表面凸凹、1.9	++
IBA	0.9	0	0	—
IBA	1.8	0	0	—
IBA	2.7	0	0	—

注:—为不生长;+生长较差;++生长一般;+++生长旺盛。下同。

Note:—indicate no growth;+indicate worse growth;++indicate normal growth;+++indicate good growth. The same below.

度 2,4-D 的培养基上,愈伤组织的诱导生长效果较好;其中在 2,4-D 的浓度为 $1.8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 这一培养基上,诱导生长愈伤组织的诱导生长效果最好;不仅愈伤组织的诱导率最高,而且愈伤组织生长得最大,色泽、形态和长势都较理想。对培养过程的观察还表明,在附加浓度为 $1.8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D 这种培养基上,培养 7 d 可见有的材料开始生长出愈伤组织;培养到 45 d 时,诱导生长的愈伤组织就生长为半球形,表面为嫩绿色颗粒状、生长非常旺盛的愈伤组织。把在附加浓度为 $1.8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D 这种培养基上由子叶诱导培养的嫩绿色、颗粒状愈伤组织分割大小为 $0.3\sim 0.4\text{ cm}$ 的愈伤组织块,继续接种到附加浓度为 $1.8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D 这种培养基上进行愈伤组织的继代增殖培养。经过 46 d 的培养,就可以培养生长一代与用子叶块为材料,在这种培养基上诱导培养 50 d 生长的几乎完全一样的嫩绿色颗粒半球状愈伤组织块。重复的 3 次试验,每次试验增殖 6 代的统计证明:平均每代愈伤组织的增殖系数为 24.6。3 次重复试验的结果基本一致。以子叶为材料进行愈伤组织诱导和继代增殖培养的结果证明:MS+KT $0.4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +2,4-D $1.8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 是活血丹子叶诱导愈伤组织培养与增殖培养的理想培养基。

2.2 不同浓度生长素对愈伤组织分化培养的影响

由表 2 可见,培养至 54 d 时,在附加浓度不同的 NAA 的培养基上培养的愈伤组织分化效果较好。其中在附加浓度为 0.1 mg·L⁻¹ NAA 的培养基上,分化效果最好。不仅分化率为 96%、培养的每块愈伤组织平均能分化出 3.6 个不定芽,而且不定芽长势好。对分化培养过程的观察还显示,在附加浓度为 0.1 mg·L⁻¹ NAA 的培养基上

培养到 6 d 时,就可见在愈伤组织块的顶端形成大小 0.1~0.2 cm 的不定芽;培养到 54 d 时,每个愈伤组织块就会分化生长一个由 2~7 个、高 0.5~1.3 cm、外观长势较旺盛的不定芽丛。2 次重复试验统计结果大致相同。结果证明:活血丹子叶愈伤组织分化培养的理想培养基为 1/2 MS+AgNO₃ 0.7 mg·L⁻¹+ZT 0.2 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹。

表 2 不同浓度生长素对愈伤组织分化培养的影响

Table 2 Effects of auxins concentrations on the differentiation of callus					
IBA/ mg·L ⁻¹	IAA/ mg·L ⁻¹	NAA/ mg·L ⁻¹	分化率/% Differentiation	平均分化不定芽个数 Differentiate buds on each callus	长势 Growth
0	0	0	0	0	—
0.1	0	0	0	0	—
0.5	0	0	0	0	—
1.0	0	0	0	0	—
1.5	0	0	0	0	—
0	0.1	0	29	1.3	+
0	0.5	0	35	1.2	+
0	1.0	0	0	0	—
0	1.5	0	0	0	—
0	0	0.1	96	3.6	++
0	0	0.5	41	2.3	+
0	0	1.0	16	2.1	+
0	0	1.5	11	1.0	+

2.3 不同培养基对不定芽生根培养的影响

培养到 30 d 时统计,结果证明:以 N₆ 为基本培养基的生根效果最好。在这种培养基上,3 次重复实验的平均生根率达到了 97.6%,平均每株试管苗的高度 4.8 cm、具有 7.3 条白色根、6.4 个叶片、茎粗 0.23 cm,外观上试管苗生长非常旺盛。把由不定芽生根培养的试管苗,切成至少有 2 个叶片、长约 1.5 cm 的茎段后,直接接种到 N₆+ABT2 号 0.5 mg·L⁻¹+IAA 0.4 mg·L⁻¹ 这种培养基上,进行生根继代增殖培养。3 次重复试验,每次增殖 7 代的统计结果表明:28 d 为一个增殖培养周期,会培养出一代长势与不定芽 30 d 为一个生根周期培养的试管苗长势一致每个培养

周期的繁殖系数为 2.7,几乎没有无效苗。说明:对不定芽用浓度为 2.0 mg·L⁻¹ 的 ABT2 号溶液进行 48 h 处理后,不定芽生根培养的理想培养基是 N₆+IAA 0.4 mg·L⁻¹;试管苗生根继代增殖培养的理想培养基是 N₆+ABT2 号 0.5 mg·L⁻¹+IAA 0.4 mg·L⁻¹。

2.4 试管苗的扦插与定植

扦插成活后 14 d 可长出新叶,扦插 30 d 后的平均成活率为 96.3%。

定植后 40 d 统计,共成活 1 905 株,扦插成活率为 98.2%。扦插成活的试管苗 50 d 后生长加速,后期长势非常旺盛,翌年正常开花结果,并且试管苗具有活血丹所有的植物学性状。

3 结论与讨论

在以往的活血丹研究中^[7],把嫩茎作为材料用于愈伤组织的诱导培养,培养基中添加浓度为 $2.0\sim 2.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的2,4-D得到了理想的效果,这种结果与该研究基本一致。由此再一次证明,在植物组织培养研究的愈伤组织诱导中,常用的IAA、NAA、2,4-D和IBA四种生长素中,2,4-D对愈伤组织的诱导作用最强。但是,在愈伤组织分化、不定芽生根及生根继代增殖培养研究中,该研究得到的理想培养基与前人的研究有所差异,这是由于研究材料的差异引起的。前人的研究所采用的是嫩茎,而该研究采用的是子叶,并且其子叶是来自种子的。种子的形成过程会由于杂交等形成新的基因型,这样就会引起与前人的研究材料的基因型的差异,从而导致研究过程理想培养基的差异。

在该研究中,采用试管苗增殖培养和扦插2种方法进行快速繁殖。试管苗增殖培养28 d为1个培养周期的繁殖系数为2.7。这种方法1株试管苗1 a能繁殖约为40万株试管苗。扣除多种非正常因素的影响,1 a繁殖20万株试管苗完

全能得到保证。而后者的扦插方法,又将使繁殖速度提高近1倍。因此,即使在繁殖过程中受到多种不利因素的影响,用这2种方法进行快速繁殖,一年之内都能繁殖出数万株试管苗,这完全能满足栽培和资源保护对种苗的需求。

参考文献:

- [1] 任建华,朱勇,廖文燕. 草地被植物——活血丹[J]. 南方农业:园林花卉版,2007(6):20-23.
- [2] 李书心. 辽宁植物志(下册)[M]. 沈阳:辽宁科学技术出版社,1991:204-205.
- [3] 南京中医药大学. 中草药大辞典(下册)[M]. 上海:上海科学技术出版社,2006:2415-2416.
- [4] 李品汉. 药食兼用芳香型野菜野菜——活血丹[J]. 科学种养,2007(9):31-32.
- [5] 陈光登,黎云祥,韩素菊,等. 活血丹组织培养与快速繁殖的研究[J]. 广西植物,2007,27(2):265-271.
- [6] 徐娜,宁淑香,李洁,等. 活血丹嫩茎无性系建立的研究[J]. 现代园艺,2011(2):4-6.
- [7] 陶建平,钟章程. 匍匐茎活血丹在不同养分条件下的形态克隆[J]. 生态学报,2000,20(2):207-211.
- [8] 姜长阳. 培养基琼脂用量的商榷[J]. 植物生理学通讯,1992,28(2):155.
- [9] 刘书宇,刘祥,朱明,等. 紫薯试管苗热处理的效应[J]. 黑龙江农业科学,2011(11):10-12.

Study on Establishment of Clone for *Giechoma longituba*

ZHANG Yu, BAI Yan-shen, SUN Jing-liang, NING Shu-xiang, JIANG Chang-yang

(Life Science College of Liaoning Normal University, Dalian, Liaoning 116029)

Abstract: In order to protect wild resources and realize cultivation, the cotyledons were used as materials to do the research on callus induction and differentiation, rooting and transplanting of tube seedlings by using tissue culture methods, finally established clone of *Giechoma longituba*. The results showed that the optimum medium for callus induction and differentiation was $\text{MS}+\text{KT } 0.4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{2,4-D } 1.8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ and $1/2\text{MS}+\text{AgNO}_3\text{ } 0.7\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{ZT } 0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{NAA } 0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. After dealt with ABT 2 (concentration of $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) for 48 h, the adventitious buds could be induced rooting in the medium of $\text{N}_6+\text{IAA } 0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. The ideal medium for rooting of the subculture was $\text{N}_6+\text{ABT } 2\text{ } 0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{IAA } 0.4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. The transplanting survival rate of tube seedlings was 96.3% and stable planting survival rate was 98.2%. Colonization of plantlets maintained for all biological traits of *Giechoma longituba*.

Key words: *Giechoma longituba*; tissue culture; clone

欢迎加盟协办单位、理事会