

文章编号:1000-2340(2007)01-0033-05

不同植物生长调节物质对天目地黄 组织培养及植株再生的影响

赵楠¹, 武雯¹, 闫坤¹, 刘思涵¹, 李宏庆^{1,2}, 王幼芳¹

(1. 华东师范大学生命科学学院, 上海 200062; 2 上海市城市化

生态过程与生态恢复重点实验室, 上海 200062)

摘要:以天目地黄幼叶片为外植体, 研究不同植物生长调节物质对其组织培养和植株再生的影响。结果表明, 实验条件下, 诱导叶片分化形成愈伤组织的最佳培养基为 MS + 6-BA 1.0 mg · L⁻¹ + 2,4-D 0.2 mg · L⁻¹; 最佳的丛生芽分化培养基为 1/2 MS + 6-BA 1.0 mg · L⁻¹ + IBA 0.05 mg · L⁻¹; 诱导丛生芽生根的最佳培养基为 1/2 MS + IBA 0.1 mg · L⁻¹。并在此基础上探讨了组织培养技术在地黄属植物药用及园林方面的开发和利用前景。

关键词:天目地黄; 地黄属; 组织培养; 快速繁殖

中图分类号:Q 949.777.8

文献标识码:A

Effect of Different Plant Growth Regulators on Tissue Culture and Plantlet Regeneration of *Rehmannia chingii*

ZHAO Nan¹, WU WEN¹, YAN Kun¹, LIU Si-han¹, LI Hong-qing^{1,2}, WANG You-fang¹

(1. School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China;

2. Key Laboratory of Urbanization and Ecological Restoration, Shanghai 200062, China)

Abstract: With young leaves of *R. Chingii* as explants, a study was conducted on the effect of different plant growth regulators on its tissue culture and plantlet propagation. The results showed that the MS medium supplemented with 1.0 mg · L⁻¹ of 6-BA and 0.2 mg · L⁻¹ of 2,4-D had ideal effects on the induction of callus from leaf explants. The optimum medium of inducing adventitious buds from callus was 1/2MS + 6-BA 1.0 mg · L⁻¹ + IBA 0.05 mg · L⁻¹. In addition, founded that 1/2 MS + IBA 0.1 mg · L⁻¹ had the best inducing effect on root formation. The expected medicinal and gardening development and application prospect of *Rehmannia* species were discussed on this basis.

Key words: *R. chingii*; *Rehmannia*; tissue culture; rapid propagation

地黄 [*Rehmannia glutinosa* (Gaert.) Libosch. ex Fisch. et. Mey.] 是大宗常用中药材, 根茎入药^[1], 具有降血糖、利尿缓泻、消炎、保肝、耐缺氧、调节免疫功能^[2-4]的作用。针对地黄生产上存在的品种退化快但更新慢等问题, 组织培养、脱毒苗培养等技术已逐渐得以应用^[5-7]。地黄属 (*Rehmannia*) 约有 6 种, 地黄分布为朝鲜半岛和日本, 其余种均为中国特有的资源植物。其中天目地黄 (*R.*

chingii H. L. Li)、裂叶地黄 (*R. piasezkii* Maxim.)、高地黄 (*R. elata* N. E. Brown) 植株高大, 花冠紫红色, 抗逆性强; 湖北地黄 (*R. henryi* N. E. Brown) 花冠淡黄白色; 茄叶地黄 (*R. solanifolia* Tsong et Chin) 株形及块根与地黄极相似。种间形态特征的这种相似性及差异性, 显示地黄属资源植物在新品种选育、地黄抗病虫害研究等方面具有广阔的应用前景。然而, 目前的研究仅局限于地黄的

收稿日期: 2006-09-10

基金项目: 上海市科委重大项目 (44031672)

作者简介: 赵楠 (1982-), 女, 河南郑州人, 硕士研究生, 研究方向为资源植物学; 通讯作者: 李宏庆。

种,制约了地黄属资源植物的开发利用和中药地黄新品种的培育。作者以天目地黄叶片为外植体探讨组织培养试验条件,旨在获得适用于地黄属全部物种的快繁技术,为地黄药用及花卉新品种的选育提供技术平台。

1 材料与方法

1.1 试验材料

材料采集于华东师范大学生物站。

1.2 试验方法

1.2.1 材料处理 于真叶期将天目地黄5~6片上部叶片剪下(2 cm×3 cm),流水冲洗2 h后,先用质量分数75%的酒精浸泡10~15 s,之后用无菌水冲洗3次,然后用质量分数0.1%的 HgCl_2 消毒10~15 min,再用无菌水冲洗5~8次,用无菌滤纸吸去叶片表面的水分。

1.2.2 愈伤组织的诱导 将处理好的叶片切成约1 cm×1 cm的小块,在基本培养基MS及附加不同浓度6-苄基腺嘌呤(6-BA)和生长素2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)组合的愈伤组织诱导培养基上接种(A1~A7,见表1),培养基中蔗糖质量浓度为 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、琼脂为 $7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。每个组合培养基为20瓶,每瓶3个外植体。随时观察统计出愈时间,25 d后统计诱导率和愈伤生长量。

1.2.3 芽的诱导 将愈伤组织切成半颗黄豆大小转接入基本培养基MS或1/2 MS中添加不同浓度6-BA和生长素吲哚丁酸(IBA)、萘乙酸(NAA)组合的芽诱导培养基(B0~B14)中(见表1),MS培养基中蔗糖质量浓度为 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、琼脂 $7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,1/2 MS培养基中蔗糖质量浓度为 $15\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、琼脂 $7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。每个组合培养基为20瓶,每瓶3块愈伤组织。25 d后统计芽诱导率,诱导出的芽以肉眼可清晰分辨为标准。

1.2.4 根的诱导 待丛生芽长至2 cm高时转接入1/2 MS培养基添加不同浓度的生长素NAA或IBA的生根诱导培养基(C1~C10)中(见表1)。培养基中,蔗糖质量浓度为 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、琼脂 $6\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。每个组合培养基为20瓶,每瓶3个幼芽。10 d后观察生根情况,统计生根率、平均根数和平均根长。

1.2.5 培养条件和数据处理 培养温度为 $(25\pm 1)^\circ\text{C}$,光照度为2000 lx,光照时间为 $14\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ 。所获数据用SPSS11.0软件进行处理,方差分析用LSD法检验,检验水平 $P\leq 0.05$ 。

表1 不同植物生长调节物质培养基处理组合

Table 1 Media with different concentrations of various plant growth regulators

培养基编号 No. of media	MS	培养基处理组合/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) Media treatment of the bud induction			
		6-BA	2,4-D	IBA	NAA
A1	1	0	0		
A2	1	0.5	0.1		
A3	1	0.5	0.5		
A4	1	1.0	0		
A5	1	1.0	0.1		
A6	1	1.0	0.2		
A7	1	1.0	0.4		
B0	1	0		0	
B1	1	0.5		0.1	
B2	1	1.0		0.05	
B3	1	1.0		0.15	
B4	1	2.0		0.1	
B5	1	2.0		0.3	
B6	1	2.0		0.5	
B7	1/2	1.0		0.05	
B8	1/2	1.0		0.1	
B9	1/2	1.0		0.2	
B10	1	1.0		0	0.1
B11	1	2.0		0	0.1
B12	1	2.0		0	0.2
B13	1	2.5		0	0.2
B14	1	3.0		0	0.2
C1	1/2			0	0.1
C2	1/2			0	0.2
C3	1/2			0	0.3
C4	1/2			0	0.4
C5	1/2			0	0.5
C6	1/2			0.1	
C7	1/2			0.2	
C8	1/2			0.3	
C9	1/2			0.4	
C10	1/2			0.5	

2 结果与分析

2.1 不同植物生长调节物质组合对叶片外植体愈伤组织诱导的影响

以天目地黄叶片为外植体诱导愈伤组织的诱导率、出愈时间和生长状况见表2。表2表明A5和A6不仅启动率高,而且诱导时间短,12~16 d后整个叶片逐渐形成黄绿色愈伤组织,生长健康旺盛。A3和A7虽然诱导率高,但是愈伤组织生长状况不好、不能产生大量的愈伤组织。在植物生长调节物质组合中,6-BA $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和2,4-D $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 及6-BA $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和2,4-D $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 诱导外植体脱分化形成愈伤组织的效果好,尤以6-BA $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和2,4-D $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 效果最好,因此得出A6培养基对天目地黄叶片脱分化形成愈伤组织的效果最好(见图1)。

表 2 不同植物生长调节物质组合对愈伤组织诱导的影响

Table 2 Effect of different media treatments

on callus inductivity

培养基编号 No. of media	诱导率/% Induction rate	出愈时间/d Period	愈伤生长量 Amount of the callus
A1	0	-	-
A2	100	12	++
A3	100	15	+
A4	0	-	-
A5	100	16	+++
A6	100	12	++++
A7	100	25	++

注: +, ++, +++, +++++ 分别表示出愈量的多少

Note: +, ++, +++, +++++ in the table means the amount of callus, respectively



图 1 天目地黄在培养基 A6 上的愈伤组织诱导效果

Fig. 1 The callus introduction of *R. chingii* on No. A6 media

2.2 不同植物生长调节物质对芽诱导的影响

质量浓度及不同植物生长调节物质组合对诱导愈伤组织形成芽的影响见表 3。表 3 表明, MS 和 1/2MS 培养基对芽诱导的影响差异不显著, 诱导率主要与植物生长调节物质的浓度配比有关。不含任何植物生长调节物质的 MS 培养基 (B0) 上丛生芽的诱导率为 0, 可见愈伤组织不能分化形成芽, 会逐渐变黄, 褐化死亡。NAA, IBA 对芽的诱导呈现明显的差异, IBA 效果最好, 诱导率明显高于 NAA, 能形成大量丛生不定芽, 生长密集, 状况良好; NAA 对芽的诱导率不高, 只有 B10 达到 100%, 但是在 B10 培养基上不定芽的生长缓慢, 生长势比较弱, 不能形成大量不定丛芽。综合细胞分裂素和生长素之间的搭配, 结合芽的诱导率和生长状况, 可认为 B7 对天目地黄芽的诱导效果最好 (见图 2)。

表 3 不同植物生长调节物质组合对芽诱导率的影响

Table 3 Effect of different plant regulators

on bud inductivity

培养基编号 No. of media	诱导率/% Induction rates
B0	0.00
B1	100 a
B2	58.3 c
B3	78.3 b
B4	18.4 f
B5	65.0 c
B6	100 a
B7	100 a
B8	76.7 b
B9	100 a
B10	100 a
B11	20.0 ef
B12	30.0 de
B13	36.7 d
B14	0.00

注: 数据后有相同字母表示差异不显著。

Note: The same letters following the column data mean insignificant difference



图 2 天目地黄愈伤组织在培养基 B7 上丛生芽诱导效果

Fig. 2 The bud introduction of *R. chingii* form callus on No. B7 media

2.3 不同植物生长调节物质培养基对地黄属植物根诱导率的影响

不同种类的生长素及质量浓度对天目地黄幼芽生根的影响见表 4。由表 4 可见, C1 ~ C5 中随着 NAA 浓度的升高, 生根率逐渐上升, 当 NAA 浓度达到 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 生根率最高达 100%, 之后随着 NAA 浓度的上升, 生根率反而下降。C6 ~ C10 中, IBA 浓度对生根率的影响规律与 NAA 相似, 浓度达 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 RA 高达 100%, 随着 IBA 浓

度的增加,生根率基本成下降趋势.从生根苗的平均根数和平均根长来看,随着 NAA 浓度的增加,生根苗平均根数呈现先下降后上升然后再下降的趋势,而平均根长呈现先上升然后下降的趋势,二者在 NAA 质量浓度为 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (C4) 时均达到最大. IBA 对生根诱导的影响和 NAA 情况不同.随着 IBA 浓度的升高,丛生苗平均根数逐渐下降,而平均根长呈现先下降再上升然后逐渐下降的趋势,二者在 IBA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (C6) 时达到最大.虽然 C4 和 C6 的 RA 都是 100%, 平均根数和平均根长均是最佳的,但是 C4 上长出的根纤细,分支少,没有形成主次根的分化,而且只有少数根是伸入培养基中 C6 生长的.相比之下, C6 生的根健康正常.所以,可以得出 C6 对丛生苗生根的效果最好(见图 3).

表 4 不同植物生长调节物质组合对生根诱导率的影响

Table 4 Effect of different plant growth regulators on root inductivity

培养基编号 No. of media	生根率/% Rooting rates	平均根数 Average No. of roots	平均根长/cm Average length of roots
C1	20.0 a	2.40 bcf	1.13 a
C2	60.0 bc	1.47 def	1.28 a
C3	80.0 d	1.40 ef	1.51 a
C4	100 e	4.07 a	1.71 a
C5	48.9 b	2.33 cdf	1.14 a
C6	100 e	3.60 ab	2.80 b
C7	80.0 d	3.27 abc	1.88 abc
C8	51.1 bc	3.13 bd	2.77 b
C9	64.4 bcd	1.93 cdf	2.56 bc
C10	42.2 ab	1.73 cdf	2.54 bc

注:同一列的数据后有相同字母表示差异不显著.

Note: The same letters following the column data mean insignificant difference



图 3 天目地黄丛生芽在培养基 C6 上生根诱导效果

Fig. 3 The root introduction of *R. chingii* from bud on No. C6 media

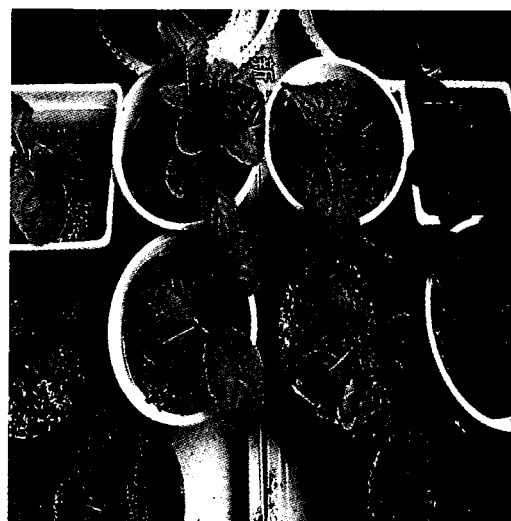


图 4 天目地黄盆栽组培苗

Fig. 4 Regenerated plantlets of *R. chingii*

3 讨论

3.1 2,4-D 对愈伤组织诱导的影响

诱导愈伤组织最常用的生长素是 IAA, NAA 和 2,4-D^[8]. 2,4-D 对愈伤组织的诱导作用优于其它生长素,其使用浓度因作物而异. 单子叶植物组织培养往往需要较高浓度的 2,4-D,而双子叶植物需要 2,4-D 的浓度一般只有单子叶植物的 1/10 ~ 1/20,并且双子叶植物脱分化后,必须及时降低或去掉 2,4-D,胚性细胞才能正常发育^[9]. 对于地黄属植物来说,单独使用细胞分裂素 6-BA 而不用生长素,不能获得愈伤组织,而只有配合生长素才能取得理想的结果,这与李明军^[10]的结果一致;但生长素 2,4-D 用量过高,愈伤组织生长不健康. 在脱分化实验中,以 6-BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的细胞分裂素搭配 2,4-D $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 对愈伤组织的诱导和生长效果最好,启动率高达 100%,并且愈伤组织生长情况健康.

3.2 愈伤组织诱导组织培养苗在地黄属植物开发利用中的应用价值

在长期的人工栽培影响下,地黄所有品种均出现易染病、品种退化迅速^[7]、梓醇含量不稳定^[11,12]等问题. 笔者栽培实践发现,地黄属各物种的生长习性与生境需求和地黄基本一致,在原产地常以天目地黄作鲜地黄入药;地黄属其它 5 种的抗性均高于地黄,尤以天目地黄和高地黄的抗性最强. 结合地黄属梓醇分布规律^[13],推测地黄的近缘物种可能存在与地黄类似的药用价值,在抗病、抗虫、梓醇含量高且稳定的优良地黄替代品种的筛选和培育方面具有开发利用的潜力.

地黄属植物花型别致,并各具特色,可为园林育种提供遗传资源.其中,高地黄早在1908年即被引入英国皇家植物园^[14],北美许多地方有引种,是一种优秀的花坛装饰、庭园观花材料.在国内,仅天目地黄偶见应用于庭园绿化.根据该属的地理分布及栽培实践可知,所有种类都能在广大亚热带地区种植,应用前景广阔.

不论是中药地黄新品种的培育,还是观赏花卉的开发,都离不开现代生物技术特别是组织培养技术^[15]的支撑.本课题成功地获得了地黄属的愈伤组织及再生植株,为地黄属植物珍稀优良种质资源的保存、优良观赏品种的快繁、抗逆性中药材品种的选育等提供了有力的技术保障和实验平台.

参考文献:

- [1] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典(第一部)[M]. 北京:化学工业出版社,2005.
- [2] KIHO T, WATANABE T, NAGAI K, et al. Hypoglycemic activity of polysaccharides fraction from Rhizome of *R. glutinosa* Libosch, *F. hueichingensis* Hsiao and the effect on carbohydrate metabolism in normal mouse liver[J]. *Yakugaku Zasshi*, 1992, 112(6):393-400.
- [3] 郑建普. 六味地黄方药理作用研究摘要[J]. *中医药学刊*, 2003, 21(10):1699-1700, 1735.
- [4] 裘月, 杜冠华, 屈志炜, 等. 常用补益中药抗脂质过氧化作用比较. *中国药理学杂志*[J], 1996, 31(2):83-86.
- [5] 毛文岳, 余椿生, 刘清琪, 等. 怀地黄茎尖培育研究[J]. *植物学通报*, 1983, (1):44-46.
- [6] 薛建平, 张爱民, 李明军, 等. 怀地黄茎尖培养和植株再生技术的研究[J]. *新乡医学院学报*, 2000, 17(1):18-20.
- [7] 温学森, 李先恩, 杨世林. 地黄病毒病及其亟待解决的问题[J]. *中草药*, 2001, 32(7):662-664.
- [8] 任凝辉, 武荣华, 王献, 等. 矮生一品红苞片外植体组织培养技术研究[J]. *河南农业大学学报*, 2001, 35(3):239-240.
- [9] 崔凯荣, 邢更生, 周功克. 植物激素对体细胞胚胎发生的诱导与调节. *遗传*, 2000, 22(5):349-354.
- [10] 李明军, 张晓丽, 陈明霞, 等. 怀地黄叶片愈伤组织的诱导形成及其可溶性糖含量变化的研究[J]. *河南农业科学*, 2005, (8):72-75.
- [11] 李先恩, 杨世林, 杨峻山. 地黄不同品种及不同块根部位中梓醇含量分析[J]. *中国药理学杂志*, 2002, 37(11):820-823.
- [12] 李更生, 刘长河, 王慧森, 等. 不同产地的地黄中梓醇含量比较[J]. *中草药*, 2002, 33(2):126-128.
- [13] 武雯, 赵楠, 李宏庆, 等. 地黄属资源植物中梓醇的分布及积累动态[J]. *华东师范大学学报*, 2006, 128(4):91-96.
- [14] HEMSLEY W B. *Rehmannia angulata*[J]. *Bot Mag*, 1908, 8:177.
- [15] 薛建平, 葛德燕, 张爱民, 等. 地黄组织培养研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2003, 28(12):1114-1117.

(责任编辑:闫志平)