

鼠尾草离体培养植株再生体系的建立

文锦芬¹, 邓明华², 施卫省¹, 彭春秀¹

(1. 昆明理工大学 现代农业工程学院, 云南 昆明 650224; 2. 云南农业大学 园林园艺学院, 云南 昆明 650201)

摘要: 对影响鼠尾草离体再生的因素进行了研究, 并以腋芽诱导率和平均每个外植体腋芽伸长数作为指标, 对不同激素配比进行正交试验, 筛选出了最佳的培养基组成。试验结果表明: 在四种基因型中, 粉萼鼠尾草的效果最好; 鼠尾草腋芽诱导和伸长的最佳培养基组合为 MS + ZT0.8 mg/L + KT0.2 mg/L + 6-BA0.4 mg/L + NAA0.05 mg/L; 适合于腋芽生根的不定根诱导培养基组合为 1/2MS + IAA0.3 - 0.4 mg/L。

关键词: 鼠尾草; 组织培养; 植株再生; 正交实验

中图分类号: S682.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-855X(2007)06-0084-05

Establishment of Salvia In - Vitro Plant Regeneration System

WEN Jin-fen¹, DENG Ming-hua², SHI Wei-sheng¹, PENG Chun-xiu¹

(1. Faculty of Modern Agricultural Engineering, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650224, China;

2. Faculty of Horticulture, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: The facts affecting the plant regeneration of salvia are studied. Inducing rate of axillary and average of axillary buds of per explants are then calculated in orthogonal test to optimize combination of phytohormones for inducing and elongating axillary. It is indicated through the results that the best for inducing and elongating axillary is salvia farinacea among the four genotypes. It is also pointed out that the maximum rate of inducing axillary and the large number of elongating axillary per explants is obtained with MS + ZT0.8mg/L + KT0.2 mg/L + 6-BA0.4 mg/L + NAA0.05 mg/L, and that elongated shoots are successfully rooted on 1/2MS + IAA0.3 - 0.4 mg/L.

Key words: salvia; tissue culture; plant regeneration; orthogonal test

0 引言

鼠尾草 *Salvia (Salvia officinalis, L.)*, 别名洋紫苏, 是唇形科鼠尾草属多年生草本植物, 原产于地中海沿岸及南欧, 阿拉伯国家、美国、加拿大等国和我国部分地区有少量栽培^[1-5]。

鼠尾草含多种矿物质及苦味素、类黄酮、单宁酸等物, 具有抗菌、防疫、防腐的功效, 对机体柔软组织有收缩的功能。早在中世纪就已被用于除秽、蔽疫, 以及便秘、痢疾、感冒、发烧、中风、肝病、羊癫疯等疾病治疗上。有促进呼吸, 血液畅流, 增强肌肉弹性及松弛神经之效用^[6-8]。鼠尾草还是一种高钾低钠、高钙低铝的芳香蔬菜, 广泛应用于欧洲、美洲的家庭饮食业。鼠尾草因其叶片中含有大量的活性物质 SOD, 且为高钾、低钠、低铝、高钙、高镁、高铁芳香物, 经常使用具有强身健体、抗衰老和延年益寿的功效^[9-11]。

近年来更是在临床、药理、化学和生药的研究上取得了很大的进展。最新研究表明, 鼠尾草的香精油中包括鼠尾稀、蒎稀、桉树脑、冰片和樟脑等, 涂抹于头皮可促进头皮头发生长, 增加黑色光泽^[7-9]。由于工业需求的不断增长, 大量的野生资源被消耗, 因此鼠尾草的人工种植和栽培受到普遍重视, 利用组织培养的方法可以在短时间内生产大量的优质种苗, 同时还可以为鼠尾草的生理生化、遗传转化的工作提供帮

收稿日期: 2007-05-10. 基金项目: 云南省自然科学基金(项目编号: 2005C0023Q); 云南省教育厅青年科学研究基金(项目编号: 04Y559B)。

第一作者简介: 文锦芬(1973-), 女, 硕士, 讲师。主要研究方向: 农业生物环境工程。

E-mail: jinfenwen2000@yahoo.com.cn.

助^[12].但鼠尾草的组织培养研究报道不多^[13-15],论文利用4种鼠尾草的茎段,研究基因型和激素不同组合对鼠尾草再生的影响,试图建立高效的鼠尾草离体培养植株再生体系.

1 材料与方 法

1.1 材 料

试验材料为种植在温室中的原生鼠尾草、黄金鼠尾草、三色鼠尾草、粉萼鼠尾草.

1.2 方 法

1.2.1 无 菌 材 料 的 获 得

取生长在温室中、生长健壮、无病虫害的鼠尾草嫩茎,用自来水冲洗10 min左右,用75%的酒精灭菌10 s,无菌水冲洗2~3遍,然后放入0.1%的HgCl₂中灭菌7 min,再用无菌水冲洗4~5遍,放入无菌烧杯中备用.

1.2.2 培 养 基 的 配 制

腋芽诱导和伸长培养基:以MS为基本培养基,添加一定质量浓度的ZT(0 mg/L,0.4 mg/L,0.8 mg/L),KT(0 mg/L,0.2 mg/L,0.4 mg/L),6-BA(0 mg/L,0.2 mg/L,0.4 mg/L)和NAA(0 mg/L,0.05 mg/L,0.1 mg/L)采用L₉(3⁴)^[16]正交设计.

生根培养基:以1/2 MS为基本培养基,添加一定质量浓度的IAA(0 mg/L,0.1 mg/L,0.2 mg/L,0.3 mg/L,0.4 mg/L,0.5 mg/L).各培养基添加30 g/L的蔗糖,7.5 g/L的琼脂,调节pH值为5.8,121℃高压灭菌20 min,冷却后备用.

1.2.3 腋 芽 的 诱 导 和 伸 长

取已经灭菌的茎段,切取含1个茎节的茎段,接种到腋芽诱导和伸长培养基上,每瓶4~5个,9次重复.15天继代1次,30天后统计腋芽的诱导频率和平均每个茎节上伸长的腋芽数.

1.2.4 腋 芽 的 生 根 和 移 栽

待腋芽伸长约2~3 cm以上,从基部切下,放于生根培养基中诱导不定根的产生,20天后统计生根情况.待长出完整根系后,敞瓶炼苗7~10天,然后洗净根系培养基,用适当浓度的多菌灵浸泡后,移栽于经过灭菌的基质中,浇1/2MS无激素液体培养基,用塑料膜覆盖保湿,15天后敞膜,移入温室中常规管理,10天后统计成活率.

1.2.5 培 养 条 件

试验培养条件设为:光照强度为2500 lx左右,光照温度为(25±1)℃,黑暗温度为(23±1)℃,光照时间14 h/d.

2 结 果 与 分 析

外植体接种7天左右,开始从切口处膨大,12天左右长出愈伤组织,同时有少量腋芽的萌发与伸长,30天左右多数外植体上都有不同数量的腋芽诱导和伸长.

2.1 不 同 基 因 型 对 腋 芽 诱 导 与 伸 长 的 影 响

将4个供试材料的茎段外植体接种于腋芽诱导和伸长培养基MS+ZT0.4 mg/L+KT0 mg/L+6-BA0.2 mg/L+NAA0.1 mg/L上.30天后,腋芽的诱导频率(原生鼠尾草、粉萼鼠尾草、三色鼠尾草和黄金鼠尾草)分别为56.4%,87.0%,75.0%和83.3%,平均每个茎段上伸长的腋芽数分别为9.7,11.3,10.4和10.9个(数据未列出),粉萼鼠尾草最高.基因型间存在较为显著的差异.

2.2 激 素 及 其 配 比 对 腋 芽 的 诱 导 和 伸 长 的 影 响

将粉萼鼠尾草茎段接种到腋芽诱导和伸长培养基上,5天左右可以看到茎段切口处稍微膨大,有少量愈伤组织形成,10天左右腋芽开始萌动,15天左右可以看到腋芽明显伸长,30天左右腋芽长度可以达到4~6 cm.但不同配方间存在十分明显的区别.30天后统计腋芽的诱导和伸长情况见图1.

2.2.1 激 素 及 其 配 比 对 腋 芽 诱 导 的 影 响

不同激素及其配比对鼠尾草腋芽诱导和伸长影响的正交试验结果见表1.由表3腋芽诱导率的R值

分析可以看出,4种激素对腋芽诱导率的影响从大到小依次为6-BA,ZT,KT和NAA.对影响腋芽伸长率各因子的K值进行分析,结果显示:ZT,KT,6-BA和NAA的质量浓度分别为0.8 mg/L,0.2 mg/L,0.4 mg/L和0.05 mg/L时,相应K值最大;之后进行了不同水平的激素对鼠尾草腋芽诱导率平均数间的显著性多重比较见表2,结果与K值表现一致.所以就腋芽诱导率这一指标而言,通过对试验结果进行正交分析以及多重比较,可以确定腋芽诱导的最佳条件为MS+ZT 0.8 mg/L+KT 0.2 mg/L+6-BA 0.4 mg/L+NAA 0.05 mg/L.

2.2.2 激素及其配比对每外植体上平均伸长的腋芽数的影响

在上述9种培养基上诱导的腋芽伸长情况见表1.

表1 鼠尾草腋芽诱导与伸长培养基中激素配比的正交试验设计 $[L_9(3^4)]$ 及结果表

Tab.1 Results of orthogonal test of different concentration of phytohormones in medium for inducing and elongation axillary buds of *Salvia officinalis*, L. $[L_9(3^4)]$

培养基 编号	激素配比/(mg·L ⁻¹)				接种外植 体数	有腋芽诱导外 植体数/个	腋芽诱导 率/%	平均每个外植体上 伸长腋芽数/个
	ZT	KT	6-BA	NAA				
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0.2	0.2	0.05	50	40	80.0	8.8
3	0	0.4	0.4	0.1	53	44	83.0	9.4
4	0.4	0	0.2	0.1	48	37	77.1	8.5
5	0.4	0.2	0.4	0	50	44	88.0	9.6
6	0.4	0.4	0	0.05	52	35	67.3	7.0
7	0.8	0	0.4	0.05	51	48	94.1	11.5
8	0.8	0.2	0	0.1	49	38	77.6	8.6
9	0.8	0.4	0.2	0	48	43	90.0	9.9
腋芽诱导率/%								
K1	163.0	171.2	144.9	178.0				
K2	232.4	245.6	247.1	241.4				
K3	261.7	240.3	265.1	237.7				
R	32.9	24.8	40.1	21.1				
平均每个外植体上伸长腋芽数								
K1	18.2	20.0	15.6	19.5				
K2	25.1	27.0	27.2	27.3				
K3	30.0	26.3	30.5	26.5				
R	3.9	2.3	5.0	2.6				

从表1中每外植体上平均伸长的腋芽数的R值的大小可以发现:不同激素对每外植体上平均伸长的腋芽数的影响不同,其影响的大小依次为6-BA,ZT,NAA和KT,而且当其质量浓度分别为0.8 mg/L,0.2 mg/L,0.05 mg/L和0.4 mg/L时,影响最大.得出初步结论后进行了不同水平的激素对鼠尾草每个外植体上伸长腋芽数平均数间的显著性多重比较见表3,结果与初步结论一致.由此,就每外植体上平均伸长的腋芽数这一指标而言,通过对试验结果进行正交分析以及多重比较,可以确定腋芽诱导的最佳条件为MS+ZT 0.8 mg/L+KT 0.2 mg/L+6-BA 0.4 mg/L+NAA 0.05 mg/L.

综合分析上述两项指标,最终确定出最佳的激素配比,即鼠尾草腋芽诱导和伸长的最佳培养基配比为



图1 腋芽的诱导和伸长

Fig.1 Inducing and elongating axillary buds

MS + ZT 0.8 mg/L + KT 0.2 mg/L + 6-BA 0.4 mg/L + NAA 0.05 mg/L.

表2 鼠尾草腋芽诱导率的方差分析表

Tab.2 Variance analysis of inducing rate of axillary buds of *Salvia officinalis*, L.

	激素配比			
	ZT	KT	6-BA	NAA
K1	163.0(cC)	171.2(cC)	144.9(cC)	178.0(cC)
K2	232.4(bB)	245.6(aA)	247.1(bB)	241.4(aA)
K3	261.7(aA)	240.3(bB)	265.1(aA)	237.7(bB)

a,b,c,……5%显著水平,A,B,C,……1%极显著水平

表3 鼠尾草每个外植体上伸长腋芽数的方差分析表

Tab.3 Variance analysis of elongation of axillary buds per explant of *Salvia officinalis*, L.

	激素配比			
	ZT	KT	6-BA	NAA
K1	18.2(cC)	20.0(cC)	15.6(cC)	19.5(cC)
K2	25.1(bB)	27.0(aA)	27.2(bB)	27.3(aA)
K3	30.0(aA)	26.3(bB)	30.5(aA)	26.5(bB)

a,b,c,……5%显著水平,A,B,C,……1%极显著水平

2.3 不定根的诱导

将伸长到2~3 cm的腋芽,从基部切下,转移到不定根诱导培养基,有大不定根的产生.比较了生长素 IAA 的不同浓度对不定根的诱导及不定根的质量的影响,结果表明:添加 IAA 的不定根诱导培养基都能诱导不定根的产生.只是不定根的诱导率 and 不定根的质量差异较大表4.其中以1/2MS + IAA 0.3~0.4 mg/L 的培养基诱导的不定根系健壮、须根丰富、且诱导率也高见图2. IAA 的质量浓度低于0.3 mg/L时,产生的不定根十分纤细、易断,不利于移栽;而 IAA 的质量浓度高于0.4 mg/L时,产生的不定根粗短,为鸡爪根,移栽成活率低.



图2 腋芽的生根
Fig.2 Rooting of axillary buds

表4 不同 IAA 的质量浓度对鼠尾草腋芽生根的影响

Tab.4 Effects of different plant hormones combination in rooting of axillary buds

$\rho(\text{IAA})/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	接种腋芽数	生根腋芽数	诱导率	平均根数	平均根长	不定根质量
0	20	0	0	0	0	—
0.1	20	15	75	4.9	3.9	纤细
0.2	20	16	80	5.7	3.6	纤细
0.3	20	16	80	7.5	3.5	较细
0.4	20	19	95	6.6	3.0	粗壮
0.5	20	16	80	6.3	0.6	鸡爪

2.4 试管苗的移栽

将已经长出完整根系的鼠尾草试管苗,敞瓶炼苗7~10天后,洗净根系的培养基,浸泡于适当浓度的多菌灵溶液中4~5 s后,移栽于经过灭菌的蛭石中,浇1/2MS无激素液体培养基,塑料膜保湿15天后,敞开膜.移入温室,10天后成活率达90%以上.

3 讨论

3.1 基因型对植物组织培养的影响

在植物组织培养中,不同基因型植株在同一浓度激素诱导下,其产生效果表现不一. 试验对4种基因型鼠尾草进行腋芽的诱导和伸长. 结果表明,粉萼鼠尾草腋芽诱导率为87.0%,平均每个外植体上伸长腋芽数为11.3个,腋芽诱导效果明显高于另外3种鼠尾草. 与前人的实验结果基本一致.

3.2 激素对试验结果的影响

在植物组织培养中,激素的种类、浓度及其配比对试验结果有相当大的影响. 试验采用正交设计试验方式,能够在传统的单因子比较分析的基础上,容纳更多的因素和水平,同时大大减少试验的次数,提高准确率. 研究表明,6-BA对鼠尾草茎段培养过程中腋芽的诱导和伸长的影响最大,适合质量浓度为0.4 mg/L,其余影响鼠尾草腋芽诱导的激素依次为ZT,KT和NAA,质量浓度分别为0.8 mg/L,0.2 mg/L和0.5 mg/L;影响鼠尾草腋芽伸长的激素依次为ZT,NAA和KT,质量浓度分别为0.8 mg/L,0.5 mg/L和0.2 mg/L. 即鼠尾草腋芽诱导和伸长的最佳培养基配比为MS + ZT 0.8 mg/L + KT 0.2 mg/L + 6-BA 0.4 mg/L + NAA 0.05 mg/L.

参考文献:

- [1] 刘娟. 欧洲香味蔬菜珍品介绍[J]. 现代种业,2004,(1):44.
- [2] 云南省植物研究所. 中国植物志(第66卷)[J]. 北京:北京科学出版社,1977.
- [3] 林成娟. 鼠尾草种植技术与市场开发[J]. 特种经济动植物(药用植物),2002,(3):30-31.
- [4] 魏俊杰,任刚,姜海. 四季常绿的香料植物——灌木鼠尾草[J]. 瓜菜栽培与果树花卉,2005,(8):18-19.
- [5] 李晖,蒋思萍,兰英儒. 西藏林芝地区的鼠尾草植物资源[J]. 西藏科技,2003(4):60-61.
- [6] 王新玲,热那·卡斯木. 鼠尾草属植物化学成分的研究发展[J]. 新疆医科大学学报,2002,9(3):235-237.
- [7] 蔡亚玲,刘焱文,谭文界,等. 河南鼠尾草化学成分的研究[J]. 中草药,1998,29(11):733,738.
- [8] 薛明,史彦斌,崔颖,等. 甘西鼠尾草化学成分的研究[J]. 天然产物研究与开发,2000,1(6):27-32.
- [9] 鲁学照,罗厚蔚. 三叶鼠尾草的化学研究[J]. 中国中药杂志,1996,21(7):424.
- [10] 史彦斌,薛明,崔颖,等. 鼠尾草属植物化学成分及生物活性研究进展[J]. 国外医药·植物药分册,1999,14(5):198-201.
- [11] 常军民,热那·卡斯木,诸年生. 新疆鼠尾草的化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发,2001,13(1):27-29.
- [12] 王宗霞,康慧. 蓝花鼠尾草组织培养试验研究[J]. 内蒙古科技与经济,2003,(9):58-59.
- [13] 客绍英,石洪凌,马作东,等. 利用正交试验优化丹参愈伤组织培养[J]. 中药材,2005,2(28):82-83.
- [14] 解晓红,李江辉,冯文龙,等. 丹参组培快繁技术研究[J]. 中药材,2004,7(27):474-475.
- [15] 李俊明. 植物组织培养教程[M]. 北京:中国农业出版社,2002.
- [16] 刘权,马宝琨,吕均良,等. 果树试验设计及统计[M]. 北京:中国农业出版社,2001.