



地黄叶片试管块根诱导体系优化的研究

薛建平*, 薛涛, 郭兰, 朱艳芳, 卢河东, 张爱民, 盛玮

(淮北师范大学 生命科学学院 资源植物生物学安徽省重点实验室, 安徽 淮北 235000)

[摘要] 目的:研究不同浓度蔗糖和植物生长物质对地黄叶片试管块根诱导的影响,建立从地黄叶片诱导试管块根的高效体系。方法:以 85-5 地黄试管苗的叶片作为外植体,先经生根诱导,后转接至正交设计的培养基中,诱导地黄试管块根。结果与结论:NAA 对试管地黄诱导影响显著,其次分别为蔗糖和 6-BA,以试管苗叶片为外植体诱导地黄试管块根的最佳培养基为 MS + 6-BA 3 mg · L⁻¹ + NAA 0.1 mg · L⁻¹ + 蔗糖 70 g · L⁻¹。该研究为今后利用地黄试管块根进行人工种子和次生代谢研究提供了高效的培养体系。

[关键词] 地黄;叶片;试管块根;正交试验

地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch 为玄参科药用草本植物,以块根入药,是我国传统的大宗中药材,具滋阴健肾、清热解毒、补血、长肌肉等功效^[1-3]。然而,由于生产中长期采用块根营养繁殖,地黄易染多种病毒病,致使地黄品种退化。当前,为解决地黄病毒病,人们主要培育脱毒苗,但培育脱毒苗成本高、周期长、不便于运输,成为限制其推广应用的瓶颈^[4]。薛建平等^[5]首次以地黄叶片为外植体成功诱导出试管块根,有望通过人工种子技术取代脱毒苗应用生产。然而,地黄叶片诱导试管块根的体系仍不完善,还存在形成的数量少、形成时间长、形成的规律和机制不明确等问题,导致生产效率不高,生产实践应用困难。因而本试验旨在对地黄叶片试管块根诱导条件进行优化,试图获得一种高效的地黄试管块根诱导体系,同时也为地黄离体块根形成机理和次生代谢的研究提供较为直观和方便的操作系统。

1 材料与方 法

1.1 材料 85-5 怀地黄试管苗由资源植物生物学安徽省重点实验室提供,经淮北师范大学生命科学学院薛建平教授鉴定为玄参科植物地黄的无菌苗。

1.2 培养基和培养条件 选用 MS 基本培养基,用

0.7% 琼脂固化,pH 5.8 ~ 6.0,添加不同浓度的蔗糖和植物生长物质,分装于 100 ~ 150 mL 三角烧瓶中,121 °C 湿热灭菌 15 ~ 20 min。选用 L₉(3)⁴ 正交表研究蔗糖、6-BA 和 NAA 对地黄叶片诱导试管地黄的影响(表 1)。培养温度为(25 ± 1) °C,光照 12 h · d⁻¹,光照强度 1 500 ~ 2 000 lx。

表 1 正交试验设计表

Table 1 The design form of the orthogonal test

水平	A	B	C
	蔗糖/g · L ⁻¹	6-BA /mg · L ⁻¹	NAA /mg · L ⁻¹
1	30	1	0
2	50	2	0.1
3	70	3	0.2

1.3 叶片的生根培养 以继代培养 20 d 的地黄试管苗为材料,由叶柄基部剪取叶片,将叶柄端向下接入生根培养基 1/2MS + IBA 1 mg · L⁻¹ + PP₃₃₃ 1 mg · L⁻¹,进行不定根诱导。

1.4 试管块根的诱导 待叶片的不定根长至 0.5 cm 左右时,将叶片和不定根一同转接至正交设计的 9 种培养基中进行试管块根诱导,每个处理 3 次重复,每次重复包括 30 个外植体。

1.5 数据统计分析 定期观察记录,20 d 后,自叶片上剪取诱导的地黄试管块根,称量并计算每个处理诱导的试管块根的平均重量,用 SPSS 软件分析数据。

2 结果与分析

地黄试管苗的叶片在生根培养基上培养 6 d 后即可在叶脉处形成大量的不定根,将叶片连同其上

[稿件编号] 20121016001

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30973963);安徽省自然科学基金项目(090413252);安徽高校省级自然科学研究重点项目(KJ2009A160)

[通信作者] * 薛建平, Tel: (0561) 3802025, E-mail: xuejp2000@yahoo.com.cn



形成的不定根叶片转接至正交设计的 9 种试管块根诱导培养基中,5 d 后不定根均开始膨大,15 d 各培养基中试管块根进一步膨大,其中 9 号培养基中试管块根发育较好。20 d 后,取各培养基中试管块根称重,计算平均重量(表 2)。

表 2 试管地黄诱导正交试验的结果

Table 2 Results of orthogonal experiment in inducing culture

No.	A B C			平均质量 /g(FW)
	蔗糖 /g · L ⁻¹	6-BA /mg · L ⁻¹	NAA /mg · L ⁻¹	
1	30	1	0	0.004 6
2	30	2	0.1	0.009 5
3	30	3	0.2	0.006 1
4	50	1	0.1	0.010 7
5	50	2	0.2	0.007 2
6	50	3	0	0.008 3
7	70	1	0.2	0.006 8
8	70	2	0	0.005 8
9	70	3	0.1	0.014 6
K ₁	0.020 2	0.022 1	0.018 7	
K ₂	0.026 2	0.022 5	0.034 8	
K ₃	0.027 2	0.029 0	0.020 1	
R	0.007 0	0.006 9	0.016 1	

通常 K 越大,代表该因子的某水平越好。正交

表 3 试管地黄平均质量的方差分析

Table 3 Variance analysis of average quality of tuberous root

变异来源	平方和	自由度	均方	F	显著性
蔗糖	0.000 009 6	2	0.000 004 8	3.97	0.201
6-BA	0.000 010 0	2	0.000 005 0	4.15	0.194
NAA	0.000 053 0	2	0.000 026 5	4.69	0.043
error	0.000 002 4	8	0.000 001 2		

3 讨论

具有变态器官的植物是药用植物王国中的一大类别。从系统发育的角度讲,植物变态器官的产生是植物对环境的适应性变异和人类定向选择的结果,从个体发育的角度讲,是根、茎、叶 3 种基本器官在形态结构和生理功能上的改变。其中,植物变态块根的发生通常是在细胞分裂素与生长素等物质的协同作用下,不定根的细胞迅速分裂和发育的结果^[6]。本试验先将离体地黄叶片进行不定根诱导,再培养不定根进一步发育膨大形成试管块根,通过

试验结果分析表明,蔗糖的 $K_3 > K_2 > K_1$,说明随着蔗糖质量浓度由 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 增加至 $70 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,试管地黄的平均重量在不断增大,可见 $70 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖最适合地黄试管块根的诱导和发育。与蔗糖的 K 类似,6-BA 的 K 也表现出 $K_3 > K_2 > K_1$,所以最适合地黄试管块根发育生长的 6-BA 的质量浓度为 $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。NAA 3 个梯度诱导的地黄试管块根重量均值为 $K_2 > K_3 > K_1$,可见随着 NAA 质量浓度由 $0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 升高至 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,诱导的试管块根平均重量呈明显上升趋势,当 NAA 质量浓度由 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 进一步增加至 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,试管块根平均重量出现下降趋势,可见 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 较适合地黄试管块根的诱导。

比较 R 可见,NAA 的 R 最大,其次为蔗糖和 6-BA,所以 3 个因素对试管地黄诱导影响大小为 $\text{NAA} > \text{蔗糖} > \text{6-BA}$ 。进一步方差分析表明(表 3),NAA 对地黄试管块根诱导的影响达显著水平($P < 0.05$)。

由表 2 直观分析可得到诱导试管地黄的最优组合为 $A_3B_3C_2$,即培养基 $\text{MS} + 6\text{-BA } 3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{蔗糖 } 70 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。进一步配制该培养基进行验证试验,发现此培养基中诱导的地黄试管块根平均质量为 $0.016 9 \text{ g}$,高于正交试验的 9 种培养基,可见该培养基适合地黄叶片试管块根的诱导。

两步诱导法明显提高了地黄试管块根的诱导效率。

NAA 对试管地黄诱导影响显著, $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 较适合地黄试管块根的生长发育,不含 NAA 或高浓度的 NAA 培养基均不利于试管地黄的形成。Hager 等^[7]指出生长素类物质可降低细胞壁的 pH,进而激活相关酶,最终引起细胞壁松弛,并诱导细胞膨大和器官形成。另外培养基中维持低浓度的 NAA 有利于延缓叶片在高渗环境下的衰老,从而有更多的光合产物转运到根部参与块根的形成,而过高浓度的 NAA 易引起不定根愈伤化^[8]。



试验中发现蔗糖和 6-BA 在地黄试管块根的诱导过程中影响不显著,但合适浓度的蔗糖和 6-BA 为试管地黄诱导的必需条件。细胞分裂素是细胞分裂的必须物质,促进不定根细胞的快速分裂,从而为块根的形成奠定数量基础^[9]。而蔗糖作为碳源不仅为细胞提供合成新化合物的碳源,而且还可能影响了地黄离体叶片内源激素的含量。郑永强等^[10]的报道指出,蔗糖能够显著影响姜试管苗内源激素水平,以 ABA 和 GA 变化较大,随着蔗糖质量分数的升高,GA 呈下降趋势,而 ABA 上升,姜试管苗以 ABA 作为正信号和 GA 作为负信号,对试管姜的形成进行有效的调控。张爱民等^[11]的研究也表明,地黄叶片试管块根诱导过程中需要低水平的 GA 和高水平的 ABA。

近年来,随着植物生物技术的发展,半夏试管块茎的培养技术日趋成熟,半夏人工种子完全可以替代试管苗作为商品供应^[12]。本研究得到的地黄试管块根作为一种休眠和繁殖的器官,是否能成为脱毒苗应用于生产的对接技术,从根本上降低脱毒苗生产成本将是以后研究的重点。另外,植物变态块根的发育过程和次生代谢过程为一复杂的遗传调控体系,每一过程都受到一系列基因的调控^[9]。因此,以地黄试管块根为模型进一步研究地黄块根发育密切相关

的基因和次生代谢的调控也具有重要价值。

[参考文献]

- [1] 李兰青. 地黄药理研究进展[J]. 中成药, 1994, 16(9): 47.
- [2] 丁自勉. 地黄[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2001.
- [3] 于震, 周红艳, 王军. 地黄药理作用研究进展[J]. 中医研究, 2001, 14(1): 43.
- [4] 温学森, 李先恩, 杨世林. 地黄病毒及亟待解决的问题[J]. 中草药, 2001, 32(7): 662.
- [5] 薛建平, 王汝毅, 张爱民, 等. 地黄叶片器官形态建成的研究[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(1): 21.
- [6] Jose B, Satheeshkumar K. Tuberos roots an ideal system for high frequency *in vitro* regeneration in *Plumbago rosea* L. [J]. Plant Tissue Cult Biotech, 2010, 20(2): 203.
- [7] Hager A, Debus G, Edel H G, et al. Auxin induces exocytosis and the rapid synthesis of a high turnover pool of plasma-membrane H⁺-ATPase[J]. Planta, 1991, 185:527.
- [8] 倪为民, 陈晓亚, 许智宏, 等. 生长素极性运输研究进展[J]. 植物学报, 2000, 42(3): 221.
- [9] Xue Hongwei, Chen Xu, Mei Yu, et al. Invited review: function and regulation of phospholipid signaling in plants[J]. Biochem J, 2009, 421:145.
- [10] 郑永强, 刘艳梅, 徐坤. 蔗糖浓度对生姜试管苗及内源激素变化的影响[J]. 中国蔬菜, 2004, 2: 15.
- [11] 张爱民, 盛玮, 薛建平, 等. 地黄叶片器官形态建成中几种内源激素的变化[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(4): 298.
- [12] 薛建平, 张爱民, 葛红林, 等. 半夏的人工种子技术[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(5): 402.

Study on optimization of induction system of test-tube tuberous roots from leaves of *Rehmannia glutinosa*

XUE Jian-ping*, XUE Tao, GUO Lan, ZHU Yan-fang, LU He-dong, ZHANG Ai-min, SHENG Wei
(Key Laboratory of Plant Resources and Biology of Anhui Province, School of Life Science, Huaibei Normal University, Huaibei 235000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of sucrose and plant growth substances of different concentrations on the induction of test-tube tuberous roots of *Rehmannia glutinosa*, in order to establish an efficient system for the induction of test-tube tuberous roots from leaves of *R. glutinosa*. **Method:** Leaves from test-tube seedlings of 85-5 *R. glutinosa* were used as explants. After rooting induction, they were transferred to medium with orthogonal design for inducing test-tube tuberous roots of *R. glutinosa*. **Result and Conclusion:** NAA played a significant role in induction of test-tube tuberous roots of *R. glutinosa*, followed by sucrose and 6-BA. With leaves from test-tube seedlings as the explants, the optimal medium for inducing test-tube tuberous roots of *R. glutinosa* was MS + BA 3.0 mg · L⁻¹ + NAA 0.1 mg · L⁻¹ + sucrose 7%. The study provides an efficient induction system for studies on artificial seeds and secondary metabolism with test-tube tuberous roots of *R. glutinosa*.

[Key words] *Rehmannia glutinosa*; leaf; tuberous root; orthogonal test

doi:10.4268/cjcm20122427

[责任编辑 孔晶晶]