

药用植物北玄参高频再生体系建立

任如意*, 薛巨坤, 李艳萍, 魏继承, 纪春艳

牡丹江师范学院生命科学与技术学院, 黑龙江牡丹江157011

摘要: 以北玄参的无菌苗叶片为外植体, 直接诱导不定芽并得到再生植株, 建立了北玄参叶片直接再生体系。结果表明, 北玄参种子直接用0.1% HgCl₂灭菌6 min就能达到良好的消毒效果, 污染率为4.95%, 种子萌发率为81.49%; 诱导北玄参叶片再生不定芽最佳培养基为MS+6-BA 0.5 mg·L⁻¹+NAA 0.2 mg·L⁻¹, 诱导率可达100%; 芽增殖培养基为MS+6-BA 0.2 mg·L⁻¹+NAA 0.2 mg·L⁻¹, 增殖倍数为9.13; 诱导生根的培养基为1/4MS+IBA 0.2 mg·L⁻¹, 生根率100%, 平均生根数为11.33; 再生植株移栽的成活率为86.96%。

关键词: 北玄参; 无菌苗; 高频再生体系

High-Frequency Regeneration System of Medicinal Plant *Scrophularia buergeriana*

REN Ru-Yi*, XUE Ju-Kun, LI Yan-Ping, WEI Ji-Cheng, JI Chun-Yan

College of Life Science and Technology, Mudanjiang Normal University, Mudanjiang, Heilongjiang 157011, China

Abstract: The leaf from sterile seedling of *Scrophularia buergeriana* was acted as explants, directly induced adventitious buds and got the regenerated plant. *In vitro* regeneration of rapid propagation system by tissue culture was established. The results showed that immersed with 0.1% HgCl₂ for 6 min was the best disinfection method for *S. buergeriana* seeds with the contamination rate of 4.95% and the sprout rate was 81.49%; the best medium for adventitious buds induction was MS+6-BA 0.5 mg·L⁻¹+NAA 0.2 mg·L⁻¹, the induction rate reached 100%; MS+6-BA 0.2 mg·L⁻¹+NAA 0.2 mg·L⁻¹ was the most suitable medium for buds multiplication, and multiplication ratio reached 9.13; rooting induction medium was 1/4MS+IBA 0.2 mg·L⁻¹, and the rooting rate reached 100% and the average number of roots was 11.33. The survival rate of regenerated plantlets was 86.96% after transplanting.

Key words: *Scrophularia buergeriana*; aseptic seedling; high frequency regeneration

北玄参(*Scrophularia buergeriana*)为玄参科玄参属高大草本植物, 具有强烈香味, 二年生或多年生, 外观与玄参类似, 很难区分, 直立茎, 高达1.5 m, 叶对生, 有时上部的互生; 叶片卵形至长卵形, 边缘有锐锯齿, 花序密集成穗状、花黄绿色(陈川2011), 分布于我国黑龙江、河北、河南、山东等地, 韩国、日本、俄罗斯远东地区也存在, 是重要的传统药材, 其干燥的根可入药, 富含天然生物活性物质(Park等2003), 可用于治疗发烧、肿胀、肠燥便秘、咽喉炎、神经炎、扁桃体炎、急性淋巴结炎、淋巴结结核(Qian等1992; 张雯洁等1994)。在中国北方一直以来用北玄参替代玄参入药, 有悠久的入药历史, 《本草纲目》已有记载(陈川2011)。关于北玄参药用成分已开展了实验室研究, 认为北玄参的主要活性成分与玄参基本相似, 差异不大, 主要含有环烯醚萜类、苯丙素甘类、糖类、肉桂酸、皂苷等(李媛等2012), 活性成分为哈巴俄苷、

肉桂酸、毛蕊花糖苷、安格洛昔, 为北玄参代替玄参入药提供了基本依据(吴喜民等2014; Li等2000; 陈川2011)。野生药用植物的人为过度采挖已致其资源蕴藏量剧减, 北玄参从种子萌发到商业化生产需要至少2年的时间(Park等2003)。本实验研究利用植物组织培养的方法, 用20~30 d苗龄的无菌苗的叶片为材料, 直接诱导不定芽并形成丛生芽的方式建立北玄参的快速繁殖体系, 为北玄参人工栽培的种苗生产提供了新方法。

材料与方法

1 植物材料

北玄参(*Scrophularia buergeriana* Miq.)种子采摘于黑龙江省森林植物园。

收稿 2014-10-16 修定 2014-11-07

资助 牡丹江师范学院省级预研项目(SY201318)。

* 通讯作者(E-mail: swxrry@126.com; Tel: 0453-6511042)。

2 试验方法

2.1 无菌体系的建立

选取大小一致, 健康成熟的北玄参种子, 先用75%酒精处理(处理时间0、20、40 s, 3个水平), 用无菌水冲洗2次, 再用0.1%氯化汞溶液进行消毒(处理时间4、6、8 min, 3个水平), 无菌水冲洗4~5次, 然后将种子置于无菌水中浸泡3~4 h后, 置于灭菌的带有滤纸的培养皿中, 用滤纸吸干表面的水分, 将种子接种于1/2MS培养基中。每个处理重复3次, 先于(25±2) °C黑暗条件下培养2 d, 再转至温度(25±2) °C的光照培养箱中培养(光周期16 h·d⁻¹), 15 d统计污染率与种子的萌发率。

2.2 不定芽的诱导与增殖

以种子萌发的无菌苗为试材, 将叶片剪成约0.5 cm×0.5 cm大小接种至含不同植物生长调节剂的芽诱导培养基上(表2), 每个处理重复实验3次, 10~12 d继代1次, 培养25~30 d后调查诱导率与增殖倍数。诱导率=(长出不定芽的外植体数/接种的外植体数)×100%; 增殖倍数=不定芽个数/接种的外植体数。

2.3 生根培养

将继代增殖长至3 cm左右的苗, 切下转至生根培养基中进行生根诱导, 并统计生根率。生根率=(生根苗数/接种苗数)×100%; 根数是每株苗长出的根数。

2.4 炼苗与移栽

生根培养20~25 d后, 将根系发达和生长状态良好的试管苗打开培养瓶的封口膜, 在室温放置2~3 d后, 将试管苗取出, 洗净根系的培养基移栽至

盛有灭菌处理的土+河沙+蛭石(2:1:1; V/V/V)的营养钵中, 前5 d可用塑料袋遮盖, 之后正常培养, 30 d后统计苗的成活率。成活率=(成活的苗数/移栽苗数)×100%。

2.5 数据处理

数据处理使用DPS 7.05分析软件。

实验结果

1 无菌体系的建立

北玄参种子比较小, 表面消毒操作比较困难, 易污染。通过不同消毒方法对北玄参种子灭菌效果的试验结果(表1)表明, 酒精的灭菌时间对种子的萌发率影响显著, 40 s处理的污染率显著低于不经酒精处理的情况, 而20 s处理与不经酒精处理对污染率的影响无显著差异。0.1% HgCl₂的消毒处理对污染率和种子的萌发率的影响均显著, 4 min处理污染率显著高于其他处理, 随着消毒时间增加, 污染率逐渐下降, 萌发率出现峰值。综合各处理的污染率与种子萌发率, 处理2、3、5的灭菌效果较好, 差异不显著, 因此北玄参种子的消毒处理只用0.1% HgCl₂灭菌6 min就能达到良好的消毒效果, 污染率为4.95%, 种子萌发率为81.49%。

2 不同植物生长调节剂组合对不定芽诱导与增殖的影响

将种子萌发的无菌苗(图1-A)在无菌条件下, 剪切叶片后, 接入不定芽诱导培养基(表2)中, 15~20 d切口处略有膨大, 随后出现芽点(图1-B), 芽点发育成明显的小芽(图1-C、D)。诱导试验的结果(表2)表明, 处理6诱导率和芽增值倍数是最优的,

表1 不同消毒方法对北玄参种子灭菌效果的影响

Table 1 Effects of different sterilizations on *S. buergeriana* seeds

处理	75%酒精处理时间/s	0.1% HgCl ₂ 处理时间/min	污染率/%	萌发率/%
1	0	4	29.52±7.55 ^a	45.85±3.96 ^{cd}
2	0	6	4.95±4.29 ^{bc}	81.49±4.41 ^a
3	0	8	4.44±7.7 ^{bc}	75.74±11.56 ^a
4	20	4	23.46±6.53 ^a	54.53±9.43 ^{bc}
5	20	6	5.34±4.64 ^{bc}	74.66±7.59 ^a
6	20	8	2.38±4.12 ^c	62.38±6.75 ^b
7	40	4	13.28±4.92 ^b	47.37±2.35 ^{cd}
8	40	6	5.41±4.79 ^{bc}	52.72±6.34 ^{bc}
9	40	8	2.56±4.44 ^{bc}	38.83±2.67 ^d

数据为平均值±标准差, 同列数字旁不同小写字母表示有显著差异(P<0.05); 表2、4同此。

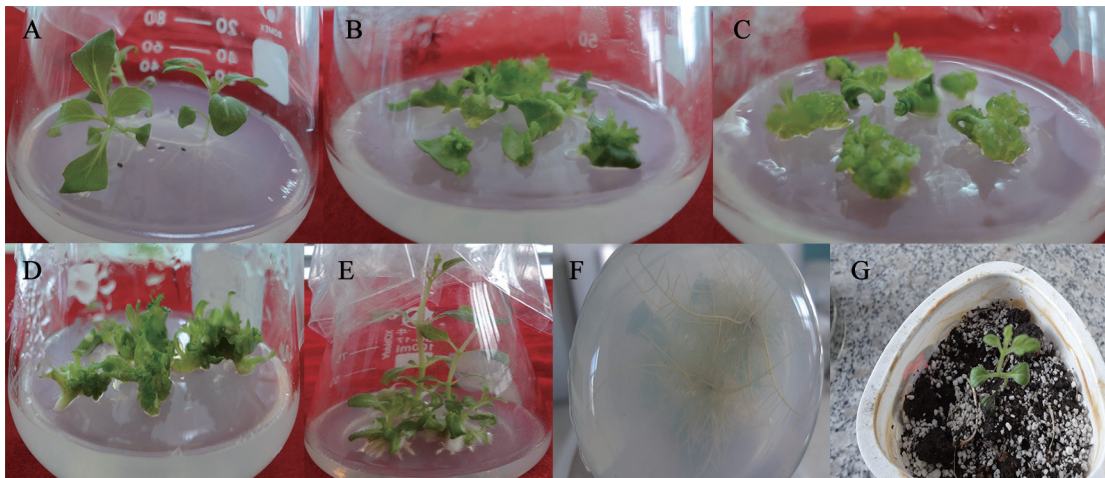


图1 北玄参种子无菌苗的不定芽诱导和植株再生

Fig.1 Adventitious buds induction and plant regeneration of *S. buergeriana* sterile seedlings

A: 种子萌发的无菌苗; B、C: 不定芽的诱导; D: 不定芽的增殖; E: 不定芽诱导生根; F: 大量不定根; G: 移栽成活的组培苗。

表2 不同植物生长调节剂对不定芽诱导与增殖的影响

Table 2 Effects of plant growth regulators on the induction and proliferation of adventitious buds

处理号	6-BA浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	NAA浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	2,4-D浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	芽诱导率/%	芽增殖倍数
1	0.2	0	0	65.58±3.28 ^{fg}	6.88±1.46 ^{bcd}
2	0.2	0.1	0.1	83.26±4.45 ^{cd}	7.13±1.55 ^{bc}
3	0.2	0.2	0.2	94.61±6.09 ^{ab}	8.38±1.85 ^{ab}
4	0.2	0.5	0.5	76.36±4.87 ^{de}	3.13±1.73 ^{hi}
5	0.5	0	0.1	66.29±5.61 ^{fg}	5.13±1.36 ^{defg}
6	0.5	0.1	0	100.00±0 ^a	9.00±2.14 ^a
7	0.5	0.2	0.5	74.01±3.22 ^{ef}	4.50±2.51 ^{fghi}
8	0.5	0.5	0.2	87.32±4.18 ^{bc}	6.63±1.85 ^{bcd}
9	1.0	0	0.2	47.22±1.2 ^h	4.13±1.25 ^{ghi}
10	1.0	0.1	0.5	73.95±3.96 ^{ef}	4.13±2.17 ^{ghi}
11	1.0	0.2	0	92.56±2.52 ^{ab}	7.88±2.03 ^{ab}
12	1.0	0.5	0.1	67.65±2.22 ^{fg}	4.88±1.73 ^{efgh}
13	1.5	0	0.5	40.27±6.01 ^h	2.88±2.53 ⁱ
14	1.5	0.1	0.2	59.72±8.67 ^g	2.75±1.67 ⁱ
15	1.5	0.2	0.1	64.28±0.83 ^g	4.50±0.93 ^{fghi}
16	1.5	0.5	0	66.75±5.93 ^{fg}	6.00±1.51 ^{cdef}

直观极差分析(表3)可以看出,以芽诱导率为评价指标,由极差大小(R值)可以判断,对诱导率影响为NAA>6-BA>2,4-D,最优组合为B3A2C1,即MS+6-BA 0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA 0.2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,实际试验芽诱导率最高组合为B2A2C1。以芽增殖倍数为衡量指标,对芽增殖影响为2,4-D>6-BA>NAA,最优组合为C1A1B3,即MS+6-BA 0.2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA 0.2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,实际试验芽增殖倍数最高组合为C1A2B2。对最优组合B3A2C1,即MS+6-BA 0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA 0.2

$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 进行芽诱导,出芽后转接至C1A2B2组合,即MS+6-BA 0.2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA 0.2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 进行增殖验证,得到北玄参芽诱导率和芽增殖倍数分别为100%和9.13。由此可见,正交设计能够筛选出较合适的试验组合。

3 不同植物生长调节剂组合与无机盐浓度对生根的影响

经过几次继代后,不定芽逐渐长大,待芽长至3 cm左右,从芽体基部切下接种至生根培养基(表

表3 不同植物生长调节剂对不定芽的诱导和增殖的直观分析

Table 3 Intuitive analysis on the induction and proliferation of adventitious buds with different plant growth regulators

指标	芽诱导率			芽增殖倍数		
	6-BA (A)	NAA (B)	2,4-D (C)	6-BA (A)	NAA (B)	2,4-D (C)
K1	79.95	54.84	81.22	6.38	4.76	7.44
K2	81.90	79.23	70.37	6.32	5.75	5.41
K3	70.34	81.36	72.22	5.26	6.32	5.47
K4	57.76	74.52	66.15	4.03	5.16	3.66
R	24.14	26.52	15.08	2.35	1.56	3.78

4)中, 培养15~20 d, 芽体基部长出大量的不定根(图1-E), 20 d统计生根率和根数, 表4可以看出处理4生根率最高, 每个芽苗的出根数最多。表5的直观极差分析可以看出, 以生根率为评价指标, 由极差大小可以判断, 对生根诱导率影响为: 培养基>IBA>NAA, 最优组合为A3C2B1, 即1/4MS+IBA 0.2 mg·L⁻¹, 实际试验芽诱导率最高组合为A2C2B1。以每株芽苗的生根数为衡量指标, 由极差大小可以判断, 对根数影响为: 培养基>NAA>IBA, 最优组合为A3B1C2, 即1/4MS+IBA 0.2 mg·L⁻¹, 与根诱导率一致, 但实际试验生根数最高组合为A2C2B1。对

最优组合A3B1C2, 即1/4MS+IBA 0.2 mg·L⁻¹进行根诱导验证, 得到北玄参根诱导率和生根数分别为100%和11.33条, 说明降低无机盐促进不定根的形成。由此可见, 正交设计能够筛选出较合适的试验组合。

4 炼苗与移栽

生根的试管苗的根系生长发达(图1-F), 打开培养瓶的封口膜, 室温放置2~3 d, 经炼苗后, 用清水洗净根部的培养基, 进行移栽(图1-G), 移栽成活率86.96%, 植株生长良好。

表4 不同培养基对不定芽生根的影响

Table 4 Effects of different medium on adventitious buds rooting

处理号	培养基	NAA浓度/mg·L ⁻¹	IBA浓度/mg·L ⁻¹	生根率/%	根数/条
1	MS	0	0	21.41±8.7 ^f	4.00±1.6 ^d
2	MS	0.2	0.2	40.69±7.25 ^e	4.38±1.06 ^d
3	MS	0.5	0.5	39.90±4.69 ^e	4.75±1.67 ^{cd}
4	1/2MS	0	0.2	100.00±0 ^a	10.25±3.2 ^a
5	1/2MS	0.2	0.5	50.00±3.61 ^d	6.63±0.92 ^{bc}
6	1/2MS	0.5	0	81.17±5.09 ^c	6.38±1.3 ^c
7	1/4MS	0	0.5	91.88±4.33 ^{ab}	8.38±2.5 ^{ab}
8	1/4MS	0.2	0	91.29±4.75 ^{ab}	8.63±2.56 ^a
9	1/4MS	0.5	0.2	83.85±3.69 ^{bc}	6.38±1.19 ^c

表5 不同培养基上生根率与根数的直观分析

Table 5 Intuitive analysis on adventitious buds rooting in different medium

指标	生根率			根数		
	培养基 (A)	NAA (B)	IBA (C)	培养基 (A)	NAA (B)	IBA (C)
K1	34.00	71.10	64.62	4.38	7.54	6.34
K2	77.06	60.66	74.85	7.75	6.55	7.00
K3	89.01	68.31	60.59	7.80	5.84	6.59
R	55.01	10.44	14.25	3.42	1.71	0.67

讨 论

本实验以北玄参种子萌发20 d的无菌苗为外植体,建立北玄参的再生快繁体系。北玄参的种子比较小,灭菌操作比较困难,容易污染。有关种子消毒方法很多,多采用75%酒精+0.1% HgCl₂(或NaClO)的消毒方法达到灭菌效果(张鸿等2012;蒋时姣等2014)。本实验研究发现短时间(20 s)的75%酒精处理+0.1% HgCl₂和单独使0.1% HgCl₂处理的灭菌效果差异不显著,而长时间的75%酒精处理又会降低种子的萌发率。HgCl₂处理时间延长,灭菌效果好,但是种子的萌发率会降低,因而建议只使用0.1% HgCl₂处理种子6 min就能达到较好的灭菌效果,污染率降到4.95%,种子萌发率为81.49%。

植物生长调节剂的种类、使用浓度以及组合配比是诱导不定芽或丛生芽形成与增殖的重要影响因素, Park等(2003)使用单一的6-BA或KT诱导北玄参叶片不定芽分化,而本实验选用6-BA、NAA和2,4-D进行试验设计,通过正交试验的直观分析使用MS+6-BA 0.5 mg·L⁻¹+NAA 0.2 mg·L⁻¹配方的诱导率高达100%,外植体会直接产生大量芽点,不定芽呈绿色,长势良好。芽点出现后,继代转至MS+6-BA 0.2 mg·L⁻¹+NAA 0.2 mg·L⁻¹增殖培养基中,芽增殖率较高,可达到9.13,芽不但大量增殖,生长速度也较快,芽高与芽粗均有增加,说明低浓度的6-BA有利于不定芽的增殖与生长,这与梁钻姬等(2012)对药用植物华泽兰的研究观点一致。根据刘梦昕等(2014)研究结果,2,4-D与6-BA组合使用能显著提高不定芽的诱导与分化,但在本实验中2,4-D对北玄参不定芽的诱导与增殖的作用不大,可能是有抑制作用,说明不同植物外植体对于外源植物生长调节剂的反应能力不同。

不定根的产生是影响再生植株移栽成活的关键,吴秀华等(2013)和朱桥等(2014)研究发现1/2MS适于生根培养,减少培养基中营养成分可刺激生根,本实验中1/2MS和1/4MS都能有效的诱导

北玄参不定芽的生根,因此本实验确定可以用1/4MS为基本培养基,附加不同浓度的NAA和IBA,结果表明,适宜浓度的NAA和IBA对北玄参不定芽生根都有一定的作用,生根率都能达到90%以上,通过正交试验的直观分析确定1/4MS+IBA 0.2 mg·L⁻¹为最佳根诱导培养基,诱导率100%,平均根数11.33。

本试验成功地建立了北玄参叶片不定芽诱导分化和植株再生体系,可实现快速繁育北玄参种苗以及为进一步的遗传操作奠定基础。

参考文献

- 陈川(2011). 药用植物玄参的栽培起源、亲缘地理及东亚玄参系统发育研究[博士论文]. 杭州: 浙江大学
- 蒋时姣, 钟宇, 张帆, 刘海鹰, 张双, 吴富雨, 黄金亮, 许淑芬, 万雪琴(2014). 柳杉种子无菌苗组培快繁体系的建立. 植物生理学报, 50 (7): 1039~1044
- 李媛, 宋宝安, 杨松, 胡德禹, 金林红(2012). 中草药玄参化学成分的研究. 天然产物研究与开发, 24: 47~51
- 梁钻姬, 潘超美, 赖珍珍, 郑芳昊, 夏静, 刘欣(2012). 药用植物华泽兰组织培养和快速繁殖. 植物生理学报, 48 (1): 85~89
- 刘梦昕, 曾洁, 黄凤智, 易姝利, 黄莹(2014). 明日叶叶片的丛生芽诱导和植株高频再生. 植物生理学报, 50 (1): 45~50
- 吴喜民, 张刘强, 陈小冲, 冯丽, 邢旺兴, 李医明(2014). 北玄参根中的一个新环烯醚萜衍生物. 药学学报, 49 (7): 1019~1021
- 吴秀华, 张艳玲, 周月, 罗克明, 汤绍虎(2013). ‘海沃德’猕猴桃叶片高频直接再生体系的建立. 植物生理学报, 49 (8): 759~763
- 张鸿, 张显强, 罗正伟, 谌金吾, 孙敏(2012). 曼陀罗种子萌发及植株再生. 中草药, 43 (12): 2499~2502
- 张雯洁, 刘玉青, 李兴从, 浦湘渝, 金永清, 杨崇仁(1994). 中药玄参的化学成分. 云南植物研究, 16 (4): 407~412
- 朱桥, 丁俊伟, 杨学文, 梁廉, 邵玲(2014). 血叶兰的组织培养与快速繁殖. 植物生理学报, 50 (6): 805~809
- Li YM, Jiang SH, Gao WY, Zhu DY (2000). Phenylpropanoid glycosides from *Scrophularia ningpoensis*. Phytochemistry, 54: 923~925
- Park SU, Chae YA, Facchini PJ (2003). Genetic transformation of the figwort, *Scrophularia buergeriana* Miq., an Oriental medicinal plant. Plant Cell Rep, 21: 1194~1198
- Qian J, Hunkler D, Rimpler H (1992). Iridoid-related aglycone and its glycosides from *Scrophularia ningpoensis*. Phytochemistry, 31: 905~911