

银条不定芽诱导及高效增殖体系的建立^{*}

张国裕¹, 程智慧¹, 李娟¹, 周文安², 王新华³

(1 西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨凌 712100; 2 陕西省武功烟叶复烤厂, 陕西 武功 712200;

3 西安大鹏生物科技股份有限公司, 陕西 西安 710075)

[摘 要] 以“二细一粗”银条茎尖、叶片、茎段组织为外植体, 研究了不同激素配比对其不定芽诱导与增殖效果的影响。结果表明, 银条叶片组织未能再生; 茎尖、茎段组织直接诱导较大不定芽的再生率较低, 平均每个外植体最多可诱导不定芽5~7个。而通过茎段先诱导出不定芽芽团, 再进行芽的伸长这一途径, 每个外植体诱导的不定芽数平均可提高到143个, 且芽团经5次继代后, 增殖再生能力无衰退表现, 且再生植株生产潜力非常巨大, 是一条较优的再生途径。茎段不定芽芽团诱导培养基以添加6-BA 50 mg/L 的MS培养基效果较好; 增殖培养基以MS + 6-BA 45 mg/L + GA₃ 1.0 mg/L 效果较好; 不定芽伸长培养基以MS + 6-BA 1.5 mg/L + NAA 0.4 mg/L + GA₃ 0.5 mg/L 较好。

[关键词] 银条; 组织培养; 不定芽诱导; 增殖体系

[中图分类号] S632.9 **[文献标识码]** A

[文章编号] 1671-9387(2004)02-0049-04

银条(*Stachys floridana* Schuttl. ex Benth) 属唇形科水苏属多年生草本植物, 其地下根状茎脆嫩多汁、营养丰富, 可腌制或炒食。因根茎中含有水苏糖、水苏碱、胆碱、胡芦巴碱等生理活性物质, 故具有润肺、补血、益肾之功效, 可治疗气喘、肺虚咳嗽、肾虚腰痛、淋巴结核、咯血等病症^[1], 并有望成为一种有效的抗肾炎药物^[2], 是近年来在药用和保健食品开发利用领域具有广阔发展前景的名特蔬菜^[3]。

银条结籽率非常低, 且难以成苗, 生产上长期以地下根状茎进行无性繁殖, 但存在出苗率低、苗期长、易造成田间缺苗及难以大规模对优良种系进行繁殖或筛选等问题。试管不定芽诱导繁殖技术是通过组织培养方法进行快速大量植物个体繁殖的一种有效方法, 并能很好地保持植物的种质特性。这一技术已在其他作物上得到广泛应用, 并取得了较好的效益^[4~6], 但有关银条试管微繁再生体系的研究尚未见报道。本研究对银条不定芽的诱导及高效增殖体系的建立进行了初步探讨, 以期获得高效再生繁殖技术体系, 加速其种质改良和优良品种的推广。

1 材料与方法

1.1 供试材料

以河南省主栽品种“二细一粗”银条为试材。

1.2 试验方法

室内培养银条健壮母株, 当植株高达10~20

cm时, 剪取充分展开的幼嫩叶片、茎段、茎尖, 自来水冲洗2~5 min后, 用体积分数0.1%的升汞消毒6~8 min, 无菌水冲洗3~4次。于无菌条件下切下叶片、带腋芽茎段、茎尖组织, 分别接种于不定芽诱导增殖培养基中培养。叶片组织切成0.5 cm × 0.5 cm, 茎尖、茎段组织长度均为0.5~1.0 cm。不定芽诱导培养以MS为基本培养基, 蔗糖30 g/L, 琼脂6.5 g/L, 附加6-BA 1.0~5.0 mg/L, TDZ 0.01~2.0 mg/L, NAA 0.2 mg/L。茎段诱导出的不定芽芽团置于芽团增殖与不定芽伸长培养基上培养。芽团的增殖与不定芽伸长培养基以MS + 蔗糖30 g/L + 琼脂6.5 g/L为基本培养基, 并采用3因素4水平的L₁₆(4⁵)正交试验, 确定6-BA, NAA和GA₃的最佳配比, 见表1。

表1 正交试验因素编码

Table 1 Treatment level code of L₁₆(4⁵)
orthogonal experiment

水平编码 Level code	因素/(mg · L ⁻¹) Factor		
	6-BA	NAA	GA ₃
1	0	0	0
2	1.5	0.1	0.5
3	3.0	0.4	1.0
4	4.5	0.7	1.5

培养条件为温度25~28℃, 光照14 h/d, 光照强度2500~3000 lx, pH 5.8。每处理7瓶, 每瓶4

^{*} [收稿日期] 2003-03-18

[基金项目] 中德政府间科技合作项目(CH-01/04); 国家农业科技成果转化基金项目(02EFA 216100592)

[作者简介] 张国裕(1978-), 男, 山东泰安人, 在读硕士, 主要从事银条脱毒快繁研究。

[通讯作者] 程智慧(1958-), 男, 陕西兴平人, 教授, 博士生导师, 主要从事蔬菜栽培生理研究。

个外植体。逐日观察, 30 d 后统计计数。计数时只统计芽长 ≥ 0.3 cm 的不定芽。

2 结果与分析

2.1 激素对银条不同组织不定芽诱导的影响

银条叶片、茎段、茎尖组织的不定芽诱导结果(表 2)表明, 以叶片组织直接诱导不定芽比较困难, 随细胞分裂素 6-BA, TDZ 质量浓度的增大, 叶片组织边缘卷曲并形成少量淡绿色紧密愈伤组织, 添加 NAA 0.2 mg/L 后, 愈伤组织形成量增加, 但经长期继代培养未能诱导出不定芽。以茎尖、茎段组织诱导不定芽较为容易, 每个处理均有不定芽产生。从不定芽的形成数量来看, 茎段组织具有更高的诱导效率, TDZ 0.5 mg/L 时, 茎段组织每个外植体平均最多可形成 6.93 个不定芽, 芽长 0.82 cm , 比茎尖组织的诱导率(4.86 个)高, 而且很容易切割转接形成

完整植株。茎段、茎尖组织不定芽的诱导数, 随细胞分裂素质量浓度的适量增加(6-BA $2.0\sim 3.0\text{ mg/L}$)而提高, 但细胞分裂素质量浓度过高(6-BA 5.0 mg/L)又会明显抑制芽的伸长, 使芽的平均高度仅有 $0.57\sim 0.68\text{ cm}$, 减少了可切割芽的个数。6-BA 与 TDZ 对芽形成的影响作用相差不大, 不定芽的诱导数均在 5~ 7 个。添加 NAA 0.2 mg/L , 对不定芽诱导数未产生明显影响, 却促进了芽的伸长, 改善了植株状况, 减少了芽的扁化现象。

在 不定芽诱导过程中, 当使用较高质量浓度的 6-BA 或 TDZ 时, 部分茎段、茎尖组织的外植体形成了绿色紧密的不定芽芽团。外植体形成芽团的比率随细胞分裂素质量浓度的增加而提高。当 6-BA 质量浓度为 5.0 mg/L 时, 茎段形成芽团的外植体比率可高达 92.9%。

表 2 激素对银条不同外植体不定芽诱导的影响

Table 2 Effect of homons on adventitious bud induction from different explants of many flower Betony												
激素/(mg · L ⁻¹) Homones			接种数 No. of explants	平均每个外植体不定芽数 No. of adventitious buds per explant (average)			不定芽芽团形成率/% Development rate of adventitious bud lump			不定芽长度/cm Length of adventitious bud		
6-BA	TDZ	NAA		叶盘 L eaves	茎段 Stem - explant	茎尖 Shoots	叶盘 L eaves	茎段 Stem - explant	茎尖 Shoots	叶盘 L eaves	茎段 Stem - explant	茎尖 Shoots
1.0			28	0	2.18	2.14	0	0	0	-	1.62	2.06
2.0			28	0	3.35	3.21	0	0	0	-	1.13	0.94
3.0			28	0	2.75	4.63	0	25	0	-	0.93	0.83
5.0			28	0	0.64	2.18	0	92.9	39.3	-	0.57	0.68
2.0		0.2	28	0	2.11	2.96	0	0	0	-	1.46	1.02
3.0		0.2	28	0	5.21	3.47	0	17.8	0	-	1.04	0.92
5.0		0.2	28	0	0.79	4.86	0	67.9	32.1	-	0.79	0.87
	0.01		28	0	1.43	1.35	0	0	0	-	2.13	2.45
	0.1		28	0	2.29	2.76	0	0	0	-	1.08	1.31
	0.5		28	0	6.93	3.62	0	21.4	0	-	0.82	0.96
	1.0		28	0	1.68	4.51	0	57.1	42.9	-	0.47	0.63
	2.0		28	0	0.52	2.54	0	82.1	64.3	-	0.61	0.68
	0.01	0.2	28	0	1.25	1.48	0	0	0	-	2.43	2.76
	0.5	0.2	28	0	6.48	3.26	0	25	0	-	0.94	1.21
	2.0	0.2	28	0	2.83	2.46	0	71.4	53.6	-	0.72	0.79

2.2 不同激素对银条茎段不定芽芽团的增殖与芽伸长的影响

虽然茎段、茎尖组织的不定芽均可以进行直接诱导, 但增殖效率较低。为提高繁殖系数, 探索一条更为高效的增殖途径, 采用 3 因素 4 水平的 $L_{16}(4^3)$ 正交试验设计, 对茎段在 6-BA 5.0 mg/L 条件下诱导出的芽团, 进行了芽团增殖与不定芽伸长研究。对结果(表 3)分析可知, 极差 R 越大, 表示该因素的影响作用越强。6-BA, NAA, GA_3 3 因素对芽团鲜重增加与每个芽团不定芽伸长数目的影响作用依次减小, 说明在芽团增殖与不定芽伸长培养中, 调整 6-

BA 的浓度是提高诱导效果的关键因素。6-BA $4.5\text{ mg/L} + GA_3 1.0\text{ mg/L}$ 处理时, 芽团鲜重增加 5.87 倍, 与直观分析得到的最优配方较为相符, 可以认为其是较好的芽团增殖培养基。6-BA $1.5\text{ mg/L} + NAA 0.4\text{ mg/L} + GA_3 0.5\text{ mg/L}$ 处理时, 不定芽伸长数为 14.3 个, 芽长度达 1.24 cm , 非常易于切割培养, 与直观分析得到的不定芽伸长最优配方一致。

2.3 生根与再生苗的移栽

银条较易生根, 将 $1\sim 2\text{ cm}$ 长的小植株切下, 转接于添加 0.5 mg/L NAA 的 MS 培养基上, 经 7 d

左右即有根长出。待有 7~ 8 条根时, 将发育良好的再生苗从培养瓶中取出, 洗去附着的培养基, 栽于盛有经消毒处理的蛭石的营养钵中, 加盖塑料膜保持湿度和温度。5~ 7 d 后逐渐通风炼苗, 7 d 浇 1 次 1/10 M S 营养液, 成活率可达 95% 以上。

表 3 L₁₆(4⁵) 正交试验结果

Table 3 The results of L₁₆(4⁵) orthogonal experiment

序号 Sequence	激素/(mg · L ⁻¹) Hormones			鲜重平均增加倍数 Average multiple of buds lump weight increased	不定芽伸长数 No. of elongated adventitious buds (average)	不定芽平均长度/cm Average length of adventitious bud
	6-BA	NAA	GA ₃			
1	1(0)	1(0)	1(0)	1.87	7.2	0.33
2	1	2(0.1)	2(0.5)	1.53	3.4	0.38
3	1	3(0.4)	3(1.0)	1.46	4.3	0.41
4	1	4(0.7)	4(1.5)	1.41	2.1	0.53
5	2(1.5)	1	4	2.14	10.4	0.68
6	2	2	3	2.57	11.7	0.76
7	2	3	2	4.74	14.3	1.24
8	2	4	1	2.78	5.7	0.58
9	3(3.0)	1	2	3.53	5.4	0.51
10	3	2	1	2.61	6.3	0.67
11	3	3	4	3.02	7.5	0.71
12	3	4	3	1.65	4.2	0.48
13	4(4.5)	1	3	5.87	3.5	0.59
14	4	2	4	2.83	2.3	0.61
15	4	3	1	2.46	3.1	0.53
16	4	4	2	1.89	2.7	0.56
	1.695	1.42	0.572	R		
	7.625	3.625	0.875		R	

3 讨 论

在植物组织培养过程中, 试管苗通常采用诱导不定芽的方式增殖扩繁^[7]。银条叶片组织在 1.0~ 5.0 mg/L 6-BA, 0.01~ 2.0 mg/L TDZ 与 0.2 mg/L NAA 的组合处理中, 均未能诱导产生不定芽。试验中 1.0~ 2.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA 处理使叶片组织边缘先形成了少量淡绿色愈伤组织, 30 d 后分化形成根, 置于空白培养基上未能进一步分化出芽。这一结果证明, 银条叶片组织不定芽的诱导较为困难。茎尖与茎段均可直接诱导产生不定芽, 但诱导效率不高, 每个外植体平均可获得不定芽 5~ 7 个。通过茎段诱导出不定芽芽团, 再进行芽

的伸长培养可显著提高芽的增殖效率, 效果较为理想。而且, 本试验中芽团经过 5 次继代后, 仍能保持较强的增殖及芽伸长能力, 可不断扩繁, 具有极大的增殖潜力, 能在较短的时间内获得大量再生植株。同时, 以芽团的形式进行银条种质试管保存, 具有方便、稳定、易于繁殖的优点^[6]。
在不定芽的诱导增殖中细胞分裂素起主要作用。TDZ 作为一种高活性物质, 在许多植物上被证明是一种对芽诱导极为有效的激素^[8, 9]。但在银条不定芽的诱导中, 与 6-BA 相比并未表现出较大差异, 且使用质量浓度较大, 说明激素种类、质量浓度因植物品种不同而存在着明显的感受性差异。NAA 的适量添加, 有改善植株状况、增加节间长度的作用。

[参考文献]

[1] 季宇彬. 中药材有效成分药理应用[M]. 哈尔滨: 黑龙江科技出版社, 1994. 441- 442.
[2] Hayashik, Nagnatsut, ItoM, et al. Acteoside: a component of *S. tachys sieboldii* Miq., may be a promising antinephritic agent (3) effect of acteoside on expression of intercellular adhesion molecule-1 in experimental nephritic glomeruli in rats and cultured endothelial cells[J]. Ph J Phamacol, 1996, 70(2): 157- 168.
[3] 程智慧, 孟焕文, 周文安, 等. 地灵高产栽培[J]. 西北园艺, 2003, (1): 30- 32.
[4] Hosoki T, Yasufuku T, HayashiM, et al. In vitro mass-propagation of chinese artichoke (*S. tachys sieboldii* Miq.) [J]. Acta Horticulturae, 1992, 319: 149- 152.
[5] 宋运贤, 陈耀峰, 傅建熙, 等. 芦荟试管微克隆繁育中芽增殖体系的建立[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2002, 30(6): 107- 109.

- [6] 李 卫,董 文,赵东利,等 TDZ 诱导甘露子茎段高频再生[J]. 西北植物学报, 2002, 22(4): 965- 969
- [7] 许智宏 植物生物技术[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1998 186- 192
- [8] Yang J, Hy Z, Guo G Q, et al In vitro plant regeneration from cotyledon explants of *Suaeda salsa* Taubert[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2001, 66: 35- 39
- [9] Fellman C D. Effect of thidiazuron and CPPU on meristem formation and shoot proliferation[J]. Hortsci, 1987, 22: 1197- 1200

Establishment of adventitious bud induction and high efficient propagation system in many flower betony (*S. tachys floridana* Schuttl ex Benth.)

ZHANG Guo-yu¹, CHENG Zhi-hui¹, LI Juan¹, ZHOU Wen-an², WANG Xin-hua³

(1 College of Horticulture, Northwest Sci-Tech University of Agricultural and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Wugong Tobacco Re-baking Factory, Shaanxi, Wugong 712200 China;

3 Xi'an Dapeng Biological Sci-Tech Stock Sharing Company, Ltd. Xi'an 710075, China)

Abstract: The stem apex, leaf disc and stem segments as explants were used to study the effects of different hormones treatments on the adventitious bud induction and propagation of many flower Betony (*S. tachys floridana* Schuttl ex Benth). The results showed that stem apex and stem segments had low reproducing rate with only got 5- 7 buds per explant in longer buds induction, while leaf disc had not showed ability to reproducing. The best way to get more reproducing plantlet (14.3 per explant) was to lengthen the bud from the bud lump which was gotten from the induced stem segments on MS medium supplemented with 6-BA 5.0 mg/L. The bud lump can be propagated for a long time and the reproducing ability would not decreased on MS medium with 6-BA 4.5 mg/L and GA₃ 1.0 mg/L. It is founded the better medium for bud elongation is MS+ 6-BA 1.5 mg/L + NAA 0.4 mg/L + GA₃ 0.5 mg/L.

Key words: many flower Betony (*S. tachys floridana* Schuttl ex Benth); tissue culture; adventitious bud induction; propagation system