

## 宽叶缬草的离体培养及不定芽发生

危兆安<sup>1a,2</sup>, 张乍如<sup>3</sup>, 彭晓英<sup>1a\*</sup>, 周凤莺<sup>1b</sup>, 周双德<sup>1a</sup>

(1.湖南农业大学 a.生物科学技术学院; b.教务处, 湖南 长沙 410128; 2.邵阳学院 生物与化学工程系, 湖南 邵阳 422000; 3.岳阳职业技术学院 医学基础部, 湖南 岳阳 414000)

**摘 要:** 以盆栽宽叶缬草野生苗为材料, 切取其嫩叶、叶柄、地下幼嫩根状茎和不定根作为外植体, 探讨不同消毒方式及不同生长调节剂组合对愈伤组织诱导和不定芽分化的影响。结果表明, 嫩叶和叶柄外植体的消毒方式以 70% 酒精浸泡 30 s, 再用 0.1% 升汞浸泡 6 min 效果较好; 地下部外植体因受污染比较严重, 消毒困难, 死亡率为 100%。叶片和叶柄均能诱导出愈伤组织, 且产生具香味的毛状根。适宜的愈伤组织诱导培养基为 MS+2,4-D 2 mg/L +6-BA 0.5 mg/L, 以叶为外植体的诱导率较高, 可达 80%。愈伤组织在供试培养基中分化困难, 最高分化率仅为 25%, 培养基为 MS+6-BA 4 mg/L+NAA 0.5 mg/L。以具芽点分化的愈伤组织为材料进行石蜡切片, 显微观察显示, 不定芽的发生起源于愈伤组织表皮细胞的分裂, 属于外起源。

**关 键 词:** 宽叶缬草; 组织培养; 愈伤组织; 不定芽

中图分类号: Q944-33 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2010)04-0395-04

## Culture *in vitro* and bud morphogenesis of *Valeriana officinalis* L. var. *latifolia* Miq.

WEI Zhao-an<sup>1a,2</sup>, ZHANG Zha-ru<sup>3</sup>, PENG Xiao-ying<sup>1a\*</sup>, ZHOU Feng-ying<sup>1b</sup>, ZHOU Shuang-de<sup>1a</sup>

(1.a.College of Bioscience and Biotechnology; b.Department of Educational Administration, HNAU, Changsha 410128, China; 2.Department of Biological and Chemical Engineering, Shaoyang College, Shaoyang, Hunan 422000, China; 3.Department of Basic Medical Sciences, Yueyang Vocational and Technical College, Yueyang, Hunan 414000, China)

**Abstract:** Amplification protocol *in vitro* was developed for multiplication of *Valeriana officinalis* L. var. *latifolia* Miq. by using leaves, petioles, rhizome and roots derived from wild plants grown in pot as explants. Effects of different plant growth regulators on callus induction, adventitious bud differentiation and bud anatomy were studied. The results showed that it was optimal for the explants to be disinfected with 70% ethanol for 30 s and then soaked with 0.1% mercuric chloride for 6 min, the optimum medium for callus induction was MS+2,4-D 2 mg/L +6-BA 0.5 mg/L, and callus induction rate of leaves was up to 80%. However, buds were hard to regenerate from callus, and the highest differential rate was 25% on the medium of MS+6-BA 4 mg/L+NAA 0.5 mg/L. Buds regenerated exogenous from callus epidermal cells.

**Key words:** *Valeriana officinalis* L.; tissue culture; callus; adventitious bud

宽叶缬草(*Valeriana officinalis* L.var. *latifolia* Miq.)系败酱科缬草属(*Valeriana*) 多年生草本植物缬草的一个变种<sup>[1]</sup>, 其根状茎及根能入药, 主治神经衰弱、心神不安、失眠等症<sup>[2]</sup>, 是重要的药用植

物与香料植物<sup>[3-7]</sup>。

宽叶缬草常见的繁殖方式是种子繁殖和根茎繁殖, 但有性繁殖效率较低<sup>[8-9]</sup>, 且根茎繁殖需耗用大量可用药材和土地, 繁殖成本高, 因此, 利用生

收稿日期: 2010-05-14

基金项目: 湖南省教育厅项目(09C877)

作者简介: 危兆安(1964—), 男, 湖南新邵人, 硕士, 讲师, 从事植物学研究, azw-1908@163.com; \*通讯作者, xypeng@hunau.net

物技术手段进行宽叶缙草优良种质的快速繁殖及有效成分的工厂化生产成为必然趋势。目前组织培养仅限于子叶的培养和愈伤组织诱导<sup>[10-13]</sup>。笔者拟采用组织培养手段探讨宽叶缙草离体诱导的适宜条件,并对不定芽的发生进行解剖学研究,以期为宽叶缙草的快速繁殖及有效成分的进一步开发利用提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

采集湖南省永顺县松柏镇大青山海拔800 m处宽叶缙草,进行室内盆栽,盆栽苗长出新叶后,分别切取嫩叶、叶柄、地下幼嫩根状茎和不定根作为外植体。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 培养基的配制及培养条件

以MS培养基为基本培养基,蔗糖3%,琼脂0.7%,pH为5.8~6.0,121℃高压灭菌20 min。培养温度为(24±2)℃,光照度为2 000 lx,每天光照12~14 h。

愈伤组织诱导培养基中添加2,4-D(1.0、2.0、4.0 mg/L)和6-BA(0、0.5、1.0、2.0 mg/L)配比;不定芽分化培养基中添加6-BA(1.0、2.0、4.0、6.0、8.0 mg/L)和NAA(0.5、1.0 mg/L)配比;生根培养基中添加NAA(0.5 mg/L)。每组试验中每三角瓶接种4枚外植体,10瓶为1个处理,每个处理设3次重复。

#### 1.2.2 外植体的消毒与接种

将外植体以流水冲净,用70%酒精浸泡(0、30、

60 s)后,转入0.1%的升汞中消毒(4、6、9 min),无菌水冲洗3次。将叶片切块(1 cm×1 cm)、叶柄与不定根切段(0.8~1 cm)、根状茎切块(1 cm×1 cm×2 mm),分别接种在愈伤组织诱导培养基上,每三角瓶接种4枚外植体,5瓶为1个处理,每个处理设3次重复。10 d后统计污染率,20 d后统计死亡率。

#### 1.2.3 不定芽再生的石蜡切片与显微观察

将正在启动的愈伤组织和分化的不定芽用FAA固定液固定,常规石蜡法制片,旋转切片机(YD-202)切片,切片厚度8 μm,海氏苏木精染色,中性树胶封片,MOTIC-BA400显微镜观察并拍照。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同消毒试剂与时间对外植体培养的影响

用70%酒精和0.1%升汞溶液对宽叶缙草的各外植体分别进行消毒处理,不同处理时间的效果见表1。由表1可知,外植体的污染率随着酒精和升汞消毒时间的延长呈下降趋势,而死亡率随着消毒时间的延长呈上升趋势。可能是因为70%酒精对细胞的穿透力较强,所以浸泡时间亦不能过长。叶片和叶柄的酒精消毒时间可为30 s,升汞溶液浸泡消毒时间为6 min。2种消毒剂配合使用能达到较好的效果。根状茎和不定根生长于土壤中,表面受污染严重,酒精浸泡60 s与升汞消毒9 min后,接种到培养基上,前3 d均显示无菌,但随后陆续出现污染,直至全部死亡。推测为内生菌感染,故地下部分的培养无法进行。

表1 不同消毒试剂和消毒时间对外植体培养的影响

Table 1 Effects of different sterilization reagent and time on explants growth

编号	酒精消毒时间/s	升汞消毒时间/min	污染率/%			死亡率/%		
			叶片	叶柄	不定根与根状茎	叶片	叶柄	不定根与根状茎
1	0	4	25	10.0	100	25	10.0	100
2	0	6	10	7.5	100	15	7.5	100
3	0	9	10	5.0	98	15	5.0	100
4	30	4	20	2.5	98	20	2.5	100
5	30	6	10	5.0	98	7.5	5.0	100
6	30	9	10	5.0	98	5.0	5.0	100
7	60	4	15	2.5	98	15	2.5	100
8	60	6	5	2.5	98	20	2.5	100
9	60	9	5	5.0	98	25	5.0	100

## 2.2 不同生长调节剂配对外植体愈伤组织诱导的影响

宽叶缙草愈伤组织诱导频率与外植体有直接关系。叶片切块和叶柄切段，均能诱导出愈伤组织，但诱导条件和愈伤组织的生长情况稍有差异。叶柄

在第 4 天开始启动(封三图 1-1)，10 d 后长出浅绿色致密愈伤组织，生长迅速；幼嫩叶片在第 5 天开始卷曲，切口边缘开始长出亮白色的愈伤组织(封三图 1-2)，结果见表 2。

表 2 不同质量浓度配比的生长调节剂对宽叶缙草不同外植体愈伤组织诱导的影响

Table 2 Effects of different plant growth substances combination on callus induction

编号	2,4-D 质量浓度/ (mg·L <sup>-1</sup> )	6-BA 质量浓度/ (mg·L <sup>-1</sup> )	愈伤组织诱导率/%		愈伤组织生长情况	
			叶柄	叶	叶柄	叶
1	1	0	45.0	55	较致密，绿色	较疏松，黄绿色
2	1	0.5	50.0	65	较致密，绿色	较疏松，白色
3	1	1	50.0	65	致密，绿色	较致密，淡绿色
4	1	2	45.0	45	致密，绿色	较致密，绿色
5	2	0	55.0	65	较致密，绿色	质地疏松，白色
6	2	0.5	65.5	80	较致密，绿色	质地疏松，浅黄色
7	2	1	65.0	80	较致密，绿色	较致密，淡绿色
8	2	2	50.0	75	致密，绿色	致密，绿色
9	4	0	50.0	70	较致密，绿色	质地疏松，浅黄色
10	4	0.5	55.0	75	较致密，绿色	质地疏松，浅黄色
11	4	1	50.0	75	较致密，绿色	较致密，黄绿色
12	4	2	50.0	75	致密，绿色	致密，绿色

2,4-D 质量浓度 1~4 mg/L 时，愈伤组织的诱导率呈上升趋势，但 2,4-D 质量浓度过高(4 mg/L)也抑制愈伤组织的产生，导致愈伤组织疏松，出现黏液化和水浸状的玻璃化现象。当 2,4-D 和 6-BA 质量浓度分别为 2 mg/L 和 0.5 mg/L 时，愈伤组织的诱导率较高。其中叶片在最适培养基上出愈率最高，可达到 80%，愈伤组织呈淡黄绿色，较致密，生长速度较快(封三图 1-3)，且愈伤组织表面长出大量白色的毛状根(封三图 1-3 箭头所示)，具浓郁的香味；叶柄的出愈率次之，后期可达到 65.5%，愈

伤组织致密，也可长白色毛状根，具浓郁香味。

## 2.3 不同生长调节剂浓度组合对愈伤组织分化的影响

将幼嫩叶片和叶柄诱导出的愈伤组织置于分化培养基中继续培养，20 d 后发现玻璃化和黏液化的愈伤组织出现褐化，无芽点的分化，而其他愈伤组织质地依然致密，颜色淡黄绿色。可见，愈伤组织不宜分化，故统计时排除此类愈伤组织。25 d 后统计愈伤组织上的不定芽分化率并记录愈伤组织的变化情况，分化结果见表 3。

表 3 不同生长调节剂及组合对不定芽分化的影响

Table 3 Effects of different growth regulator on the differentiation of adventitious buds

编号	6-BA 质量浓度/(mg·L <sup>-1</sup> )	NAA 质量浓度/(mg·L <sup>-1</sup> )	分化率/%		愈伤组织生长情况
			叶柄	叶片	
1	1.0	0.5	0	0	疏松，透明，玻璃化
2	1.0	1.0	0	0	疏松，透明，毛状根增多
3	2.0	0.5	0	0	疏松，浅黄色
4	2.0	1.0	0	0	疏松，浅黄色，毛状根增多
5	4.0	0.5	20	25	稍致密，浅黄绿色，分化少量芽点
6	4.0	1.0	15	25	稍致密，浅黄色，毛状根增多，分化少量芽点
7	6.0	0.5	15	20	稍致密，浅黄绿色，分化少量芽点
8	6.0	1.0	5	10	稍致密，浅黄色，分化少量芽点
9	8.0	0.5	5	5	稍致密，浅黄绿色
10	8.0	1.0	0	0	稍致密，浅黄色

随着 6-BA 质量浓度的升高,愈伤组织由疏松转为稍致密,颜色由透明的浅黄色转为绿色,更有利于芽点的分化.由叶柄诱导出的愈伤组织较致密,但分化率低于叶片诱导的愈伤组织. BA(4.0 mg/L)和 NAA(0.5 mg/L)配合使用稍有利于致密浅黄绿色愈伤组织的分化培养,但该组试验中最高分化率只达到 25%,适宜的分化培养基配方还需要作进一步的试验.

#### 2.4 生根培养与移栽

将分化的不定芽在原增殖培养基上继续培养至 3 cm 高时,从基部切割再放入生根培养基 MS+NAA(0.5 mg/L).8 d 后即可产生白色的不定根(封三图 1-4).炼苗后可盆栽(封三图 1-5)或移入大田栽培(封三图 1-6).

#### 2.5 不定芽再生的细胞学观察

石蜡切片的观察结果显示,切割的叶片外植体在培养基中培养几天后,切割边缘的细胞脱分化,细胞染色较深(封三图 1-7).这些细胞不断进行分裂,产生大量的薄壁细胞,形成愈伤组织.将愈伤组织切割下来,在芽分化培养基上培养,愈伤组织表面细胞再分化,逐渐形成典型的芽原基的结构(封三图 1-8 箭头所示).说明宽叶缬草愈伤组织不定芽发生属外起源

### 3 讨论

宽叶缬草的叶片和叶柄都能诱导出愈伤组织,但叶柄诱导出的愈伤组织较为致密,分化率低于叶片诱导的愈伤组织.推测为前者的维管组织较多,不利于分化.尽管试验中不定芽分化率仅有 25%,但已成功诱导宽叶缬草试管植株并移栽成活,将为离体培养体系的建立提供一定的技术参考.

在愈伤组织培养过程中,随 NAA 含量的增多,

愈伤组织上出现大量的毛状根,对不定芽的分化产生负面影响,但这些毛状根的干粉具有类似于野生植株干粉的清香,目前这些干粉成分的测定正在进行之中.

#### 参考文献:

- [1] 郭淑华. 缬草的特征特性及繁殖技术[J]. 甘肃农业科技, 2004(11): 52.
- [2] 黄宝康, 黄流清, 赵忠新, 等. 国产缬草属 4 种药用植物镇静催眠作用的比较研究[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(11): 2710-2711.
- [3] 黄宝康, 郑汉臣, 秦路平. 缬草属植物的镇静催眠作用及机制[J]. 药学实践杂志, 2007, 2(3): 134-136.
- [4] 杨乾, 鞠爱华, 白万富, 等. 宽叶缬草的化学成分及药理活性研究进展[J]. 中国现代应用药学杂志, 2008, 25(7): 613-616.
- [5] 郅建坤, 屈会化, 栾新慧. 缬草属植物化学成分及药理研究概况[J]. 中国药学杂志, 2002, 37(10): 729-733.
- [6] 张振学, 姚新生. 药用植物缬草的化学研究进展[J]. 中国药物化学杂志, 2000, 10(3): 226-230.
- [7] 邓芹英. 缬草根化学成分的研究[J]. 分析测试学报, 1995, 14(2): 18-21.
- [8] 陈倩, 王跃进, 王有为. 宽叶缬草繁殖生物学特性研究[J]. 武汉植物学研究, 2005, 23(2): 169-173.
- [9] 董燕, 韩见宇, 孙超. 宽叶缬草种子繁殖研究[J]. 种子生产, 2007, 26(9): 107-108.
- [10] 罗世家, 周光来, 张坤. 缬草叶片组织培养研究[J]. 湖北民族学院学报: 自然科学版, 2005, 23(2): 137-140.
- [11] 张兰英, 李耿光, 郝殊婷, 等. 宽叶缬草子叶培养再生植株及其繁殖[J]. 植物生理学通讯, 1988(2): 57-58.
- [12] 陈建荣, 秦玉芝, 谷臣华. 宽叶缬草叶愈伤组织诱导初步研究[J]. 吉首大学学报: 自然科学版, 2000, 21(3): 14-16.
- [13] 刘娟, 汪洋. 黑水缬草组织培养与快速繁殖研究[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(9): 2171-2172.

责任编辑: 罗慧敏

英文编辑: 胡东平