

# 白花丹参的组织培养和植株再生

梁宏伟<sup>1</sup>, 王锋祥<sup>2</sup>, 崔秀伟<sup>3</sup> (1. 三峡大学生物技术研究中心, 湖北省天然产物研究与利用重点实验室, 湖北宜昌 443002; 2. 莱芜职业技术学院生物研究所, 山东莱芜 271100; 3. 山东省莱芜市农业科学技术研究所, 山东莱芜 271100)

**摘要** [目的] 通过植物组织培养技术快速大量繁殖白花丹参优良品系, 深度开发利用这一药用植物资源。[方法] 以白花丹参的幼嫩叶片和叶柄作为外植体, 接种至器官发生分化培养基上诱导丛生芽, 然后作壮苗培养, 继而生根培养, 建立一套快速再生体系。[结果] 在 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L 和 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L 培养基上均能诱导分化大量丛生芽, 然后转接至 MS+KT 1.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L 继代培养基上做继代、壮苗培养, 消除玻璃化现象。选取健壮芽苗转接至 1/2 MS+IBA 0.2 mg/L 培养基上生根培养, 待试管苗上长出数条 2 cm 长的健壮根系时即可炼苗移栽, 成活率在 90% 以上。[结论] 建立了一套完整的白花丹参组织培养再生体系。

**关键词** 白花丹参; 组织培养; 植株再生

**中图分类号** S603.6 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)21-09876-01

## Tissue Culture and Plant Regeneration of *Salvia miltiorrhiza* Bge. f. alba

LIANG Hong-wei et al (Biotechnology Research Center of China Three Gorges University, Key Laboratory of Natural Products Research and Development of Hubei Province, Yichang, Hubei 443002)

**Abstract** [Objective] The research aimed to propagate abundantly excellent line of *S. miltiorrhiza* Bge. f. alba by plant tissue culture, and strengthen the utilization of the officinal plant. [Method] With the leaf and leafstalk of *S. miltiorrhiza* Bge. f. alba as explants, the different medium were used to induce clustered buds, strengthen regenerative bud and conduct rooting induction so as to establish a set of rapid propagation system. [Result] The great number of clustered bud were induced at MS medium with supplement 2.0 mg/L 6-BA and 1.0 or 0.5 mg/L NAA. And the buds were transferred to MS medium with supplement 1.5 mg/L KT and 0.2 mg/L NAA in order to strengthen bud and eliminate vitrification of buds. Then rooting induction was conducted at 1/2 MS medium with supplement 0.2 mg/L IBA. The regenerated plant was exercised and transplant when they outgrew a few 2 cm stocky roots. The survive rate reached over 90%. [Conclusion] A whole regeneration system of *S. miltiorrhiza* Bge. f. alba was established.

**Key words** *Salvia miltiorrhiza* Bge. f. alba; Tissue culture; Plant regeneration

白花丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bge. f. alba)是唇形科植物丹参的变形<sup>[1]</sup>, 主要分布在山东省莱芜山区。在《山东中草药手册》及《泰山药用植物》中有过白花丹参的记载, 白花丹参与紫花丹参相比较, 在疗效上有独到之处, 所以引起了医药工作者和商家的广泛关注, 并被逐渐开发利用。目前, 白花丹参已作为一个新品种被收录进《山东省中药材标准》(2002年版)<sup>[2]</sup>。医学研究证明, 该药物有效成分高于《中国药典》中的紫花丹参, 具有祛痰止痛、活血通络、清心除烦的功效, 对妇女不孕、月经不调、肝脾肿大、心绞痛等均具有明显的治疗效果, 尤其对血栓闭塞性脉管炎有特效。目前白花丹参的药品开发尚处在基础研究阶段, 至今少见有关白花丹参组织培养和植株再生的报道。

## 1 材料与方

**1.1 材料** 以采自温室栽培的白花丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bge. f. alba)幼嫩叶及叶柄为外植体。

**1.2 方法** 用洗洁精将叶及叶柄清洗干净后, 流水冲洗 30 min, 然后置于 70% 乙醇溶液中浸泡 20 s, 再用 0.1% 升汞溶液灭菌 10 min 后, 用无菌水冲洗 5 次(以上操作均需轻轻摇动)。按无菌操作要求将外植体剪切成 0.5~1.0 cm<sup>2</sup> 小块接种至器官发生分化诱导培养基上。

**1.3 培养过程** 将外植体接种至①MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L; ②MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L 培养基上诱导不定芽。培养 3 周后, 将①、②培养基上分化产生的芽苗转接至③MS+KT 1.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L 的培养基上壮苗, 待芽苗长至 3~4 cm 时剪切单芽茎段做继代培

养。选取继代培养中的健壮芽苗转接至④1/2 MS+IBA 0.2 mg/L 培养基上做生根培养。

**1.4 培养条件** 以上所用的培养基均添加 0.7% 琼脂, 30 g/L 蔗糖(A.R), pH 值 5.8。培养温度(25±2)°C, 光照时间 12 h/d, 光照强度 2 000~3 000 lx。

## 2 结果与分析

**2.1 不定芽的诱导** 外植体在器官分化诱导培养基上培养 7 d 后, 叶片外植体切口不同程度卷曲膨大并产生芽点; 16 d 后切口处形成大量丛生芽, 40 d 时生长至 3~5 cm 高的丛生芽苗(图 1)。2 种培养基诱导再分化效果相近, 但部分芽苗出现玻璃化现象, 可能是 6-BA 浓度偏高所致。该问题在继代和壮苗培养中可得到解决。



图 1 白花丹参的诱导丛生芽(培养 40 d)

Fig. 1 The clustered shoots induction of *Salvia miltiorrhiza* Bge. f. alba

**作者简介** 梁宏伟(1976-), 男, 内蒙古赤峰人, 讲师, 从事珍稀濒危植物的濒危机制、发育机理、保护和利用研究。

**收稿日期** 2009-04-07

(下转第 9904 页)

表2 家鸡胚胎甲基化比例

Table 2 The methylation proportion of chicken embryo %

日龄 Day old	非该两种甲 基化位点 Methylation loci except these two kinds	<sup>14</sup> C 甲基 化比例 <sup>14</sup> C methylation proportion	<sup>13</sup> C 甲基 化比例 <sup>13</sup> C methylation proportion	两种甲基化 比例合计 Proportion total of two kinds of methylation
3	360	17.88	15.08	32.96
7	323	20.00	18.48	38.48
12	350	20.76	18.69	39.45
15	299	23.08	24.65	47.73
合计 Total	1 332	20.48	19.30	39.78

注: 因为该方法对于<sup>13</sup>C<sup>m</sup> CGG 或<sup>14</sup>C<sup>m</sup> CCGG, 两种酶都是敏感的, 即都不能酶切, 都无带显示, 因而无法检测出来, 所以对于非差异位点, 只能认为可能为未发生甲基化位点。

Note: Because the method was sensitive to <sup>13</sup>C<sup>m</sup> CGG and <sup>14</sup>C<sup>m</sup> CCGG, it could not be digested and had no band. So it couldnot be detected. For non-differential locus, the loci was thought as having no methylation.

标记表达, 说明在胚胎发育期间, 组织形成确实受基因组甲基化调控的影响<sup>[7]</sup>。熊远柱等在国内首次将此项技术用于家畜基因组 DNA 甲基化的研究, 在杂种优势的预测上, 验证了总体甲基化程度与杂种优势无关, 而特异位点上的甲基化改变, 对杂种优势有显著效应这一结论<sup>[8]</sup>。徐青等用荧光标记代替同位素标记的方法, 提出了家鸡上变异的甲基化位点数量, 但种类多这一结论<sup>[9]</sup>。

笔者研究发现, CCGG 位点单链外侧的胞嘧啶甲基化和双链内侧胞嘧啶甲基化的比例共计 39.78%, 与现有的报道基本相符。HpaII 与 MspI 识别相同的 CCGG 序列, 但它们对基因组中甲基化的敏感性不同, 用其处理基因组 DNA, 就会产生甲基化敏感多态性片段。通常个体基因组带型 I (CCGG 位点没有发生被检测到甲基化类型) 占较大比例, 而单链外侧的胞嘧啶甲基化和双链内侧胞嘧啶甲基化, 更容易倾向哪一种则没有定论。该研究结果表明, 二者发生几率基本接近, 这与和徐青等对成年家鸡的研究结果较为接近<sup>[9]</sup>。但是, 甲基化发生也是具有组织特异性的, 因此下一步研究应该更加

(上接第 9876 页)

**2.2 继代、壮苗培养** 待诱导的芽苗长至 3~4 cm 时剪切单芽茎段做继代培养。继代培养基中, 以 KT 替代 6-BA 并降低植物激素的浓度, 使芽苗旺盛健壮生长, 培养过程中玻璃化现象逐渐消除。继代培养过程中部分芽苗会生根, 但不健全。

**2.3 生根移栽** 选取继代培养中健壮芽苗转接至生根培养基上, 待试管苗上长出数条 2 cm 长的健壮根系时, 移至光线较好的房间内散光下炼苗 3~5 d, 然后移至温室打开瓶口炼苗 1 d。第 2 天用镊子小心地将植株取出, 用自来水将根上的琼脂洗去后移栽到经灭菌消毒的蛭石加腐殖土 (1:1) 中, 搭小拱棚保持湿度, 注意遮阴和适当通风, 移栽后生长良好, 成活率在 90% 以上。

针对不同组织结构, 不同器官的分化及相关过程中甲基化水平变化来开展。试验结果同时表明, 甲基化水平在胚胎发育中是呈现升高趋势的, 这和现有的表观遗传胚胎学的观点相同, 即 DNA 甲基化, 基因组印记等表观遗传现象在胚胎发育中都有着相应的体现。研究表明, 当减少 3 倍的甲基胞嘧啶, 在胚胎干细胞的增殖或生命力中没有出现可探测的影响; 但减少相同量的胚胎 DNA 甲基化, 则会导致异常的生长发育和胚胎的致死现象。甲基化模式在干细胞发育或早期胚胎形成时就已经建立, 而且在随后的有丝分裂细胞分化时一直存在。所以, 这种甲基化水平递升的结果和表观遗传观点是符合的, 也是对这一观点的有力佐证。但是, 如果要把研究具化到表观遗传对性状的调控, 还需要对具体参与其中的基因和组织器官特异性甲基化进行进一步研究。

### 参考文献

- [1] MARK L, LIANG G M, CHARLES H, et al. Identification and characterization of differentially methylated regions of genomic DNA by methylation-sensitive arbitrarily primed PCR [J]. *Cancer Research*, 1997, 57: 594-599.
- [2] XIONG L Z, XU C G, SAGHAI M A, et al. Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines, detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique [J]. *Mol Gen Genet*, 1999, 261: 439-446.
- [3] XU M L, LI X Q, KORBAN S S, et al. AFLP-Based Detection of DNA Methylation [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2000, 18: 361-368.
- [4] SANTOS F, HENDRICH B, REIK W, et al. Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo [J]. *Development Biol*, 2002, 241: 172-182.
- [5] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南 [M]. 金冬雁, 译. 2 版. 北京: 科学出版社, 1995.
- [6] VOS P, HOGERS R, BLEEKER M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting [J]. *Nucleic Acids Research*, 1995, 23: 4407-4414.
- [7] CHAKRABARTY D, YU K W, PAEK K Y. Detection of DNA methylation changes during somatic embryogenesis of Siberian ginseng (*Eleutherococcus senticosus*) [J]. *Plant Science*, 2003, 165: 61-68.
- [8] 蒋曹德, 邓昌彦, 熊远. DNA 甲基化差异对猪生长性状的影响 [J]. *畜牧兽医学报*, 2005, 36(2): 105-110.
- [9] QING X U, SUN D X, YUAN Z, et al. F-MSAP: A practical system to detect methylation in chicken genome [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2005, 50: 2039-2044.

### 3 讨论

目前, 用白花丹参开发成的保健食品已大量上市。英国伦敦大学药用植物研究所还把白花丹参作为治疗老年痴呆症的重要植物药。在山东省莱芜市苗山镇已建立白花丹参种苗基地 20 hm<sup>2</sup><sup>[2]</sup>。但传统繁殖方法不仅速度慢, 产量低而且品质容易退化。通过组织培养来改良其品质、提高产量、离体培养克隆增殖白花丹参优良品系, 可以快速大量繁殖优良的白花丹参种苗, 可望从根本上解决当前白花丹参栽培中面临的问题和质量控制问题。

### 参考文献

- [1] 李建秀, 孙秀霞, 周凤芹, 等. 山东丹参类药用植物新资源 [J]. *山东中医药大学学报*, 1995, 19(3): 190-191.
- [2] 马丽虹, 翟树林, 王传杰. 白花丹参的开发进展 [J]. *中国林副特产*, 2005(1): 72.