

云南萝芙木叶愈伤组织诱导与植株再生

龙绛雪¹, 曹福祥¹, 曹基武¹, 董旭杰¹, 李治平²

(1. 中南林业科技大学, 湖南长沙 410004; 2. 醴陵市林业局, 湖南醴陵 412200)

摘要: 研究了云南萝芙木叶愈伤组织的诱导及器官发生条件。结果表明: 诱导愈伤组织的培养基为 MS+2,4-D 2.0 mg/L+6-BA 0.5 mg/L; 诱导愈伤组织芽分化和增殖的培养基分别为 MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L 和 MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L; 根分化的最适培养基为 1/2 MS+NAA 0.8 mg/L; 生根苗经练苗后移栽, 成活率达 90%, 生长良好。

关键词: 云南萝芙木; 组织培养; 愈伤组织; 植株再生

中图分类号: Q813.1 文献标志码: A

Callus Inducement and Plantlet Regeneration from Leaves of *Rauwolfia yunnanensis* Tsiang

LONG Jiang-xue¹, CAO Fu-xiang¹, CAO Ji-wu¹, DONG Xu-jie¹, LI Zhi-ping²

(1. Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, Hunan, China;

(2. Forestry Bureau of Liling City, Liling 412200, Hunan, China)

Abstract: This paper makes a study of callus formation and bud differentiation from the leaves of *Rauwolfia yunnanensis* Tsiang. The results show that the optimum medium for the inducement is that of MS+2,4-D 2.0 mg/L+6-BA 0.5 mg/L; the MS medium with 6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L and 6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L is preferable to the bud sprouting and regeneration; and the 1/2MS medium with NAA 0.8 mg/L is suitable for the root differentiation. After acclimatization, 90% of the regenerated plantlets transferred to an open field survive and grow well. re 90% of the plantlets survived and showed excellent growth.

Key words: *Rauwolfia yunnanensis* Tsiang; tissue culture; callus tissue; plantlet regeneration

云南萝芙木 *Rauwolfia yunnanensis* Tsiang 为夹竹桃科萝芙木属植物, 中国植被记录本属植物大约有 60 种, 分布于美洲、非洲、亚洲及大洋洲各岛屿。我国有 7 种^[1], 主要分布于西南、华南及台湾等省区。萝芙木以干燥根及茎入药。在印度, 萝芙木 *R. serpentina* 又称蛇根木, 数百年来被用来治疗头痛、焦虑和解蛇毒等, 享有“灵丹妙药”的美称^[2]。1952 年, Muller 等人从萝芙木根粗提取物中分离出利血平^[3], 随后被用来治疗高血压和精神方面的疾病^[4], 引起了医药界的高度重视。现已发现萝芙木根中含有几十种生物碱, 最主要的有利血平、阿马尼新、育亨宾等, 可以用于治疗多种疾病。国际市场上对该原料药总需求大, 每年需干根约 20 000 t, 且每年以 100~150 t 的需求增长^[5]。

我国上个世纪 60 年代利用本国的萝芙木资源自主生产了“降压灵”等降压药, 替代了印度进口的萝芙木制剂“寿比南”, 成为当时全国广泛应用的抗高血压药^[6]。在国产萝芙木中, 云南萝芙木^[7]生物总碱和育亨宾、利血平含量较高。由于过度采挖, 云南萝芙木野生资源出现了严重紧缺的局面。目前云南萝芙木主要通过种子与扦插繁殖种苗^[8~11], 但萝芙木种子采收困难, 发芽率低, 扦插生根困难, 因此进行萝芙木的组培快繁是解决萝芙木种源不足的有效途径^[12,13]。关于云南萝芙木的组织培养仅见 1979 年郑光植^[14]利用茎段诱导愈伤组织提取

收稿日期: 2008-02-18

基金项目: 云南省 2007 年度产业化重大关键技术开发项目[云发改高科(2007)1718 号]资助。

作者简介: 龙绛雪(1970—), 女, 湖南双峰人。讲师, 硕士研究生, 主要从事植物生理生化方面的教学与研究。

利血平等生物碱的报道,然而有关云南罗芙木组织培养进行植株再生还未见报道.本研究利用云南罗芙木叶作外植体诱导愈伤组织,进而诱导分化形成完整植株,为云南罗芙木快速繁殖提供了有效途径.

1 材料与方法

1.1 叶片愈伤组织诱导及芽的分化

1.1.1 外植体的消毒

选取云南罗芙木茎尖1~2轮嫩叶作外植体,用自来水冲洗2h,蒸馏水冲洗2~3次,用70%酒精消毒10s,0.1%升汞消毒7~8min,再用无菌水冲洗5~6次,备用.

1.1.2 愈伤组织的诱导

将消毒的叶片切成5mm×5mm大小并接种在含不同质量浓度的生长素及生长素与细胞分裂素组合的MS培养基上,25℃暗培养,每3d观察1次,25d后统计不同激素处理对愈伤组织诱导的影响.挑选其中呈颗粒状、饱满富有光泽的愈伤组织,经继代增殖培养,用于下一步的诱导分化(注:每个处理接种20个外植体,重复3次,下同).

1.1.3 芽的分化诱导

转接上述愈伤组织到含6-BA(1.0~3.0mg/L)+NAA(0.05~0.20mg/L)组合的MS培养基上,暗培养2周后转为自然光培养1周,再12h/d光照培养(光强2000lx).每3d观察1次,记录出现芽点的时间,6周后统计芽的分化率.

1.1.4 芽的增殖

将带芽点的愈伤组织切成小块,接种到含较高质量浓度6-BA的新鲜培养基中进行继代培养,经过20d观察并记录芽的增殖情况,用芽增殖倍数来表示,即

$$\text{芽增殖倍数(倍)} = (\text{芽总数} / \text{总愈伤组织块数}) \times 100\%$$

1.2 试管苗的生根诱导与炼苗移栽

1.2.1 生根诱导

切下增殖产生的3~4cm高的试管苗,接种在配有不同质量浓度NAA、IBA的1/2MS生根培养基中,每5d观察记录,4周后统计其生根率、平均根数、平均根长及生长状况.

1.2.2 炼苗移栽

炼苗时间为5~7d.先将生根苗转移至室外,松开封口膜(但不要揭掉),自然光照2~3d后可完全揭去封口膜.炼苗完成后移出生根苗,洗去培养基,栽入准备好栽培基质的营养钵中,栽培基质为珍珠岩、河沙及泥炭土的混合物($m_{\text{珍珠岩}} : m_{\text{河沙}} : m_{\text{泥炭土}} = 1 : 1 : 1$),初次浇透水,第1个星期注意湿度保持在85%左右.20d后统计成活率及生长状况,成活的小苗可移至大田栽培.

2 结果与分析

2.1 植物激素对愈伤组织诱导的影响

2.1.1 3种生长素类对愈伤组织诱导的影响

将外植体分别接种在含有2,4-D、NAA、IBA(分别为0.5、1.0、2.0、4.0mg/L)的MS培养基上,进行单因素生长素对愈伤组织诱导影响试验,结果见表1.

由表1可知,2,4-D启动愈伤组织诱导比NAA、IBA早.在2,4-D的处理上,幼叶接种后5~8d叶片边缘开始发皱,10d后叶片边缘开始长出灰绿色愈伤组织,第18d整个叶片已经完全诱导出愈伤组织,愈伤组织疏松水渍状.在一定质量浓度范围内,随着2,4-D质量浓度的增加,愈伤组织启动时间提前,但高质量浓度的2,4-D对愈伤组织的发生具有抑制作用,所形成的愈伤组织也逐渐褐化,说明培养基中2,4-D的质量浓度过高时会产生毒害作用.低质量浓度的NAA(0.5~1.0mg/L)不能诱导出愈伤组织;随着NAA质量浓度的增加,愈

伤组织也逐渐增多,同时有不同程度地分化.单独使用不同质量浓度的 IBA,一个月后也未见愈伤组织发生.由此可见,单独使用 IBA 对云南罗芙木叶片愈伤组织诱导是不适宜的,2,4-D、NAA 对愈伤组织诱导具有一定的促进作用,但单独使用的诱导效果均不佳.

表1 不同质量浓度的生长素对愈伤组织诱导的影响[†]

Table 1 The effect of different concentration auxin on callus inducement

激素质量浓度 (mg·L ⁻¹)	启动时间 /d	出愈率 /%	质地	颜色	根/芽	生长势
2,4-D 0.5	8	70.0±5.0	疏松	浅绿色	—	+
2,4-D 1.0	7	81.7±3.3	疏松	浅绿色	—	+
2,4-D 2.0	5	93.3±6.7	疏松,水渍状	浅绿色	—	++
2,4-D 4.0	5	83.3±3.7	疏松,水渍状	灰绿色,局部褐化	—	+++
NAA 0.5	—	—	—	—	—	—
NAA 1.0	18	11.7±3.3	疏松	黄褐色	生根 0.1~0.3 cm	+
NAA 2.0	15	43.3±1.7	疏松	黄褐色	生根 0.3~0.8 cm	+
NAA 4.0	13	81.7±3.3	疏松	黄褐色	生根 0.5~1.5 cm	++
IBA 0.5~4.0	—	—	—	—	—	—

[†] +愈伤生长量少; ++愈伤生长量较多; +++愈伤生长量多, 一无愈伤, 下同.

2.1.2 不同激素对比对愈伤组织诱导的影响

不同植物激素组合对云南罗芙木愈伤组织诱导的影响见表2. 由表2可以看出,不同激素组合对愈伤组织的诱导优于单因素生长素. 2,4-D与BA组合能有效地促进愈伤组织的形成和生长,其中2.0 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L BA组合形成的愈伤组织富有光泽,生长快,为胚性愈伤组织,适宜作分化培养或细胞悬浮培养的材料(见图1);KT的加入对愈伤组织的启动有抑制作用;2,4-D+NAA组合愈伤组织诱导率高,但愈伤组织易褐化;BA+NAA组合愈伤组织诱导启动慢,形成的愈伤组织量较少,同样逐渐褐化.综合对比后得出,2.0 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L BA组合对愈伤组织的诱导和分化培养是最适宜的,因此,愈伤组织的诱导及继代均以此为培养条件.

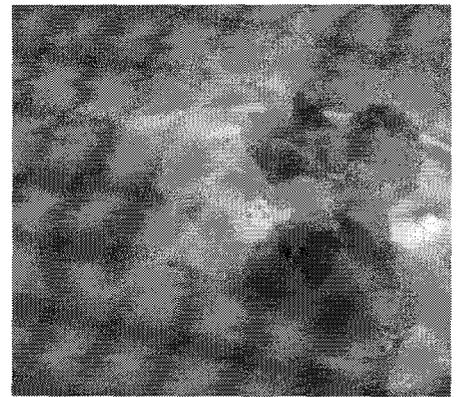


图1 叶片愈伤组织诱导

Fig. 1 Induced callus from leaf

表2 不同激素交互作用对叶片愈伤组织诱导的影响

Table 2 Interactive effects of plant hormone on callus inducement

激素配比	启动时间 /d	出愈率 /%	质地	颜色	生长势
1.0 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L NAA	14	91.7±3.3	较疏松	浅黄色,局部褐化	++
2.0 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L NAA	12	100±0.0	较疏松,绒毡状	浅黄色,褐化严重	+++
1.0 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L BA	8	81.6±3.3	较致密	黄白色	++
2.0 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L BA	6	100±0.0	疏松,颗粒状	黄白色	+++
1.0 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L KT	18	26.7±6.7	较致密,结节状	黄褐色	+
2.0 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L KT	15	45±5.0	疏松,水渍状	黄褐色,逐渐褐化	++
1.0 mg/L BA+0.5 mg/L NAA	14	51.7±6.7	较疏松	黄褐色	+
2.0 mg/L BA+0.5 mg/L NAA	12	81.7±3.3	疏松,水渍状	黄褐色,逐渐褐化	++

2.1.3 6-BA 与 NAA 的比例对愈伤组织诱导芽分化的影响

通过 6-BA(x_{6-BA})与 NAA(x_{NAA})配比试验结果表明(表 3): 6-BA 的质量浓度对愈伤组织的分化有明显的影响,随着 6-BA 质量浓度的增加,愈伤组织诱导芽的分化率也增加,但并不完全呈正相关.同时,6-BA 与 NAA 的配比对愈伤组织分化出芽有明显影响: x_{6-BA}/x_{NAA} 比值低时,促进愈伤组织生长,抑制芽的分化,分化的芽矮小畸形;当 x_{6-BA}/x_{NAA} 的比值为 5 时,愈伤组织褐化严重,部分愈伤组织分化出根;随着 x_{6-BA}/x_{NAA} 比值的增大,芽分化率也逐渐增大,愈伤组织也由原来的黄白色逐渐变为绿色,并在其表面出现突出的芽点;当 x_{6-BA}/x_{NAA} 达到 60 时,芽的个数和生长状态达到最好(见图 2).实验还发现,接种的愈伤组织块不能太小,以直径 0.8~1.0 cm 大小为宜,过小的组织块容易死亡;一般接种的组织块在分化培养基上可进一步生长到原来的 1.5~2.0 倍.



图 2 愈伤组织分化芽

Fig. 2 Differentiated shoots from callus of leaf

表 3 6-BA 与 NAA 的比例对愈伤组织芽分化的影响[†]

Table 3 Effect of different concentrations and combinations of auxin and cytokinins on the differentiation of leaf callus

BA+NAA/(mg·L ⁻¹)	x_{6-BA}/x_{NAA}	出芽外置体/个	出芽率/%	出芽总数	平均出芽数
1.0+0.2	5	7	13.3±3.3	11	1.6
1.0+0.1	10	11	18.3±1.7	23	2.1
1.0+0.05	20	14	26.7±3.3	36	2.6
2.0+0.2	10	13	21.7±3.3	29	2.2
2.0+0.1	20	20	33.3±1.7	56	2.8
2.0+0.05	40	25	41.7±3.3	78	3.1
3.0+0.2	15	17	28.3±6.7	54	3.2
3.0+0.1	30	27	45.0±5.0	97	3.6
3.0+0.05	60	32	53.3±1.7	138	4.3

[†] 每组接种外植体 20 个,出芽外植体和出芽总数为 3 次总和,平均出芽数=出芽总数/出芽外植体总数.

2.1.4 6-BA 与 NAA 的比例对芽增殖的影响

根据分化培养结果可以看出,较高质量浓度的 6-BA 与较低质量浓度的 NAA 有利于愈伤组织分化出丛生芽,因此芽的增殖培养选择较高比例的 6-BA 与 NAA 组合,诱导芽增殖的激素配比及结果见表 4.由表 4 可知,2.0 mg/L BA+0.05 mg/L NAA 组合的芽由于增殖系数较低,因此芽粗壮,芽高 3~4 cm,节间长度适中;随着 6-BA 使用质量浓度的增加(2.5~3.0 mg/L),芽增殖系数也大大提高,出芽较整齐,但再生的芽总体上没有前者壮实,节间较长,特别是 3.0 mg/L BA+0.05 mg/L NAA 组合,芽出现疯长,表现为茎秆细长,叶片小,此种试管苗对生根诱导不利;3.0 mg/L BA+0.1 mg/L NAA 组合可作最适芽增殖培养基配方,在此培养基上,原愈伤组织基部可以再形成新的丛生芽团(见图 3),从而进一步提高了芽的增殖倍数.由于丛生芽生长不一致,较长的芽可以直接作生根诱导或进行芽的增殖,较短的芽可以通过继代继续生长.培养基中添加 200 mg/L 水解乳蛋白,可以提高丛生芽的质量.



图 3 增殖的丛生芽

Fig. 3 Development of adventitious shoots

表 4 BA 与 NAA 配比对芽增殖的影响

Table 4 Effect of different concentrations and combinations of auxin and cytokinins on regeneration of adventitious shoot from leaf derived callus

BA+NAA/(mg·L ⁻¹)	出芽率/%	增殖系数	芽生长状态
2.0+0.05	100	5.6±1.4	出芽整齐, 茎秆粗壮, 节间 1.0~1.2 cm
2.5+0.1	100	14.7±1.8	出芽较整齐, 茎秆较粗壮, 节间 1.2~1.5 cm
3.0+0.05	100	16.3±1.7	出芽较整齐, 茎秆细长, 节间 1.8~2.2 cm
3.0+0.1	100	17.0±3.0	出芽较整齐, 茎秆较粗壮, 节间 1.2~1.6 cm

2.2 试管苗的生根诱导及练苗移栽

NAA 与 IBA 对试管苗的生根影响见表 5。由表 5 可知, 从根启动时间、生根率及生根数等方面来看, NAA 对根的诱导明显优于 IBA。

在附加 NAA 的培养基中, 生根率及生根数随 NAA 的质量浓度的增加而升高, 当 NAA 达到 0.8 mg/L 时, 其诱导效果也达到最佳状态(见图 4、图 5); NAA 的质量浓度增加到 1.0 mg/L 时, 生根率及生根数反而下降, 说明高质量浓度的 NAA 对生根具有抑制作用。IBA 对试管苗根诱导表现出类似的规律, 整体诱导效果较 NAA 差。所不同的是, NAA 诱导的试管苗基部均有不同程度的愈伤组织产生, 在愈伤组织处产生大量的根, 根短而粗, 每条不定根直径超过 1 mm, 这对于以采收根部为主要原材料的罗芙木来说具有十分重要的意义, 粗大发达的根系有利于植株的生长和生物碱的积累, 练苗与移栽也易于成活; IBA 诱导的不定根直接由皮下形成层分化而来, 没有愈伤组织产生, 诱导出的根细长。

生根苗在珍珠岩、河沙及泥炭土 ($m_{\text{珍珠岩}} : m_{\text{河沙}} : m_{\text{泥炭土}} = 1 : 1 : 1$) 的基质上练苗锻炼 20 d 后, 生长健康, 成活率达 90% 以上, 并有新芽抽出(见图 6), 此后移至更大的营养钵或大田能正常生长。从目前植株生长情况看, 遗传稳定性好^[15]。

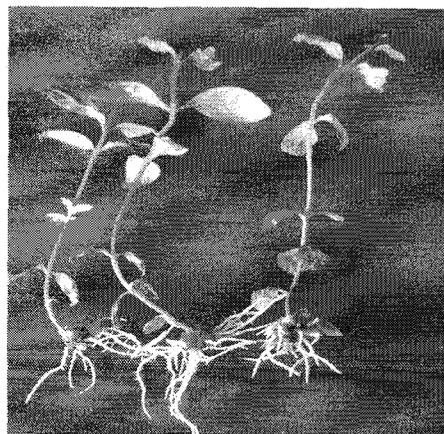


图 5 芽诱导生根

Fig. 5 Induced rooting

表 5 不同生长素对诱导生根的影响

Table 5 Influence of medium combination of NAA and IBA on rooting

激素/(mg·L ⁻¹)		平均生根率/%	平均生根数/条	平均根长/cm
NAA	IBA			
0.2	0	33.3±1.7	4.3±0.5	1.4±0.1
0.5	0	73.3±1.7	9.5±1.0	1.7±0.2
0.8	0	95.0±5.0	12.4±2.1	2.1±0.3
1.0	0	80.0±5.0	4.8±0.6	0.9±0.2
0	0.2	18.3±1.7	1.5±0.3	1.0±0.1
0	0.5	50.0±5.0	2.3±0.5	1.4±0.3
0	0.8	66.7±3.3	3.3±0.4	1.7±0.3
0	1.0	46.6±3.3	2.1±0.4	0.8±0.2

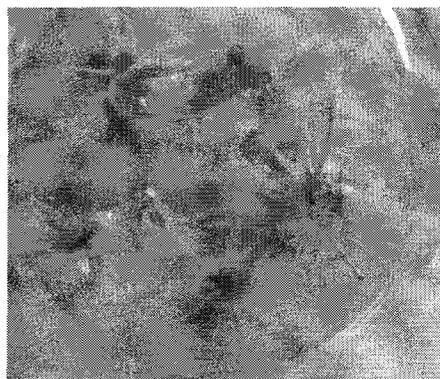


图 4 芽诱导生根

Fig. 4 Induced rooting

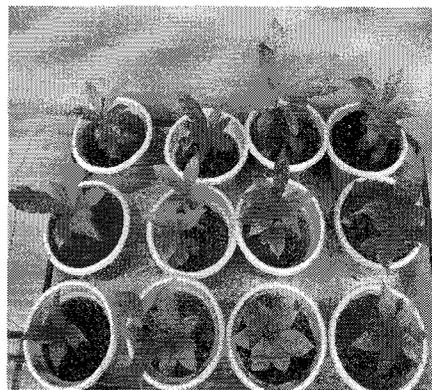


图 6 移栽的再生苗

Fig. 6 Plantlets regeneration

3 结论与讨论

3.1 结论

(1) 诱导云南萝芙木叶愈伤组织产生和继代的适宜培养基配方为 MS+2,4-D 2.0 mg/L+6-BA 0.5 mg/L, 诱导率达 100%; 诱导的愈伤组织淡黄色, 颗粒状, 生长速度快. 单独使用生长素诱导愈伤组织效果不佳, 不同激素组合诱导效果优于单因素激素诱导.

(2) 诱导愈伤组织分化和芽增殖的适宜培养基配方分别为 MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L 和 MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L, 分化率为 53.3%, 最大增殖倍数达 20.

(3) 诱导无菌苗根分化的适宜培养基配方为 1/2MS+NAA 0.8 mg/L, 根分化率为 95%, 根系发达, 练苗成活率达 90%.

3.2 讨论

(1) 离体的云南萝芙木叶外植体能分泌大量白色乳汁状液体, 其中的酚类物质容易氧化引起愈伤组织褐化. 因此, 外植体应在自来水下冲洗 2 h 以上, 减少伤流和酚类物质, 从而降低愈伤组织的褐化.

(2) 生长调节剂在植物组织培养中起着至关重要的作用, 其中生长素有促进细胞增殖和促进生根等生理作用. 有研究证明 2,4-D 对于愈伤组织的诱导和生长非常有效, 其活力明显高于 NAA 和 IBA^[16]. 本实验也证明了 2,4-D 对叶片愈伤组织的启动效果优于 NAA 和 IBA, 但 2,4-D 与 BA 配合使用效果更好. 生根效果一般以 IBA 最好, 属于皮下生根, 形成的根多而细长. 在云南萝芙木试管苗的生根诱导中, NAA 的生根效果优于 IBA, 这与 R. Baksha 的研究结果一致, 同时也表明不同植物对生长素诱导生根的敏感性不同.

(3) 在木本植物中, 具有再生能力的愈伤组织主要由胚外植体得到, 而其它部位获得的愈伤组织再生能力极低, 这一直是木本植物利用组织培养技术进行植物改良和植物繁殖的一大障碍^[17]. 本实验通过较高比值 (BA 与 NAA 的质量浓度比) 的配比, 获得了云南萝芙木叶愈伤组织再生, 为云南萝芙木快速繁殖提供了有效的途径. 如何进一步提高愈伤组织的分化率, 降低愈伤组织分化过程中的褐化问题将有待继续探讨.

参考文献:

- [1] 李秉涛. Flora of China[M]. 北京: 科学出版社, 1995: 16, 143.
- [2] Albert S, Lyons. Ancient India[M]. Submitted by public Medical History, 2006: 27-30.
- [3] Mueller J M, Schlittler E, Bein H J. Reserpine the sedative principle of *Rauwolfia serpentina* [J]. *Experientia*, 1952, 8: 338.
- [4] Steck H. Le syndrome extrapyramidal et diencephalique au Largactil et au Serpasil[J]. *Ann. Med. Psychol.*, 1954, 112: 737-43.
- [5] Azhar Ali Farooqi, Sreeramu B S. Cultivation of medicinal and Aromatic Crops [M]. Universities Press (India) Private Limited, 2001: 210-219.
- [6] 刘力生, 陈孟勤, 曾贵云, 等. 高血压研究四十年[J]. *中国医学科学院学报*, 2002, 24(4): 401-408.
- [7] 曹福祥, 徐庆军, 王承南, 等. 萝芙木属植物的物种和分布[J]. *中南林业科技大学学报*, 2007, 27(6): 154-158.
- [8] 蒲崇德, 李开云. 云南萝芙木的栽培[J]. *中国野生植物*, 1991, 10(4): 491.
- [9] 许勇, 王正良. 云南萝芙木的扦插繁殖试验[J]. *热带农业科技*, 2004, 27(4): 45-46.
- [10] 赵永生, 周亚兴, 查云盛. 云南萝芙木引种驯化栽培及发展前景[J]. *中国民族民间医药杂志*, 2006, 80: 179-180.
- [11] 刘锡葵, 张方进, 祖炬雄. 云南萝芙木在怒江河谷地区试种报告[J]. *中药材*, 2007, 30(6): 631-633.
- [12] ShahrearAhmad, Amin M N, Azad M A K, et al. Micropropagation and plant regeneration of *Rauwolfia serpentina* by tissue culture technique[J]. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2002, 5(1): 75-79.
- [13] Baksha R, Miskat Ara Akhter Jahan, Rahima, et al. In vitro clonal propagation of *Rauwolfia serpentina* (Linn.) Benth[J]. *Bangladesh J. sci. ind. res.*, 2007, 42(1): 37-44.
- [14] 郑光植, 梁 崧. 云南萝芙木的组织培养[J]. *植物学报*, 1979, 21(2): 195-196.
- [15] 何 钢, 燕亚飞, 刘贤桂, 等. 金狮桂花丛生芽的诱导[J]. *中南林业科技大学学报*, 2007, 27(4): 28-32.
- [16] 丁路明. 2,4-D 和 6-BA 对早熟禾愈伤组织诱导的影响[J]. *草原与草坪*, 2003, 1: 34-371.
- [17] 陈陆琴. 五种木本植物的组织培养及其生理生化研究[D]. 大连: 辽宁师范大学, 2005: 9-10.