

# 地黄愈伤组织诱导条件的研究

刘梦林<sup>1</sup>, 睢鑫<sup>2</sup>, 崔红<sup>1\*</sup>, 王哲<sup>1</sup>, 李雪君<sup>1</sup>

(1. 河南农业大学, 国家烟草栽培生理生化研究基地, 河南郑州 450002; 2. 平原大学, 河南新乡 453002)

**摘要** 为寻求诱导地黄愈伤组织的最佳培养条件和激素配比, 研究了地黄不同外植体、激素浓度及其组合、培养基种类等条件下暗培养对地黄愈伤组织诱导的影响。结果表明: 以地黄叶片、叶柄、茎段作为外植体在 MS + 1.0~1.5 mg/L NAA 条件下诱导率均能达到 100%, 其中叶片诱导的愈伤生长势较好; 单独使用 NAA 和 2,4-D 均能高频率诱导出愈伤, 加入 0.5 mg/L 6-BA 后明显提高生长速度; MS、IS 培养基诱导率高, 但 B5 培养基中愈伤生长势较好。

**关键词** 地黄; 组织培养; 愈伤组织; 诱导条件

**中图分类号** Q943.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2006)21-5542-02

## Study on the Condition of Callus Induction of *Rehmannia glutinosa* Libosch

LIU Meng-lin et al (National Research Centre of Tobacco Physiology and Biochemistry, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002)

**Abstract** To gain the optimization conditions of the callus induction, the research on the inducement conditions of the callus from the different tobacco explants was conducted and the different culture media were added with various concentrations of 2,4-D, NAA and 6-BA. The result indicated that the rate of callus induction from leaf, petiole and stem segment was 100% on the medium with MS + 1.0~1.5 mg/L NAA, but more callus from leaf was induced. Two kinds of auxins could induce callus, but the callus grew faster in the medium added with 0.5mg/L 6-BA. MS and LS medium was more suitable for the callus induction and the callus from B5 medium grew best.

**Key words** *Rehmannia glutinosa* Libosch; Tissue culture; Callus; Inducement condition

地黄(*Rehmannia glutinosa* Libosch)是一种重要的常用传统补益中药, 为玄参科植物地黄的新鲜或干燥块根。始载于《神农本草经》, 列为上品, 具有滋阴清热, 补血止血等功效。现代药理研究发现, 地黄具有调节免疫功能, 影响心血管系统、造血系统、内分泌系统、中枢神经系统等各方面活性, 并具有抗肿瘤、抗衰老及降血糖等<sup>[1]</sup>多方面功效, 国内外对地黄的研究一直比较多。近年来, 应用植物细胞培养技术生产次生代谢产物或生产天然的植物成分, 已在许多植物上获得成功, 但在植物细胞培养中, 选择高产的外植体, 寻找合适的培养条件是提高植物细胞的生长速度和次生代谢产物的产量, 实现工业化生产的先决条件<sup>[2]</sup>, 所以愈伤组织诱导条件的筛选显得特别重要。有关地黄愈伤组织的诱导, 国内已有一些报道<sup>[3-5]</sup>, 但他们均以地黄离体快繁为主要目的。该试验在地黄不同外植体、激素浓度及其组合、培养基种类等条件下暗培养对地黄愈伤组织进行诱导, 以期获得地黄愈伤组织的高频率诱导, 并从中筛选出一些有用次生代谢产物高的株系, 为今后进行细胞悬浮培养生产药用成分及进一步研究提供一些有效载体和理论依据。

## 1 材料与与方法

**1.1 材料** 为温县农科所提供的“温 85-5”。

**1.2 无菌苗的获得** 从田间挖取地下块根, 流水冲洗干净, 用 70% 酒精表面消毒 30 s, 然后用 15% 的 NaClO 溶液对块根消毒 15 min, 再用无菌水冲洗 5~6 次。将带芽眼的部分切成小块放入 MS 培养基中, 在光照培养箱中培养, 光照强度为 2 000 lx, 光周期为 16 h 光照, 8 h 黑暗, 温度 26 ℃。

**1.3 幼苗的增殖培养** 40 d 左右将无菌苗自基部切下, 然后切成带有 1 个茎节的茎段分别放入 MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L 培养基中, 在光照培养箱中继代增殖培养。

**1.4 地黄愈伤组织的诱导** 将地黄无菌苗的叶片剪成 0.5

cm × 0.5 cm 小块, 叶柄、茎切成 0.5 cm 左右放入相应培养基上, 分以下情况: ①MS 添加不同激素及其组合; ②不同培养基 MS、B5、LS、Miller。培养过程中对其生长情况进行观察, 30 d 后统计诱导出的愈伤组织数量并计算诱导率, 同时记录愈伤组织的质地、颜色及生长情况。愈伤组织诱导率计算方法:

$$\text{诱导率} = \frac{\text{长出愈伤组织的外植体数}}{\text{总接种外植体的块数}} \times 100\%$$

## 2 结果与分析

### 2.1 不同激素及其配比对地黄愈伤组织诱导的影响(表 1)

地黄愈伤组织的诱导相对较容易, 但在无激素的对照组无愈伤组织的产生, 说明激素在愈伤组织诱导过程中起着决定作用。单独使用浓度为 1.0~2.0 mg/L NAA 和 2,4-D, 诱导率均能达到 100%; 低浓度时随浓度的增加, 诱导率增加, 生长

表 1 不同激素、不同浓度对诱导率的影响

浓度 // mg/L		接种外植体数	愈伤组织块数	诱导率 %	质地	生长情况
2,4-D	6-BA					
0	0	0	20	0		
0.5	0	0	30	24	80.0	浅黄色, 颗粒状 +
0.5	0.5	0	30	26	86.7	浅黄色, 颗粒状 +
0.5	1.0	0	30	30	100	黄色, 颗粒状 +++
1.0	0	0	30	30	100	黄色, 颗粒状 +++
1.0	0.5	0	30	30	100	黄色, 颗粒状 +++
1.5	0	0	30	30	100	黄色, 颗粒状 +++
1.5	0.5	0	30	28	93.3	黄色, 颗粒状 +++
2.0	0	0	30	26	86.7	黄色, 颗粒状 +++
0	0	0.5	30	25	83.3	灰白色, 疏松 ++
0	0	1.0	30	30	100	灰白色, 疏松 ++
0	0.5	1.0	30	30	100	灰白色, 疏松 +++
0	0	2.0	30	27	90.0	灰白色, 疏松 ++

注: + 生长势差; ++ 生长势较好; +++ 生长势好。下表同。

速度加快, 质地越好; 达到一定的浓度后诱导率不再增加, 并且出现褐化, 尤其是高浓度的 2,4-D。但是不同激素对愈伤组织质地影响差别较大, 2,4-D 诱导的愈伤呈浅黄色颗粒状, 而 NAA 诱导的愈伤呈灰白色, 疏松。6-BA 的加入对地黄愈伤组织的诱导与生长都有很大的促进作用, 在 2,4-D 浓度为 0.5 mg/L 时, 随着 6-BA 浓度的增加, 诱导率明显提高, 且生

**作者简介** 刘梦林(1979-), 男, 河南沈丘人, 硕士研究生, 研究方向: 中药组织培养。\* 通讯作者, 博士, 副教授, E-mail: cuihong@371.net。

**收稿日期** 2006-07-31

长速度加快;当 2,4-D 浓度提高到 1.0 mg/L 时,诱导率已达 100%,6-BA 的添加能提高愈伤的生长速度。

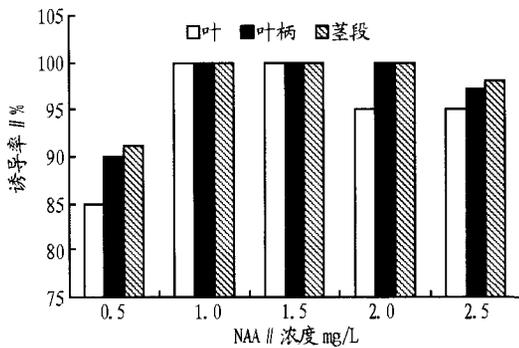


图 1 不同外植体对地黄愈伤组织诱导的影响

**2.2 不同外植体对地黄愈伤组织诱导的影响** 总体看,在 NAA 和 6-BA 共同诱导下,叶、叶柄、茎段对地黄愈伤诱导影响差别不大(图 1)。6-BA 浓度为 0.5 mg/L,随着 NAA 浓度的增加,叶、叶柄、茎段诱导率趋势一致,先增大后减少,愈伤均

为灰白色,疏松,但是叶片诱导时愈伤长势较好,茎段诱导的愈伤容易生根,不利于后期培养。

### 2.3 不同培养基对地黄愈伤组织诱导的影响(表 2、图 2)

以叶片和叶柄为外植体,分别在 MS、B5、LS、Miller 培养基添加 1.0 mg/L NAA 和 0.5 mg/L 6-BA 进行诱导,除 Miller 外,另 3 种培养基都能高频率诱导地黄愈伤。MS、LS 最相近,获得灰白色疏松愈伤,长势较好;B5 诱导率稍低,愈伤乳白色,但是后期生长速度最快;Miller 诱导率低,几天后愈伤组织迅速出现褐变现象,且组织块体积不再增大,生长速度极为缓慢。

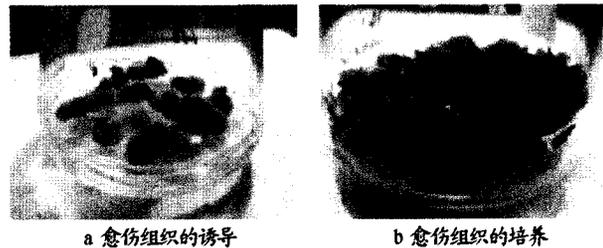


图 2 愈伤组织的诱导和培养

表 2 不同培养基对地黄愈伤组织诱导的影响

培养基类型	接种外植体数		愈伤组织块数		诱导率/%		色泽	生长情况
	叶	叶柄	叶	叶柄	叶	叶柄		
MS	30	25	30	25	100	100	灰白色,疏松	++
B5	30	25	29	24	96.7	96	乳白色,疏松	+++
LS	30	25	30	24	100	96	灰白色,疏松	++
Miller	30	25	24	23	80	92	发褐,疏松	+

### 3 讨论

诱导出旺盛生长的愈伤组织是药用植物大规模培养的关键,由于愈伤的诱导受许多因素的影响(外植体、培养基种类、激素种类及浓度、光温等),在诱导时需对培养条件进行优化,才能获得理想的材料。大量的文献表明,幼嫩的根、茎、叶、花或果实都是诱导愈伤组织的外植体,诱导的愈伤质地,生长速度有一定的区别。该试验仅对叶片、叶柄、茎段做了诱导,三者差别不大,从取材的角度看,叶片应是较佳的材料。一般来说,植物细胞在离体条件下,愈伤组织形成及器官发生对外源激素的需要是必不可少的<sup>[6]</sup>。激素的种类、浓度和组合十分错综复杂,不同的外源生长调节物质作用不同。地黄在 NAA 存在的情况下,诱导的愈伤多疏松,含水量大,易于做细胞悬浮培养,而 2,4-D 诱导的愈伤质地较致密,易于诱导芽分化;在组织培养中,常根据培养基配方中含盐量的不同将培养基分为 4 大类<sup>[7]</sup>,MS、LS 属于富集元素平衡培养基即高盐培养基,B5 属于高硝酸钾培养基,Miller 属于中等无机盐含量的培养基。该试验中,高盐的 MS、LS 有利于地黄愈伤的诱导,而高硝酸钾的 B5 有利于愈伤的生长,这与李琰对丹参的试验结果一致<sup>[8]</sup>。

不同外植体,不同诱导条件对药用植物次生代谢产物也有很大的影响。李琰等<sup>[10]</sup>对杜仲的研究表明,以叶片为外植体建立的愈伤组织,绿原酸含量较高;以胚轴为外植体建立的愈伤组织,黄酮含量较高。因此,该试验的下一步的工作不仅对地黄愈伤诱导条件进一步优化,更重要的是检测不同外植体、不同诱导条件下诱导的愈伤次生代谢含量。

### 参考文献

- [1] 王汀,陈礼明,刘青云.地黄药理研究进展[J].基层中药杂志,2001,15(1):41-43.
- [2] 唐克轩.中草药生物技术[M].上海:复旦大学出版社,2005.
- [3] 李明军,张嘉宝,刘萍.怀地黄离体培养再生植株及其生长调控[J].河南师范大学学报:自然科学版,1996,24(4):60-63.
- [4] 陈敏艳,梁宗锁,闫金婷,等.地黄组织培养及植株再生的研究[J].西北植物学报,2004,24(6):1083-1087.
- [5] 吴美芬,陈伟东.怀地黄块根、茎的组织培养及植株再生[J].植物生理学通讯,1986,22(2):41.
- [6] 詹祥灿.植物体细胞胚状体与器官建成的生理生化基础[J].植物学通报,1993,10(2):1-6.
- [7] 黄学林,李筱菊.高等植物组织离体培养形态建成及其调控[M].北京:科学出版社,1995:30-32.
- [8] 李琰,张存莉,严志海,等.不同培养基对杜仲愈伤组织诱导和生长的影响[J].西北林学院学报,2003,18(3):37-39.
- [9] 李琰,董娟娥,姜在民,等.杜仲愈伤组织中次生代谢产物积累动态研究[J].西北植物学报,2004,24(11):2033-2037.

(上接第 5515 页)

比自然花期提前 1 个月开花,可于 8 月中旬将已有花芽的桂花放入 13~14℃的暗室,经 10 d 左右即可开花。

**3.2 推迟花期** 利用增高温度的办法抑制花芽的萌动,可推迟花期。当 8 月中下旬夜温降至 18℃时,将盆栽花卉放入温室内,白天保持 25~35℃,夜温在 20℃以上。若光照过强、室温过高时,可在植株周围及叶片上喷水,以防灼伤。

入室时间视室外气温而定,如室外气温在 18℃以下时,可于计划花期前 10~15 d 入室。如国庆节用花,9 月 15 日前后入室,花期 7 d 左右。

### 参考文献

- [1] 沈兆敏.桂花栽培与利用[M].北京:金盾出版社,2002.
- [2] 虞佩珍.花期调控原理与技术[M].沈阳:辽宁科学技术出版社,2003.
- [3] 陈建峰,郭小平.无公害桂花人工丰产栽培技术[J].林业实用技术,2006(3):38-39.