

文章编号 1000-2421(2006)02-0182-04

小红参愈伤组织的诱导及分化*

罗春梅¹⁾ 邱璐^{2)**} 杨清辉³⁾ 萧凤回³⁾ 刘爱民¹⁾¹⁾ 云南省楚雄农业学校, 楚雄 675000; ²⁾ 云南省楚雄师范学院, 楚雄 675000; ³⁾ 云南农业大学农学院, 昆明 650201

摘要 通过不同外植体、基本培养基、暗培养、激素对小红参愈伤组织诱导和分化的试验研究, 结果表明诱导小红参愈伤组织产生的最佳条件为: 以真叶和顶芽(或侧芽)为外植体, 在 MS+BA 0.2 mg/L+NAA 3.0 mg/L 培养基上, 进行暗培养, 愈伤诱导率达 95%。芽形成的愈伤组织组织在 MS+BA 5.0+NAA 1.5~2.0 中均能分化出幼苗, 分化率达 100%, 但叶形成的愈伤组织未能分化出苗。

关键词 小红参; 组织培养; 愈伤组织; 不定芽

中图分类号 Q 943.1; S 572 **文献标识码** A

小红参为茜草科(Rubiaceae)植物云南茜草 *Rubia yunnanensis* (Franch.) Diels 的全草, 其性味甘、苦, 微温, 主要以根入药^[1], 是云南省彝族、白族、普米族、傈僳族等民族共同使用的野生中药材, 为临床上常用的典型民族药。具有补血活血、祛风除湿、软坚破积、镇静镇痛的功能, 主要用于治疗月经不调、贫血、失眠、跌打损伤、风寒湿痹、筋骨疼痛、半身不遂、角膜云翳、疮疖肿痛^[2]、银屑病^[3]、肺结核、慢性胃炎、肾炎、尿道炎、膀胱炎、脉管炎(虚寒型)、冠心病、心绞痛^[4]、过敏性紫癜、顽固性鼻衄及癌症肿瘤等^[5]。

小红参目前尚未形成规模种植, 主要依靠野生资源, 因无序采挖, 大量资源濒临枯竭, 药材供不应求, 价格高(市场收购价 25~48 元/kg), 市场需求量大。野生的小红参存在生长年限不一, 有效成分含量不稳定、质量不均一、产量不稳定等问题。而人工种植主要采用种子繁殖、枝条扦插、分株繁殖的方法。前者存在种子难萌发(50~60 d 才出苗), 生育期过长, 隔年种子发芽率较低的问题。后 2 种则存在繁殖系数低, 耗种量大, 成活率低的问题^[6]。为此, 开展小红参组织培养技术研究, 既可以保护小红参的野生资源量, 又可为小红参的大规模种植提供大量优质种苗, 实现小红参资源的合理开发利用, 使其为云南省天然药物产业发挥最大的经济效益。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为经过 1~2 a 人工种植的小红参, 取自楚雄农业学校药园, 连根挖起带土移栽至实验室内预培养, 每 2~3 d 用多菌灵溶液喷布, 半个月后取材进行试验。试验所用的小红参种子采自楚雄星升药业公司。

1.2 对植株不同部位的离体培养

用小红参的种子、根、根茎、茎、叶、顶芽、花、果实为外植体。经清洗消毒后, 分别接种于 MS+BA 3 mg/L+NAA 0.5 mg/L、MS+BA 3 mg/L+NAA 1.0 mg/L、MS+BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L、MS+BA 0.2 mg/L+NAA 2.0 mg/L 4 种培养基上。

1.3 不同基本培养基的对比

用小红参的真叶为外植体, 经清洗消毒后, 分别接种于 MS、1/2MS、N₆ 基本培养基, 添加 BA 0.2 mg/L+NAA 2.0 mg/L 相同激素水平的培养基上。

1.4 诱导顶芽(或侧芽)形成愈伤组织

用小红参的顶芽(或侧芽)为外植体, 经清洗消毒后, 分别接种于以 MS 为基本培养基, 添加 BA/NAA、BA/2,4-D 和 KT /2,4-D 3 组不同激素组合

收稿日期: 2005-11-06

* 云南省科技厅云南省中药现代化科技产业专项(2002zy-24)资助

** 通讯作者

罗春梅, 女, 1971 年生, 硕士, 讲师。工作单位: 云南省楚雄农业学校, 楚雄 675000

及水平的培养基上。第1组:BA 0.2、0.5 mg/L 2个水平,NAA 1.0、2.0、3.0 mg/L 3个水平,共6个处理。第2组:BA 0.2 mg/L 1个水平,2,4-D 1.0、2.0、3.0 mg/L 3个水平,共3个处理。第3组:KT 0.2 mg/L 1个水平,2,4-D 1.0、2.0、3.0 mg/L 3个水平,共3个处理。以上各个组的每个处理均接种5瓶,每瓶接种4块,每个处理共20块外植体。

1.5 对外植体进行暗培养时间的对比

用小红参的真叶和顶芽(或侧芽)为外植体,经清洗消毒后,接种于MS+BA 0.2 mg/L+NAA 2.0 mg/L培养基上,分别进行0,5,10,15 d暗培养时间的对比。

1.6 诱导愈伤组织分化成芽

将叶片、顶芽(或侧芽)形成的愈伤组织分别接种于不同激素配比的培养基上,1个月后观察不同激素组合对诱导不同部位的愈伤组织幼苗分化的影响。以上试验,培养基均添加琼脂0.9%,蔗糖浓度为3%,经121℃灭菌15 min,pH5.6~5.8,光照强度2000 lx,光照时间14 h/d,培养温度(25±2)℃,培养30 d后观察并统计愈伤诱导率、愈伤出现时间、愈伤的生长势。

2 结果与分析

2.1 植株不同部位的离体培养效果

接种30 d后观察、统计种子、根、根茎、叶、花、果实、顶芽(或侧芽)等不同外植体对诱导小红参产生愈伤组织和不定芽的试验结果,可以看出,在MS+BA 0.2+NAA 2.0培养基上诱导率可达85%,其次是顶芽(或侧芽),诱导率75%,其它3种培养基基本均不能诱导愈伤组织产生。花、果实、根、根茎愈伤组织的诱导率都较低,而种子和茎的诱导率均为零。

2.2 不同基本培养基对离体培养的影响

以叶片为外植体,接种30 d后观察并统计,结果如表1所示。在BA 0.2 mg/L+NAA 2.0 mg/L相同激素水平下,MS基本培养基诱导小红参真叶形成愈伤组织的效果要明显优于1/2 MS和N₆ 2种培养基,愈伤诱导率可达95%,出现愈伤时间提前2~3 d,生长量最大。对3种基本培养基的愈伤诱导率进行统计分析,结果显示3种基本培养基的愈伤诱导率差异显著($P<0.05$)。通过比较,对小红参离体培养采用MS基本培养基最好。

表1 不同基本培养基的培养效果

Table 1 Effect of different basic medium on callus formation

基本培养基	接种数	形成愈伤数	愈伤诱导率/%	出现愈伤时间/d	生长量	颜色
Basic medium	Inducing number	Callus number	Callus rate	Callus forming days	Growing number	Color
MS	20	19	95	11	大 Big	橙红 Salmon
1/2 MS	20	12	60	15	小 Small	橙色 Orange
N ₆	20	15	75	13	中 Middle	橙色 Orange

2.3 不同激素浓度组合对顶芽(或侧芽)形成愈伤组织的影响

外植体接种30 d后观察,统计资料整理如表2所示。以MS为基本培养基,通过BA/NAA、BA/2,4-D、KT/2,4-D 3组不同激素配比的比较,发现在BA/NAA组合中,BA 0.2+NAA 1.0~3.0 mg/L范围内均能产生愈伤组织,而当BA浓度提高到0.5 mg/L时,外植体只能芽萌发,而不形成愈伤组织。在BA 0.2 mg/L+2,4-D 1.0~3.0 mg/L和KT 0.2 mg/L+2,4-D 1.0~3.0 mg/L激素组合中,也均能产生愈伤组织。

对表2中诱导率高于80%的②、③、⑧、⑨4种培养基进行统计分析,4种培养基的愈伤诱导率差异并不显著($P>0.05$)。但以出愈量和出愈时间看,③出愈时间最早,1周左右在外植体生长点上可见橙红色愈伤组织形成,出愈量最大,愈伤诱导率可

达95%。

2.4 不同暗培养时间对离体培养的影响

以真叶为外植体接种30 d后观察,结果如表3所示。真叶接种于MS+BA 0.2 mg/L+NAA 2.0 mg/L培养基上,发现随着暗培养时间延长,外植体形成愈伤组织的诱导率呈上升趋势,愈伤组织的生长量也随之增加,出现愈伤组织的时间明显提前。对4种处理进行统计分析,结果表明不同暗培养时间的诱导率差异极显著($P<0.01$)。

2.5 不同浓度激素组合对愈伤组织分化成芽的影响

叶片、顶芽(或侧芽)形成的愈伤组织分别接种于不同激素配比的培养基上,30 d后观察,结果显示,在所有BA、KT与NAA的激素组合中,叶的愈伤组织均未能分化出不定芽,而芽的愈伤组织均能分化形成不定芽(表4)。

表 2 不同激素浓度组合对愈伤组织形成的影响

Table 2 Effect of the different hormone densities of BA/NAA on callus formation

激素组合/mg · L ⁻¹	出愈时间/d	诱导率/%	颜色	出愈量
Hormone combination	Callus forming days	Callus rate	Color	Callus number
① BA 0.2+NAA 1.0	9~10	25	橙色 Orange	小 Small
② BA 0.2+NAA 2.0	8~9	85	橙红 Salmon	中 Middle
③ BA 0.2+NAA 3.0	7~8	95	橙红 Salmon	大 Big
④ BA 0.5+NAA 1.0	未出 Not occurred	0	—	—
⑤ BA 0.5+NAA 2.0	未出 Not occurred	0	—	—
⑥ BA 0.5+NAA 3.0	未出 Not occurred	0	—	—
⑦ BA 0.2+2,4-D 1.0	10~11	32	橙色 Orange	小 Small
⑧ BA 0.2+2,4-D 2.0	9~10	85	橙红 Salmon	中 Middle
⑨ BA 0.2+2,4-D 3.0	7~8	87	暗红 Garnet	中 Middle
⑩ KT 0.2+2,4-D 1.0	10~11	30	橙色 Orange	小 Small
(11) KT 0.2+2,4-D 2.0	10~11	75	橙红 Salmon	中 Middle
(12) KT 0.2+2,4-D 3.0	9~10	78	橙红 Salmon	中 Middle

表 3 暗培养对愈伤组织形成的影响

Table 3 Effect of the dark culture on callus formation

暗培养时间/d	出愈时间/d	诱导率	生长量	颜色
Dark culturing days	Callus forming days	Callus rate/%	Callus number	Color
0	15	35	小 Small	橙色 Orange
5	9	55	中 Middle	橙色 Orange
10	7	78	大 Big	橙红 Salmon
15	7	90	大 Big	橙红 Salmon

表 4 不同激素组合对愈伤组织幼苗分化的影响

Table 4 Effect of different hormone combination on formation of adventitious bud from the callus

激素组合/mg · L ⁻¹	分化率	长势	叶色
Hormone combination	Inducing rate/%	Growth vigor	Leaf color
① MS+BA 3.0+NAA 0.5	46	慢 Slow	淡绿 Pale green
② MS+BA 5.0+NAA 0.5	90	较快 Slightly fast	绿 Green
③ MS+BA 5.0+NAA 1.0	95	较快 Slightly fast	绿 Green
④ MS+BA 5.0+NAA 1.5	100	快 Fast	绿 Green
⑤ MS+BA 5.0+NAA 2.0	100	快 Fast	绿 Green
⑥ MS+BA 3.0+KT 2.0+NAA 0.5	93	较快 Slightly fast	绿 Green
⑦ MS+BA 3.0+KT 3.0+NAA 0.5	86	较慢 Slightly slow	淡绿 Pale green
⑧ MS+BA 4.0+KT 2.0+NAA 0.5	68	较慢 Slightly slow	淡绿 Pale green
⑨ MS+BA 4.0+KT 3.0+NAA 0.5	56	慢 Slow	淡绿 Pale green

对表中分化率高于 90% 的②、③、④、⑤、⑥ 5 种培养基进行统计分析,5 种培养基的诱导率差异极显著 ($P < 0.01$)。通过比较,芽的愈伤组织在 BA 5.0+NAA 1.5~2.0 的组合中,分化率达 100%,长势最快,叶色浓绿。

3 讨论

通过对小红参的种子、根、根茎、茎、叶、花、果实、顶芽(或侧芽)外植体的比较,诱导结果显示:愈伤组织的诱导率是叶、顶芽(或侧芽) > 花 > 根茎 > 果实,而种子、根、茎均不能形成愈伤组织。这可能是由于种子中含有抑制萌发的成分,在人工种植中,采用沙藏处理种子,需要 50~60 d 左右才能萌芽。而根、茎这些高度分化的部位,则由于木质素和色素含量高,内含较多的酚类物质化合物,故外植体容易

褐变死亡,难以诱导形成愈伤组织。顶芽(或侧芽)正处于分生状态,细胞分裂能力强,生长速度快,接种后形成的酚类物质较少,褐变较轻,易于脱分化形成愈伤组织。培养过程中发现用中等年龄的叶片比年龄过小或过老的叶片更易于诱导形成愈伤组织。

大部分植物愈伤组织的颜色为透明的无色、黄色、绿色,而小红参愈伤组织的颜色却为橙红色,这可能与小红参内含的化学成分有关。据报道小红参中分离得到的化学成分有 30 多个,其中蒽醌、甙类、三萜类占大多数,此外还有环肽类、萘醌类成分。现已知蒽醌是植物合成的天然色素的前体物质^[7],目前利用植物组织和细胞培养方法,已从一些药用植物(如:狭叶番泻树、海巴戟等)中通过工业化生产获得了这类蒽醌天然色素^[8-9]。可见蒽醌是导致小红参的根、茎、愈伤组织成红色的主要化学成分。

邱璐等^[10]在云桑组织培养中发现,使用 1/2 MS培养基,降低无机盐浓度,能有效减轻褐化现象,降低褐化率。在小红参组织培养中采用 1/2 MS培养基,虽然褐化有所减轻,但愈伤组织的诱导率比 MS 培养基显著降低。无机盐中有些离子,如 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 是参与酚类合成与氧化酶类的组成成分或辅助因子,因此这些离子浓度过高会增加氧化酶的活性,从而促进酚类迅速氧化成褐色的醌类物质^[11]。另据报道,对于某些植物材料,适当提高培养基中 KNO_3 的含量,可在一定程度上发挥类似抗坏血酸的作用来对抗褐变^[12]。本试验结果表明:与 MS 培养基相比, N_6 培养基中含较高的 KNO_3 、较低的 Mn^{2+} ,甚至不添加 Cu^{2+} ,但通过比较, N_6 培养基对愈伤组织的诱导率比 MS 培养基显著降低。对 3 种培养基进行比较,诱导效果是 $MS > N_6 > 1/2 MS$ 。

小红参叶、芽形成的愈伤组织分化成芽的能力不一样,经过多种不同激素浓度组合的比较,叶形成的愈伤组织均不能分化出不定芽,只有芽形成的愈伤组织才能分化形成芽。据陈芳清等^[13]报道,对茜草科植物红芽大戟属红芽大戟的茎、叶、芽愈伤组织幼苗分化比较,在不同 BA/NAA 的激素组合中,茎段、叶的愈伤组织均未能分化出不定芽,只有芽的愈伤组织能形成不定芽。本试验发现小红参与同是茜草科的红芽大戟有类似的现象。

综上所述,诱导小红参愈伤组织产生的最佳条件为以真叶和顶芽(或侧芽)为外植体,在 $MS+BA 0.2 mg/L+NAA 3.0 mg/L$ 培养基上,进行暗培养,愈伤诱导率高达 95%。芽形成的愈伤组织在

$MS+BA 5.0+NAA 1.5\sim 2.0$ 的组合中均能分化出幼苗,分化率达 100%,长势最快,叶色浓绿,而叶形成的愈伤组织未能分化出苗。

参 考 文 献

- [1] 兰茂. 滇南本草 [M]. 昆明:云南人民出版社,1975,4:349.
- [2] 杨宇. 小红参的临床运用[J]. 中国民族民间医药杂志,2000,(2):119-120.
- [3] 代夫,王正文,王朝凤. 小红参对银屑病活血化痰作用的研究[J]. 昆明医学院学报,1994,15(4):70.
- [4] 符光利. 小红参临床运用点滴[J]. 中国民族民间医药杂志,2001,(4):246-247.
- [5] 吴煜秋,张荣平. 中药小红参的研究概况(综述)[J]. 中国民族民间医药杂志,2003,(5):259-264.
- [6] 刘爱民. 小红参栽培技术研究[J]. 中药研究与信息,2004,5(12):21-23.
- [7] 谢启昆. 药用植物组织培养[M]. 上海:上海科学技术出版社,1986:9-10.
- [8] 王纪华,赵冬梅. 药用植物组织培养和细胞培养生产药物及色素研究进展[J]. 特产研究,1991,(1):28-29.
- [9] 刘蜀宝,王建设. 生物技术促进中药现代化[J]. 怀化医学专学报,2004,3(1):99-101.
- [10] 邱璐,陈善娜,杨跃仙,等. 云桑组织培养中褐化问题的研究[J]. 蚕业科学,2000,26(2):118-119.
- [11] 高国训. 植物组织培养中的褐变问题[J]. 植物生理学通讯,1999,35(6):501-505.
- [12] 珠海,王东霞,李长杰. 如何对抗植物组培中的组织褐变[J]. 中国花卉盆景,2002,(12):29
- [13] 陈芳清,丘安机,徐祥浩. 药用植物红芽大戟的组织培养[J]. 广西植物,1997,17(2):149-151

Callus Induction and Bud Formation of *Rubia yunnanensis* (Franch.) Diels

LUO Chun-mei¹⁾ QIU Lu²⁾ YANG Qing-hui³⁾ XIAO Feng-hui³⁾ LIU Ai-min¹⁾

(¹⁾ Chuxiong Agricultural School, Chuxiong, Yunnan 675000, China;

²⁾ Chuxiong Normal University, Chuxiong Yunnan 675000, China;

³⁾ Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650201, China)

Abstract The effect of different plantlet, basic medium, dark culture, hormone combination and densities on the formation and differentiation of callus of *Eucalyptus smithii* L. was studied. It was found that callus form well in the dark using true leaf and bud as plantlet, $MS+BA 0.2 mg/L+NAA 3.0 mg/L$ as basic medium with the forming rate of callus up to 95%. The callus from the bud can differentiate to form bud using $MS+BA 0.5+NAA 0.5$ as medium with the rate up to 100%. But the callus from the leaf can not differentiate to form adventitious bud.

Key words *Eucalyptus smithii* L.; tissue culture; callus; adventitious bud

(责任编辑:张志钰)