

虎杖愈伤组织的诱导及其白藜芦醇形成初探

欧菊泉¹, 陈雪香², 丁利华^{2,3}, 曹 庸²

(1. 湘潭大学后勤产业处, 湖南 湘潭 411105; 2. 吉首大学张家界校区湖南省林产化工工程重点实验室, 湖南 张家界 427000;

3. 湖南省张家界市一中, 湖南 张家界 427000)

[摘 要] 将虎杖 *Polygonum cuspidatum* 不同外植体经不同消毒时间处理后, 接种在添加不同激素种类和水平的相同基本培养基上或相同激素种类和水平基本培养基上进行诱导实验, 同时对根和根茎芽、叶、韧皮诱导的愈伤组织进行白藜芦醇含量的测定。结果表明: 基本培养基以 MS 较好, 外植体叶对激素种类较为敏感, 其中适当浓度的 NAA 诱导愈伤组织比 2,4-D 的效果好, KT 比 BA 好, 添加 KT 的培养基上诱导愈伤组织比较紧密, 有利于分化, 在 MS+NAA 2 mg/L+KT 0.1 mg/L 培养基上诱导愈伤组织较好, 根茎芽的诱导率最高, 为 73%; 愈伤组织的生长趋势从接种的第 3 天开始生长, 到 21 d 时生长达到最高峰, 干质量为 0.461 2 g, 以后生长速度减慢; 对不同材料诱导的愈伤组织进行白藜芦醇含量的测定, 其中根茎部芽的诱导的愈伤组织中白藜芦醇含量最高, 其次是叶和根, 最低的为韧皮。

[关键词] 植物组织培养; 愈伤组织; 诱导; 白藜芦醇; 虎杖

[中图分类号] Q949.744; Q813.1+2 **[文献标识码]** A

Callus Inducement and Resveratrol Formation of *Polygonum cuspidatum*

OU Ju-quan¹, CHEN Xue-xiang², DING Li-hua^{2,3}, CAO Yong²

(1. Rear Service Industry Department of Xiangtan University, Xiangtan 411105, Hunan, China;

2. Hunan Province Key Laboratory of Forest Product and Chemical Industry Engineering, Zhangjiajie 427000, Hunan, China;

3. The First Middle School of Zhangjiajie, Zhangjiajie 427000, Hunan, China)

Abstract: The inducing experiments were carried out. Different explants of *Polygonum cuspidatum* after treatment of different antiseptics time were inoculated on the same elementary culture medium to which are added different kinds and levels of photohormones or on the different elementary culture medium to which are added the same kinds and levels of photohormones. The results show: MS is the best elementary culture medium; leaf explant was more sensitive to photohormone kinds; effects on calli inducing NAA were better than 2,4-D; and KT were better than BA. Calli induced on the culture medium with KT were of high compactness that was quite beneficial to differentiation. Divided culture medium containing MS+NAA 1.0 mg/L+KT 1.5 mg/L had good effects of re-divided onplant stem. Culture medium containing MS+NAA 2 mg/L+KT 0.1 mg/L had good inducing effect on calli and its inducing rate on rhizome with bud was the highest, reaching up to 73%. The growing trend of callus began to grow three days after inoculation, and its growth came to the tiptop in the twenty-first day, but its growing speed became slow after its growth reached 0.461 2 g. A determination of the content of Resveratrol in the callus induced by different materials indicates the fact that the buds of rhizoma had the maximum content, the following being leaves and roots, and the bast having the minimum.

Key words: plant tissue culture; callus; inducement; resveratrol; *Polygonum cuspidatum*

对植物愈伤组织的诱导, 在其它方面已有不少的研究^[1~12], 而虎杖愈伤组织的诱导还鲜见报道。虎杖 *Polygonum cuspidatum* 是蓼科蓼属多年生草本植物^[13], 其籽含有较高的白藜芦醇。白藜芦醇 resveratrol 具有抗癌^[14]、抗高血压和导致冠状动脉血管扩展等活性, 具有降低大鼠血清中总胆固醇以及降血脂等作用^[15], 可有效抑制血管细胞中组织因子 TF 和细胞质的异常表达, 防止心血管疾病发生^[16]。随着白藜芦醇的市场需求量加大, 虎杖的采挖量也在加大。因虎杖是一种小型灌木, 生长速度较慢, 若长期大量的采挖, 将会造成虎杖野生资

[收稿日期] 2006-02-24

[作者简介] 欧菊泉(1965—), 男, 湖南湘潭人, 工程师, 大学, 主要从事园林绿化工作。

源大幅度减少和虎杖野生资源的缺乏,因此利用虎杖组织及细胞培养大规模生产白藜芦醇,已成为一条重要途径。

1 材料与方法

1.1 实验材料

采取吉首大学张家界校区试验地虎杖的根状茎、根状茎芽、茎、叶作为实验材料。

1.2 实验方法

1.2.1 愈伤组织适宜培养基的筛选

用固体培养法培养,通过不同基本培养基以及外源生长调节物质的对比试验,筛选出愈伤组织的适宜培养基。

选取健壮无病的虎杖植株,取其根状茎、根状茎的芽、茎、叶,用自来水冲洗干净并晾干表面水分,在超净工作台内用75%酒精消毒30s,无菌水冲洗1次,然后用0.1% HgCl_2 溶液消毒10min,再用无菌水冲洗7次,放在无菌滤纸上晾干,切成 $0.5 \times 0.5 \text{ cm}^2$ 的小块,接种在以 B_5 、 N_6 、MS为基本培养基并附加不同生长调节剂的愈伤组织诱导培养基上培养。培养条件为:温度 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$,光照强度1200 Lx,每20d继代1次。

1.2.2 根状茎芽愈伤组织生长曲线的测定

以MS培养基为基本培养基,附加 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA+ $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT的植物激素,每三角瓶(50 mL)中装入20 mL的固体培养基,在超净工作台中每瓶接入0.9g愈伤组织,并将愈伤组织分为大小相近的6小块,在温度为 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$,光照12h,光照强度1200 Lx,湿度为85%的培养箱进行培养,每隔3d取1次样,用超纯水洗掉表面的培养基,用滤纸吸干表面水,装入塑料管中,放到 -35°C 的超低温冰箱中预冷12h,然后放到真空干燥器中干燥24h,将冷冻干燥的愈伤组织称重。观察时间为27d,分别记载其干质量和鲜质量,每个结果为3个平行式样的平均值。

1.2.3 不同材料诱导的愈伤组织中白藜芦醇含量的测定

选取健壮无病的虎杖植株,取其根、根茎芽、茎、叶、韧皮作为诱导愈伤组织的外植体,清洗杀菌方法同1.2.1,将其接在MS₂培养基上进行培养,培养条件为温度 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$,光照强度1200 Lx,每20d继代1次。

1.2.3.1 白藜芦醇的提取与检测 将材料放到 -35°C 的超低温冰箱中预冷12h,然后放到真空干燥器中干燥24h,将冻干的愈伤组织称重,磨碎,提取体积为愈伤组织:乙酸乙酯=1:90。先用超声波处理30min后,放到冰箱中冷藏提取48h。提取液过滤,浓缩定容进行白藜芦醇含量的测定。

1.2.3.2 白藜芦醇的测定 采用高效液相LC-9A(日本Shimadzu)分析,柱子Dima Technologies(C_{18} 迪马公司-色谱配件专家。规格:250 mm $\times$ 4.6 μm ,流动48.2%的乙醇。流速:1 mL/min,柱温 30°C 。检测器:紫外检测器。标样为含量99.8%的Resveratrol(Sigma公司)。检测波长为306 nm。采用外标一点法计算样品的含量。

表1 不同基本培养基对虎杖叶愈伤组织的诱导

Table 1 The induction of callus of *Polygonum cuspidatum*'s leaves in the different elementary culture mediums

编号	基本培养基	外植体	外源植物激素 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	出愈时间 /d	诱导率 /%
1	MS	叶	1(2,4-D)	20	5
2			0.3(2,4-D+KT)	13	86
3			0.1(2,4-D+6-BA)	16	65
4			1(2,4-D)	20	7
5	B_5	叶	0.3(2,4-D+KT)	16	45
6			0.1(2,4-D+6-BA)	21	56
7	N_6	叶	1(2,4-D)	23	12
8			0.3(2,4-D+KT)	25	53
9			0.1(2,4-D+6-BA)	20	60

† 均以未污染外植体计数。

2 结果与分析

2.1 不同基本培养基上的诱导

实验

不同的基本培养基诱导的愈伤率差异较大,在MS基本培养基和2,4-D+KT0.3的激素水平上诱导率最高,为86%,且其出愈时间最短,为13d,而 B_5 、 N_6 基本培养基上的诱导率偏低,出愈时间较MS基本培养基要长(见表1)。

2.2 激素种类及水平的诱导比较实验

激素种类和浓度对虎杖叶愈伤组织的影响较大, NAA 的诱导比 2,4-D 要好, NAA1+KT0.1 的激素种类水平组合的诱导率为 90%, 且诱导愈伤组织的时间为 13 d, 诱导较快. 比 2,4-D1+KT0.1 组合的诱导率要高 4%, 愈伤组织比较紧密, 易分化, 产生不定芽, 而 NAA2+6-BA0.2 的激素种类组合诱导率最低, 为 35%, 且出愈伤时间较长, 为 20 d (见表 2).

2.3 不同消毒时间处理对愈伤组织诱导的影响

不同的实验材料用不同的消毒方法处理后, 从不同的材料诱导率看, 叶作为外植体诱导愈伤组织较茎、根茎、带芽根茎要好. 在叶消毒的处理中, 其中用 75% 酒精消毒 30 s 和 0.1% 汞消毒 10 min 的诱导率为 80%, 材料的污染率为 5%, 而叶用 75% 的酒精消毒 30 s 和 0.1% 的升汞消毒 5 min 处理后, 其诱导率虽然较前一种高 4%, 但其从材料的污染率和未污染材料的诱导率两方面综合考虑看, 前一种消毒处理较好 (见表 3).

2.4 根茎和根茎芽在不同激素水平培养基上的诱导

根和根茎芽在不同激素水平培养基的诱导, 其中根茎和根茎芽在 MS+NAA2 mg·l⁻¹+KT0.1 mg·L⁻¹ 中诱导率较高, 分别为 67% 和 73%, 但从出愈伤时间看, 根茎芽的出愈伤时间只要 6 d, 比根茎出伤愈要快, 其诱导效果较好; 而 MS+NAA2 mg/L+KT1.0 mg/L 培养基的诱导时间长, 且诱导率低, 其诱导效果差 (见表 4).

2.5 茎和叶在不同培养基上的诱导

从茎和叶的诱导实验看, 茎和叶在 MS+NAA1 mg/L+KT0.1 mg/L 上的诱导率均较高, 诱导率分别为 55% 和 77%, 且叶的诱导时间为 11 d, 较茎的诱导时间要短. 从诱导的培养基考虑, 以 MS+NAA1 mg/L+KT0.1 mg/L 诱导较好, 从诱导的外植体的材料看, 叶比茎好 (见表 5).

表 2 不同激素种类和水平对虎杖叶愈伤组织诱导的影响

Table 2 The effects different kinds and levels of photohormones on induction of callus of *Polygonum cuspidatum*'s leaves

编号	激素浓度 (mg·L ⁻¹)	出愈时间 /d	诱导率 /%
1	2,4-D1+KT0.1	13	86
2	2,4-D1+KT0.2	15	77
3	2,4-D1+KT0.1	18	76
4	2,4-D1+KT0.2	19	73
5	NAA1+KT0.1	13	90
6	NAA1+KT0.2	15	80
7	NAA2+KT0.1	17	73
8	NAA2+KT0.2	19	70
9	NAA1+6-BA0.1	18	48
10	NAA2+6-BA0.2	20	35

表 3 不同实验材料用不同消毒时间处理后消毒效果

Table 3 The Disinfection results of different experiment materials treated with different disinfection time

外植体	75%酒精 消毒时间/s	0.1%升汞 消毒时间/min	材料 污染率/%	未污染材料 的诱导率/%
叶	30	5	30	84
	30	10	5	80
	30	15	2	73
	30	20	0	8
茎段	30	5	45	70
	30	10	20	75
带芽茎段	30	15	5	52
	30	20	0	15
	30	5	100	0
根茎	30	10	50	60
	30	15	30	46
带芽根茎	30	20	15	35

表 4 根茎及根茎芽在不同激素水平培养基的愈伤组织诱导率

Table 4 The induction rates of root stem and rhizome bud of *Polygonum cuspidatum* in culture mediums with different photohormone levels

培养基	根茎		根茎芽	
	出愈伤时间/d	诱导率/%	出愈伤时间/d	诱导率/%
NAA1+KT0.1	21	6	6	50
NAA1+KT0.5	20	43	6	56
NAA1+KT1.0	/	0	6	55
NAA2+KT0.1	22	67	6	73
NAA2+KT0.5	11	33	11	36
NAA2+KT1.0	25	10	26	11

表 5 茎和叶在不同激素水平培养基上的诱导

Table 5 The induction experiments of caudices and leaves in culture mediums with different photohormone levels

培养基	茎		叶	
	出愈伤时间/d	诱导率/%	出愈伤时间/d	诱导率/%
NAA1+KT0.1	20	10	26	20
NAA1+KT0.5	26	50	/	0
NAA1+KT1.0	26	50	11	0
NAA2+KT0.1	22	55	11	77
NAA2+KT0.5	22	22	11	71
NAA2+KT1.0	22	30	/	0

2.6 不同材料诱导的愈伤组织中白藜芦醇的含量

不同材料诱导的愈伤组织中的白藜芦醇的含量见表6。

2.7 根茎芽愈伤组织生长曲线

刚接进去的愈伤组织为黄色,干质量为0.0941 g,生长到第6天时,愈伤组织的颜色开始出现一些粉红色,干质量增加到0.1421 g,以后逐渐转为粉红色,愈伤组织生长较快;到21 d时,愈伤组织的生长量达到最大,干质量为0.4612 g;21 d后,愈伤组织开始出现绿点,以后逐渐转为绿色,愈伤组织生长速度减慢;到第24天时,愈伤组织生长量已呈下降的趋势,愈伤组织的大部分转为绿色;27 d时,其干质量下降为0.3381 g。

2.8 愈伤组织生长不同时期白藜芦醇的含量变化

根茎芽在生长曲线的第0天时,其白藜芦醇的含量较低,为 $9.4 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,以后逐渐增多;到第6天时,其含量达 $16.21 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$;但第6天后,其白藜芦醇的含量逐渐降低;到第12天时,其含量降到 $6.3 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$;到17 d时,其含量又逐渐上升;到第26天时,其含量达到较高,为 $14.9 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$;26 d后,其白藜芦醇的含量又逐渐降低,仅为 $7.5 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ (见图2)。其生长曲线与白藜芦醇积累表现出的一致性,与白藜芦醇类似物增加呈一定的正相关性。由此可见,白藜芦醇类似物量的增加,不影响愈伤组织的生长和增殖。

3 讨 论

(1)以MS为基本培养基,叶为外植体,

75%的酒精消毒30 s和0.1%升汞消毒10 min之后,在 $\text{MS} + \text{NAA} 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{KT} 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基中诱导愈伤组织效果较好,而以 $\text{MS} + \text{NAA} 2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{KT} 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基,以根茎芽为外植体诱导愈伤组织较好,且以根茎芽的诱导率较高,所需时间很短。

(2)虎杖愈伤组织的生长与白藜芦醇的含量的关系,愈伤组织生长最快的时期,其白藜芦醇的含量不是最高的时期,其愈伤组织的生长最大的时期出现在21 d,而白藜芦醇的含量最高时期是在第6天和第26天,即愈伤组织的生长速度和白藜芦醇的含量不呈正相关性。由此可见,在虎杖愈伤组织旺盛生长的前期和后期收获是较合适的,可以得到较高产量的白藜芦醇。

表6 不同材料的愈伤组织白藜芦醇含量[†]

Table 6 The content of resveratrol in the different calli of *Polygo*

样品	样重/g	峰面积	白藜芦醇/ ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
叶愈伤组织	0.136	309	7.08
根愈伤组织	0.213 8	848	3
韧皮愈伤组织	0.395 6	545	3.6
根茎芽愈伤组织	0.123 3	1435	

[†] 表中数据为3次试验的平均值。

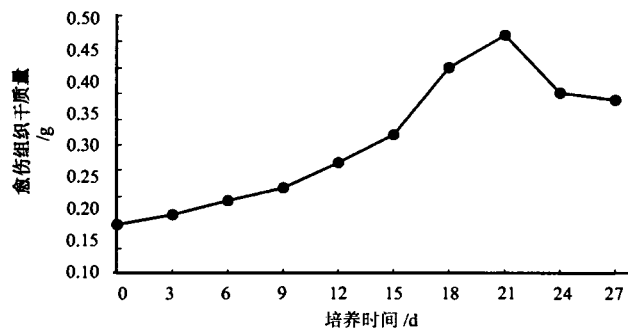


图1 虎杖根状茎芽愈伤组织生长曲线

Fig. 1 The growth cruves of *Polygonum cuspidatum* rhizome bud callus

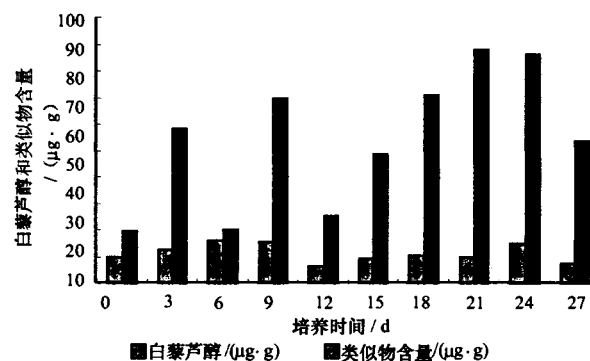


图2 虎杖根茎芽愈伤组织生长与白藜芦醇积累曲线

Fig. 2 Resveratrol accumulation and growth curves of *Polygonum cuspidatum* rhizome bud calli

[参 考 文 献]

- [1] 何业华,熊细满,谢碧霞,等. 枣树组织培养愈伤组织诱导的研究[J]. 中南林学院学报,1997,17(1):13—18.
- [2] 冉隆贤,林雪坚,文仕知,等. 芦竹组织培养技术研究[J]. 中南林学院学报,1998,18(1):49—52.

(下转至第50页)

- [15] 龙光生,李午平,葛宜和,等.马尾松半同胞优良家系选择研究[J].中南林学院学报,2002,22(1):17-22.
- [16] 曾思齐,欧阳君祥.马尾松低质低效次生林分类技术研究[J].中南林学院学报,2002,22(2):12-16.
- [17] 周德明,陈晓萍,张建湘,等.马尾松飞播林地土壤微生物的研究[J].中南林学院学报,2002,22(3):59-62.
- [18] 方 晰,田大伦,胥灿辉.马尾松人工林生产与碳素动态[J].中南林学院学报,2003,23(2):11-15.
- [19] 黄政龙.马尾松松毛虫危害与气象因子的关系初探[J].中南林学院学报,2004,24(1):106-109.
- [20] 杨章旗.马尾松优良家系选择的适宜年龄研究[J].中南林学院学报,2004,24(4):24-26.
- [21] 龙光生,李午平,唐效蓉.马尾松纸浆材密生型家系的选择[J].中南林学院学报,2004,24(5):16-18.
- [22] 李志辉,漆良华,柏方敏,等.马尾松飞播林土壤肥力研究[J].中南林学院学报,2004,24(5):32-38.
- [23] 郭清和,康文星.湖南省马尾松林公益效能的经济评估[J].中南林学院学报,2005,25(3):1-6.
- [24] 樊后保,李燕燕,黄玉梓.马尾松-细叶青冈混交林的生物量及其生产力结构[J].中南林学院学报,2005,25(6):38-41.
- [25] 李志辉,何友军,漆良华,等.马尾松飞播林综合经营专家模拟系统的研制[J].中南林学院学报,2005,25(6):84-89.
- [26] 《福建森林》编辑委员会.福建森林[M].北京:中国林业出版社,1993.134-139.
- [27] 林 鹏.福建植被[M].福州:福建科技出版社,1990.91-116
- [28] 陈存及,陈伏法.阔叶树种栽培[M].北京:中国林业出版社,2000.
- [29] 俞新妥.混交林营造原理及技术[M].北京:中国林业出版社,1989.
- [30] 黄三祥,罗菊春,艾训儒.龙洞河流域马尾松群落结构及改造技术的研究[J].中国生态农业学报,2004,12(4):174-176.
- [31] 李燕燕,樊后保,林德喜,等.马尾松林混交阔叶树的生物量及其分布格局[J].浙江林学院学报,2004,21(4):388-392.

[本文编校:胡曼辉]

(上接第 27 页)

- [3] 何业华,伍成厚,胡中沂,等.枣树愈伤组织培养不定芽的分析[J].中南林学院学报,1998,18(3):44-50.
- [4] 徐刚标,何 方,陈良昌,等.银杏愈伤诱导与继代培养的研究[J].中南林学院学报,1999,19(3):32-36.
- [5] 谢碧霞,何业华,易志军,等.盾叶薯蓣愈伤组织培养及其高产系的筛选[J].中南林学院学报,1999,19(4):17-21.
- [6] 周国英,刘君昂,周德明.山萸菜组织培养研究[J].中南林学院学报,2000,20(1):65-67.
- [7] 唐效蓉,李午平,郭照光.芦荟组培苗移栽与叶面施肥配套技术[J].中南林学院学报,2002,22(3):32-36.
- [8] 金晓玲,何 平.大叶举愈伤组织诱导与继代培养的影响因素[J].中南林学院学报,2003,23(1):32-36.
- [9] 郑子成,何淑勤.大果沙棘组织培养技术[J].中南林学院学报,2003,23(4):42-45.
- [10] 王晓红,谭晓风,石明旺.非洲菊 F1 的组织培养[J].中南林学院学报,2003,23(5):45-48.
- [11] 易自力,陈智勇,蒋建雄,等.三种冷季型草坪愈伤组织再生体系的建立[J].中南林学院学报,2005,25(6):25-28.
- [12] 曾艳玲,谭晓风,乌云塔娜,等.梨不同杂交和自交组合幼胚组织培养的研究[J].中南林学院学报,2005,25(1):29-32.
- [13] 中国植物志编委会.中国植物志[M].北京:科学出版社,1985.
- [14] Meishiang J, Lining C, Udeani G O, et al. Cancer chem. opreventive activity of resveratrol, a natural product derive from grapes[J]. Science, 1997, 275(1): 218-220.
- [15] Burknhard S, Reiter R J, Tan D X, et al. DNA oxidatively damaged by chromium(Ⅲ) and H₂O₂ is protected by the antioxidants melatonin, N(1)-acetyl-N(2)-fomyl-5-methoxykynuramine, resveratrol and uric acid[J]. Int. J. Biochem. Cell Biol., 2001, 33(8): 775-783.
- [16] Stivala L A, Savio M, Carafoli F, et al. Specific structural determinants are responsible for the antioxidant activity and the cell cycle effects of resveratrol[J]. J. Biol. Chem., 2001, 276(25): 22586-22594.

[本文编校:胡曼辉]