

怀地黄愈伤组织诱导及细胞悬浮培养体系的建立

张晓丽^{1,2}, 王建军¹, 徐守真¹, 李敬敬¹, 陈明霞^{1,2}, 李明军^{1,2}

(1. 河南师范大学 生命科学院, 河南 新乡 453007; 2. 河南省高校道地中药材保育及利用工程技术研究中心, 河南 新乡 453007)

摘 要:研究了植物生长调节剂和接种方式对怀地黄叶片愈伤组织诱导的影响和细胞悬浮培养体系的建立。结果表明:将叶片正接在 MS+2,4-D 1 mg/L+6-BA 0.4 mg/L 培养基上,愈伤组织生长良好,诱导率达 100%;在该培养基上多次继代,可形成 3 种类型的愈伤组织,其中 I 型愈伤组织淡黄色、颗粒透亮、分散性好且疏松易脆,适合进行细胞悬浮培养;在 MS+2,4-D 3 mg/L+6-BA 0.5 mg/L 培养基中,悬浮培养细胞生长曲线呈“S”型,培养 15 d 时细胞干重达最大值,为 4.94 g/L。

关键词:怀地黄;愈伤组织;细胞悬浮培养

中图分类号:S 567.23⁺9 **文献标识码:**A

文章编号:1001-0009(2012)01-0162-03

怀地黄 [*Rehmannia glutinosa* f. *hueichingensis* (Chan et Seih) Hsiao] 为玄参科地黄属多年生草本植物,是我国出口的大宗药材之一,主要成分为梓醇、糖类、氨基酸、无机元素及维生素等物质,在药材上可分为鲜地黄、生地黄和熟地黄 3 种。怀地黄不仅药用价值高,而且可广泛用于食疗和食补,如泡菜、脯、酒等加工产品已投放市场,收到了很好的效果^[1]。

利用细胞工程可将药用植物的自然生产转变为工业化生产,通过细胞大规模培养直接生产出有效药用成分,简化产物提取分离步骤和降低产物分离提纯成本,并且生产性能稳定、产物含量均一。目前,在人参、紫草和红豆杉等药用植物的细胞培养方面已进行了大量的研究^[2],并且有的已实现规模化生产^[3]。近年来,河南师范大学生命科学学院“四大怀药”组织培养实验室对怀地黄的组织培养、脱毒快繁等进行了一系列的研究^[4-6]。在此基础上,现对其愈伤组织的诱导、继代及细胞悬浮

培养技术体系的建立进行研究,以期对怀地黄有效药用成分的规模化生产奠定技术基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

怀地黄优良品种“85-5”试管苗,来自河南师范大学“四大怀药”组织培养研究室。

1.2 试验方法

1.2.1 愈伤组织的诱导 在超净工作台上,将试管苗叶片切成 0.5 cm×0.5 cm 的小块,接种到 MS+2,4-D 1.0 mg/L 和 6-BA(0.1、0.2、0.3、0.4 mg/L)培养基中,每 2 d 观察愈伤组织的生长情况并统计数据。选择最佳诱导培养基,筛选接种方式对愈伤组织诱导的影响。采用正接(叶片上表面接触培养基)和背接(叶片下表面接触培养基)2 种接种方式进行接种。培养基中蔗糖浓度 3%,凝固脂浓度 6‰,pH 为 6.0,在 121℃、1.1 kg/cm² 压力下灭菌 20 min。愈伤组织诱导率=(形成愈伤组织的叶片数/接种叶片数)×100%。

1.2.2 愈伤组织的继代 将诱导形成的愈伤组织转入最佳诱导培养基中进行继代培养,每 18 d 继代培养 1 次。在继代培养过程中,根据愈伤组织的形态、颜色以及质地的不同,将其分成不同的类型。

1.2.3 细胞悬浮培养体系的建立 分别称取 1.8 g 继代培养后不同类型的愈伤组织,用玻璃棒擗碎后,接种于液体培养基 MS+2,4-D 3 mg/L+6-BA 0.5 mg/L 中,

易脱落。果实小,为了采下果实就需要加大振动强度,但随着振动强度的加大,会使一些大的叶片和青果也随之振动脱落。因此,当单个果实重量小于 0.2 g 时,不宜机械采摘。

第一作者简介:张晓丽(1981-),女,河南漯河人,硕士,讲师,研究方向为药用植物生物技术。

责任作者:李明军(1962-),男,河南温县人,博士,教授,硕士生导师,研究方向为药用植物生物技术。

基金项目:国家农业科技成果转化资金资助项目(2009D00010539);河南省教育厅科技攻关资助项目(2010A180009)。

收稿日期:2011-11-03

3.2 对果实大小的要求

采摘机采摘果实采用的是振动原理,通过将采摘器插入果枝进行振动,使枝条产生瞬间作用力,果实在重力和瞬间作用力的双重作用下,果实和果萼分离而脱落。果实越大,则振动时产生的作用力越大,果实越容

120 r/min 悬浮振荡培养,每 15 d 继代培养 1 次。多次继代后,将细胞悬浮培养物用 80 目筛网过滤,滤液分装后继续培养,作为起始悬浮培养液,细胞接种量为 30 g/L 鲜重。每隔 2 d 取 3 瓶细胞培养液进行离心(5 000 r/min,10 min),在冷冻干燥机中干燥至恒重后,测定细胞干重。以平均细胞干重为纵坐标,时间为横坐标,绘制悬浮培养细胞的生长曲线。

1.3 培养条件

愈伤组织诱导及继代培养:温度(25±2)℃,光强 2 000 lx,光照时间 14 h/d。细胞悬浮培养:温度(25±2)℃,光强 500 lx,光照时间 24 h/d。

2 结果与分析

2.1 不同因素对愈伤组织诱导的影响

2.1.1 植物生长调节剂对愈伤组织诱导的影响 将叶片接种到不同浓度植物生长调节剂培养基中,观察发现,接种 3 d,叶缘均略微向上卷曲,6 d 时,在 2,4-D 1 mg/L 培养基中叶片叶缘处首先出现淡黄色、颗粒状、触之易碎的愈伤组织;7 d 时,6-BA 0.3 mg/L 和 0.4 mg/L 培养基中,叶片相同部位也出现类似的愈伤组织;9 d 时 6-BA 0.1 mg/L 和 0.2 mg/L 培养基中也形成黄色颗粒状或浅黄色透明状的愈伤组织。18 d 时怀地黄片愈伤组织的诱导形成和生长情况见表 1。由表 1 可知,6-BA 浓度为 0.3 mg/L 和 0.4 mg/L 时,愈伤组织诱导率、出愈时间和出愈量均处于较佳状态,从节约成本角度出发,选择 6-BA 浓度为 0.3 mg/L。

表 1 植物生长调节剂对怀地黄叶片愈伤组织诱导的影响

植物生长调节剂/mg·L ⁻¹	接种数/个	出愈时间/d	诱导率/%	出愈量
2,4-D 1	50	6	97	+++
2,4-D 1+6-BA 0.1	50	9	90	++
2,4-D 1+6-BA 0.2	50	9	96	+++
2,4-D 1+6-BA 0.3	50	7	100	++++
2,4-D 1+6-BA 0.4	50	7	100	++++

注:“+”越多,表示诱导形成的愈伤组织越多。下周。

2.1.2 接种方式对愈伤组织诱导的影响 将叶片正接和背接接种到表 1 筛选出的最佳培养基中,观察愈伤组织诱导情况。18 d 时怀地黄叶片愈伤组织的诱导形成和生长情况见表 2。由表 2 可知,叶片背接与正接相比,愈伤组织的出现时间比正接推迟 2 d,诱导率也低于正接,出愈量也远远不如正接多,故可以认为正接方式更适合愈伤组织的诱导。

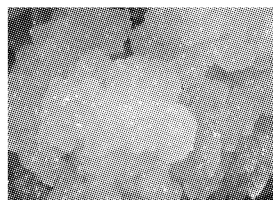
表 2 接种方式对怀地黄叶片愈伤组织诱导的影响

接种方式	接种数/个	出愈时间/d	诱导率/%	出愈量
正接	100	7	100	++++
背接	100	9	90	++

2.2 愈伤组织的继代培养与分类

将叶片诱导形成的愈伤组织转入继代培养基中

(MS+2,4-D 1 mg/L+6-BA 0.4 mg/L)进行培养,愈伤组织生长十分迅速。多次继代后,形成多种类型的愈伤组织,根据其形态、颜色以及质地的不同,将其分为 3 种类型(图 1)。I 型,淡黄色愈伤组织,颗粒透亮,分散性好,疏松易脆,生长迅速,平均每 15 d 愈伤组织体积可增至原来的 3~4 倍,此类型愈伤组织可长期继代;II 型,暗黄色愈伤组织,颗粒较大,较致密,分散性较差,易长出白色毛状发根和根状物,且短短几天时间就可将愈伤组织完全覆盖。此类型愈伤组织继代后基本不能转化为其它类型,由于其生长缓慢,故长期继代后此类型愈伤组织逐渐减少直至消失;III 型,灰白色愈伤组织,团块状,颗粒小,生长较慢,分散性最差,含水量小,易褐化,长期继代后一部分可转化为 I 型愈伤组织,另一部分则可保持其现有性状继续增殖。



I 型愈伤组织



II 型愈伤组织



III 型愈伤组织

图 1 怀地黄愈伤组织的类型

将上述 3 种类型的愈伤组织长期继代培养,4 个月,II 型愈伤组织被淘汰,只有 I 型和 III 型 2 种愈伤组织能够保留下来。

2.3 细胞悬浮系的建立

将 I 型和 III 型 2 种愈伤组织在液体培养基上进行振荡培养。经过 1~2 个月继代培养,只有 I 型愈伤组织建立的细胞悬浮系能够迅速生长,颜色淡黄、分散性及稳定性均较好,镜检观察多由小细胞团和单细胞组成,且多为圆细胞;III 型愈伤组织建立的细胞悬浮系生长缓慢,且在培养液中紧密地成团生长,不能达到细胞悬浮培养的要求,故淘汰 III 型愈伤组织建立的细胞悬浮系。对由 I 型愈伤组织建立的细胞悬浮系中悬浮培养细胞的生长曲线作图(图 2)。

由图 2 可知,在细胞悬浮培养过程中,生长曲线呈“S”型。生长周期可分为延迟期(0~6 d)、指数生长期(6~15 d)和静止期(15~21 d)3 个阶段。在延迟期,细胞干重增长缓慢;从第 6 天开始,细胞干重快速增长,到第 15 天达到峰值;之后,细胞干重缓慢下降。确定悬浮

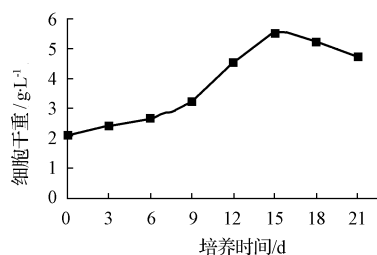


图2 怀地黄悬浮培养细胞生长变化曲线

培养的细胞必须在15 d以前进行继代,以保持其旺盛的分裂能力和细胞活性。

3 结论与讨论

3.1 植物生长调节剂对怀地黄叶片愈伤组织诱导的影响

单独使用2,4-D时,愈伤组织形成的最早,且早期形成愈伤组织的量较大,但随着时间的延长,愈伤组织生长变缓或停滞,较早出现衰老迹象。故认为,在愈伤组织诱导形成过程中,2,4-D生理活性强,诱导快,单独使用即可诱导形成愈伤组织,但所形成的愈伤组织生长迟缓,易老化。2,4-D与6-BA配合使用不仅对愈伤组织的诱导和增殖都具有良好的促进作用^[7-8],而且还可以延缓愈伤组织的衰老,从而减缓或抑制褐化^[9]。

3.2 愈伤组织类型对细胞悬浮培养体系建立的影响

愈伤组织的外观形态和生理状态都直接影响其建立的细胞悬浮系的质量,愈伤组织质地越疏松,细胞的分散程度越大。因此,必须先获得颜色鲜亮、结构疏松易脆、颗粒状、生长旺盛的愈伤组织,这常常是由固体培养成功过渡到液体培养的先决条件^[10]。刚诱导出的愈伤组织只有少部分符合这些条件,大部分都生长缓慢、质地较硬、易褐化且细胞间联系紧密,这些愈伤组织不能直接用来建立悬浮细胞系,需对其进行经过一定时间的筛选、继代后才能使用。

对诱导形成的愈伤组织筛选、继代后,进行悬浮振荡培养,发现其细胞生长曲线呈“S”型,在培养初期,细胞几乎不分裂,生长缓慢,培养物增重缓慢;从第6天开始,细胞干重快速增长,细胞分裂繁殖旺盛,有大量单细胞生成,细胞数目大大增加;随培养天数的增加,培养基内营养物质逐渐被消耗、细胞生长空间也在减少以及细胞生长速度也逐渐变慢,15 d后,营养物质已基本耗尽、细胞生长空间急剧减少,同时也积累了大量有害物质,造成生长环境恶化,导致细胞生长速度减慢甚至褐化死亡。因此,在静止期到来之前,必须进行继代培养,或者将其收获。从细胞生长曲线可以看出,怀地黄愈伤组织进行细胞悬浮培养是可行的,这也为怀地黄细胞悬浮培养的进一步研究奠定了基础。

参考文献

- [1] 焦作市科学技术局. 四大怀药[M]. 郑州:中原农民出版社,2004.
- [2] 朱至清. 植物细胞工程[M]. 北京:化学工业出版社,2003:173.
- [3] 陈文源,吕一婷. 药用植物细胞悬浮培养与新药研发进展[J]. 亚热带植物科学,2009,38(4):85-88.
- [4] 张楠,张晓丽,曹香林,等. 脱毒怀地黄块茎醇及营养成分的分析[J]. 中草药,2009,40(8):1311-1313.
- [5] 李明军,杜琳,张晓丽,等. 怀地黄的脱毒培养及快速繁殖[J]. 农业生物技术学报,2007(15):131-134.
- [6] 李明军,徐鑫,夏民,等. PP₃₃₃与BA组合对怀地黄试管苗生长发育的影响[J]. 植物学通报,2006,23(1):56-59.
- [7] 张颖,杨畅,谢海. 杜仲叶片愈伤组织诱导研究[J]. 北方园艺,2011(5):173-174.
- [8] 张家菁,于元杰. 防风愈伤组织培养研究[J]. 北方园艺,2011(2):183-185.
- [9] 刘建福,吴清,杨道茂,等. 阳桃胚乳愈伤组织诱导和不定芽发生的研究[J]. 热带亚热带植物学报,2004,12(4):367-370.
- [10] 孙敬三,朱至清. 植物细胞工程实验技术[M]. 北京:化学工业出版社,2006.

Research on Callus Induction and Cell Suspension Culture of *Rehmannia glutinosa* f. *hueichingensis* (Chan et Seih) Hsiao

ZHANG Xiao-li^{1,2}, WANG Jian-jun¹, XU Shou-zhen¹, LI Jing-jing¹, CHEN Ming-xia^{1,2}, LI Ming-jun^{1,2}

(1. College of Life Science, Henan Normal University, Xixiang, Henan 453007; 2. Engineering Technology Research Center of Nursing and Utilization of Genuine Chinese Crude Drugs, University of Henan Province, Xixiang, Henan 453007)

Abstract: The effects of inoculation method and plant growth regulator on callus induction and establishment of cell suspension culture system were studied. The results showed that when upper surface of leaf contact the medium, callus grows well on MS+2,4-D 1 mg/L+6-BA 0.4 mg/L, induction rate was 100%; on the same medium, callus could be divided into 3 types, callus of type I was straw yellow, bright particles, well dispersed and granular, fragile, this type of callus was suitable for cell suspension culture; on MS+2,4-D 3 mg/L+6-BA 0.5 mg/L, the growth curve of suspension culture cells were 'S' type, cells dry weight was 4.94 g/L when cells cultured for 15 days.

Key words: *Rehmannia glutinosa* f. *hueichingensis* (Chan et Seih) Hsiao; callus; cell suspension culture