

虎杖疏松愈伤组织培养条件的优化

曾超珍¹, 张映辉², 刘志祥¹

(1. 中南林业科技大学 生命科学与技术学院 湖南 长沙 410004; 2. 浏阳市田家炳实验中学 湖南 浏阳 410300)

摘要: 研究虎杖疏松愈伤组织诱导的最佳因素组合。通过单因素和正交试验研究不同外植体、不同浓度的非激素水平和激素水平对虎杖愈伤组织诱导率、疏松程度以及增殖率的影响。结果表明: 以叶柄为外植体更容易诱导出疏松的愈伤组织, 虎杖愈伤组织诱导的最佳非激素因素为 pH 值 5.8 蔗糖 5 g/L, 水解酪蛋白 300 mg/L, 肌醇 10 mg/L, 继代增殖最佳的激素组合 2, 4-D 2.5 mg/L+NAA 0.3 mg/L。适宜的激素和非激素组合, 能促进虎杖获得质地疏松、淡黄色、生长旺盛的愈伤组织。

关键词: 虎杖; 疏松愈伤组织; 诱导; 增殖
中图分类号: S 567.23⁺9 **文献标识码:** B **文章编号:** 1001-0009(2008)12-0167-02

虎杖 (*Polygonum cuspidatum*) 是蓼科蓼属多年生灌木状的草本植物^[1], 其成分主要为蒽醌类、黄酮类、芪类化合物和酚性成分等, 具有抗病毒、抗氧化、抗肿瘤、降血脂、抗菌和治疗心血管疾病的作用^[2-3]。虎杖提取物已广泛用于医药、食品、化妆品等多种行业中。

近年来, 虎杖中的芪类化合物——白藜芦醇是研究热点, 随着白藜芦醇的需求量越来越大, 由于过度的开发, 使得虎杖野生资源面临枯竭。因此利用虎杖组织和细胞培养大规模生产白藜芦醇, 是一个重要的解决途径。目前, 对虎杖的组织培养已有一些研究^[6-7], 但对虎杖的疏松愈伤组织的诱导和增殖还未见报道。该研究优化虎杖愈伤组织的诱导条件, 以诱导出生长旺盛、质地疏松的愈伤组织, 为虎杖细胞悬浮培养提供试验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

虎杖幼嫩植株采于湖南中医药大学种植基地。

1.2 方法

1.2.1 外植体消毒与培养 选取幼嫩虎杖的叶柄作为外植体, 用流水冲洗干净, 75%酒精浸泡 30 s, 无菌水洗涤 3 次, 再用 0.1%升汞溶液消毒 10 min, 无菌水冲洗 3 次, 把叶柄切成 0.5 cm 大小, 接种于含不同植物生长调节物质的 MS 固体培养基上培养。培养条件: 温度 (25±2)℃, 光照强度 1 200 lx, 光照 12 h/d, 每 25 d 继代 1 次。

第一作者简介: 曾超珍(1978-), 女, 讲师, 主要从事药用植物的教学与科研工作。E-mail: chaozhenzeng@sina.com。
基金项目: 中南林业科技大学青年基金资助项目 (06007B); 湖南省教育厅面上资助项目 (06C891)。
收稿日期: 2008-07-28

1.2.2 不同外植体诱导试验 分别选用虎杖叶柄、叶片和茎作为外植体, 接入 MS+NAA 0.5 mg/L+KT 0.2 mg/L 的培养基中培养 25 d 后, 计算其诱导率。

1.2.3 不同非激素水平对愈伤组织诱导的影响 试验以 MS+NAA 0.5 mg/L+KT 0.2 mg/L 的培养基中, 分别添加不同浓度配比蔗糖、水解酪蛋白、肌醇和不同 pH, 采用正交试验考察不同的非激素水平对虎杖愈伤组织诱导的影响。

表 1 因素水平表				
因子水平	A 蔗糖 / g · L ⁻¹	B 水解酪蛋白 / mg · L ⁻¹	C 肌醇 / mg · L ⁻¹	D pH
I	0	200	0	5.4
II	5	300	10	5.8
III	10	400	20	6.2

1.2.4 不同激素水平对虎杖愈伤组织增殖的影响 试验结果表明, 2, 4-D、NAA 对虎杖的增殖影响最大, 因此该试验以 MS 为基本培养基, 分别添加不同浓度配比的 2, 4-D、NAA, 考察植物激素对虎杖愈伤组织增殖率和疏松度的影响。

1.2.5 结果统计 愈伤组织诱导率=诱导愈伤组织的外植体块数/接种外植体块数×100%; 愈伤组织增殖率=(W₂-W₁)/W₁×100%; W₁ 接种时愈伤组织鲜重, W₂ 收获时愈伤组织鲜重。

2 结果与分析

2.1 不同外植体对虎杖愈伤组织诱导的影响

表 2 外植体对愈伤组织诱导的影响			
外植体类型	叶片	叶柄	茎
出愈率/%	83.2	100	43.5
疏松程度	致密	疏松	较疏松

由表 2 可知, 外植体对虎杖愈伤组织的诱导和生长情况有较大的影响, 叶柄最容易诱导出疏松、有活力的

愈伤组织。叶片出愈时间最短, 5 d 就有愈伤组织在其切口处出现, 生长旺盛, 但较为致密, 诱导率不如叶柄。茎的愈伤组织质地较疏松, 但出愈率较低, 污染率高。因此以叶柄为外植体进行愈伤组织的培养适合进一步的细胞悬浮培养。

2.2 不同非激素水平对虎杖愈伤组织诱导的影响

由表 3 可知, 4 种非激素因素对虎杖愈伤组织诱导影响大小顺序为: pH 值> 蔗糖> 肌醇> 水解酪蛋白, 得到最佳的非激素组合为 A₂B₂C₂D₂, 即 pH 值 5.8, 蔗糖 5 g/L, 水解酪蛋白 300 mg/L, 肌醇 10 mg/L。

表 3 不同非激素水平对愈伤组织的影响

试验号	因素				诱导率 / %
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	65
2	1	2	2	2	100
3	1	3	3	3	55
4	2	1	2	3	85
5	2	2	3	1	90
6	2	3	1	2	95
7	3	1	3	2	90
8	3	2	1	3	70
9	3	3	2	1	85
K1	73.3	80.0	76.7	80.0	
K2	90.0	86.7	90.0	95.0	
K3	81.7	78.3	78.33	70.0	
R	16.7	8.3	13.3	25.0	

表 4 不同激素水平对虎杖愈伤组织增殖率的影响

编号	激素浓度/ mg · L ⁻¹	增殖率/ %	疏松度
1	2.4-D 1.5+NAA 0.3	300	较疏松
2	2.4-D 2.0+NAA 0.3	800	紧密
3	2.4-D 2.5+NAA 0.3	1 000	疏松
4	2.4-D 1.5+NAA 0.4	233	较疏松
5	2.4-D 2.0+NAA 0.4	900	疏松
6	2.4-D 2.5+NAA 0.4	733	紧密

2.3 激素水平对虎杖愈伤组织诱导的影响

由表 4 可知, 当激素水平为 2.4-D 2.5 mg/L+NAA 0.3 mg/L 时, 虎杖愈伤组织的增殖率达 1 000%, 且质地疏松。采用这种激素组合对虎杖叶柄的愈伤组织进行

多次继代培养, 获得质地疏松、淡黄色、生长旺盛的愈伤组织。

3 讨论

采用人工组织和细胞培养生产白藜芦醇具有繁殖速度快、繁殖系数高的优势, 且不受地理环境及气候等自然条件影响, 是解决原料资源不足的最佳途径, 而虎杖愈伤组织生长过于致密导致难以实现细胞悬浮培养, 因此获得疏松、生长快速愈伤组织是实现虎杖细胞悬浮培养的前提。目前, 关于虎杖组织培养的研究的报道还很少, 曹庸等^[7]通过比较虎杖不同外植体愈伤组织诱导率发现根茎芽的诱导率最高, 为 73%, 但该试验研究发现虎杖叶柄的诱导率更高。从试验中发现不同的非激素组合对虎杖愈伤组织的诱导率有一定的影响, 因此研究愈伤组织诱导率的影响因素要做好全面的考虑。有关白藜芦醇关键酶在组织培养中的变化以及细胞悬浮培养产生白藜芦醇的影响因素的研究, 是今后研究的重点。

参考文献

[1] 谢扬, 朱秋华, 严铁琛. 虎杖活性成分及其提取分离方法研究概况[J]. 时珍国医国药, 2004, 15(9): 615-617.
[2] 薛岚. 中药虎杖的药理研究进展[J]. 中国中药杂志, 2000, 25(11): 651-653.
[3] 杨建文, 杨彬彬, 张艾. 中药虎杖的研究与应用开发[J]. 西北农业学报, 2004, 13(4): 156-159.
[4] Meishiang J, Lining C, U deani G O, et al. Cancer chem. opreventive activity of resveratrol, a natural product derive from grapes[J]. Science, 1997, 275(1): 218-220.
[5] 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)-forny 1-5-methoxykynuramine, resveratrol and uric acid[J]. Int. J. Biochem. Cell Biol. 2001, 33(8): 775-783.
[6] 欧菊泉, 陈雪, 丁利华, 等. 虎杖愈伤组织的诱导及其白藜芦醇形成初探[J]. 中南林业学院学报, 2006, 26(3): 24-50.
[7] 曹庸, 陈雪, 唐永红, 等. 虎杖愈伤组织的诱导及高产白藜芦醇材料的筛选[J]. 生命科学研究, 2006, 10(3): 270-275.

Optimization on Conditions of Loose Callus Induction of *Polygonum cuspidatum*

ZENG Chao-zhen¹, ZHANG Ying-hui², LIU Zhi-xiang¹

(1. College of Life Science and Technology, Central South University of Forestry and Technology, Changsha, Hunan 410004, China;
2. Experimental High School of Tianjiabing, Liuyang, Hunan 410300, China)

Abstract: Study on optimum factors of loose callus induction of *Polygonum cuspidatum*. By single factor and orthogonal experiments, the effects of different explants, exhormonal and hormonal combinations on callus induction, loosen and growth of *Polygonum cuspidatum* were investigated. Results showed that Leafstalk was much easier to induct loose callus induction, the optimum exhormonal factors of callus induction were pH 5.8, sucrose 5 g/L, casein hydrolysate 300 mg/L, inositol 10 mg/L, the optimum hormonal combinations of growth of *Polygonum cuspidatum* were 2, 4-D 2.5 mg/L +NAA 0.3 mg/L. The loosen, yellow, growth bloom callus induction of *Polygonum cuspidatum* were obtained under the proper exhormonal and hormonal.

Key words: *Polygonum cuspidatum*; Loose callus; Induction; Proliferation