

红芽大戟愈伤组织诱导及分化研究

韦莹¹, 余丽莹¹, 黄浩^{1*}, 韦鹏霄², 岑秀芬²

(1. 广西壮族自治区药用植物园, 南宁 530023; 2. 广西大学农学院, 南宁 530005)

摘要: 以野生红芽大戟茎段、叶片和嫩芽为材料, 经消毒灭菌后, 接种于含不同激素组合的 MS 固体培养基上, 分别进行愈伤组织诱导和分化, 结果表明, 在茎段、叶片和嫩芽 3 种外植体中, 嫩芽的愈伤组织诱导率最高, 生长最好, 最佳诱导愈伤组织激素组合为 MS+6-BA 2.0 mg·L⁻¹+NAA 0.4 mg·L⁻¹。该研究旨在筛选出适合红芽大戟诱导分化的培养体系, 进一步解决生产中繁殖率低的问题, 为红芽大戟组织培养快速繁殖、种质资源保存提供重要参考依据。

关键词: 红芽大戟; 愈伤组织; 诱导; 分化

中图分类号: Q943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2009)06-0817-05

Studies on callus induction and differentiation of *Knoxia valerianoides*

WEI Ying¹, YU Li-Ying¹, HUANG Hao^{1*},

WEI Peng-Xiao², CEN Xiu-Fen²

(1. Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plants, Nanning 530023, China;

2. College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530005, China)

Abstract: This research was conducted to select a suitable culture system for the induction and differentiation of *Knoxia valerianoides*, so as to improve the propagation rate during its production. After disinfection and sterilization, the stems, leaves and buds as the experimental materials were inoculated on MS solid media with different hormone combinations for callus induction and differentiation. The results showed that the buds had the highest inductivity and the best growth among the three explants (stem, leaf and bud). The best hormone combination for callus induction was MS medium supplemented with 2.0 mg/L 6-BA and 0.4 mg/L NAA. This investigation could provide some important references for the rapid propagation of tissue culture and germplasm resource conservation of *K. valerianoides*.

Key words: *Knoxia valerianoides*; callus; induction; differentiation

红芽大戟(*Knoxia valerianoides*)又名红大戟, 为茜草科红芽大戟属植物, 主产于广西、广东两省区, 云南、福建、海南亦有少量分布, 生长在低山坡草丛中的半阴半阳处, 是中医常用的中药材, 以块根入药, 主要化学成分为蒽醌类化合物。主治胸腹积水, 痰饮喘满, 水肿腹胀, 二便不利, 痈肿疮毒等, 具有泻水、解毒、散结的功效。还具有抗菌作用, 特别是对金黄色

葡萄球菌和绿脓杆菌有较强的抑制作用(郭晓庄, 1992; 全国中草药汇编编写组, 1975; 中国医学科学院药物研究所, 1982; 广东中药志编委会, 1994)。可以治疗狂症, 是中成药紫金锭的主药(梁忠纪, 2002)。

红芽大戟作为一种珍贵的中药材, 繁殖非常缓慢, 在自然界中主要通过种子繁殖。由于种胚发育不良, 自然散落的种子发芽率不到 1%, 用常规方法

收稿日期: 2009-06-12 修回日期: 2009-10-25

基金项目: 广西科技攻关项目(桂科攻 0322024-3A); 广西卫生厅自筹基金(Z2009343); 广西药用植物园青年基金(桂药基 200815)[Supported by Key Technologies Research and Development Program of Guangxi(0322024-3A); Self-Prepared Foundation of Health Department of Guangxi(Z2009343); Youth Foundation of Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plants(200815)]

作者简介: 韦莹(1980-), 女, 广西都安人, 研究实习生, 从事药用植物组织培养工作, (E-mail) weiyang800312@163.com。

* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: hmouse163.com)

贮藏 1 年以上的种子基本丧失活力,几乎不能出苗。近年来,随着市场需求量不断增大,其价格不断上涨而引发了滥采乱挖,造成红芽大戟药源短缺,野生资源已处于濒临枯竭的状态。以往主要从种子种植(卫锡锦,1997)、生态学(陈芳清等,1995;何茂全等,1994)、医药学方面作初步研究,在组织培养方面仅有邱安经(1993)、陈芳清等(1997)做了相关的研究,而从愈伤组织诱导和分化的角度进行系统研究仍未见报道。为了进一步保护和开发红芽大戟种质资源,对其进行组织培养快速繁殖研究至关重要。本研究利用广西百色红芽大戟野生资源为试验材料,研究不同浓度的 2,4-D、不同 6-BA 和 NAA 对红芽大戟愈伤组织诱导及分化的影响,为红芽大戟野生资源的保存和开发利用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

2009 年春季采集广西百色市田林县野生的广西红芽大戟块茎,于广西药用植物园引种驯化圃埋土种植,当茎段长至 30cm 左右时,选择健壮无病虫害的植株,剪取含有三个茎段的顶芽作为试验材料。以 MS 为基本培养基,据不同目的添加不同浓度的 6-BA、NAA 及 2,4-D 等。所有培养基均附加琼脂 5 g/L、蔗糖 30 mg/L。pH5.8。培养基在 1.1 kg/cm²、121 °C 条件下灭菌 20 min。

表 1 不同取材部位对愈伤组织诱导的影响
Table 1 Effects of different material positions on callus induction

取材部位 Position	有效外植体数 No. of explants	愈伤组织数 No. of callus	愈伤组织诱导率 Callus induction rate(%)	愈伤组织质量 Callus quality
叶片 Leaf	45	35	77.8	差
嫩芽 Bud	45	41	91.1	最好
茎段 Stem	50	43	86.0	好

1.2 试验方法

用自来水将试验材料冲洗干净,分别剪取其茎段、叶片、嫩芽(含顶芽和腋芽),在超净工作台上进行灭菌处理。灭菌后的材料均用无菌水冲洗 4~5 次,每次 5 min。培养条件:室温 26~28 °C;光照 18.75~25 μmol·m⁻²·s⁻¹,每天 10 h。芽愈伤组织诱导率及分化率计算公式:愈伤组织诱导率(%)=(产生愈伤组织的外植体数/接种外植体数)×

100%;芽分化率(%)=(分化出绿芽的愈伤组织数/接种的愈伤组织总数)×100%。

2 结果与分析

2.1 不同取材部位对愈伤组织诱导的影响

分别剪取红芽大戟的叶片、茎段和嫩芽,用升汞灭菌处理 15 min,切取嫩芽、不带腋芽的茎段(长度为 1 cm 左右)、叶片(1 cm² 左右)接种于诱导培养基 MS+BA2.0 mg·L⁻¹+NAA0.4 mg·L⁻¹上,比较不同部位的愈伤组织诱导率。培养 7 d 后,三种试材均产生愈伤组织,其中嫩芽的效果最为明显,体积膨大最大。所有的试材颜色均由原来的绿色变成黄白色。20 d 的统计结果如表 1。

从表 1 看出,红芽大戟不同取材部位在诱导培养基中形成愈伤组织的程度不同。芽诱导率和愈伤组织质量最好,愈伤组织呈淡黄色透明状,质地疏松,有颗粒状绿点,其中有 9 个愈伤组织长出了小丛芽。茎段次之,愈伤组织呈黄白色,疏松,但无颗粒状绿点。叶片最差,其愈伤组织质量紧密,易褐化、枯死。因此,芽是红芽大戟愈伤组织诱导的最佳外植体。这与陈芳清等(1997)的研究相似。

2.2 不同 2,4-D 浓度对愈伤组织诱导的影响

红芽大戟嫩芽和茎段在含不同浓度 2,4-D 的培养基上进行诱导培养,愈伤组织出现的时间有所差异。嫩芽在接种 6 d 后即开始出现整体逐渐膨大现象,而茎段在接种后第 8 天两端的伤口才逐渐膨大。在第 15 天进行观察统计时发现,在嫩芽的 CK 处理中,30 个接种材料有 26 个长出小芽,2,4-D 浓度为 0.5~2.5 mg·L⁻¹时诱导出的愈伤组织呈黄白色,但均没长出芽。茎段的 CK 处理没有长出小苗,并出现由两端向中间褐化的现象,在 2,4-D 浓度为 0.5~2.5 mg·L⁻¹时,茎段表面长出黄白色颗粒状的愈伤组织,但均无绿点产生。

从表 2 看出,红芽大戟的嫩芽和茎段在含有不同浓度 2,4-D 培养基中诱导的愈伤组织诱导率很高,均达到 95%以上,且无褐化,但愈伤组织质量随浓度的增大呈先增加后降低的趋势,浓度为 1.0~1.5 mg·L⁻¹效果最好,愈伤组织均呈透明淡黄色,质地疏松。将愈龄相同的愈伤组织接种到激素组合为 MS+6-BA5.0 mg·L⁻¹+NAA0.05 mg·L⁻¹和 MS+6-BA0.5 mg·L⁻¹+KT1.0 mg·L⁻¹+NAA0.1 mg·L⁻¹的分化培养基中均无法分化出绿点和丛芽。结合

陈芳清等(1997)对红芽大戟愈伤组织的研究,我们认为,2,4-D不利于红芽大戟愈伤组织的诱导。

表 2 不同 2,4-D 浓度对愈伤组织诱导的影响
Table 2 Effects of different concentrations
of 2,4-D on callus induction

取材部位 Position	处理代号 Treatments	外植体 个数 No. of explants	愈伤组 织数 No. of callus	愈伤组织 诱导率 CIR (%)	愈伤组 织质量 Callus quality
嫩芽 Bud	(CK)	50	0	0	—
	0.5	55	53	96.4	好
	1.0	60	60	100	最好
	1.5	55	55	100	最好
	2.0	65	63	96.9	好
	2.5	60	58	96.7	好
茎段 Stem	(CK)	65	0	0	两端褐化
	0.5	70	67	95.7	好
	1.0	65	65	100	最好
	1.5	60	60	100	好
	2.0	55	53	96.4	一般
	2.5	65	64	98.5	好

表 3 不同 6-BA 浓度对愈伤组织诱导的影响
Table 3 Effects of different concentrations
of 6-BA on callus induction

取材部位 Position	处理代号 Treatments	外植体数 No. of explants	愈伤组 织数 No. of callus	愈伤组 织诱导 率 CIR (%)	愈伤组 织质量 Callus quality	芽丛诱 导率 FBI (%)
叶 Leaf	(CK)	40	0	0	—	0
	1.0	40	37	92.5	差	0
	1.5	50	48	96	差	0
	2.0	55	54	98.2	差	0
	2.5	40	40	100	好	0
	3.0	45	43	95.6	差	0
嫩芽 Bud	(CK)	50	0	0	—	0
	1.0	45	41	91.1	差	9.2
	1.5	50	46	92	一般	40.5
	2.0	55	55	100	最好	100
	2.5	60	60	100	最好	100
	3.0	40	38	95	好	76.8
茎段 Stem	(CK)	45	0	0	—	0
	1.0	45	42	93.3	一般	0
	1.5	45	44	97.8	好	0
	2.0	50	49	98	好	0
	2.5	40	40	100	最好	0
	3.0	40	39	97.5	好	0

CIR: Callus induction rate; FBI: Frequency of bud clump induction. The same below.

2.3 不同 6-BA 浓度对不同部位诱导分化的影响

将不同部位的外植体在不同浓度 6-BA 的培养基上培养,15 d 后观察,发现除叶片、嫩芽、茎段的 CK 处理外(叶片大部分褐化后枯死;嫩芽不膨大,茎段不

膨大同时也有少量褐化),含有 6-BA 的各处理均膨大形成愈伤组织,大小和质量的优劣均为嫩芽>茎段>叶片,但愈伤组织体积均比用 2,4-D 诱导的小。

不同部位的材料均以 6-BA 浓度为 2.5 mg · L⁻¹ 的诱导质量效果最好,嫩芽的各处理中的愈伤组织均不同程度地出现绿点或长出小丛芽,嫩芽在 6-BA 浓度为 2.0 mg · L⁻¹ 和 2.5 mg · L⁻¹ 时出芽率均达到 100%,在靠近长出芽基部部位的愈伤组织,长出较多的带绿色颗粒;茎段的愈伤组织质地均较疏松、呈淡黄色透明状;叶片形成的愈伤组织体积较小且有部份褐化。茎段和叶片的愈伤组织均未长出芽,不同浓度 6-BA 对红芽大戟叶片、嫩芽和茎段诱导分化的影响见表 3(统计时间为接种后 20 d)。从表 3 可知,6-BA 浓度为 2.5 mg · L⁻¹ 时对红芽大戟的嫩芽进行诱导分化的效果最好,愈伤组织诱导率和丛芽分化率高并且芽长势较好,粗壮,叶色浓绿。

2.4 同一浓度 NAA 与不同浓度 6-BA 配组对不同部位诱导的影响

不同外植体在 NAA 和 6-BA 配组的诱导处理中,在同一个处理中,不同部位的诱导情况与以上的单因素诱导试验情况相似,均在 8 d 左右就开始膨大逐渐长成愈伤组织,愈伤组织的质量优劣均为嫩芽>茎段>叶片。培养 15 d 后统计结果(表 4)。

从表 4 看出,叶片作为外植体时,随着 NAA 的浓度的升高,愈伤组织诱导率逐渐变大,当 NAA 的浓度为 0.4 mg · L⁻¹ 和 0.6 mg · L⁻¹ 时,叶片的愈伤组织诱导率达 90% 以上,同时褐化率也随着 NAA 浓度增大而降低。但叶片的愈伤组织生长量都小于同处理中的茎段和嫩芽的愈伤组织,这与前面所做的单因子试验的结果相同。在茎段和嫩芽的处理中也发现,愈伤组织质量随着 NAA 浓度的增加而增加,呈黄白色透明颗粒状,以 NAA 浓度为 0.4 mg · L⁻¹,6-BA 浓度为 2.0 mg · L⁻¹ 和 4.0 mg · L⁻¹ 时愈伤组织的质量较好。

培养 30 d 后观察发现,嫩芽的大部分愈伤组织均长出了丛芽,以在低浓度的 NAA0.2 mg · L⁻¹ 下丛芽的数量较多,而在高浓度的 NAA0.4 mg · L⁻¹ 和 0.6 mg · L⁻¹ 下只有几个愈伤组织长出很细弱的丛芽。综合来说,激素组合 NAA0.4 mg · L⁻¹ + 6-BA2.0 mg · L⁻¹ (或 4.0 mg · L⁻¹) 对愈伤组织的诱导效果较好。

2.5 不同 NAA 浓度与同一浓度 6-BA 配组对不同部位诱导分化的影响

当 6-BA 浓度为 2.0 mg · L⁻¹ 时,将嫩芽、茎段、

叶片作为外植体进行诱导分化,红芽大戟愈伤组织随 NAA 浓度改变而出现不同的变化(表 5)。从表 5 看出,三种外植体的愈伤组织诱导率均达 95% 以上,在同一处理中,三者间的愈伤组织质量也是以嫩芽的为最佳,茎段次之,叶片最差;且只有嫩芽的愈伤组织能分化出丛芽,丛芽的分化率随着 NAA 的

浓度的增加而下降。芽诱导出的愈伤组织分化出的芽粗壮,叶片墨绿色。综合各项因素,认为嫩芽作为外植体的效果最为理想,并以 6-BA2.0 mg · L⁻¹ + NAA0.4 mg · L⁻¹ 处理的诱导效果较好(图 1)。此外,在试验中发现,带腋芽的茎段也具有较好的诱导分化能力。

表 4 同一浓度 NAA 和不同 6-BA 对愈伤组织诱导的影响

Table 4 Effects of different concentrations of NAA combined with 6-BA on callus induction

激素组合 Hormone combination 浓度(mg · L ⁻¹)	叶片 Leaf		茎段 Stem		嫩芽 Bud	
	愈伤组织诱导率 CIR (%)	愈伤组织质量 CQ	愈伤组织诱导率 CIR (%)	愈伤组织质量 CQ	愈伤组织诱导率 CIR (%)	愈伤组织质量 CQ
NAA0.2+6-BA2.0	10.0	差	100	一般	100	一般
NAA0.2+6-BA4.0	22.5	差	100	好	100	好
NAA0.2+6-BA6.0	93.8	差	100	一般	100	一般
NAA0.2+6-BA8.0	69.7	差	99.5	一般	100	一般
NAA0.4+6-BA2.0	98.5	差	100	好	100	最好
NAA0.4+6-BA4.0	96.4	差	100	好	100	最好
NAA0.4+6-BA6.0	100	一般	98.7	好	100	好
NAA0.4+6-BA8.0	98.2	差	96.3	一般	100	一般
NAA0.6+6-BA2.0	100	一般	100	好	100	好
NAA0.6+6-BA4.0	100	差	94.0	好	100	好
NAA0.6+6-BA6.0	98.7	差	91.6	一般	100	一般
NAA0.6+6-BA8.0	99.5	差	90.5	好	100	一般

表 5 不同浓度的 NAA 和同一浓度 6-BA 对愈伤组织诱导的影响

Table 5 Effects of different concentrations of NAA combined with 6-BA on callus induction

激素组合 Hormone combination 浓度(mg · L ⁻¹)	叶片 Leaf			茎段 Stem			嫩芽 Bud		
	愈伤组织诱导率 CIR (%)	愈伤组织质量 CQ	丛芽诱导率 FBI (%)	愈伤组织诱导率 CIR (%)	愈伤组织质量 CQ	丛芽诱导率 FBI (%)	愈伤组织诱导率 CIR (%)	愈伤组织质量 CQ	丛芽诱导率 FBI (%)
6-BA2.0+NAA0.1	95.0	差	0	97.8	差	0	97.5	一般	38.6
6-BA2.0+NAA0.2	98.2	差	0	100	一般	0	100	好	33.5
6-BA2.0+NAA0.3	100	一般	0	100	一般	0	100	好	32.8
6-BA2.0+NAA0.4	100	一般	0	100	好	0	100	最好	28.6
6-BA2.0+NAA0.5	100	一般	0	100	好	0	100	一般	20.8
6-BA2.0+NAA0.6	96.4	差	0	98.6	一般	0	100	一般	12.5

CQ: Callus quality; FBI: Frequency of bud clump induction.

3 讨论

3.1 选择适当的外植体是诱导愈伤组织成功的关键

外植体的年龄、发育阶段、生长环境,选取部位和时间都可能导致外植体生理、生化状态的差异,从而影响组织培养形态的发生。选取最佳部位的材料作为外植体进行诱导和分化至关重要。实验中,将红芽大戟叶片、嫩芽、茎段作为诱导愈伤组织的外植体,均能诱导出愈伤组织,叶片的愈伤组织体积很小,紧密;嫩芽和茎段的愈伤组织质量较好、疏松、体

积较大。但除嫩芽外,叶片和茎段的愈伤组织在分化培养中均无法分化出绿点和丛生芽。试验结果表明,嫩芽是最适宜红芽大戟愈伤组织诱导分化的外植体。根据植物细胞的全能性理论,茎段和叶片的愈伤组织应能分化出丛芽,但无论是以往的研究(邱安经等,1993;陈芳清等,1997),还是本文的工作,尽管进行了的许多分化试验,均无法对茎段和叶片的愈伤组织分化出丛芽,这是由于植物特性还是试验设计所致,需进一步深入研究。

3.2 不同的外源激素对诱导愈伤组织的影响较大

培养物对激素的需要量取决于它本身内源激素



图 1 1. 嫩芽愈伤组织诱导及分化; 2. 茎段愈伤组织诱导, 未分化; 3. 叶片愈伤组织诱导, 未分化。

Fig. 1 1. Induction and differentiation on buds; 2. Stems induction, no differentiation; 3. Leaf induction, no differentiation.



图 2 1. 移栽后 60 d 的植株; 2. 移栽后 100 d 块根的生长情况; 3. 移栽后 90 d 开花情况。

Fig. 2 1. Plants transplanted for 60 d; 2. Roots after transplanting for 100 d. 3. Flowering after transplanting for 90 d.

的水平,这一水平又随植物种类、组织的部位以及生长期等条件而变动。我们尝试用 2,4-D 进行诱导分化试验,虽然 2,4-D 诱导出的愈伤组织质量较 6-BA 好,但在分化培养基中无法分化丛生芽,这是 2,4-D 的毒害作用所致还是另有其他原因,还需今后进行深入研究。在使用 NAA、6-BA 不同浓度进行配组对诱导表明,随着 NAA 浓度的增大,3 种外植体的愈伤组织玻璃化程度也逐渐加大,在培养基表面长出气生根的数量逐渐增多,也影响到丛芽的分化。所以,在使用不同激素配比进行诱导试验中,要找出适当的浓度配比才能达到最佳的诱导效果。本研究使用单因子、多因子激素配比试验对广西红芽大戟愈伤组织诱导和分化进行系统研究,筛选出适合其诱导和分化的最佳因子,得出质量较佳的试管苗。经生根诱导后,成功进行了移栽(图 2),为进一步解决广西红芽大戟资源保护、因自然繁殖困难导致药材紧缺等难题提供较好的技术支持和理论依据。

参考文献:

- 广东中药志编委会. 1994. 广东中药志(第 1 卷)[M]. 广东科技出版社,220—222
- 中国医学科学院药物研究所. 1982. 中药志(第 2 册)[M]. 第 2 版. 人民卫生出版社出版,5—6 郭晓庄. 1992. 有毒中草药大辞典[M]. 第 1 版. 天津科技翻译出版公司,243—245
- 全国中草药汇编编写组. 1975. 全国中草药汇编(上册)[M]. 北京:人民卫生出版社,382—383
- Chen FQ(陈芳清),Qiu AJ(丘安机),Xu XH(徐祥浩). 1997. Tissue culture of *Knoxia valerianoides* Thorelet Petard(药用植物红芽大戟的组织培养)[J]. *Guihaia*(广西植物),17(2):149—151
- Liang JZ(梁忠纪). 2002. Broad prospects of *Knoxia valerianoides* Thorelet Petard(红芽大戟前景广阔)[J]. *New Technique Country*(农村新技术),8:55
- Chen FQ(陈芳清),Xu XH(徐祥浩). 1995. Bionomy study on individual of *Knoxia valerianoides* Thorelet Petard(药用植物红芽大戟的个体生态学研究)[J]. *J Wuhan Bot Res*(武汉植物学研究)13(2):147—151
- He MQ(何茂全),Hu YS(胡延松),Huang JJ(黄健君). 1994. Studies on the observe of ecological condition and biological characteristics of *Knoxia valerianoides* Thorelet Petard(红大戟的生态环境及生物学特性的观察)[J]. *Chin Wild Plant Res*(中国野生植物资源),(2):12—14
- Wei XJ(卫锡锦). 1997. Cultivation techniques of *Knoxia valerianoides* Thorelet Petard(红大戟的栽培技术)[J]. *Chin Herb Med*(中药材)20(12):598
- Qiu AJ(邱安经),Xu XH(徐祥浩). 1993. Tissue culture of *Knoxia valerianoides* Thorelet Petard(红芽大戟的组织培养)[J]. *Chin Herb Med*(中药材)(9):9—10