

文章编号: 1000-4025(2004)09-1734-05

# 唐古特大黄组织培养技术的研究<sup>\*</sup>

徐文华, 陈桂琛<sup>\*</sup>, 李毅, 王莉

(中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001)

**摘要:** 试验选用唐古特大黄(*Rheum tanguticum* Maxim. ex Regel) 种子萌发的无菌苗及无菌苗子叶、下胚轴、胚根和幼根作为材料, 研究唐古特大黄不同外植体的离体培养技术。结果表明, 唐古特大黄的无菌苗和无菌苗子叶、下胚轴、胚根和幼根都可以作为离体培养的良好外植体。唐古特大黄的最适分化培养基是: B<sub>5</sub>+ NAA 0.1 mg/L + 6-BA 3 mg/L; 最适生根培养基是: 1/2MS+ NAA 1 mg/L + 3% 蔗糖或 1/2MS+ NAA 0.5 mg/L + 3% 蔗糖; 愈伤组织诱导培养基是: MS+ 2, 4-D 1 mg/L + NAA 1 mg/L + 6-BA 1 mg/L。

**关键词:** 唐古特大黄; 组织培养; 再生; 愈伤组织

**中图分类号:** Q943.1      **文献标识码:** A

## Studies on tissue culture technique of *Rheum tanguticum*

XU Wen-hua, CHEN Guichen<sup>\*</sup>, LI Yi, WANG Li

(Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China)

**Abstract:** Plantlets were regenerated from the *Rheum tanguticum* Maxim. ex Regel via tissue culture. The sterile shoots, cotyledons, hypocotyls, radicles and young roots of seed germinated seedlings of *Rheum tanguticum* Maxim. ex Regel were used as explants cultured *in vitro* to induce the plant regeneration. The experiment results showed that the sterile shoot differentiation medium is B<sub>5</sub>+ NAA 0.1 mg/L + 6-BA 3 mg/L, the medium for rooting is 1/2MS+ NAA 1 mg/L + 3% sucrose and 1/2MS+ NAA 0.5 mg/L + 3% sucrose, and the callus inducing medium is MS+ 2, 4-D 1 mg/L + NAA 1 mg/L + 6-BA 1 mg/L.

**Key words:** *Rheum tanguticum* Maxim. ex Regel; tissue culture; regeneration; callus

唐古特大黄(*Rheum tanguticum* Maxim. ex Regel), 又名鸡爪大黄, 属蓼科(Polygonaceae) 大黄属(*Rheum* Linn.) 多年生粗壮草本, 生长于海拔 2 300~ 4 200 m 的沟谷林缘、山坡林下、河岸溪边和半阳坡灌丛一带<sup>[1]</sup>, 是我国传统的特产中药材, 为“正品大黄”之一<sup>[2-4]</sup>。分布于西藏东部、青海、甘肃, 主产于我国青海省<sup>[5]</sup>。主治实热积滞、瘀血经闭、痈肿疔疮、水火烫伤等症<sup>[6]</sup>。

近年来, 大黄的生产一直依赖野生植物的采收, 致使野生大黄日益减少。由于得不到有效的保护, 大

黄天然资源已近于枯竭<sup>[7]</sup>。而目前对大黄的研究多集中于化学成分、药理作用、临床疗效等方面。作为市场紧缺的名贵中药材, 随着相关产品的开发, 其需求量已呈现供不应求的趋势。通过组织培养途径实现唐古特大黄的人工繁殖既可以保护野生资源, 又可满足日益增长的市场需求。本实验报道对唐古特大黄无菌苗分化及其愈伤组织诱导的研究结果。从无菌苗直接成苗对于扩大优质大黄繁育途径, 提高繁育速度, 保持优良性状等方面具有重要的意义; 诱导愈伤组织, 对大黄药用有效成分分析和细胞的悬

\* 收稿日期: 2003-11-01; 修改稿收到日期: 2004-02-23

基金项目: 中国科学院“西部之光”项目(2000年度); 国家中西部专项(2001BA901A47); 青海省重大科技攻关招标项目(2001-N-107-02)联合资助

作者简介: 徐文华(1974-), 女(汉族), 助理研究员。

\* 通讯联系人。Correspondence to: CHEN Guichen. E-mail: gcchen@mail.nwipb.ac.cn

浮培养可进一步研究, 为实现唐古特大黄的人工快速繁殖和药材生产的产业化等奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试材料为唐古特大黄 (*Rheum tanguticum* Maxim. ex Regel) 种子, 采自青海省果洛州。

### 1.2 方法

种子在 52 ℃ 的水浴锅内恒温浸泡 12 min 后, 置冷蒸馏水中 5~ 6 h。在超净工作台上, 将处理过的种子用 0.2% 的 HgCl<sub>2</sub> 水溶液 (含吐温-40) 浸泡灭菌 10~ 12 min, 无菌水冲洗 4~ 5 遍后, 接种到附加 3% 蔗糖的 MS 无激素固体培养基上。5 d 后胚根伸出, 种皮分泌大量褐色物质使培养基褐化, 转接一次。转接 5~ 7 d 后, 子叶长出, 分别将子叶未伸展的无菌幼苗、无菌苗的子叶 (0.5 cm × 0.5 cm)、下胚轴切段 (0.5~ 1.0 cm)、胚根 (1.0 cm)、幼根 (1.0~ 1.5 cm) 接种在培养基上。

### 1.3 培养条件

无菌苗分化培养选 B<sub>5</sub> 培养基, 其余培养为 MS 或 1/2 MS 基本培养基, 附加蔗糖 30 g/L 和 15 g/L

(部分诱根培养)、琼脂粉 5 g/L 及各种激素, pH 为 5.8。在温度为 25 ± 1 ℃, 光源为日光灯, 光照度为 2 000~ 3 000 lx 和光照时间为 12 h · d<sup>-1</sup> 的条件下培养。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同外植体的离体培养

经初步试验, 设计了不同激素配比的 9 种培养基 (表 1), 并选取易于分化的无菌苗 (种子萌发, 子叶未伸展) 作为外植体, 首先进行了最佳分化培养基的筛选。实验结果表明, 选无菌苗为外植体在 9 种培养基上都能分化, 除 F8 之外, 分化率都为 100%。从死亡率、平均分化芽数和长势总体情况考虑, 以 F4、F6、F9 为首选基本培养基, 进行最佳分化培养基的筛选。F4、F6、F9 每一种分别接种 5 瓶, 一个周期后统计数据表明, 分化率最高分别达到 233%、246%、150%; 平均每个外植体分化芽数分别为 14 芽/个、16.75 芽/个、6 芽/个。因此, 最后确定 F6 为最佳分化培养基。在不同激素处理的培养基上, 分化丛生芽的长势明显不同。

表 1 几种分化培养基上无菌苗的分化率

Table 1 Differentiation rates of sterile shoot on different medium

培养基 Medium	激素 Hormones (mg/L)		外植体数 Number of explants	分化率 Differentiation rates (%)	死亡率 Death rates (%)	平均每个外植体分化芽数 Average number of regeneration shoots per explant	长势 Growth vigour
	NAA	6-BA					
F1	0	1	4	100	50.0	4.5	++
F2	0	2	8	100	37.5	5.4	+++
F3	0	3	6	100	33.3	7.25	+++
F4	0.1	1	4	100	0	9.0	+++
F5	0.1	2	6	100	16.7	5.8	++
F6	0.1	3	6	100	16.7	11.6	+++
F7	0.2	1	4	100	25.0	6.33	++
F8	0.2	2	5	50	20.0	5.5	+
F9	0.2	3	6	100	0	8.0	++++

注: “+” ~ “++++” 代表生长势从弱到强。

Note: “+” to “++++” respectively refers to the growth vigour from weak to stronger.

表 2 不同外植体分化情况比较

Table 2 Comparison of differentiation of variant explants

外植体 Explant	外植体数 Number of explants	分化率 Differentiation rates (%)	死亡率 Death rates (%)	长势 Growth vigour
无菌苗 Sterile shoot	6	100	16.7	+++
子叶 Cotyledon	43	0	34.88	-
下胚轴 Hypocotyl	50	86.21	42.00	++
幼根 Young root	59	31.25	37.25	++

注: ++, +++ 分别表示一般和良好。

Note: ++, +++ respectively refers to general and best.

无菌苗的子叶、下胚轴和幼根在分化培养基 F6 上生长 15~ 20 d 后, 可以观察到开始出现分化; 生

长 35 d 后, 可以明显观察到下胚轴和幼根切段的切口处分化出再生芽, 主要是通过器官发生途径分化

出再生芽。再生芽需要进一步诱导生根成苗。

在分化培养基 F6 上, 各外植体的分化和生长情况是不同的(表 2)。

从表 2 可以看出, 下胚轴芽分化率最高, 达到 86.21%, 同时死亡率也相对较高; 幼根的分化率不到 40%; 子叶没有分化。试验观察发现, 起初在子叶切口处有明显的浅黄白色瘤状突起形成, 几天后逐渐变绿, 有分化迹象, 到后期外植体逐渐褐化死亡。无菌苗、下胚轴和幼根形成的再生苗都容易继代成活。

此外, 在生长分化时间上, 下胚轴和幼根形成丛生芽的时间短, 约为 25~30 d 左右; 无菌苗分化成丛生芽的时间较长, 约在 45~50 d 左右; 而无菌苗形成的再生芽较健壮。

## 2.2 再生芽的增殖

再生芽可以多次继代增殖, 每个芽每代新增 3~4 个丛生芽(图 1, c), 单芽数平均达到 875 个。但多次继代后, 分化率逐渐降低, 为了促进壮芽和后期生根, 经过筛选得到壮芽培养基是 F9。在壮芽培养基上进行继代, 再生芽伸长快且健壮。

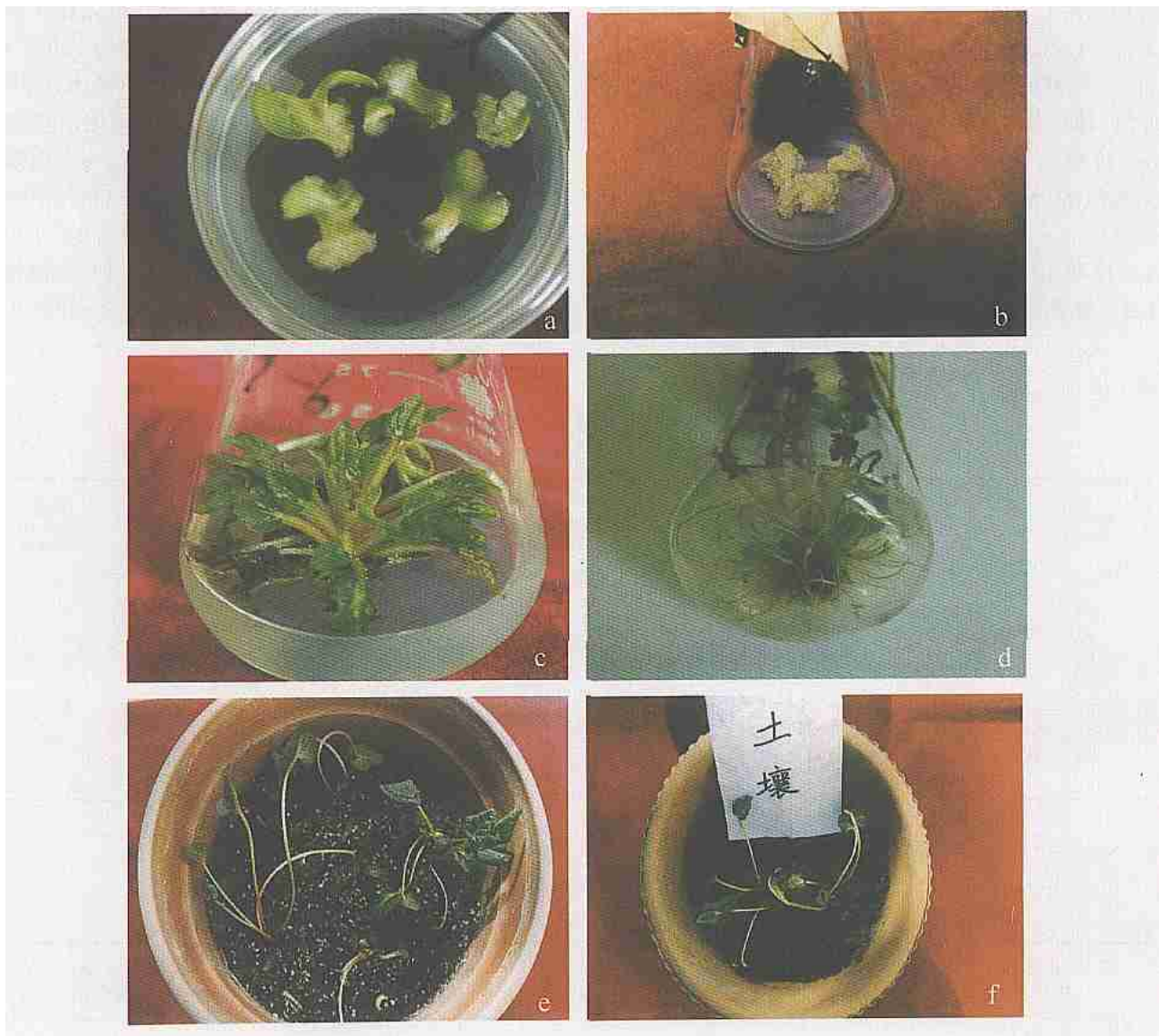


图 1 唐古特大黄组织培养系列图

a 子叶切口处产生愈伤组织; b 生长旺盛的愈伤组织; c 无菌苗分化形成丛生芽; d 根的分化; e 珍珠岩中移栽成活的小苗; f 转移到土壤中成活的小苗

Fig 1 Serial figures of *Rheum tanguticum* Maxim. ex Regel tissue culture

a Calluses resulting from cotyledon; b Calluses of growing vigorously; c Cluster shoots differentiated from sterile shoots; d Root differentiation; e The surviving young plant in the pearl; f The surviving young plant in the soil

### 2.3 再生苗的生根诱导

唐古特大黄组培再生苗多为丛生苗, 将继代增殖培养中形成的高约 3.0~4.0 cm 的健壮无根苗切割成单芽, 转入生根培养基 G1~G5 中诱导生根(图 1, d), 实验结果(表 3)如下: 第 55 天统计数据表明, G4 诱根效果最好, 观察到 15 d 时根原基变白, 突起, 根开始长出, 25 d 时长出 3~4 条长 0.5~1 cm

的根, 根呈白色, 诱根率达 66.67%。第 30 天时 G2 培养基中试管苗开始长根, 第 35 天时 G3、G5 中的试管苗开始出根; G1 最后出根, 约 45 d 时长出粗壮的根。第 70 天统计数据表明, G2 诱根效果最好, 达 100% 的诱根率; G4 次之, 诱根率为 88.89%; G5 诱根率最低。

表 3 不同激素和蔗糖浓度对试管苗生根的影响

Table 3 Effect of different concentration hormones and sucrose on rooting of tube-plantlets

培养基 Medium	激素 Hormones (mg/L)	蔗糖 Sucrose (%)	接种芽数 Number of shoots	第 55 天生根率 Rooting rates of 55 days (%)	第 70 天生根率 Rooting rates of 70 days (%)	死亡率 Death rates (%)	开始长根时间 Time of growing roots
G1	1.0	3.0	6	40.0	80.0	16.67	第 45 天
G2	1.0	3.0	9	62.5	100	11.11	第 30 天
G3	0.5	1.5	8	50.0	87.5	0	第 35 天
G4	0.5	3.0	9	66.67	88.89	0	第 15 天
G5	1.0	1.5	8	25.0	50.0	0	第 35 天

注: G1 为 MS 基本培养基; G2、G3、G4、G5 为 1/2MS 培养基; 附加不同浓度的激素(NAA)和蔗糖, 见表 3, pH=5.8。

Notes: G1 refers to MS basic medium; G2, G3, G4, G5 refer to 1/2MS basic medium; supplemented with different amount of NAA and sucrose (Table 3), pH=5.8

再生苗在不同基本培养基、不同激素和蔗糖浓度的诱根培养基中, 其生根时间、数量不同。再生苗生根比较缓慢。实验结果表明虽然各组合均可诱导生根, 但诱根时间、数目明显不同。25 d 后 G4 培养基中再生苗最先长根, 30 d 后 G2 培养基中有根长出。G2 和 G4 相比, 在基本培养基和蔗糖浓度一致条件下, NAA 的浓度影响苗生根的时间。G4 中 NAA 的浓度是 G2 中 NAA 浓度的 1/2, 但 G4 中形成根的时间却比 G2 早 15 d。蔗糖浓度从 3% 降低到 1.5% 时, G3 和 G5 培养基中的根几乎同时形成, 表明 NAA 浓度没有太大的影响。MS 与 1/2MS 相比, 虽然长根时间迟, 45 d 时根原基才突起变白, 但长出的根较其它的粗壮。在生根数量上, G1 培养基中根的数量比另外 4 种少, 但根系明显粗于其它 4 种。G2~G5 中形成的根多而细。影响试管内生根的因素, 如基本培养基、蔗糖浓度、植物激素、光照、温度等对诱根培养都是很重要的。大多数诱根培养基都使用低盐浓度的培养基, 如 1/2MS 或 1/3MS 培

培养基, 降低无机盐浓度, 有利于生根, 而且根多, 发根也快<sup>[8]</sup>。本实验结果也证明了这一点。虽然生根比较慢, 但只要根原基一形成, 根原基的伸长就很快, 随继代时间增长生根能力也有所提高。

### 2.4 愈伤组织的诱导和继代培养

本试验初步研究了以唐古特大黄无菌苗各器官为外植体, 愈伤组织的诱导情况。首先以子叶为外植体, 筛选了唐古特大黄最适愈伤组织诱导培养基(表 4)。将一周龄的唐古特大黄无菌苗子叶切成 0.5 cm × 0.5 cm 大小的块, 接至不同的培养基(I、II、III)上诱导愈伤组织(图 1, a)。可以看出, 子叶在 3 种培养基上愈伤组织的诱导率都相对较高, 但在 III 培养基上愈伤组织诱导率最高, 达到 97.92%。诱导出的愈伤组织转入含有 2,4-D 2 mg/L、6-BA 0.2 mg/L 和 NAA 0.2 mg/L 的 MS 培养基上进行继代培养, 愈伤组织生长良好, 呈淡黄色, 结构(图 1, b)致密, 每 20~25 d 转代一次。

表 4 不同培养基上子叶愈伤组织的诱导

Table 4 Callus inducing of cotyledon on different medium

培养基 Inducing medium	激素 Hormones (mg/L)			外植体块数 Number of explants	形成愈伤组织的 外植体块数 Number of explants of forming callus	诱导率 Callus inducing rates (%)	死亡率 Death rates (%)
	2,4-D	NAA	6-BA				
I	3	1	1	71	48	88.89	23.94
II	2	1	1	46	29	87.88	28.26
III	1	1	1	58	47	97.92	17.24

通过比较不同外植体在 III 培养基上的愈伤组织

诱导情况(表 5)可以看出, 子叶的愈伤组织诱导率

最高,下胚轴次之,幼根的愈伤诱导率最低,所以子叶应该是诱导愈伤组织的最佳外植体。

表 5 不同外植体愈伤组织的诱导

Table 5 Callus inducing of different explants

外植体 Explants	外植体块数 Number of explants	形成愈伤组织的外植体块数 Number of explants of forming callus	诱导率 Callus inducing rates(%)	死亡率 Death rates(%)
子叶 Cotyledon	58	47	97.92	17.24
下胚轴 Hypocotyl	42	28	90.32	26.19
幼根 Young root	53	25	65.79	28.3
胚根 Radicle	34	17	80.95	38.24

在诱导时间上,子叶、下胚轴、胚根和幼根诱导愈伤组织的时间没有明显区别,一般 7 d 左右外植体都膨大、拱起;在愈伤组织质量、颜色上,子叶形成的愈伤组织结构致密,为浅黄白色;下胚轴和胚根形成的愈伤组织呈疏松、水浸状,颜色呈浅白色;幼根形成的愈伤组织为水浸状,颜色起初呈浅白色,之后逐渐变黑。高等植物,尤其是药用植物的组织培养,越来越引起人们的关注。已有一些报道,如人参在自然条件下生长缓慢,远不能满足市场的需求,利用人参的愈伤组织细胞悬浮培养进行药物生产,目前已接近商业水平。大黄也是种常用中药材,但它的药用根部属多年生,生长缓慢,用组织培养方法可以改善其生产状况。目前我们已经得到了大黄的愈伤组织,其药用有效成分的分析 and 细胞的悬浮培养,还有待于进一步研究。

### 3 结 论

(1) 唐古特大黄的无菌苗和无菌苗子叶、下胚轴、胚根和幼根都可以作为离体培养的良好外植体。无菌苗及无菌苗的下胚轴是适宜诱导分化的最适外植体;无菌苗的子叶是适宜愈伤组织诱导的最适外植体。

(2) 唐古特大黄的最适分化培养基是:  $B_5 + NAA 0.1 \text{ mg/L} + 6-BA 3 \text{ mg/L}$ 。

(3) 最适生根培养基是:  $1/2 MS + NAA 1 \text{ mg/L} + 3\%$  蔗糖或  $1/2 MS + NAA 0.5 \text{ mg/L} + 3\%$  蔗糖。

(4) 愈伤组织诱导培养基是:  $MS + 2, 4-D 1 \text{ mg/L} + NAA 1 \text{ mg/L} + 6-BA 1 \text{ mg/L}$ 。

### 参考文献

- [1] YANG W L (杨文莲), SU Y F (苏艳芳), ZHENG J H (郑俊华). A survey on the resources of rhubarb in Qinghai area[J]. *Journal of Beijing Medical University* (北京医科大学学报), 1998, 30(6, suppl): 71 (in Chinese).
- [2] LOU ZH C (楼之岑). Rhubarb research: retrospects and prospects[J]. *Journal of Beijing Medical University* (北京医科大学学报), 1993, 25(5, suppl): 1- 3 (in Chinese).
- [3] XIE Z Q (谢宗强), SHANG A M (尚安明), ZHENG J H (郑俊华). Characteristics of the habitats and communities of *Rheum palmatum* and *R. likiangense* in Yushu Qinghai[J]. *Journal of Beijing Medical University* (北京医科大学学报), 1998, 30(6, suppl): 6- 9 (in Chinese).
- [4] FU G (富戈), XU B J (徐秉玖), LU Y (陆艳). HPLC determination of free and combined anthraquinone in *Rheum tanguticum* Maxim. [J]. *Journal of Beijing Medical University* (北京医科大学学报), 1998, 30(6, suppl): 20- 21 (in Chinese).
- [5] LU L (刘莉), MEI Q B (梅其炳), LI B L (李保莉). Antioxidation of *Rheum tanguticum* Maxim. polysaccharide on acute liver injury mice[J]. *Journal Fourth Military Medical University* (第四军医大学学报), 2001, 22(6): 530- 533 (in Chinese).
- [6] WANG X F (王雪峰), ZHENG J H (郑俊华), CHEN Q H (陈青云). GC/MS in the study of chemical constituents of volatile oil from *Rheum tanguticum* [J]. *Chinese Pharmaceutical Journal* (中国药学杂志), 1995, 30(12): 719- 720 (in Chinese).
- [7] ZHANG T (张韬), SHANG A M (尚安明), ZHENG J H (郑俊华). Determination of anthraquinones in 16 species of Sect Rhapontica of *Rheum* [J]. *Journal of Beijing Medical University* (北京医科大学学报), 1993, 25(5, suppl): 43- 45 (in Chinese).
- [8] 曹孜义. 果树花卉无毒苗快繁技术[M]. 兰州: 甘肃科学技术出版社, 1998: 35- 38