



虎杖愈伤组织的诱导及其白藜芦醇含量的变化

王丹丹, 李兴林, 崔兴华, 周鑫

(工业微生物教育部重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 为了利用细胞工程开发虎杖悬浮细胞培养、积累白藜芦醇, 必须探索虎杖松散型愈伤组织的培养基及其培养条件。以灭菌虎杖茎段、叶片、茎尖等为外植体, 探讨 9 种激素组合在琼脂和珍珠岩固体培养基上诱导愈伤组织的出愈时间、出愈率、在继代培养中分化状况和白藜芦醇含量变化。结果表明: 珍珠岩作为支撑物, 诱导的愈伤组织比琼脂好; 含有 NAA 或 KT 的培养基, 诱导形成的愈伤组织在继代中均可分化; ①号培养基 (MS+2,4-D 4.0 mg/L+6-BA 2.0 mg/L+3%蔗糖) 对幼叶、茎段和茎尖等都有出愈时间早、出愈率高和愈伤组织生长速度快、松散, 适宜于悬浮细胞的培养; 愈伤组织白藜芦醇的含量与其外植体来源呈正相关, 其中, 由幼茎形成的愈伤组织白藜芦醇含量 (鲜重) 最高, 达到 160 μg/g。

关键词: 虎杖; 白藜芦醇; 愈伤组织; 植物激素; 珍珠岩

中图分类号: Q813.1⁺2

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2009)02-0009-04

Induction of Callus and the Change of Their Resveratrol Contents from *Polygonum cuspidatum*

WANG Dan-dan, LI Xing-lin, CUI Xing-hua, ZHOU Xin

(Key Laboratory of Industrial Microbiology, Ministry of Education,

College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: In order to make use of suspension cells from *Polygonum cuspidatum* to accumulate resveratrol, the medium and culture condition of relaxed callus of *Polygonum cuspidatum* would be optimized. Stem axis, young leaves and stem tips were acted as explants to induce callus of *Polygonum cuspidatum* in the medium containing MS with 9 kinds of plant hormone combination, which agar and perlite were used as solid components; and then callus development time, callus development rate, callus differentiation during subculture and callus resveratrol content were studied. The results are shown that, the callus induced in medium with perlite is better than with agar; the callus can be differentiated into tissues from the medium containing NAA or KT during subculture; in medium ① with MS+2,4-D 4.0 mg/L+6-BA 2.0 mg/L, callus development time is short, and callus development rate is high, and callus is relaxed, and callus development speed is quick from explants of stem axis, young leaves and stem tips, while it can be fit for suspension culture; there is positive relationship between callus resveratrol contents and their origin of their explants, thereinto, the resveratrol content of callus from stem axis induction is 160 μg/g wet weight, and it is the highest content.

Keywords: *Polygonum cuspidatum*; resveratrol; callus; plant hormone; perlite

虎杖 (*Polygonum cuspidatum*) 是蓼科蓼属多年生草本植物^[1]。虎杖的有效药用成分主要为蒽醌类和二苯乙烯类化合物^[2], 尤其是白藜芦醇, 由于其具有多种生物学活性及药理作用, 已作为单体成分在医药、

化工及食品领域中应用, 而虎杖就是该单体成分的原药^[3-5]。但是, 长期采挖造成的虎杖野生资源匮乏, 以及野生虎杖的白藜芦醇含量低且不稳定、人工栽培品质退化、采集加工繁琐等问题制约着它的进一步开

收稿日期: 2008-10-10; 修回日期: 2008-11-28

基金项目: 天津市应用基础及前沿技术研究计划项目 (08JCZDTC15300)

作者简介: 王丹丹 (1984—), 女, 天津人, 硕士研究生; 通信作者: 李兴林, 副教授, lxlszf@tust.edu.cn.

发和使用^[6]. 因此,开展虎杖的细胞、组织大规模培养生产白藜芦醇,已成为一条重要的途径. 而虎杖愈伤组织的诱导是实施产业化的第一步. 目前,蓼科植物组织培养的目标主要是获得再生植株^[7-11],其形成的愈伤组织难以适合悬浮细胞的培养. 本文旨在探讨诱导虎杖松散型愈伤组织形成的较佳培养基和培养条件,为通过悬浮细胞培养、生产白藜芦醇积累基本的实验参数.

1 材料与方 法

1.1 外植体的消毒

洗衣粉水漂洗→清水(自来水)漂洗数次→在超净台上 75%乙醇消毒 10 s→无菌水漂洗 2 次(3、10 min)→次氯酸钠消毒不超过 30 s(茎段、叶片、茎尖时间依次减短 5 s)→无菌水漂洗 3 次(5、3、2 min).

1.2 愈伤组织的诱导

将无菌处理的外植体分别接种到加有不同激素组合^[7-11]的 MS 琼脂固体培养基或珍珠岩固体培养基中(见表 1),在(25 ± 2) °C 温度下培养. 光照培养条件

为:光照 16 h,黑暗 8 h,光照强度约 400 μmol/(m²·s).

1.3 愈伤组织的继代培养

将诱导的愈伤组织每两周继代一次. 继代培养基、激素组合及浓度与诱导愈伤组织的培养基相一致. 经过一定时间的继代培养,观察愈伤组织的分化状况.

1.4 白藜芦醇的提取和含量测定

1.4.1 提取步骤

称取适量愈伤组织加入微量石英砂→研磨→加入 5 mL 99.5%甲醇→振荡、摇匀→蔽光、45 °C 水浴 4 ~ 5 h→离心→过微孔膜→HPLC 测定.

1.4.2 HPLC 测定白藜芦醇含量

流动相 V_{乙腈} : V_水 = 30 : 70(水中加入 0.02%磷酸)^[12];流量 1.0 mL/min;测定波长 303 nm.

白藜芦醇含量标准曲线方程制定:白藜芦醇标样质量浓度为 0 ~ 500 μg/mL,经 HPLC 测定,吸收峰面积(x)与白藜芦醇含量(y)的标准方程:y=0.013 1x-7.485 6, R²=0.995 8. 经查表可知,吸收峰面积与白藜芦醇含量之间相关系数达到极显著水平(P=0.01).

白藜芦醇含量测定:待测样的白藜芦醇吸收峰面积带入方程,即可计算出白藜芦醇的含量.

表 1 愈伤组织诱导和继代的培养基

Tab.1 Medium of callus development and subculture

序号	基本培养基	生长激素/(mg·L ⁻¹)	细胞分裂素/(mg·L ⁻¹)
①	MS(琼脂或珍珠岩)	2,4-D 4.0	6-BA 2.0
②	MS(琼脂或珍珠岩)	2,4-D 1.0	KT 0.1
③	MS(琼脂或珍珠岩)	NAA 2.0	KT 0.1
④	MS(琼脂或珍珠岩)	NAA 2.0	KT 0.5
⑤	MS(琼脂或珍珠岩)	NAA 1.0	KT 0.1
⑥	MS(琼脂或珍珠岩)	2,4-D 2.0	KT 0.1
⑦	MS(琼脂或珍珠岩)	2,4-D 6.0	6-BA 2.0
⑧	MS(珍珠岩)	NAA 0.2	6-BA 1.0+KT 0.2
⑨	MS(珍珠岩)	2,4-D 0.5	6-BA 2.0+KT 0.2

2 结果与讨论

2.1 琼脂和珍珠岩作为支撑物培养的愈伤组织比较

在 MS 液体培养基加入琼脂或珍珠岩分别形成的固体培养基中,形成的愈伤组织有明显的区别. 琼脂支撑培养的愈伤组织分布在外植体边缘生长,并且较致密;珍珠岩支撑培养的愈伤组织成团状包裹着外植体生长,表面呈霜状,相对较松散. 愈伤组织生长速度快、松软,便于悬浮细胞的培养. 这是由于珍珠岩多孔、轻软等特点,使该培养基具有固定支持好、持水率高、透气性强以及便于补加液体等优势. 以下实验

均以珍珠岩作为支撑物,诱导愈伤组织和继代培养.

2.2 愈伤组织的诱导与继代培养

2.2.1 叶片愈伤组织的诱导及继代培养

表 2 列出了 8 种激素组合对叶片的诱导及其形成的愈伤组织在相应培养基中的继代培养结果. 由表 2 可知:①、⑦、⑨培养基的出愈率较高,但⑦的出愈时间较慢,长势明显不如①、⑨旺盛. 除①、⑦培养的愈伤组织为淡黄色和乳白色之外,其他的激素配比在第一次继代时愈伤组织均出现绿色(分化),且质地很硬,其中,以③、④培养的愈伤组织最为明显. 虎杖的愈伤组织大部分最初呈淡黄色和乳白色,在生长周期的初期有少部分呈现粉色,但随着生长时间的推移

粉色会逐渐消失.由此表明,在培养基中 KT 或 2,4-D 含量低可能是导致虎杖叶片愈伤组织容易发生分

化的原因.因此,对于叶片愈伤组织的诱导和继代培养应选择①号培养基.

表 2 叶片愈伤组织的诱导及其在继代中愈伤组织的分化情况

Tab.2 Callus induction from leaves and callus differentiation during subculture

培养基	出愈时间/d	出愈率/%	愈伤组织特点	分化情况
①	12	100	淡黄色、乳白色,质地较硬,生长较快	否
②	13	86	淡黄色、偶有淡粉色和黄绿色,质地较硬,生长较快	是
③	12	77	黄绿色、偶有淡粉色,质地很硬,生长较快	是
④	11	71	黄绿色、偶有淡粉色,质地很硬,生长较快	是
⑤	26	20	淡黄色、偶有淡粉色和黄绿色,质地较硬,生长缓慢	是
⑥	13	9	淡黄色、黄绿色,质地较硬,生长较快	是
⑦	15	96	淡黄色、乳白色,质地较硬,生长较慢	否
⑧	12	98	黄绿色,质地较硬,生长较快	是

2.2.2 茎段愈伤组织的诱导及继代培养

表 3 列出了 8 种激素组合对茎段的诱导,以及形成的愈伤组织在相应培养基中的继代培养的结果.由表 3 可知:①、⑧出愈时间短且出愈率高.从外观上看,①愈伤呈淡黄色,⑧呈灰白色.继代过程中

除①、⑦愈伤组织为淡黄色和乳白色(⑦的长势较慢)外,其他的激素配比在第一次继代时愈伤组织也均出现深绿色(分化),且质地较硬,以③、④最为突出.所以,对于茎段愈伤组织的诱导和继代都可选用①号培养基.

表 3 茎段愈伤组织的诱导及其在继代中的分化情况

Tab.3 Callus induction from stem axis and their differentiation during subculture

培养基	出愈时间/d	出愈率/%	愈伤组织特点	分化情况
①	13	90	淡黄色、乳白色,质地较硬,生长较快	否
②	13	84	淡黄色、偶有淡粉色和黄绿色,质地较硬,生长较快	是
③	22	55	黄绿色、偶有淡粉色,质地很硬,生长缓慢	是
④	22	22	黄绿色、偶有淡粉色,质地很硬,生长缓慢	是
⑤	22	10	淡黄色、偶有淡粉色和黄绿色,质地较硬,生长缓慢	是
⑥	13	85	淡黄色、黄绿色,质地较硬,生长较快	是
⑦	17	90	淡黄色、乳白色,质地较硬,生长较慢	否
⑧	12	90	灰白色、黄绿色,质地较硬,生长很快	是

2.2.3 茎尖愈伤组织的诱导及继代培养

表 4 列出了 7 种激素组合对茎尖的诱导,以及形成的愈伤组织在相应培养基中的继代培养结果.由 4 表可知:①、⑥、⑦出愈率高,但⑦的出愈时间稍长.继代过程中除①、⑦愈伤组织为淡黄色和乳

白色(⑦的长势较慢)之外,其他的激素配比在第一次继代时愈伤组织也均出现绿色(分化),且质地很硬,仍以③、④最为突出.所以,对于茎尖愈伤组织的诱导和继代可选用①、⑦号培养基.

表 4 茎尖愈伤组织的诱导及其在继代中的分化情况

Tab.4 Callus induction from stem tips and their differentiation during subculture

培养基	出愈时间/d	出愈率/%	愈伤组织特点	分化情况
①	12	97	淡黄色、乳白色,质地较硬,生长较快	否
②	14	75	淡黄色、伴有淡粉色和黄绿色,质地较硬,生长较快	是
③	8	73	黄绿色、偶有淡粉色,质地很硬,生长较快	是
④	11	36	黄绿色、偶有淡粉色,质地很硬,生长较快	是
⑤	8	50	淡黄色、偶有淡粉色和黄绿色,质地较硬,生长较快	是
⑥	13	80	淡黄色、黄绿色,质地较硬,生长较快	是
⑦	15	96	淡黄色、乳白色,质地较硬,生长较慢	否

2.3 愈伤组织的生物量变化

采用①和⑦号培养基研究不同外植体形成愈伤

组织的生物量变化,结果见表 5.由表 5 可以看出:同一外植体在①号培养基中的生物量增长比在⑦号培

培养基中快;相同培养条件下,愈伤组织的生长速度依次为:茎尖、幼叶和茎段。

表5 来源不同的愈伤组织生物量(鲜重)的变化

Tab.5 Biomass (wet weight) changes of different origin callus

处理	幼叶			茎段			茎尖		
	接种量/g	收获量/g	增重/%	接种量/g	收获量/g	增重/%	接种量/g	收获量/g	增重/%
①	1.38	6.97	405	1.22	5.59	358	0.94	4.81	417
⑦	0.95	4.06	327	0.87	3.43	295	0.73	3.31	354

2.4 虎杖外植体与愈伤组织的白藜芦醇含量

测定虎杖外植体茎段、幼叶以及由茎段和幼叶诱导形成的愈伤组织中白藜芦醇含量,结果见图 1。由图 1 可知:虎杖的白藜芦醇在茎段中的含量高于在幼叶中的含量;在茎段形成愈伤组织中的含量高于幼叶愈伤组织中的含量。这与虎杖不同部位外植体中白藜芦醇含量是相一致的;同一外植体与其形成的愈伤组织相比,后者白藜芦醇含量稍高。

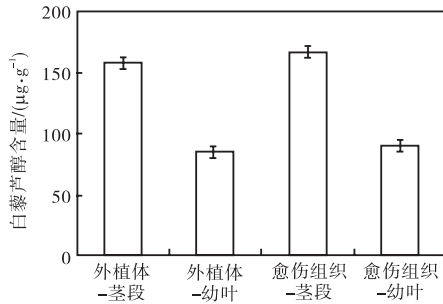


图1 虎杖外植体及其愈伤组织的白藜芦醇含量(鲜重)
Fig.1 Resveratrol content of explants and their callus from stem axis and young leaves

3 结 语

虎杖叶片、茎段和茎尖的最适合不分化愈伤组织的诱导和继代培养基为:MS+2,4-D 4.0 mg/L+6-BA 2.0 mg/L+3%蔗糖,pH 5.8,珍珠岩作支撑物。在相同培养条件下,三种外植体形成愈伤组织的生长情况:茎尖优于幼叶优于茎段。由于茎段愈伤组织的质地比较致密,单株茎尖的数量少,在实验室内不能满足制备大量愈伤组织的需求等缘故,因此,选择幼叶作为培养虎杖松散型愈伤组织的外植体是切实可行的。

参考文献:

[1] 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.

[2] 刘树兴,程丽英. 虎杖有效成分的开发现状及展望[J]. 食品科技,2005,2(2):96-98.

[3] Meishiang J,Lining C,Udeani G O,et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derive from grapes[J]. Science,1997,275(1):218-220.

[4] Hisashi Matsuda,Hiroshi Shimoda,Toshio Morikawa,et al. Phytoestrogens from the roots of *Polygonum cuspidatum* (polygonaceae):structure-requirement of hydroxyanthraquinones for estrogenic activity[J]. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters,2001,11(4):1839-1842.

[5] Cheol S P,Yonng C L,Jong D K,et al. Inhibitory effects of *Polygonum cuspidatum* water extract(PCWE)and its component resveratrol on acyl-coenzyme A-cholesterol acyltransferase activity for cholesteryl ester synthesis in HepG2 cells[J]. Vascular Pharmacology,2004,40(6):279-284.

[6] 冯雷. 虎杖研究新进展[J]. 医药论坛杂志,2003,24(9):78-79.

[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):271-275.

[8] 杨培君,李会宁,赵桦. 虎杖的组织培养与快速繁殖[J]. 西北植物学报,2003,23(12):2192-2195.

[9] 文涛,梁莉,曾杨,等. 不同光照强度对虎杖愈伤组织的影响[J]. 中国中药杂志,2007,32(13):1277-1280.

[10] 欧菊泉,陈冒香,丁利华,等. 虎杖愈伤组织的诱导及其白藜芦醇形成初探[J]. 中南林学院学报,2006,26(3):24-27.

[11] 易霁琴,童方平,宋庆安. 虎杖组织培养技术研究[J]. 湖南林业研究,2007,34(1):10-12.

[12] 江曙,朱蓉蓉,张芳,等. 虎杖中白藜芦醇提取方法及工艺优化[J]. 南京中医药大学学报,2006,22(3):197-199.