

- [1] Liu G J. *Ephedra* (麻黄) [M]. Beijing: Chinese Traditional Medicine Publishing House, 2001.
- [2] Zhong L. Determination and analysis on fighting a drought of *Ephedra przewalskii* [J]. *Qinghai Oprataculture* (青海草业), 2000 (1): 20-21.
- [3] Department of Biology in Nankai University. *Basic Microbiology* (基础微生物学) [M]. Tianjin: Tianjin Educational Publishing House, 1975.
- [4] Meng S D. Function of phytohormone from rhizosphere soil microorganisms on wheat growth [J]. *Plant Physiol* (植物生理学通讯), 1998 (6): 427.
- [5] Al-Achi B. J et al. Competitive colonization between *Pseudomonas* species in sterile soil [J]. *Curr microbiology*, 1991, 23: 97-104.
- [6] Nanjing Institute of Pedology. *Method of Study about Soil Microbiology* (土壤微生物研究法) [M]. Beijing: Science Press, 1985.
- [7] Liu L S. Study on characteristic of *Gentiana macrophylla* seed germination [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(3): 268.
- [8] Bashan Y. Enhanced growth of wheat and soybean plants inoculated with *Azospirillum brasilense* is not necessarily due to general enhancement of mineral uptake [J]. *Appl Environ Microbio*, 1990: 769-775.

新疆紫草无性繁殖体系的建立

计巧灵*

(新疆大学生命科学与技术学院, 新疆 乌鲁木齐 830046)

摘要: 目的 为了促进新疆紫草大面积人工栽培, 缓解自然资源匮乏的现状, 通过组织培养技术建立了新疆紫草的无性繁殖体系。方法 诱导新疆紫草多种外植体脱分化均已成功, 胚状体扩增后萌发出大量的试管苗; 愈伤组织扩增后诱导出大量的不定芽, 不定芽经诱导生根后, 得大量的试管苗, 试管苗土栽成活。结果 外植体脱分化期间, 2, 4-D 不可缺少, KT 的作用优于 BA; 嫩芽切段脱分化最快, 愈伤组织质量最好; 降低 2, 4-D 浓度有利于愈伤组织扩增和再分化; 一定浓度 KT 或 BA 都可诱导出不定芽, 前者还有利于球形胚的形成; 球形胚培养初期, 培养基中加入适量激素能使球形胚大量增殖, 并很快发育; 适当的昼夜温差(10 ~ 28 °C)和自然光照有利于壮苗的形成和移栽成活。在移栽的 236 株试管苗中, 31 株土培成活, 成活率达 13. 2%。结论 通过组织培养方法建立的新疆紫草无性繁殖体系稳定、可用。

关键词: 新疆紫草; 组织培养; 再生植株; 无性繁殖系

中图分类号: R 282. 21

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2003)11-1041-04

Establishment of asexual multiplication system of *Arnebia euchroma*

Ji Qiao-ling

(Institute of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumuqi 830046, China)

Abstract: **Object** In order to promote the artificial cultivation of *Arnebia euchroma* (Royle) Johnston, and save the wild herb from relieving the lack of resources, the asexual multiplication system of *A. euchroma* was established by tissue culture technique. **Methods** Dedifferentiation in many kinds of explants of *A. euchroma* by inducement succeeded. After the embryos were multiplied, there were a lot of germinated transplants in media. After callus were multiplied, many adventitious buds had formed in the media, then they were rooting; the transplants formed by inducement and the plants survived after being cultured in soil. **Results** During the dedifferentiation, 2, 4-D was essential, the effect of KT was better than BA. The shoot sections were dedifferentiated in the most rapid way among the explants. The callus from them were in very good quality. It is of benefit to the callus multiplication and redifferentiation after reducing the concentration of 2, 4-D. Both KT and BA can induce adventitious buds, KT was also suitable for the formation of globular-shaped embryos. In initial period of sphere embryos culture, it was necessary to add the plant growth regulators in media for multiplying sphere embryos and promoting their development.

* 收稿日期: 2003-01-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(38960025)

作者简介: 计巧灵(1956-), 女, 新疆乌什县人, 副教授, 理学学士, 1982年毕业于新疆大学生物系, 至今一直在新疆大学生命科学与技术学院任教, 主要从事细胞生物学、细胞工程、电镜技术方面的教学与科研工作; 1993年主持完成了国家自然科学基金项目: 新疆紫草组织和细胞培养及其有效成分提取(项目号 38960025), 后主要参加完成了多项有关药用植物快繁、移植、有效成分分离提取等科研项目。 Tel: (0991) 8581529 E-mail: wangji@xj.cninfo.net

Proper temperature difference between day and night (10 —28) and natural light were helpful for the formation of strong sprouts and survival of transplants. The survival rate was 13.2% with 31 plantlets survived among 236 transplants cultured in soil. **Conclusion** The asexual multiplication system of *A. euchroma* established through tissue culture is stable and available.

Key words: *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst.; tissue culture; regenerated plantlet; asexual multiplication system

紫草根中的萘醌类混合物(紫草素)不仅具有抗菌消炎、解毒透疹、治疗烧伤的作用,而且具有抗肿瘤细胞的作用^[1~3]。中药紫草中以新疆紫草质量较好^[1, 4, 5]。它主要分布于新疆境内。但近十几年来,随着紫草市价的升高,掠夺式的乱挖滥采屡禁不止,不仅严重地破坏了自然植被,而且使新疆紫草资源日益匮乏。20 世纪 80 年代日本开始利用细胞悬浮培养技术生产紫草素。20 世纪 90 年代以来,国内学者对此也进行了大量的研究,如以氯化铜^[6]、表面活性剂聚山梨酯 20、多糖、 γ -射线^[7]、油菜素内酯^[8]、真菌诱导物等处理,可以提高新疆紫草或滇紫草悬浮培养细胞中紫草素含量,用紫草细胞固定化培养法建立了基质消耗与紫草素合成量的动力学模型^[9],用豆蔻酸甲酯、正十六烷离析^[10]、树脂 XAD-2、R-A^[11]、聚氨酯泡沫吸附等方法可提高紫草素的提取率等,工业发酵生产紫草素的技术日趋成熟,但生产成本偏高。

新疆有很多高海拔的砾石山地都适宜于新疆紫草的生长,但近年人为掠夺式地挖掘,资源日渐枯竭,加之新疆紫草以种子繁殖,生长五年才开花、结果,自然繁殖缓慢,给人工种子繁殖新疆紫草带来了较大的困难。另外,以种子繁殖生产周期长,采用常规育种方式进行品种改良周期很长。而利用组培无性快繁技术不仅能提供大量的栽培苗,缩短栽培周期,还能进行周期较短的品种改良。为了充分利用新疆较大面积的、未被利用的高海拔山地优越的光、温等自然条件,人工大面积种植新疆紫草,合理而持续地利用自然资源,使环境改善与经济效益同步发展,建立新疆紫草无性快繁体系就显得很有必要,而且很有现实意义。本实验在以前工作基础上^[12, 13]就新疆紫草无性繁殖系的建立进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料:实验用植物采自新疆伊犁地区海拔 2 300 m 左右的高山砾石坡,经新疆大学赵建成教授鉴定为新疆紫草 *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst.。

1.2 组织培养方法:组织和细胞培养时,取自然生

长的新疆紫草的白色嫩芽和幼叶(叶长 0.5 cm),无菌水洗数次后,转入 0.1% 升汞溶液(加入聚山梨酯 80 2 滴)中灭菌 5 min,再以无菌水反复洗涤,切除原伤口后,接种到不同的诱导培养基上,诱导其脱分化。另取新疆紫草种子去壳,经 5% 次氯酸钠灭菌处理 2 min,以无菌水洗涤数次后,接种在 1/2 MS(无激素)培养基上,27 ℃ 下培养 6~7 d,待种胚萌发长高近 1 cm 时,切下子叶和胚轴段,接种到不同的诱导培养基上,诱导其脱分化。另取部分子叶块直接接种到再分化培养基上,诱导其分化不定芽。

愈伤组织经 4 个月继代扩增后大部分转入再分化固体培养基上,诱导其再分化,结合石蜡切片和形态观察检查再分化情况。少部分松散愈伤组织经过悬浮,过 100 目筛后,取滤过液的沉淀,进行细胞悬浮培养,诱导其胚性化,并定期取样在倒置显微镜下观察,了解细胞的分裂、分化情况。分化出的芽生长到一定高度时切离,经扶壮,芽高 3 cm 以上时诱导生根,形成试管苗。经悬浮培养形成的球形胚转入固体培养基,使其发育为各期胚状体,进而发育成苗。试管苗经炼苗、移栽,土培成活。

诱导新疆紫草外植体脱分化的培养基列于表 1 中,每种激素组合重复 4~5 次;再分化培养基见表 2,每种不同的培养基重复 4 次;芽扶壮以 LS 为基本培养基,附加 NAA 0.3 mg/L+ BA 0.4, 0.6 mg/L;生根培养基为 LS+ IBA 2.0 mg/L+ 活性碳 200 mg/L。固体培养基均以 0.7% 琼脂固化,含 3% 蔗糖(生根培养基减半),pH 5.8~6.0,置于 22 ℃~28

℃ 下培养(芽扶壮和诱导不定芽生根阶段,部分芽放在昼夜温差 10 ℃~28 ℃ 下培养),脱分化、再分化诱导初期均在暗处进行,其余过程在光照下进行,培养架上的光照度为 1 500~2 000 lx,光照 14 h/d。细胞悬浮培养用 MSB+ IAA 0.6 mg/L+ KT 1.0 mg/L,其中或加入 Gln 100 mg/L 或 Phe 100 mg/L 或 0.1% 琼脂,置 THZ—03 型恒温振荡器上(27 ℃, 80 r/min),黑暗中培养,每隔 5 d 换液一次。

1.3 显微制片法:石蜡切片时,用纳瓦兴固定液固定材料,按常规脱水、包埋、制片,切片厚 5 μ m,以

番红-固绿对染,用 BH 型 Olympus 摄影显微镜观察并拍照。

表 1 诱导新疆紫草外植体脱分化的培养基

Table 1 Culture media induced didifferentiation for explants of <i>A. euchroma</i>				
培养基编号	NAA	2,4-D	BA	KT
	$/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	$/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	$/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	$/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$
1	0.4	0.2	0.2	
2	0.4	0.2	0.4	
3	0.4	0.2	0.6	
4	0.4	0.2	0.8	
5	0.4	0.2	1.0	
6	0.4	0.2		0.5
7	0.4	0.2		1.0
8	0.4	0.2		1.5
9	0.4	0.2		2.0

以上均以 MSB 为基本培养基

All above are with MSB as basic culture media

表 2 诱导新疆紫草愈伤组织再分化的培养基

Table 2 Culture media induced callus redifferentiation of <i>A. euchroma</i>			
培养基编号	NAA	BA	KT
	$/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	$/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	$/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$
10	0.4	1.0	
11	0.4	1.2	
12	0.4		1.5
13	0.4		2.0
14	0.4		2.5
15	0.4	1.0	
16	0.4	1.2	
17	0.4		1.5
18	0.4		2.0
19	0.4		2.5
20	0.4	1.0	
21	0.4	1.2	
22	0.4		1.5
23	0.4		2.0
24	0.4		2.5

10~14 号、15~19 号、20~24 号分别以 MSB, MS, LS 为基本培养基

No. 10- 14, 15- 19 and 20- 24 with MSB, MS, LS as basic culture media respectively

2 结果与分析

2.1 外植体的脱分化:不同来源的外植体在诱导脱分化培养基上均能产生愈伤组织,但愈伤组织产生的快慢及质地有很大差异,嫩芽切段在 7 号培养基上产生愈伤组织最快,产量高,愈伤组织乳白色、稍疏松;其次是胚轴段在 8 号培养基产生愈伤组织较

快,产量较高,愈伤组织质地、色泽较好。在含 BA 的培养基上愈伤组织生长也较快,但疏松、透明呈水浸状。在愈伤组织继代培养中如果仍用原培养基,愈伤组织生长快,但较透明、疏松,若将 2,4-D 降至 0.1 mg/L,这样经过 4~5 次继代,可得到大量高质量的愈伤组织。在继代培养过程中,有些乳白色的愈伤组织可逐渐变红(产生了紫草素),因而整块愈伤组织半边红、半边白,发红的愈伤组织扩增很慢,在转瓶时将其切除有利于乳白色愈伤组织的生长。

2.2 愈伤组织的再分化:将继代产生的愈伤组织大部分转入再分化培养基上,经 3 个月的培养,在 24 号、21 号培养基上可看到大量的不定芽产生,起初有些愈伤组织团块表面变得光滑、明亮,逐渐看到表面有许多小的瘤状突起,最后形成了芽丛。在有 KT 的培养基上有些愈伤组织逐渐产生了许多谷粒状的小颗粒堆,石蜡切片观察发现,此种小颗粒是许多胚状体。幼叶在 12 号培养基上能直接产生不定芽丛,不定芽起源于伤口处,先形成少量结构紧密的愈伤组织,然后在隆起处产生多个小瘤状突起,进而发育为不定芽。待芽丛长至 1 cm 高,芽丛中的芽一个个清晰可见时,将各芽切离,转入扶壮培养基上培养。不定芽的切离不能太早,太早会因看不清芽与芽的分界而伤及不定芽,致使部分芽呈畸形,芽数量减少或再分化时间延迟。细胞悬浮培养过程中,定期观察发现,加入 Gln 100 mg/L 或加入 0.1% 琼脂均能促进细胞分裂,加入 L-Phe 100 mg/L 对促进细胞分裂作用不明显。待产生大量的球形胚后,转入固体培养基上培养,球形胚在固体培养基上培养初期,培养基中仍需加入适量激素,我们采用 MSB+ KT 0.5 mg/L+ IAA 0.3 mg/L 培养基,能使球形胚大量增殖,并很快发育为各期胚状体。新疆紫草胚状体形态与合子胚相似,经历球形、心形、鱼雷形、子叶形各时期。

2.3 不定芽扶壮、生根及试管苗移栽:切离后的不定芽在扶壮过程中,用 BA 0.6 mg/L 较合适,但温度和光照是两个很重要的因素。在恒温、恒定光照强度的培养架上,芽的生长较快,但叶片窄长、新绿色,显示出体质较弱。若将接有切离芽的培养瓶放在玻璃温室中培养,情况就好得多,温室温度昼夜在 10~28℃ 波动,自然光照强度比培养架上强很多,在这种条件下,芽的生长虽然稍慢,但长出的叶片比较宽、厚,呈浓绿色,显示出个体的强壮,玻璃温室中这种光、温条件与新疆紫草自然生长环境中的光、温条件较接近,以这种方式扶壮的芽有较强的生命力。扶壮后的芽长高至 3 cm 以上时就可以诱导生根,在

诱导生根过程中, 来自培养架上扶壮的芽生根慢, 而在玻璃温室扶壮的芽生根快, 苗健壮。待试管苗根粗达 2 mm 以上时, 经 5 d 的敞口炼苗后, 洗净根部琼脂, 移入由灭菌蛭石填充的营养杯中, 盖上薄膜一周, 揭膜后培养一个月, 移入土壤填充的花盆中栽培, 一个月后统计成活率。在移栽的 236 株试管苗中, 31 株土培成活, 成活率达 13. 2%。

3 讨论

在诱导新疆紫草多种外植体脱分化的多次探索中发现, 0. 4 mg/L NAA 加 0. 2 mg/L 2, 4-D 是个较合适的生长激素浓度, 配以 5 个 BA 的浓度梯度和 4 个 KT 的浓度梯度, 实验表明, 这几种激素浓度的配比均能诱导出愈伤组织, 嫩芽切段在 MSB+ 0. 4 mg/L NAA+ 0. 2 mg/L 2, 4-D+ 1. 0 mg/L KT 培养基上产生愈伤组织最快, 产量和质量最好。胚轴切段在 1. 5 mg/L KT 时(其他条件不变)也能产生较高质量的愈伤组织。

新疆紫草嫩芽、胚轴段来源的愈伤组织, 均可诱导产生大量的不定芽。但在这之前的愈伤组织扩增过程中, 激素水平须进行调整, 尤其是降低 2, 4-D 浓度, 不仅有利于愈伤组织扩增, 且对后续诱导愈伤组织的再分化也很有利。在再分化诱导过程中, 提高细胞分裂素的浓度是关键, 2. 5 mg/L KT 或 1. 0 mg/L BA 都有利于不定芽的分化, 前者还有利于球形胚的形成。3 种基本培养基使用结果表明, LS 培养基就可以满足要求, 这有利于降低组培苗的成本。从芽丛中切离不定芽, 应等到芽长至一个个分界明显时再切离较好, 以免周围的芽受损。在芽的扶壮过程中, 适度增大昼夜温差和光照强度, 虽然幼芽生长稍慢, 但容易形成壮芽, 而且对诱导生根有利, 对试管苗移栽成活也很有利。细胞悬浮培养能产生大量的球形胚。球形胚在固体培养基上培养初期需要加少量激素诱导, 才能大量扩增并继续发育, 待长成鱼雷后期胚和子叶胚时, 即使在没有激素的培养基上也可以顺利萌发形成试管苗。

试管苗移栽成活率不高的原因可能是当时移栽地的环境条件、气候条件不太适宜新疆紫草的生长发育所致。自然界光照强度、温度和海拔高度有密切的关系, 在海拔高的阳坡上光照很强, 但气温并不太高, 昼夜温差较大, 是新疆紫草生长的合适环境。还

需对新疆紫草适宜的移栽环境和气候条件进行深入的探讨。提高移栽成活率, 使这种技术尽快地运用到实际生产中去。

References:

- [1] Gao J H. Survey in the resources, chemistry, pharmacology and clinic from *Arnebia euchroma* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1986, 17(6): 28-31.
- [2] Lu G R. Test of the anticancer effect of monomer separated from shikonins [J]. *Chin J Integrated Tradit Chin West Med* (中国中西医结合杂志), 1990, 10(7): 422-425.
- [3] Fan H X, Zhu W H. Tissue culture of *Arnebia euchroma* and formation of shikonin derivatives [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1988, 23(9): 716-720.
- [4] Li Z L, Liang G Y. Quality comparison of three *Lithospermum erythrorhizon* [J]. *J Tradit Chin Med* (中药通报), 1982 (2): 9-10.
- [5] Fang D Q, Hou S S, Li X M. Progress about shikonin from cell culture in *Lithospermum erythrorhizon* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1992, 23(4): 209-212.
- [6] Ye H C, Yin Z H, Li G F, *et al.* Effects of physical and chemical factors on callus culture of *Arnebia euchroma* and formation of shikonin derivatives [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1991, 33(12): 927-931.
- [7] Zhang H, Cao R Q, Yang Y H. Influence of gamma-ray on shikonin formation in cultured cell of *Onosma paniculatum* B. F. [J]. *J Plant Resources Environ* (植物资源与环境), 1999, 8(1): 42-45.
- [8] Zhang H, Xiang Y H, Yang Y H. Exploration of brassinosteroids enhanced shikonin production from the cell of *Onosma paniculatum* B. F. [J]. *J Nanjing Univ- Nat Sci* (南京大学学报·自然科学版), 1999, 35(2): 151-155.
- [9] Yuan L H, Luo X M, Ouyang P K. Influence of immobilization conditions on production of shikonin and its derivatives [J]. *J Nanjing Univ Chem Tech* (南京化工大学学报), 1999, 21(2): 44-48.
- [10] Kim D J. Enhanced shikonin production from *Lithospermum erythrorhizon* by in site extraction and calcium alginate immobilization [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1990, 36: 460-464.
- [11] Shimomura K. Shikonin production and secretion by hairy root cultures of *Lithospermum erythrorhizon* [J]. *Plant Cell Report*, 1991, 10: 282-286.
- [12] Ji Q L, Gou P, Wang W G. Study on the callus induced from segments of *Arnebia euchroma* (Royle) Johnson [J]. *J Xinjiang Univ-Nat Sci* (新疆大学学报·自然科学版), 1992, 9(4): 96-100.
- [13] Ji Q L, Wang W G, Li R J, *et al.* Explant tissue culture and plantlet regeneration of *Arnebia euchroma* [J]. *J Xinjiang Univ- Nat Sci* (新疆大学学报·自然科学版), 1993, 10(3): 91-94.