

- ranunculaceous medicinal plants in China [J]. *Acta Pham Sin* (药学报), 1965, 12(3): 193-195.
- [2] Wang T Z, Fang X P, Zhang H, et al. Studies on the medicinal plants of *Rhizoma Coptidis* [J]. *Bull Chin Mater Med* (中药通报), 1988, 13(1): 7.
- [3] *Ch P* (中国药典) [S]. Vol 1. 2000.
- [4] Long C L, Li H, Dao Z L, et al. Ethnobotanical studies in Gaoligong Mountains: I. The Lemo People [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 1999, 11 (Suppl): 131-136.
- [5] Long C L, Li H, Zhou Y L, et al. Ethnobotanical studies in Gaoligong Mountains: II. The Dulong ethnic group [J]. *Acta Bot Yunnanica* (云南植物研究), 1999, 11 (Suppl): 137-144.
- [6] Fu L G. *Rare, Precious and Endangered Plants in China* (中国珍稀濒危植物) [M]. Shanghai: Shanghai Education Publishing House, 1989.
- [7] Fu L G. *China Plant Red Book—Rare and Endangered Plant Species* (中国植物红皮书·珍稀濒危物种) [M]. Vol 1. Beijing: Science Press, 1992.
- [8] Song C S, Xu R Z, Zhang Q H. *China Rare and Endangered Protected Plants* (中国珍稀濒危保护植物) [M]. Beijing: China Forestry Publishing House, 1989.
- [9] Department of Nature Reservation. State Environmental Protection Agency (SEPA). *China Plant Red Book* (中国植物红皮书) [M]. Beijing: China Environmental Science Press, 1990.
- [10] Yu Y F. National plant list for priory conservation, the milestone of plant conservation in China [J]. *Plants* (植物杂志), 1995, 5(151): 3.
- [11] Delectis Florae Reipublicae Popularis Sinicae, Agendae Academiae Sinicae Edita. *Flora Reipublicae Popularis Sinicae* (中国植物志) [M]. Tomus 27. Beijing: Science Press, 1979.
- [12] Wu Z Y. *Index Florae Yunnanensis* (云南植物索引) [M]. Tomus 1. Kunming: The People's Publishing House, 1984.
- [13] Wang W C. *Vascular Plants of the Hengduan Mountains* (横断山区维管植物) [M]. Vol 1. Beijing: Science Press, 1993.
- [14] Editorial Board of China Herbal, State Administration of Traditional Chinese Medicine, China. *China Herbal* (中华本草) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1999.
- [15] Wu Z Y. *Flora Yunnanica* (云南植物志) [M]. Tomus 11. Beijing: Science Press, 2000.
- [16] Li H, Guo H J, Dao Z L. *Flora of Gaoligong Mountains* (高黎贡山区植物志) [M]. Beijing: Science Press, 2000.
- [17] Xue J R. *Gaoligong Mountains Nature Reserve* (高黎贡山区自然保护) [M]. Beijing: China Forestry Publishing House, 1995.
- [18] Xu Z H. *Nujiang Nature Reserve* (怒江自然保护) [M]. Kunming: Yunnan Art Publishing House, 1998.
- [19] Ma Y X. *The Integrated Study on Dulong River and Dulong People* (独龙江与独龙人的综合研究) [M]. Kunming: Yunnan Science and Technology Press, 1996.
- [20] Pandit M K, Babu C R. The cytology and taxonomy of *Coptis teeta* Wall (Ranunculaceae) [J]. *Bot J Linnean Society*, 1993, 111: 371-378.
- [21] Pandit M K, Babu C R. Biology and conservation of *Coptis teeta* Wall.—an endemic and endangered medicinal herb of eastern Himalaya [J]. *Environ Conserva*, 1998, 25(3): 262-272.
- [22] Li H. *Flora of Dulongjiang Region* (独龙江地区植物志) [M]. Kunming: Yunnan Science and Technology Press, 1993.

总序香茶菜的组织培养与快繁研究

丁 兰^{1,2}, 吕军旺², 汪汉卿^{1*}

(1. 中国科学院兰州化学物理研究所 O S S O 国家重点实验室, 甘肃 兰州 730000;

2. 西北师范大学生命科学学院, 甘肃 兰州 730070)

摘要:目的 对总序香茶菜进行组织培养和离体快速繁殖。方法 以总序香茶菜带芽茎段为外植体, 在附加有不同种类和不同浓度激素的MS培养基上进行培养。结果 最佳芽诱导培养基: MS+BA 0.05~0.5 mg/L+NAA 0.01~0.05 mg/L; 最佳芽增殖培养基: MS+BA 0.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L (或 IAA 0.01 mg/L); 最佳生根培养基: MS+NAA 0.1 mg/L+活性炭 0.05%; 最佳愈伤组织诱导与生长培养基为: MS+2,4-D 1.0~2.0 mg/L+BA 0.1~0.2 mg/L。结论 成功建立了快速无性繁殖系。

关键词: 总序香茶菜; 组织培养; 快速无性繁殖系; 愈伤组织

中图分类号: R282.21

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)01-0115-03

Tissue culture and rapid propagation of *Rabdosia racemosa*

D N G L an^{1,2}, L U Jun-wang², W A N G Han-qing¹

(1. O S S O State Key Laboratory, Lanzhou Institute of Chemophysics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000,

China; 2. College of Life Science, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China)

Key words: *Rabdosia racemosa* (Hemsl.); tissue culture; rapid propagation; callus

香茶菜属 [*Rabdosia* (Bl.) Hassk.] 植物是我国 民间广泛使用的草药, 供药用的约有 30 余种。具有

* 收稿日期: 2004-03-07

作者简介: 丁 兰(1964—), 女, 四川德阳人, 副教授, 博士, 研究方向为天然药物化学及细胞工程。

清热解毒、活血破瘀、抗菌消炎、抗肿瘤和治疗各种肝炎等功效。分离得到的相当数量的二萜化合物具有抗肿瘤、抗菌、抑制线粒体的氧化磷酸化作用、昆虫拒食活性、植物生长调节剂活性等,而且抗菌、抗肿瘤等作用的机制研究已取得了明显的阶段性成果^[1,2]。冬凌草、毛叶香茶菜和溪黄草目前已开发成药,作为抗菌消炎、抗癌药物在临床上广泛应用^[1]。

随着人们对该属植物及其生物活性的不断深入认识,对其开发和应用也会越来越广泛。由于自然资源量极为有限,大量采集对生态环境会造成极大的破坏,利用现代生物技术解决其资源问题势在必行。有关香茶菜属植物的组织培养已有一些研究报道^[3,4]。

总序香茶菜 *Rabdosa racemosa* (Hem sl.) Hara 在甘肃省有较为丰富的自然资源,笔者对其化学成分进行了提取分离及结构鉴定,部分化合物还具有较好的抗肿瘤活性(将另文报道),显示了良好的开发前景。对甘肃产总序香茶菜进行了离体培养,为其大规模栽培提供可靠的理论依据及技术路线。

1 材料和方法

1.1 植物材料:总序香茶菜 2000 年 8 月中旬采自甘肃省兰州市郊,由西北师范大学生命科学学院孙坤博士鉴定为 *R. racemosa* (Hem sl.) Hara, 标本现存于西北师范大学植物标本室。

1.2 组织培养:取总序香茶菜的带芽茎段、幼叶、叶柄,流水冲洗 10~12 h,然后用 0.1% 升汞溶液(滴加 1~2 滴聚山梨酯)消毒 7~8 min,用无菌水冲洗 5~6 次。超净台上将叶片切成 0.5 cm × 0.5 cm 小块,叶柄和带芽茎段切成 0.8 cm 左右的小节,进行接种。将带芽茎段的形态学上部向上插于培养基上。

1.3 愈伤组织成分分析:收集愈伤组织,自然干燥后用甲醇浸泡 3 次,浓缩浸泡液,备用。以原植物提取的单体化合物为标样,进行薄层色谱,用 5% 的乙醇硫酸液显色。

1.4 培养条件:培养基:MS 基本培养基,附加不同浓度的激素;蔗糖浓度:3.0%;pH 值 5.8;琼脂:0.8%~0.9%;光照强度:1 000 lx;光照时间:12 h/d;培养温度:(22 ± 2)。

2 结果和讨论

2.1 激素对芽诱导的影响:将带芽茎段接种于表 1 所列培养基中,7 d 后外植体开始膨大,15 d 后侧芽长出,28 d 后统计试验结果。从表 1 可以看出,MS 培养基附加适宜浓度的 BA 和 NAA (或 IAA、2,4-D) 均能诱导芽的产生。当 BA 质量浓度在 0.05~0.5 mg/L, NAA (或 IAA) 质量浓度在 0.01~0.05

mg/L, 且细胞分裂素浓度高于生长素浓度时,均有较好的诱导率,可达到 50%~100%,如 3、4、5、8、9 号培养基,尤其是 4 号培养基为最好,诱导率可达到 100%;当 BA 超过 1.0 mg/L, 或 NAA 超过 0.5 mg/L 时,芽的诱导受到抑制,当 BA 达到 2.0 mg/L, 或 NAA 达到 1.0 mg/L 时,外植体仅有愈伤组织产生,但没有芽的形成;较低浓度的 BA 与较低浓度的 NAA (或 IAA) 的激素配比,诱导单芽(图 1-A)形成(如 1、3、4、8 号培养基);较高浓度的 BA 与较低浓度的 NAA (或 IAA) 的激素配比,诱导丛芽(图 1-B)产生(5、6、9 号培养基)。同时还观察到,在 BA 浓度相同条件下, NAA 的诱导活性好于 IAA。另外,2,4-D 的使用不利于芽的诱导,会导致大量愈伤组织(图 1-C)的产生。

表 1 激素对出芽的影响

Table 1 Effect of hormone on inducing lateral buds

培养基 编号	调节因子/(mg · L ⁻¹) BA	NAA	IAA	2,4-D	外植体 数/个	芽诱导 率/%	愈伤组织 诱导率/%	芽生长 状况
1	0.01	0.5	-	-	12	25	8	单芽
2	0.1	1.0	-	-	12	0	17	-
3	0.05	0.01	-	-	12	83	0	单芽
4	0.2	0.02	-	-	12	100	0	单芽
5	0.5	0.05	-	-	12	92	8	丛芽
6	1.0	0.05	-	-	12	33	25	丛芽
7	2.0	0.2	-	-	12	0	42	-
8	0.1	-	0.01	-	12	67	0	单芽
9	0.5	-	0.05	-	12	50	0	丛芽
10	0.1	-	-	0.1	12	25	75	单芽
11	0.1	-	-	1.0	12	0	82	-
12	0.2	-	-	2.0	12	0	92	-



A-单芽 B-丛芽 C-愈伤组织
A-single shoots B-clustered shoots C-calli

A-单芽 B-丛芽 C-愈伤组织

A-single shoots B-clustered shoots C-calli

图 1 试管苗和愈伤组织生长的观察

Fig. 1 Observation of growth of shoots and calli

2.2 激素对芽增殖的影响:待初代培养的无菌苗长到 3~4 cm 时,将其切段成 0.8~1.0 cm 的带芽茎段,用微型扦插法接种于表 2 所列培养基中,4 周后统计结果。从表 2 中可以看出,BA 在 0.05~0.2 mg/L,同时 NAA (或 IAA) 在 0.01~0.02 mg/L 时,带芽茎段的侧芽萌发,基部生根,形成单个完整植株。重复上述操作(对单个植株切割后再进行扦插),可保持 3~4 倍的增殖率。此法可一次成苗,简化了培养程序,降低了培养的成本,但如表中所示,此种方法培育的苗生长较弱,需经过壮苗培养后方

表 2 激素对芽增殖的影响

Table 2 Effect of hormone on proliferation of lateral buds

培养基 编号	激素组合/(mg·L ⁻¹)			芽平均 数/个	苗生长 状况	生根率 /%
	BA	NAA	IAA			
1	0.05	0.01	-	0	单芽,弱	100
2	0.1	-	0.01	0	单芽,弱	100
3	0.2	0.02	-	0	单芽,弱	100
4	0.5	-	0.01	5.3	丛芽,壮	62
5	0.5	0.05	-	6.0	丛芽,壮	90
6	1.0	0.1	-	3.5	丛芽,壮	50
7	2.0	0.2	-	2.0	丛芽,弱	13

可进行移栽。

当 BA 质量浓度在 0.5~1.0 mg/L, NAA (或 IAA) 质量浓度在 0.01~0.1 mg/L 时, 带芽茎段从侧芽处产生丛芽, 芽生长速度快, 芽的增殖较好, 平均每个带芽茎段可产芽 3.5~6.0 个。当 BA 质量浓度 1.0 mg/L 时, 芽的增殖受到抑制, 生根率降低, 同时茎段基部还产生大量愈伤组织。因而, 4 号和 5 号培养基是较好的芽增殖培养基, 尤其是 5 号培养基, 既能保持较好的增殖率又有较好的生根率。

2.3 生根及壮苗培养: 将增殖培养中的丛芽切成单芽, 接种于生根培养基中 (MS+NAA 0.1 mg/L+活性炭 0.05%) 生根率达 100%, 苗生长健壮, 2 周后可移栽。

2.4 愈伤组织培养: 愈伤组织的优化培养是药用植物细胞悬浮培养及其次生代谢物质生产和研究的基础。本实验选取了香茶菜的叶、叶柄、茎段为外植体, 分别接种于表 1 所列培养基中, 其结果证明, 茎段是产生愈伤组织的最佳外植体, 诱导率可达 92%; 叶柄的诱导率最高只有 10%, 幼叶的诱导率为 0。

2.4.1 激素对茎段形成愈伤组织的影响: 从表 1 可以看出, 高浓度细胞分裂素和高浓度生长素均能诱导愈伤组织形成, 如: 2、6、7、10、11、12 号培养基。其中 2、4-D 对愈伤组织诱导最有效, 诱导率可达 75%~92%。因此, 11、12 号培养基是较好的愈伤组织诱导培养基。

2.4.2 激素对愈伤组织生长的影响: 4 周后, 将愈伤组织转入与其初代相同的新鲜培养基中 (表 1 中 2、6、7、10、11、12 号培养基) 进行培养, 如此反复转接 4 代后, 统计实验结果。结果表明, 在附加有 NAA 的培养基中的愈伤组织生长缓慢, 质地致密; 在附加有 2、4-D 的培养基中的愈伤组织生长较快, 质地疏松, 是较好的单细胞悬浮培养的材料。观察结果表明, 11 号、12 号培养基是较好的愈伤组织生长培养

基。上述培养基中的愈伤组织长时间不继代, 愈伤组织会分化出大量的根, 因此, 应保持 4 周继代 1 次。

2.5 愈伤组织化学成分的初步分析: 收集附加有 2、4-D 的培养基上的愈伤组织, 自然干燥后用甲醇浸泡 3 次, 浓缩浸泡液, 备用。以原植物提取的三萜化合物齐墩果酸、二羟基熊果酸、三羟基熊果酸等以及二萜化合物为标样, 进行薄层色谱, 5% 的乙醇浓硫酸显色, 对愈伤组织中化合物进行检测。结果表明, 愈伤组织中的次生代谢物质较少, 检出熊果酸和 w angzaozin A 的存在。熊果酸和 w angzaozin A 在硅胶薄层板上显紫红色。

3 结论

迄今为止, 已对 70 多种香茶菜属植物的化学成分进行了研究, 有近 500 种二萜化合物从中分离得到, 研究表明其中的大多数二萜化合物具有良好的抗炎和抗肿瘤活性, 此属植物具有良好的新药开发前景。冬凌草等种类已开发上市, 因此, 香茶菜属植物离体快繁的研究对此属植物实现试管苗的工厂化生产以及进一步的资源开发利用具有重要意义。

本实验以总序香茶菜的带侧芽茎段为外植体, 成功建立了其快速无性繁殖系, 对其芽的诱导、增殖、生根进行了较为深入的探讨。实现总序香茶菜的离体快繁可通过 2 种途径, 一是可以利用带侧芽茎段进行离体微型扦插; 二是利用丛芽增殖和生根培养, 以获得再生植株。两种方法各有优劣, 前者培养程序简单, 方便易行, 且培养基中激素含量低, 利于长期继代培养, 但试管苗较弱, 需壮苗后移栽; 后者增殖速度快, 但由于培养基中激素含量较高, 长期继代培养将增加植株的变异率, 不利于离体快速繁殖系植株优良性状的保持。本实验从芽诱导率、芽的增殖率、生根率以及培养程序的简单易行等技术特点, 基本已达到了试管苗工厂化生产的要求, 因而认为利用组织培养技术进行总序香茶菜的资源开发和利用是切实可行的。

References

- [1] Shun H D, Xu Y L, Jiang B. *Diterpenoids from Isodon species* (香茶菜属植物二萜化合物) [M]. Beijing: Science Press, 2001.
- [2] Chen P Y, Guo Y W, Xun M J. Investigation survey and medical prospect of *Isodon species* [J]. *Bull Tradit Chin Med* (中药通报), 1987, 12(12): 707-712.
- [3] Li J Y, Wang T X, Yang X P, et al. Studies on the induction of calli and cell culture of *Rabdosia rubescens* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31(12): 938-941.
- [4] He H, Xing J C, Xiao S E, et al. *In vitro* culture and rapid propagation of *Isodon serra* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32(3): 255-256.