

秦艽组织培养研究

齐香君, 王薇, 陈如意 (陕西科技大学生命科学与工程学院, 陕西西安 710021)

摘要 [目的] 为解决中药秦艽的种源问题。[方法] 以秦艽的幼嫩叶片为外植体, 在不同培养基上进行愈伤组织的诱导和分化以及根的诱导, 寻找秦艽愈伤组织培养和快速繁殖的最佳途径。[结果] 秦艽愈伤组织培养和快速繁殖的最佳途径为: 以秦艽幼嫩叶片为外植体, 以 MS+1.0 mg/L NAA +1.0 mg/L 6-BA 为愈伤组织的诱导培养基, 以 MS+0.3 mg/L NAA +1.0 mg/L 6-BA 为愈伤组织的分化培养基, 以 1/2 MS 为生根培养基。通过该途径, 可在较短周期内得到再生的秦艽植株。[结论] 该研究结果可用于秦艽的生物技术育种, 并能推动秦艽的人工栽培。

关键词 秦艽; 叶片; 组织培养; 再生植株

中图分类号 Q943.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)05-01812-02

Preliminary Study on Tissue Culture of *Gentiana macrophylla* Pall.

QI Xiang-jun et al (College of Life Science and Engineering, Shaanxi University of Science and Technology, Xi'an, Shaanxi 710021)

Abstract [Objective] The research aimed to solve the seed source problem of traditional Chinese medicine *Gentiana macrophylla* Pall. [Method] With the tender leaves of *G. macrophylla* as explants, the callus induction and differentiation, and the root induction were conducted on different medium to seek the optimum approach for the tissue culture and rapid propagation of *G. macrophylla*. [Result] The optimum approaches for the tissue culture and rapid propagation of *G. macrophylla* were as follows: taking the tender leaves of *G. macrophylla* as explants, taking MS + 1.0 mg/L NAA + 1.0 mg/L 6-BA as the induction medium of callus, taking MS + 0.3 mg/L NAA + 1.0 mg/L 6-BA as the differentiation medium of callus and taking 1/2 MS as the rooting medium. Through this approach, the regenerated plants could be gained in a shorter period. [Conclusion] The research results could be applied in the biotechnology breeding of *G. macrophylla* and promote the artificial cultivation of *G. macrophylla*.

Key words *Gentiana macrophylla* Pall.; Leaves; Tissue culture; Regenerated plant

秦艽(*Gentiana macrophylla* Pall.)为龙胆科龙胆属多年生草本植物,是我国传统中药和国家重点保护的野生药材之一^[1]。秦艽以干燥根入药,其味辛、苦、平,有祛风湿、清湿热、止痹痛之功效^[2],用于保肝、健胃、利胆、消炎、治疗风湿性和类风湿性关节炎、脑脊髓膜炎等病症^[3-5],主产于陕西、甘肃、四川、内蒙古等地。近年来,由于需求量猛增,过度采挖,致使野生秦艽资源濒临濒危状态,故用生物技术对秦艽进行组织培养和快速繁殖具有现实意义。

1 材料与方法

1.1 供试材料 用于诱导愈伤组织的外植体取自陕西省凤县秦艽种植基地的秦艽幼嫩叶片。

1.2 培养条件 以 MS 为基本培养基,分别附加不同种类和浓度的激素。诱导培养基:①6-BA 0.5 mg/L(单位下同);②6-BA 1.0;③2,4-D 0.5+6-BA 0.5;④2,4-D 1.0+6-BA 0.5;⑤NAA 1.0+6-BA 0.5;⑥NAA 1.0+6-BA 1.0。分化培养基:⑦MS+NAA 0.5+6-BA 1.0;⑧MS+NAA 0.3+6-BA 1.0。生根培养基:⑨1/2MS。

以上培养基均添加 3%蔗糖、0.8%琼脂粉,pH 值为 5.8~6.0。培养温度为(25±2)℃,光照强度 2 000 lx,光照时间为 12 h/d。

1.3 无菌材料的处理 取秦艽叶片,用洗洁精水小心清洗其表面并用流水冲洗后,用洁净纱布吸干,于无菌条件下用 75%乙醇消毒 10 s,无菌水冲洗 1~2 次,再放入 0.1%升汞溶液中浸泡 6 min,无菌水冲洗 4 次。把叶片切成 0.5 cm × 0.5 cm 大小的方块,分别接种于诱导培养基①~⑥上。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的诱导 接种到培养基③~⑥号上的叶片在培养 7 d 后开始膨大,边缘卷曲,15 d 后在切口及叶脉处开始形成愈伤组织;①和②号培养基上叶片膨大、卷曲,但未

见有愈伤组织生成。30 d 后,培养基③~⑥号中均形成了一定的愈伤组织,其中③和④号培养基中的愈伤组织呈黄白色,质地较为疏松,⑤和⑥号中的愈伤组织呈黄绿色,质地较为紧密,有白色毛状根发生(图 1);①和②号培养基上的叶片仍没有愈伤组织出现。培养 45 d 后,①~⑥号培养基上的愈伤组织诱导率分别为 0.0、14.07%、26.92%、40.96%、52.17%。

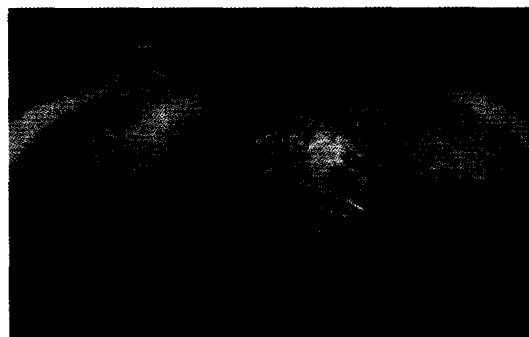


图 1 诱导出的秦艽愈伤组织

Fig. 1 Induced callus of *Gentiana macrophylla* Pall.

2.2 愈伤组织的分化 45~50 d 后,将诱导培养基④和⑥上产生的愈伤组织分别转入不同的分化培养基中进行分化培养。接种 30 d 后记录试验结果并作比较,结果表明:由诱导培养基④中产生的愈伤组织在⑦、⑧号分化培养基上的分化率分别为 11.76%、23.81%;由诱导培养基⑥中产生的愈伤组织在⑦、⑧号分化培养基上的分化率分别为 45.00%、66.67%。可见,⑧号培养基中的愈伤组织分化率明显大于⑦号;由诱导培养基⑥中产生的愈伤组织分化率明显大于诱导培养基④。

2.3 根的诱导 当小苗长至 1.5~2.5 cm 高时,在无菌条件下将健壮的丛生苗分成单株,转移至生根培养基⑨上诱导生根,30 d 后,幼苗生长健壮,基部形成一定量黄色或淡绿色的根(图 2),且根较根较长,生根率超过 90%,说明培养



图2 秦艽的再生植株

Fig. 2 Regeneration plant of *Gentiana macrophylla* Pall.

基⑨兼有生根和壮苗的作用。

3 讨论

一般来说,植物的愈伤组织诱导、分化和植株再生受外植体、激素种类和浓度及培养条件等因素制约。该研究中,秦艽愈伤组织培养和快速繁殖的合理方案应为:以秦艽幼嫩叶片为外植体,接种在 MS+NAA 1.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L 的培养基上诱导愈伤组织,在 MS+ NAA 0.3 mg/L+6-BA 1.0 mg/L 的培养基上进行分化,在 1/2 MS 培养基上诱导生根,

可以在较短时间内得到再生秦艽植株,对推动人工栽培秦艽、保护濒临灭绝的秦艽野生资源有着积极的现实意义。

参考文献

- [1] 张恩迪,郑汉臣.中国濒危野生药用动植物资源的保护[M].上海:第二军医大学出版社,2000:28.
- [2] 中华人民共和国药典委员会.中华人民共和国药典(2005 年版 1 部)[M].北京:化学工业出版社,2005:191.
- [3] 李艳秋,赵德化,潘伯荣,等.龙胆苦甙抗鼠肝损伤的作用[J].第四军医大学学报,2001,22(18):1645-1649.
- [4] 刘占文,陈长勋,金若敏,等.龙胆苦甙的保肝作用研究[J].中草药,2002,33(1):47-50.
- [5] ROJAS A,BAH M,ROJAS J L,et al.Smooth muscle relaxing activity of gentiopicroside isolated from *Gentiana spathacea*[J].Planta Me,2000,66(8):765-767.
- [6] TAN R X,WOLFENDER J L,ZHANG L X,et al.Acyl secoiridoids and atifungal constituents from *Gentiana macrophylla*[J].Phytochemistry,1996,42(5):1305-1313.
- [7] HASE K,LI J,BASNET P,et al.Hepatoprotective principles of *Suertia japonica* Makino on D-galactosamine/Lipopolysaccharide-induced liver injury in mice[J].Chem Pharm Bull,1997,45(11):1823-1827.
- [8] 王英,楼之岑.中药秦艽的研究概述[J].药学通报,1987,22(3):153.

(上接第 1782 页)

- reduction and biomass recovery under stress conditions in cotton[J]. Indian J Agri Sci,1990,60(11):739-741.
- [2] 李玲,余光辉.水分胁迫下植物脯氨酸累积的分子机理[J].华南师范大学学报:自然科学版,2003(1):126-134.
- [3] 李玉全,张海燕.作物耐盐性的分子生物学研究进展[J].山东科学,2002(2):8-14.
- [4] 郭学民,东方阳,孙耀中,等.旱作转 BADH 基因水稻茎的解剖结构特征与产量的关系[J].华北农学报,2005(3):38-41.
- [5] 梁峥,骆爱玲,赵原,等.干旱和盐胁迫诱导甜菜叶中的甜菜碱醛脱氢酶的积累[J].植物生理学报,1996(2):32-35.
- [6] 姜立智,梁宗锁.干旱胁迫对植物基因的诱导及基因产物的变化[J].干旱地区农业研究,2001(3):47-51.
- [7] 赵恢武,陈杨坚,胡鸞雷,等.干旱诱导性启动子驱动的海藻糖-6-磷酸合酶基因载体的构建及转基因烟草的耐旱性[J].植物学报,2000(6):23-26.
- [8] 罗克明,郭余龙.棉花 *Lea* 蛋白 *D-113* 基因启动子的克隆及序列分析[J].遗传学报,2002(2):161-165.
- [9] 俞嘉宁,山仑.LEA 蛋白与植物的抗旱性[J].中国生物工程杂志,2002(2):34-37.
- [10] 陈红兵,郭继虎,王金胜,等.水分胁迫时小麦生化指标与抗旱性的关系[J].山西农业大学学报,2000(2):41-44.
- [11] 李楠,赵玉锦,赵琦,等.大麦 *HVA1* 基因和 LEA 蛋白与植物抗旱性的研究[J].生物技术通报,2006(4):36-39.
- [12] CHENG X G,HOU Y X.含有 AP2 结构域的一个陆地棉 *GhDREB* 转录因子的特性及体外表达[J].棉花学报,2002(1):23-26.
- [13] 张慧军,董合忠,石跃进,等.山菠菜胆碱单加氧酶基因对棉花的遗传转化和耐盐性表达[J].作物学报,2007(7):1073-1078.
- [14] 黄波,金龙国,刘进元,等.棉花中一个类 *DREB1/CBF* 基因(*Gh-DREB1L*)的分子克隆及其功能分析[J].中国科学,2006(5):210-216.
- [15] 陈峰,李洁.酵母单杂的原理与实例[J].生物工程进展,2001(4):57-62.
- [16] PARDINAS J R,COMEBATES N J,PROUTY S M,et al.A unified approach for isolation of cDNAs from differentially expressed genes[J].Anal Biochem,1998,257(2):161-168.
- [17] KOLTUNOW A M,TRUETTNER J,COX K H,et al.Different temporal and spatial gene expression patterns occur during anther development[J].Plant Cell,1990,2:1201-1224.
- [18] 郭宾会,高双成,景蕊莲,等.小麦苗期水分胁迫诱导差异表达 cDNA 的研究[J].生物技术通报,2003(2):6-11.
- [19] 路运才,石云素,宋燕春,等.玉米苗期水分胁迫下相关基因差异表达研究[J].玉米科学,2006(3):278-282.
- [20] VONSTEIN O D,THIES W G,HOFMANN M.A high throughput screening for rarely transcribed differentially expressed genes[J].Nucleic Acids Research,1997,25(13):2598-2602.
- [21] ALLEN S,JENNIFER L N,ANDY M,et al.Ettn patterns the *Arabidopsis* floral meristem and reproductive organs[J].Development,1997,124:4481-4491.
- [22] 李丽娟,赵奂,李艳军,等.植物中的 *DREB* 类转录因子[J].首都师范大学学报,2006(5):42-46.
- [23] SUZUKI K,YUN D J,CHEN X Y,et al.An atropa-belladonna hyoscyamine 6 beta-hydroxylase gene is differentially expressed in the root pericycle and anthers [J].Plant Mol Biol,1999 (1):141-152.
- [24] DIANE M,DOROTHEA T,JONATHAN G,et al.Methyl jasmonate induces traumatic resin ducts,terpenoid resin biosynthesis and terpenoid accumulation in developing xylem of Norway Spruce stems[J].Plant physiology,2002,129:1003-1018.
- [25] SCHAFFRATH U F E,DUDLER R.Evidence for different signaling pathways activated by inducers of acquired resistance in wheat[J].Mol Plant-Microbe Interact,1997,10:779-783.
- [26] THOMMA B P H J,EGGERMONT K,PENNINCKX I A M A,et al.Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens [J].Proc Natl Acad Sci USA,1998 (25):15107-15111.
- [27] 朱龙付,涂礼莉,张献龙,等.黄萎病菌诱导下海岛棉抗病反应的 SSH 文库构建及分析[J].遗传学报,2005,32(5):528-532.
- [28] 蔡应繁,莫剑川,曾宇,等.抑制性消减杂交法克隆棉属突变材料腺体发育相关的 cDNAs[J].北京林业大学学报,2003(3):6-10.