

药用植物半枝莲的离体快繁

瞿大枏, 陈崇顺*, 王轶, 杨燕燕, 曹伟杰

(南京师范大学生命科学学院, 江苏省生物多样性与生物技术重点实验室, 江苏南京 210046)

摘要 以茎尖为外植体进行了离体快繁研究。利用 6-BA×IBA 和 6-BA×NAA 两种激素组合诱导丛生芽, 6-BA×IBA 激素组合的最佳增殖培养基是 MS+6-BA 0.5 mg/L+IBA 0.1 mg/L, 增殖系数可达 6.5; 6-BA×NAA 激素组合的最佳增殖培养基是 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0 mg/L, 增殖系数可达 6.1; 两种组合无显著性差异。在 MS 基本培养基上即可生根且长势良好, 生根率为 100%; 诱导丛生芽试验中 6-BA 浓度不能超过 0.5 mg/L, 否则会有愈伤组织出现。

关键词 半枝莲; 离体快繁; 诱导

中图分类号 Q943.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2007)17-05065-02

Rapid Propagation *In Vitro* of *Scutellaria barbata* D. Don

QU Da-zong et al (College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing, Jiangsu 210097)

Abstract In order to protect the wild resource of *Scutellaria barbata* D. Don, its rapid propagation *in vitro* was studied using shoot-tip as explant. The results showed that the optimal mediums for the bud differentiation were MS + 6-BA 0.5 mg/L + IBA 0.1 mg/L and MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0 mg/L. Multiplication coefficients of the two were 6.5 and 6.1, respectively but there was no significant difference between them. MS medium was the optimal medium for root formation and the rooting rate was 100%. Concentrations of 6-BA should be lower than 0.5 mg/L in order to avoid callus formation during shoot induction.

Key words *Scutellaria barbata* D. Don; Rapid propagation *in vitro*; Induction

半枝莲(*Scutellaria barbata* D. Don)为唇形科黄芩属植物, 具有清热解毒、活血化瘀、消肿止痛等功效, 是近年来国内外抗肿瘤中药的研究热点, 为国家中医药管理局近年重点推荐发展的 63 种紧缺中药材之一^[1]。由于对半枝莲需求量的增大, 其野生资源也日益匮乏。目前对半枝莲的研究多集中于有效药用成分的测定和临床药理研究^[2], 而对其组织培养和育种方面的研究尚未展开。笔者对半枝莲优良植株进行离体快繁, 有利于半枝莲野生资源的保护和优良植株性状的保持。同时, 为半枝莲多倍体育种以提高有效药用成分做准备^[3]。

1 材料与方法

1.1 外植体的选取 试验种子在安徽省亳州中药材市场购得, 经南京师范大学张光富副教授鉴定。种子在花盆里发芽成苗, 20 d 后苗长 2~3 cm 时切取 1 cm 长的健壮茎尖, 自来水冲洗 40 min, 移入超净工作台。经含 2% 活性氯的 NaClO 溶液消毒 5 min, 无菌水冲洗 3~4 次, 每次 1~2 min, 最后转入 MS 基本培养基, 获得无菌小苗^[4]。无菌小苗在 MS 基本培养基[含蔗糖 30 g/L、琼脂 6 g/L, pH 值为(6.0±0.2)]生长 30 d 后苗长约 4~5 cm 时, 切取外植体。

1.2 不同激素对丛生芽诱导的影响 将长约 1 cm 的茎尖作为外植体接种至添加 6-BA(浓度梯度 0、0.1、0.5、1 mg/L)×IBA(浓度梯度 0、0.1、0.2、0.5 mg/L)和 6-BA 浓度梯度(0、0.1、0.5、1 mg/L)×NAA(浓度梯度 0、0.1、0.2、0.5 mg/L)2 种组合的 MS 培养基上诱导丛生芽。每处理样品量为 40 个外植体, 40 d 后统计增殖系数。根据外植体在培养基上的增殖系数和生长状况来确定最佳繁殖培养基^[5-6]。

1.3 不同激素对生根的影响 以诱导出的长度约为 1 cm 的丛生芽为外植体接种至添加 6-BA(浓度梯度 0、0.1 mg/L)×IBA(浓度梯度 0、0.1 mg/L)和 6-BA(浓度梯度 0、0.1 mg/L)×NAA(浓度梯度 0、0.1 mg/L)2 种组合的 MS 培养基上, 每

处理样品量为 40, 根据生根的数量和健壮程度来确定最适生根培养基。

1.4 组织物理条件 以上组织培养过程中的培养条件为: 光强(1 800±200) lx、温度(24±2) °C 和光周期 18 h/d。

1.5 试验数据的统计分析 用 SPSS 13.0 统计软件对相关试验数据进行方差分析, 并将分析结果排序。

2 结果与分析

2.1 不同激素对丛生芽诱导的影响

2.1.1 激素 6-BA×IBA 组合对丛生芽的诱导。 结果见表 1, 从第 5 组处理至第 10 组处理, 随着 6-BA 浓度的增大, 诱导的丛生芽数目增多, 但芽长逐渐变短, 芽顶端对生叶变小直至消失, 同时伴有玻璃化现象; 茎段逐渐膨大, 颜色渐变成深绿, 至 6-BA 浓度为 1 mg/L 时成绿色愈伤组织。通过 SPSS 统计分析, 第 10 组这个组合诱导的丛生芽数目最多, 增殖系数为 6.5, 除与第 9 组在 0.05 水平上无差异外, 与其他组均在 0.05 水平上有差异。同时观察表明, 该组合的芽苗长势最好。

2.1.2 激素 6-BA×NAA 组合对丛生芽的诱导。 表 2 表明, 外

表 1 不同激素(6-BA×IBA)浓度对丛生芽诱导的影响

组合序号	激素//mg/L		增殖系数	方差	显著水平
	6-BA	IBA			
1	0	0	1.7	0.21	cd
2	0	0.1	1.8	0.84	cd
3	0	0.2	1.7	3.30	cd
4	0	0.5	1.3	2.10	d
5	0.1	0	2.0	3.2	cd
6	0.1	0.1	1.7	1.40	cd
7	0.1	0.2	1.9	2.51	cd
8	0.1	0.5	1.6	1.61	cd
9	0.5	0	6.1	23.10	a
10	0.5	0.1	6.5	21.60	a
11	0.5	0.2	4.8	8.16	b
12	0.5	0.5	4.5	6.50	b
13	1.0	0	4.0	6.60	b
14	1.0	0.1	2.8	6.96	c
15	1.0	0.2	2.3	4.76	cd
16	1.0	0.5	2.4	5.89	cd

注: 同列不同小写字母表示在 0.05 水平有差异。下表同。

作者简介 瞿大枏(1980-), 男, 安徽枞阳人, 硕士研究生, 研究方向: 药用植物生物技术。* 通讯作者, 博士, 硕士生导师。

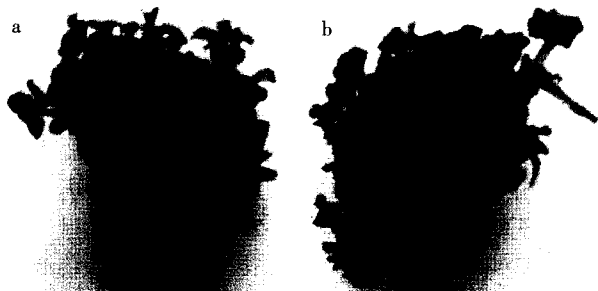
收稿日期 2007-03-08

植株的生长状况与表 1 同组的生长状况基本相似,但诱导出的丛生芽比表 1 同组的稳定,方差小。通过 SPSS 统计分析,第 9 组处理与其他组在 0.05 水平上有差异,诱导芽芽数最多,增殖系数为 6.1。

表 2 不同激素(6-BA×NAA)浓度对丛生芽诱导的影响

组合序号	激素//mg/L		增殖系数	方差	显著水平
	6-BA	NAA			
1	0	0	1.7	0.21	gh
2	0	0.1	2.0	0.45	fgh
3	0	0.2	2.3	0.96	efgh
4	0	0.5	2.6	2.59	def
5	0.1	0	2.0	0.35	fgh
6	0.1	0.1	2.8	1.11	cde
7	0.1	0.2	2.4	1.29	defg
8	0.1	0.5	2.8	4.46	cde
9	0.5	0	6.1	2.34	a
10	0.5	0.1	3.4	2.69	bc
11	0.5	0.2	3.1	4.09	cd
12	0.5	0.5	3.9	1.69	b
13	1.0	0	4.0	1.50	b
14	1.0	0.1	4.1	3.54	b
15	1.0	0.2	4.0	4.30	b
16	1.0	0.5	1.6	4.19	h

图 1 是 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0 mg/L 和 MS+6-BA 0.5 mg/L+IBA 0.1 mg/L 培养基中半枝莲丛生芽的生长状况,虽两培养基中的丛生芽数目相当,但后者长势优于前者。综合分析,选择 MS+6-BA 0.5 mg/L+IBA 0.1 mg/L 为诱导丛生芽的最适培养基,在最适培养基中的生长状况见图 2(a)。



注:a 为 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0 mg/L 中丛生芽的生长状况;b 为 MS+6-BA 0.5 mg/L+IBA 0.1 mg/L 中丛生芽的生长状况。

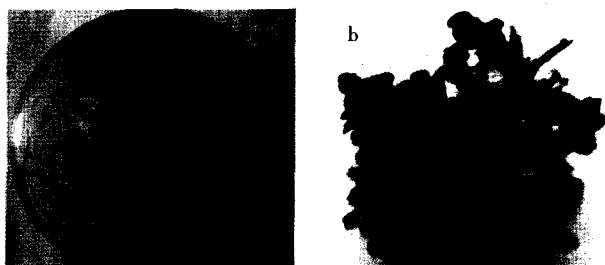
图 1 不同培养基中半枝莲丛生芽的生长状况

2.2 生根培养基的确定 表 3 表明,随着外加激素浓度的增大,根长出的天数推迟,根数减少,根变短变脆,不利移栽。笔者推测,激素对根生长的这种作用,可能是半枝莲内源激素较高,已满足根系生长正常所需,外加激素导致过量,对根生长产生了抑制。根系在 MS 基本培养基中即可长势良好,且生根率达 100%可作为半枝莲的最佳生根培养基。根的生长状况如图 2(a)所示。

表 3 不同激素处理培养基中根的生长状况

组合序号	激素//mg/L			出现天数//d	40 d 根数	40 d 根长//cm	生长状况
	6-BA	IBA	NAA				
1	0	0	0	11	8.1	3.9	细长
2	0	0.1	-	13	5.3	2.0	粗短
3	0	-	0.1	14	4.8	1.9	粗短
4	0.1	0	0	12	5.1	2.2	粗短
5	0.1	0.1	-	13	4.2	1.3	粗短
6	0.1	-	0.1	15	3.9	1.2	粗短

2.3 玻璃化现象 无论外植体为茎尖还是带腋芽的茎段,在添加了高浓度 6-BA(0.5 mg/L 以上)培养基中,诱导出的丛生芽均出现了玻璃化现象(图 3)。推测可能是激素 6-BA



注:a 为 MS 基本培养基中根的生长状况;b 为 MS+6-BA 1 mg/L+NAA 0.5 mg/L 培养基中愈伤组织的生长状况。

图 2 培养基中根和愈伤的生长状况



注:箭头所指为严重玻璃化的丛生芽。

图 3 半枝莲丛生芽的玻璃化现象

浓度过高导致。

但半枝莲玻璃化组培苗继代后长势良好,不像其他植物一旦玻璃化就无法逆转。

3 讨论

3.1 愈伤组织的出现 丛生芽诱导试验中,出现了 2 种愈伤组织。当激素 6-BA 浓度低于 0.5 mg/L,茎的切口处出现了很小的乳白色愈伤,随着 IBA 浓度的增高逐渐增大,乳白色的愈伤组织也变大,但直径最多不超过 0.4 cm。这种愈伤不能分化丛生芽,一段时间后褐化死亡;另一种愈伤是当激素 6-BA 浓度高于 0.5 mg/L 时,由外植体茎段膨大形成的绿色愈伤组织可随着丛生芽的生长而变大,与丛生芽长在一起,同时还可分化出丛生芽。其中 MS+6-BA 1 mg/L+NAA 0.5 mg/L 培养基诱导的愈伤组织最大,直径可达 2 cm。愈伤上的丛生芽长势微弱,茎段很短。图 2(b)是 40 d 后愈伤的生产状况。

3.2 以茎段为外植体诱导丛生芽 笔者还尝试对带腋芽的茎段诱导丛生芽,将茎段竖插和横放在添加 6-BA×IBA 组合的 MS 培养基上。诱导丛生芽的最佳培养基都是 MS+6-BA 0.5 mg/L,增殖系数分别是 5.7 和 4.8,均比以茎尖为外植体诱导丛生芽的增殖系数低。

参考文献

- [1] 林敬明,刘煜,罗荣城.半枝莲的化学成分及其抗肿瘤作用的研究现状[J].中药材,2006,29(4):407-410.
- [2] 艾建国,高山林.丹参同源四倍体的诱导、鉴定及有效成分的含量测定[J].药物生物技术,2003,10(6):372.
- [3] 陈世华,张霞,赵彦修,等.中华补血草的组织培养和快速繁殖体系的优化[J].安徽农业科学,2006,34(19):4885-4886.
- [4] 李翠芹,王喆之.土贝母组织培养及植株再生[J].中药材,2006,29

表 1

牙鲆与其他物种 *Mx* 基因编码氨基酸相似性的比较

%

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
1																			
2	98.7																		
3	77.9	78.1																	
4	77.4	77.8	99.2																
5	77.9	78.1	97.0	96.3															
6	77.8	77.8	96.1	95.5	96.5														
7	75.1	76.0	88.1	87.5	88.1	88.3													
8	77.6	77.8	97.8	97.1	95.7	96.5	87.6												
9	50.5	50.7	51.9	51.8	51.8	52.1	51.1	51.8											
10	50.8	51.2	52.6	52.4	52.2	52.3	52.7	52.7	80.5										
11	78.9	78.9	80.3	8.3	80.3	80.3	77.6	80.3	72.4	73.1									
12	50.6	51.2	51.6	51.4	51.9	52.4	50.8	51.3	49.7	47.9	73.7								
13	53.3	53.5	53.8	53.7	54.3	53.9	53.5	54.0	52.7	51.3	75.0	69.2							
14	53.5	53.6	54.0	53.8	54.5	54.0	53.6	54.2	52.7	51.1	75.0	69.4	99.4						
15	50.3	50.7	52.1	51.9	52.4	52.3	51.1	51.8	48.1	47.3	72.4	77.8	70.7	70.9					
16	50.6	51.2	52.9	52.7	53.0	52.7	51.4	53.7	50.8	51.4	71.1	54.4	59.7	59.8	56.3				
17	55.1	55.6	55.3	55.1	55.6	55.3	53.9	55.1	52.7	51.9	78.9	66.5	73.5	73.5	66.5	59.7			
18	50.3	50.7	51.8	51.6	51.8	51.6	50.2	51.8	50.6	50.6	73.7	54.7	58.8	58.9	56.8	74.2	59.9		

注:1 为牙鲆 *Mx*;2 为日本比目鱼 *Mx*;3、4、5 分别为大西洋鲑 *Mx1*、*Mx2*、*Mx3*;6、7、8 分别为虹鳟 *Mx1*、*Mx2*、*Mx3*;9 为斑马鱼 *MxE*;10 为鲫鱼 *Mx*;11 为河鲈;12、13、14 分别为挪威小鼠 *Mx1*、*Mx2*、*Mx3*;15、16 分别为大鼠 *Mx1*、*Mx2*;17、18 分别为人 *MxA*、*MxB*。图 3 同。

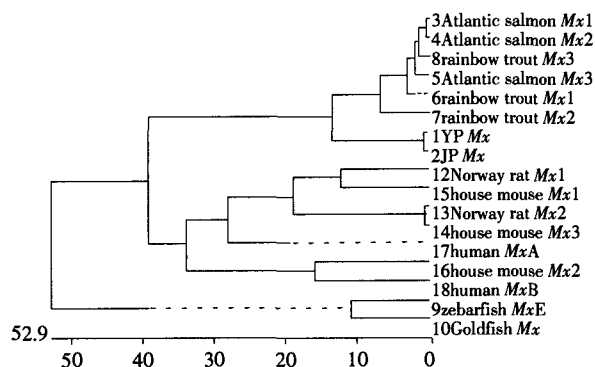


图 3 根据 *Mx* 基因核苷酸序列所得部分脊椎动物的分子进化树
为 88.3%、96.5%；大西洋鲑 *Mx1* 和大西洋鲑 *Mx* 只有 4 个氨基酸的差异, 同源性高达 99.2%, 可能是同一个位点上的 2 个等位基因; 大西洋鲑 *Mx1* 与大西洋鲑 *Mx3* 有 17 个氨基酸不同, 大西洋鲑 *Mx3* 可能代表另一个基因位点, 但是虹鳟和大西洋鲑都是四倍化的鱼类, 鱼体内存在多种 *Mx* 蛋白是否是由于它们的染色体组加倍现象, 还有待进一步的研究证明。在斑马鱼上也发现有 *Mx* 和 *MxE* 2 种类型, 但令人意外的是, 两者之间的同源性却很低, 只有 47.7%, 不可能是一对等位基因(吴海峰等, 2004)。将已知鱼类 *Mx* 蛋白氨基酸序列进行同源性比较, 发现斑马鱼 *MxE* 与鲫鱼 *Mx* 的同源性却很高, 达 80.5%。但是从表 1 可以看出牙鲆与这

2 种 *Mx* 蛋白(斑马鱼 *MxE*、鲫鱼 *Mx*) 的比较结果明显低于其他 15 种 *Mx* 蛋白, 其结果甚至还没有哺乳动物与其他鱼类 *Mx* 的同源性高。如牙鲆 *Mx* 蛋白与斑马鱼 *MxE*、鲫鱼 *Mx* 的同源性分别为 50.5%、50.8%, 而与人 *MxA*、小鼠 *Mx2*、*Mx3* 的同源性为 55.1%、53.3%、53.5%, 均略高于其与斑马鱼 *MxE*、鲫鱼 *Mx* 的同源性。那么, 是否别的鱼类也存在这种现象? Jong-Young Lee 等(2000)在河鲈白血球 cDNA 文库中用 DNA-DNA 杂交印迹只发现一种河鲈 *Mx* 蛋白; Wai Ho Yap 等(2003)也曾用 Southern 杂交及登陆鲑染色体组数据库对比查询的方法来证实红鳍东方鲀是否存在不同类型的 *Mx* 蛋白, 结果也只发现一种 *Mx* 蛋白。牙鲆的 *Mx* 蛋白是否有其他类型有待于进一步研究。

参考文献

[1] LINDENMANN J. Resistance of mice to mouse adapted Influenza A virus[J]. Virology, 1962, 16: 203-204.
 [2] 刘建欣, 郑昌学. 现代免疫学—免疫的细胞和分子基础[M]. 北京: 清华大学出版社, 2002.
 [3] STAHELI P, YU Y S, GROB R, et al. A double stranded RNA inducible fish gene homologous to the murine influenza virus resistance gene *Mx*[J]. Mol Cell Biol, 1989(9): 3117-3121.
 [4] LEE J Y, HIRONO I, AOKI T. Cloning and analysis of expression of *Mx* cDNA in Japanese flounder, *paralichthys olivaceus* [J]. Dev Comp Immunol, 2000, 24(4): 407-415.
 [5] ARNHEITER H, SKUNTZ S, NOTEBORN M, et al. Transgenic mice with intracellular immunity to influenza virus[J]. Cell, 1990, 62: 51-61.

(上接第 5066 页)

(3): 209.

[5] 庞发虎, 周素, 杜瑞卿. 驱蚊香草组织培养技术研究[J]. 安徽农业科

学, 2006, 34(13): 3045-3046.

[6] 朱玉球, 夏国华, 方慧刚, 等. 白术组培快繁技术[J]. 中药材, 2006, 29(3): 212.

科技论文写作规范——缩略语

采用国际上惯用的缩略语。如名词术语 DNA(脱氧核糖核酸)、RNA(核糖核酸)、ATP(三磷酸腺苷)、ABA(脱落酸)、ADP(二磷酸腺苷)、CK(对照)、CV(变异系数)、CMS(细胞质雄性不育性)、IAA(吲哚乙酸)、LD(致死剂量)、NAR(净同化率)、PMC(花粉母细胞)、LAI(叶面积指数)、LSD(最小显著差)、RGR(相对增长率)、单位名缩略语 IRRI(国际水稻研究所)、FAO(联合国粮农组织)等。对于文中有些需要临时写成缩写的词(如表及图中由于篇幅关系以及文中经常出现的词而写起来又很长时), 则可取各主要词首字母写成缩写, 但需在第一次出现处写出全称, 表及图中则用注解形式在下方注明, 以便读者理解。