

• 药材与资源 •

丹参不定根组织培养的研究(Ⅱ) 碳源、氮源和磷源对丹参不定根培养的影响

郭肖红, 高文远*, 李克峰

(天津大学药物科学与技术学院, 天津 300072)

摘要:目的 研究碳源、氮源和磷源对丹参 *Salvia miltiorrhiza* 不定根生长及其有效成分丹参酮Ⅱ_A和原儿茶醛量的影响。方法 利用组织培养技术结合 HPLC 分析手段,通过改变培养基碳源种类和浓度、氮源和磷源浓度,研究其对丹参不定根生长和丹参酮Ⅱ_A、原儿茶醛量的影响。结果 碳源、氮源、磷源对于不定根培养是必需的。以蔗糖为碳源,添加 30 g/L 蔗糖,培养 20 d,不定根增殖倍数最高,60 g/L 蔗糖最适合丹参酮Ⅱ_A合成,低质量浓度蔗糖更利于原儿茶醛合成。间歇添加蔗糖至培养 25 d,不定根增殖率是对照的 2.3 倍,丹参酮Ⅱ_A量是对照的 2.4 倍。培养基 NH_4^+ 和 NO_3^- 总浓度保持 60 mmol/L, $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 为 1:4、1:4、1:1 时分别得到最大的不定根增殖倍数、丹参酮Ⅱ_A和原儿茶醛的量。改变培养基 KH_2PO_4 浓度时,丹参不定根生长均比对照组旺盛,但高浓度 KH_2PO_4 抑制了丹参酮Ⅱ_A合成。结论 本实验确定了丹参不定根悬浮培养的最佳碳源种类和浓度、氮源比例和磷源浓度,表明不同碳源、氮源和磷源对丹参不定根生长和次生代谢物合成有显著影响。

关键词:丹参;丹参酮Ⅱ_A;原儿茶醛;碳源;氮源;磷源

中图分类号:R282.13

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)06-0907-05

Tissue culture of *Salvia miltiorrhiza* adventitious roots (Ⅱ)

Effects of carbon, nitrogen, and phosphate sources on culture of *Salvia miltiorrhiza* adventitious roots

GUO Xiao-hong, GAO Wen-yuan, LI Ke-feng

(College of Pharmaceuticals and Biotechnology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: Objective To study the effects of carbon, nitrogen, and phosphate sources on the growth of *Salvia miltiorrhiza* adventitious roots and the contents of tanshinone Ⅱ_A and protocatechuic aldehyde. **Methods** The adventitious roots were obtained through tissue culture by manipulation of carbon, nitrogen, and phosphate sources and the contents of tanshinone Ⅱ_A and protocatechuic aldehyde were determined by HPLC. **Results** Carbon, nitrogen, and phosphate sources were necessary for the culture of *S. miltiorrhiza* adventitious roots. The highest times of root multiplication were achieved at sucrose level of 30 g/L after 20 d culture, 60 g/L sucrose and low level sucrose were favorable for biosyntheses of tanshinone Ⅱ_A and protocatechuic aldehyde, respectively. The highest root yield and tanshinone Ⅱ_A content on day 25 were obtained by intermittent sugar adding during cultivation, and the production of adventitious roots and tanshinone Ⅱ_A were 2.3- and 2.4-fold compared with those of control, respectively. The maximum root growth rate, contents of tanshinone Ⅱ_A and protocatechuic aldehyde were achieved while $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ was 1:4, 1:4, and 1:1, respectively when concentration of total nitrogen source was kept at 60 mmol/L. To compare with the control group, changing of KH_2PO_4 concentration could favor for the adventitious root growth, but high KH_2PO_4 concentration inhibited tanshinone Ⅱ_A biosynthesis. **Conclusion** The results show that various carbon, nitrogen, and phosphate sources have the significant effects on adventitious root culture of *S. miltiorrhiza*. The best carbon source and its concentration, nitrogen and phosphate sources for the growth of *S. miltiorrhiza* adventitious root and the synthesis of secondary metabolite

收稿日期:2006-10-10

基金项目:国家 863 项目(2003AA2Z2040);国家中医药管理局中医药科学技术研究专项(04-05ZP10)

* 通讯作者 高文远 Tel:(022)87401895 E-mail:pharmgao@tju.edu.cn

are confirmed.

Key words: *Salvia miltiorrhiza* Bunge; tanshinone I_A ; protocatechuic aldehyde; carbon sources; nitrogen sources; phosphate sources

丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 以根和根茎入药, 主要含脂溶性二萜类化合物和水溶性酚酸类化合物, 是治疗心血管疾病的重要中药。国内外学者先后开展了丹参的组织培养研究, 对丹参细胞和毛状根培养次生代谢产物的研究有一些报道^[1~3], 但是关于不定根培养和合成次生代谢产物的报道比较少^[4]。本实验主要研究了碳源、氮源和磷源对丹参不定根生长及次生代谢产物合成的影响。

1 材料与方法

1.1 材料: 为在附加 IBA 2 mg/L 和 KT 0.2 mg/L 的基本 MS 液体培养基中继代多次的丹参不定根。

1.2 碳源对丹参不定根培养的影响

1.2.1 碳源种类对丹参不定根培养的影响: 将传代多次的丹参不定根约 1 g 接种到 250 mL 三角瓶中培养 20 d。三角瓶内含 50 mL 2 mg/L IBA 和 0.2 mg/L KT 的 MS 培养基, 培养基分别添加 3% 蔗糖、3% 葡萄糖、3% 果糖、1.5% 葡萄糖+1.5% 果糖、1.5% 果糖+1.5% 蔗糖、1.5% 葡萄糖+1.5% 蔗糖。培养基 pH 值灭菌前调到 6.0, 摇床转速 110 r/min, 每个处理 3~4 瓶。

1.2.2 蔗糖质量浓度对丹参不定根培养的影响: 将传代多次的丹参不定根约 1 g 接种到 250 mL 内含 50 mL 2 mg/L IBA 和 0.2 mg/L KT 的 MS 培养基的三角瓶中, 培养基添加不同质量浓度的蔗糖 (20、30、50、60、80 g/L)。每隔 5 d 测定不定根产量和有效成分的量, 共 30 d。培养基 pH 值和摇床转速同上, 每个处理 3~4 瓶。

1.2.3 蔗糖添加对丹参不定根培养的影响: 将丹参不定根约 1 g 接种到 250 mL 三角瓶中, 分别在第 6、11、16 天往三角瓶中加入 30、30、60 g/L 蔗糖, 第 25 天收获不定根。培养基 pH 值和摇床转速同上, 每个处理 3~4 瓶。

1.3 氮源对丹参不定根培养的影响: 丹参不定根接种到 250 mL 三角瓶中继代培养 20 d, 三角瓶内盛有 50 mL 添加 2 mg/L IBA 和 0.2 mg/L KT, 3% 蔗糖的 MS 培养基, 同时用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 代替原 MS 培养基中的 NH_4NO_3 , 在保持总氮素 60 mmol/L 不变条件下, 改变 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 的比值。培养基 pH 值和摇床转速同上, 每个处理 3~4 瓶。

1.4 磷源对丹参不定根培养的影响: 丹参不定根接

种到 250 mL 三角瓶中继代培养 20 d, 三角瓶内盛有 50 mL 附加 2 mg/L IBA 和 0.2 mg/L KT, 3% 蔗糖的 MS 培养基, 其中 KH_2PO_4 浓度分别为基本 MS 培养基的 1/4、1/2、1、2、4 倍, 培养基 pH 值和摇床转速同上, 每个处理 3~4 瓶。

1.5 有效成分提取和测定方法: 收获不定根后, 分别称取每瓶不定根鲜质量, 并于 105 °C 恒温下烘 30 min, 然后于 60 °C 恒温烘干 7~8 h 至恒重, 称取不定根干质量, 并计算其增长率 [增长率 = (生长量 - 接种量) / 接种量]。每个处理的不定根合并后用甲醇超声提取分离测定丹参酮 I_A 的量, 水提醇沉法提取分离测定原儿茶醛的量。两者的分析均采用 HPLC 法, 参照文献进行测定^[5], 分析体系分别为甲醇-水 (8: 2) 和甲醇-0.5% HAc (15: 85) 进行等速洗脱, 体积流量 1 mL/min。丹参酮 I_A 和原儿茶醛的对照品由中国药品生物制品检定所提供。

2 结果

2.1 碳源对丹参不定根培养的影响

2.1.1 碳源种类对丹参不定根培养的影响: 表 1 是不同碳源对丹参不定根生长及其有效成分丹参酮 I_A 和原儿茶醛的影响。3% 蔗糖为碳源时明显有利于丹参不定根增殖, 1.5% 葡萄糖+1.5% 蔗糖为碳源时得到最高量的丹参酮 I_A , 而以 3% 果糖为碳源时, 原儿茶醛量最高。综合考虑经济成本和不定根生长, 选用蔗糖作为碳源。

2.1.2 蔗糖质量浓度对丹参不定根培养的影响: (1) 蔗糖质量浓度对丹参不定根生长的影响: 不同质量浓度蔗糖对丹参不定根生长的影响见图 1。可以看出, 随着培养时间增加干质量持续增加, 第 20 天达到最大值, 然后又开始下降。其中以添加 30 g/L 蔗糖干质量增长率最高, 达到 5.07 倍, 20 d 后由于蔗糖被消耗尽, 不定根干质量迅速下降。蔗糖为 20 g/L 时, 由于蔗糖在 15 d 左右差不多被消耗完, 所以干质量增加倍数少。蔗糖为 60 g/L 的培养基中丹参不定根增长率要小于 30、50 g/L。同时可以看到蔗糖为 80 g/L 时, 干质量增加也较显著。20 d 后由于蔗糖未被消耗光, 干质量下降并不十分显著。因此丹参不定根培养以添加 30 g/L 蔗糖, 培养 20 d 后收获能得到最大的干质量。(2) 蔗糖质量浓度对丹参酮 I_A 和原儿茶醛合成的影响: 图 2 为不同质量浓

度蔗糖对丹参不定根中丹参酮Ⅱ_A和原儿茶醛合成的影响。较高质量浓度的蔗糖有利于丹参酮Ⅱ_A的合成,当蔗糖为 20、30 g/L 时,丹参酮Ⅱ_A量先上升后下降,在 20 d 仅为 5.14 和 6.38 μg/g,然后迅速

上升到最高值,分别为 12.73 和 24.40 μg/g;蔗糖为 50 g/L 时,丹参酮Ⅱ_A的量先上升后下降,20 d 达到低谷,然后迅速上升到最大值;蔗糖为 60 g/L 时,丹参酮Ⅱ_A的量第 20 天达到最大值(42.33 μg/g)。

表 1 不同碳源对丹参不定根培养的影响

Table 1 Effects of various carbon sources on culture of *S. miltiorrhiza* adventitious roots

碳源	鲜质量/g	干质量/mg	干质量增长率/倍	丹参酮Ⅱ _A /(μg·g ⁻¹)	原儿茶醛/(μg·g ⁻¹)
3%蔗糖	5.51±0.07	345.33±8.96	5.07±0.13	6.84	123.59
3%葡萄糖	2.67±0.27	179.93±7.50	2.33±0.18	5.01	88.62
3%果糖	1.43±0.10	114.20±0.14	0.96±0.04	3.51	205.79
1.5%葡萄糖+1.5%果糖	1.87±0.18	125.97±12.32	1.19±0.11	5.19	106.27
1.5%葡萄糖+1.5%蔗糖	2.74±0.19	176.30±7.31	1.98±0.07	17.15	130.37
1.5%果糖+1.5%蔗糖	2.43±0.27	168.70±15.70	1.85±0.36	4.69	130.03

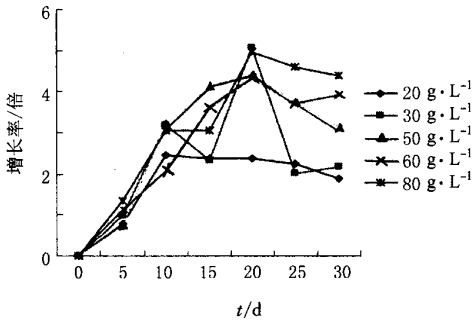


图 1 蔗糖质量浓度对丹参不定根生长的影响

Fig. 1 Effects of sucrose concentrations on growth of *S. miltiorrhiza* adventitious root

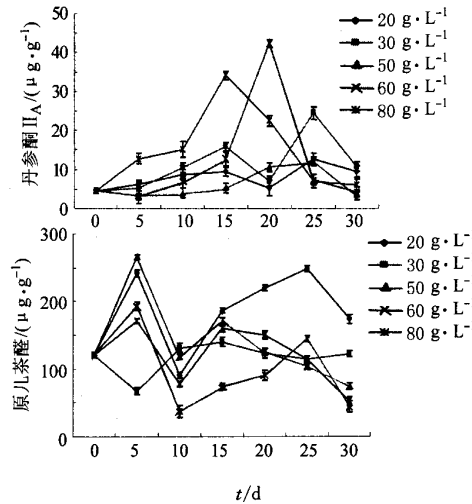


图 2 蔗糖质量浓度对丹参次生代谢物合成的影响

Fig. 2 Effects of sucrose concentrations on secondary metabolite biosynthesis of *S. miltiorrhiza*

蔗糖质量浓度对原儿茶醛的量并没有显著的影响,但总的来说,低质量浓度的蔗糖更利于原儿茶醛合成。除蔗糖为 30 g/L 外,原儿茶醛量第 5 天达到较高值,这可能与培养液果糖和葡萄糖量迅速升高有关,接着原儿茶醛的量迅速下降,然后又开始持续上升。并且添加 20 g/L 蔗糖时,原儿茶醛的量

达到所有处理的最大值 265.86 μg/g。而添加 30 g/L 蔗糖时,原儿茶醛的量先下降然后迅速上升,此后几乎没有多大变化。

2.1.3 蔗糖添加对丹参不定根培养的影响:由实验可知,低质量浓度蔗糖有利于不定根生长,而高质量浓度蔗糖(60 g/L)更利于丹参酮Ⅱ_A形成。为了进一步改善培养条件,提高不定根生物量和丹参酮Ⅱ_A的量,本实验采用蔗糖添加,即在第 6、11 天分别往培养基中加入 30 g/L 蔗糖以提高不定根生物量,第 16 天加入 60 g/L 蔗糖以提高丹参酮Ⅱ_A的量。由图 3 可以看出,未添加蔗糖即 6 d 前,两组不定根生物量几乎相同,随着蔗糖的添加,添加组不定根生物量明显高于对照组,第 25 天达到最大值,增殖倍数为 8.44,是对照组的 2.3 倍。至于丹参酮Ⅱ_A(图 4),对照组从第 6 天到第 25 天量增加不明显,由 16.58 μg/g 增加到 26.92 μg/g,而添加组丹参酮Ⅱ_A的量增加很快,由第 6 天的 15.38 μg/g 增加到第 25 天的 55.92 μg/g,是对照组的 2.4 倍。这表明通过间歇往培养基中添加蔗糖对于提高不定根生物量和丹参酮Ⅱ_A的量是有效的。

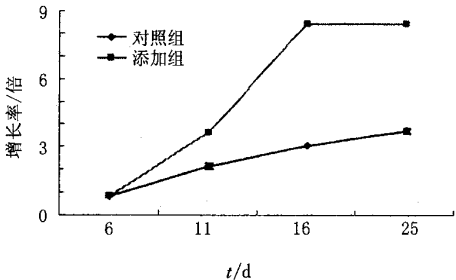


图 3 蔗糖添加对丹参不定根生长的影响

Fig. 3 Effects of sucrose adding on growth of *S. miltiorrhiza* adventitious roots

2.2 氮源对丹参不定根生长的影响:见表 2,随着 NH₄⁺/NO₃⁻ 比值增加,培养基 pH 值不断降低,

NO_3^- 为唯一氮源时 pH 为 5.94, NH_4^+ 为唯一氮源时 pH 为 3.54。 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 由 0 增加到 1 : 4, 丹参不定根增殖倍数增加至最大值; 继续增大 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 比值, 不定根增殖倍数下降, 当全部为 NH_4^+ 时不定根几乎停止生长, 趋于死亡。氮源对次生代谢

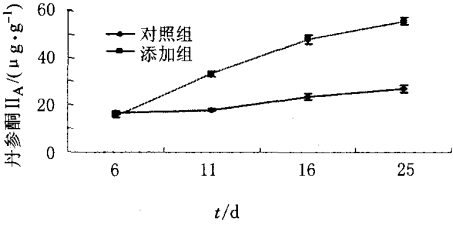


图 4 蔗糖添加对丹参酮 II_A 量的影响
Fig. 4 Effects of sucrose adding on tanshinone II_A content in *S. miltiorrhiza*

物合成的影响呈折线变化, 低比例的 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 时丹参不定根颜色较红, 丹参酮 II_A 的量较高, 培养基颜色也较红, 比例为 1 : 4 时丹参酮 II_A 的量最高。 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 为 1 : 1 时原儿茶醛的量最高, 其次是 1 : 4。由上可得出 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 为 1 : 4 培养效果较好。

2.3 磷源对丹参不定根生长的影响: 表 3 显示降低或者提高 KH_2PO_4 浓度均能提高丹参不定根生长速率, 高浓度磷源抑制了丹参酮 II_A 合成, 当 KH_2PO_4 浓度为基本培养基的 2 倍时, 丹参酮 II_A 的量仅为 0.24 倍, KH_2PO_4 浓度为基本培养基的一半时, 丹参酮 II_A 的量为 1.57 倍。而磷源对原儿茶醛合成没有显著性影响, 各种处理下其量变化不大。

3 讨论

表 2 氮源对丹参不定根培养的影响

Table 2 Effects of nitrogen sources on culture of <i>S. miltiorrhiza</i> adventitious roots						
氮源 ($\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$)	鲜质量/g	干质量/mg	pH 值	干质量增长率/ 倍	丹参酮 II _A / ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	原儿茶醛/ ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
0 : 0	4.63±0.22	230.50±9.56	5.94	2.83±0.50	11.81	81.49
1 : 4	4.25±0.13	345.41±5.78	5.82	4.88±0.35	35.24	201.09
1 : 2	3.86±0.08	305.77±4.01	5.60	4.19±0.31	11.20	59.42
1 : 1	2.63±0.14	218.53±7.86	5.35	2.54±0.29	10.75	286.74
2 : 1	3.90±0.15	290.25±7.05	5.22	3.86±0.42	20.76	125.58
4 : 1	3.92±0.16	287.46±8.78	4.97	3.79±0.12	4.42	69.85
全部为 NH_4^+	1.48±0.15	109.10±5.33	3.54	0.81±0.16	31.96	49.07

表 3 磷源对丹参不定根培养的影响

Table 3 Effects of phosphate sources on culture of <i>S. miltiorrhiza</i> adventitious roots					
KH_2PO_4 /倍	鲜质量/g	干质量/mg	干质量增长率/倍	丹参酮 II _A / ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	原儿茶醛/ ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
1/4	13.10±0.19	706.00±16.75	5.41±0.51	12.29	62.99
1/2	13.09±0.53	637.15±28.33	5.18±0.49	16.92	71.01
1	10.07±0.41	549.25±18.60	3.16±0.19	10.77	77.50
2	12.72±0.14	690.15±20.33	5.57±0.12	2.62	72.62
4	11.10±0.17	614.45± 4.60	4.05±0.25	5.11	75.77

3.1 碳源: 不同植物培养过程中所需的碳源种类和浓度不同, 一般是添加蔗糖、葡萄糖或果糖, 其中以蔗糖最常用。糖类在培养基中除了作为碳源和能源外, 还具有维持培养基一定渗透压的作用。本实验研究发现添加葡萄糖或果糖并不能提高不定根的产量, 但是葡萄糖结合蔗糖或以果糖作为唯一碳源均能提高丹参酮 II_A 和原儿茶醛的量。综合考虑经济成本、根产量和次生代谢物的量, 宜选用蔗糖为碳源。蔗糖质量浓度较高时丹参不定根生长受到了抑制, 可能与高糖带来的培养基高渗透压有关, 这与三七细胞培养结果一致^[6], 而较高质量浓度的蔗糖得到了高质量的丹参酮 II_A, 说明适当提高渗透压有利于丹参酮 II_A 合成, 至于原儿茶醛, 低浓度蔗糖更利于其合成, 其影响机制有待进一步探讨。为了进一步

提高培养效果, 采取间断添加蔗糖, 两阶段培养丹参不定根, 即先添加低质量浓度蔗糖提高不定根生物量, 然后添加高质量浓度蔗糖提高丹参酮 II_A 的量, 结果表明此方法是可行的。这为两阶段培养丹参不定根奠定了一定的实验基础。

3.2 氮源: 培养基中的硝态氮和铵态氮对丹参不定根生长和次生代谢物合成都有一定的作用。以 NO_3^- 为唯一氮源时, 不定根生长较旺盛, 但是次生代谢合成受到抑制, 适当增加 NH_4^+ 使其 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 为 1 : 4, 丹参不定根增殖倍数增加, 达到最大值, 而且次生代谢物的量明显增加。继续增大 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 比值, 不定根增殖倍数下降, 全部为 NH_4^+ 时不定根几乎停止生长, 趋于死亡, 其原因是培养基中 NH_4^+ 的量太高, 培养基酸化, 细胞毒性增

加,从而抑制了根生长和次生代谢物合成,而 NO_3^- 可以协同作用调节离子吸收,消除 NH_4^+ 对细胞的毒害作用^[7]。氮源对次生代谢物合成的影响规律不如其对不定根生长影响明显,呈折线变化。低比例的 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 时丹参不定根颜色较红,丹参酮Ⅱ_A的量较高,培养基颜色也较红,比例为1/4时丹参酮Ⅱ_A的量最高。 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 为1:1时原儿茶醛的量最高,其次是1:4,因此 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 为1:4培养效果较好。

3.3 磷源:磷是植物组织培养重要的营养因素。但是国内外学者对磷对细胞生长的作用看法不一。Amino等认为MS培养基中的磷(1.25 mmol/L)抑制了长春花细胞生长^[8]。Katsuhiko等报道指出培养基中磷源是长春花细胞生长的必需元素,磷源饥饿时细胞几乎停止生长,磷源浓度加倍对细胞生长没有太多的影响,再加大磷源浓度至4倍、8倍,细胞吸收过量的磷以致生长严重受阻^[9]。本实验结果表明加大或减少磷源浓度均能促进不定根生长。磷源对次生代谢物的生物合成也起非常重要的作用,不同植物的次生代谢合成所需磷浓度不同。丹参不定根培养中过量的磷源抑制了丹参酮Ⅱ_A合成,可能是由于过量的磷加速不定根内源有机酸的降解^[10],而一些有机酸比如甲羟戊酸、法尼基二磷酸等是丹参酮Ⅱ_A合成途径中必需的,原儿茶醛不同的合成

机制使其受磷源浓度变化影响不大。

References:

- [1] Chen H, Chen F, Chiu F C, *et al.* The effect of yeast elicitor on the growth and secondary metabolism of hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2001, 28(1): 100-105.
- [2] Chen H, Chen F. Effects of yeast elicitor on the growth and secondary metabolism of a high-tanshinone-producing line of the Ti transformed *Salvia miltiorrhiza* cells in suspension culture [J]. *Process Biochem*, 2000, 35(8): 837-840.
- [3] Yan Q, Shi M, Ng J, *et al.* Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots [J]. *Plant Sci*, 2006, 170(4): 853-858.
- [4] Koichiros H, Takashki K. Tanshinone production in adventitious roots and regenerates of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *J Nat Prod*, 1991, 54(6): 1583-1587.
- [5] Guo X H, Gao W Y, Chen H X, *et al.* Effects of metal ion on the accumulation of tanshinone Ⅱ_A and protocatechuic aldehyde in adventitious culture of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2005, 30(12): 885-888.
- [6] Zhao Y J, Chen Z, Ma X J, *et al.* Studies on nutrition character in *Panax quinquefolium*; N. Effects of nitrogen forms on medium pH (primary report) [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1993, 24(4): 205-206.
- [7] Lin Z L, Wang C C, Chen G H. Studies on nitrogen proportion and phosphate concentration in watermelon tissue culture [J]. *Fujian Fruits* (福建果树), 1994 (1): 2-3.
- [8] Amino S, Fujimura T, Komamine A. Synchrony induced by double phosphate starvation in suspension culture of *Catharanthus roseus* [J]. *J Physiol Plant*, 1983, 58: 393-396.
- [9] Katsuhiko S, Makiko M, Yoshiaki Y, *et al.* Inorganic phosphate as a negative conditioning factor in plant cell culture [J]. *Plant Sci*, 1995, 107: 117-124.
- [10] Liu S, Zhong J J. Phosphate effect on production of ginseng saponin and polysaccharide by cell suspension cultures of *Panax ginseng* and *Panax quinquefolium* [J]. *Process Biochem*, 1998, 33(1): 69-71.

不同产地何首乌的 ITS 序列研究

张宏意¹, 石祥刚²

(1. 广东药学院中药学院, 广东 广州 510240; 2. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘要:目的 研究不同产地何首乌的 ITS 片段遗传差异性, 分析该片段在何首乌道地性的 DNA 分子鉴别和野生资源品种的鉴定及种质资源研究中的意义。方法 从来自不同原产地的何首乌中提取总 DNA, 以核基因组 ITS 通用引物为引物进行扩增, 扩增产物经纯化后, 用 PCR 产物直接测序法进行测序。结果 各样品 rDNA 的 ITS 及 5.8S rDNA 完全序列, 18S 和 26S rDNA 部分序列, 共约 648 bp, 其中 ITS1 长度为 195 bp, 5.8S 长度为 164 bp, ITS2 长度为 189 bp。序列间共有 17 个变异位点。结论 ITS 序列可对何首乌的道地性做出鉴别, 对野生资源品种的鉴定具有较好的分辨性。

关键词:何首乌; 道地性; ITS 序列

中图分类号:R282.7

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)06-0911-04

Analysis of rDNA ITS sequences in root tuber of *Polygonum multiflorum* from various habitats

ZHANG Hong-yi¹, SHI Xiang-gang²

(1. School of Chinese Materia Medica, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510240, China;

丹参不定根组织培养的研究(Ⅱ)碳源、氮源和磷源对丹参不定根培养的影响

作者：[郭肖红](#)，[高文远](#)，[李克峰](#)，[GUO Xiao-hong](#)，[GAO Wen-yuan](#)，[LI Ke-feng](#)
作者单位：[天津大学药物科学与技术学院](#), 天津, 300072
刊名：[中草药](#) **ISTIC** **PKU**
英文刊名：[CHINESE TRADITIONAL AND HERBAL DRUGS](#)
年，卷(期)：2007, 38 (6)
被引用次数：9次

参考文献(10条)

1. [Chen H;Chen F;Chiu F C](#) [The effect of yeast elicitor on the growth and secondary metabolism of hairy root cultures of Salvia miltiorrhiza](#)[外文期刊] 2001 (01)

2. [Chen H;Chen F](#) [Effects of yeast elicitor on the growth and secondary metabolism of a high-tanshinone-producing line of the Ti transformed Salvia miltiorrhiza cells in suspension culture](#)[外文期刊] 2000 (08)

3. [Yan Q;Shi M;Ng J](#) [Elicitor induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in Salvia miltiorrhiza hairy roots](#)[外文期刊] 2006 (04)

4. [Koichiros H;Takashki K](#) [Tanshinone production in adventitious roots and regenerates of Salvia miltiorrhiza](#)[外文期刊] 1991 (06)

5. [Guo X H;Gao W Y;Chen H X](#) [Effects of metal ion on the accumulation of tanshinone II A and protocatechuic aldehyde in adventitious culture of Salvia miltiorrhiza](#)[期刊论文]-[中国中药杂志](#) 2005 (12)

6. [Zhao Y J;Chen Z;Ma X J](#) [Studies on nutrition character in Panax quinquefolium:IV.Effects of nitrogen forms on medium pH \(primary report\)](#) 1993 (04)

7. [Lin Z L;Wang C C;Chen G H](#) [Studies on nitrogen proportion and phosphate concentration in watermelon tissue culture](#) 1994 (01)

8. [Amino S;Fujimura T;Komamine A](#) [Synchrony induced by double phosphate starvation in suspension culture of Catharanthus roseus](#)[外文期刊] 1983

9. [Katsuhiro S;Makiko M;Yoshiaki Y](#) [Inorganic phosphate as a negative conditioning factor in plant cell culture](#)[外文期刊] 1995

10. [Liu S;Zhong J J](#) [Phosphate effect on production of ginseng saponin and polysaccharide by cell suspension cultures of Panax ginseng and Panax quinquefolium](#)[外文期刊] 1998 (01)

本文读者也读过(10条)

1. [郭肖红](#). [高文远](#). [李克峰](#). [GUO Xiao-hong](#). [GAO Wen-yuan](#). [LI Ke-feng](#) [丹参不定根组织培养的研究\(Ⅰ\)培养基种类、盐强度和有机组分对丹参不定根培养的影响](#)[期刊论文]-[中草药](#)2007, 38 (3)

2. [夏静](#). [张大海](#). [宋艳波](#). [王玉庆](#). [牛颜冰](#) [无花丹参叶盘组织培养再生体系的优化选择](#)[期刊论文]-[山西农业大学学报\(自然科学版\)](#) 2006, 26 (3)

3. [张跃非](#). [雷家容](#). [代其林](#) [丹参的组织培养及快速繁殖](#)[期刊论文]-[植物生理学通讯](#)2003, 39 (2)

4. [廖兰](#) [鼓泡生物反应器培养丹参不定根的研究](#)[学位论文]2007

5. [解晓红](#). [李江辉](#). [冯文龙](#). [解红娥](#). [陈丽](#). [李红霞](#). [武宗信](#) [丹参组培快繁技术研究](#)[期刊论文]-[中药材](#)2004, 27 (7)

6. 郭肖红. 丹参不定根组织培养的研究[学位论文]2006
7. 陈巍, 郭肖红, 高文远, 陈海霞, 黄璐琦, 肖培根, CHEN Wei, GUO Xiao-hong, GAO Wen-yuan, CHEN Hai-xia, HUANG Lu-qi, XIAO Pei-gen 丹参不定根离体培养的研究[期刊论文]-中国中药杂志2006, 31(17)
8. 肖克硕, 王迎迎, 高致明, 孙寒, XIAO Ke-shuo, WANG Ying-ying, GAO Zhi-ming, SUN Han 丹参苗期生长特性研究[期刊论文]-河南农业科学2010(5)
9. 张玲, 王丽英, 夏作理, ZHANG Ling, WANG Li-ying, XIA Zuo-li 紫花丹参不同部位铅、汞、砷等元素的含量测定[期刊论文]-中国医院药学杂志2008, 28(21)
10. 单成钢, 王志芬, 苏学合, 闫树林, 孙宏春, SHAN Cheng-gang, WANG Zhi-fen, SU Xue-he, YAN Shu-lin, SUN Hong-chun 丹参组织培养研究进展[期刊论文]-现代中药研究与实践2007, 21(3)

引证文献(9条)

1. 李琰, 杨钰琪, 陈培, 冯俊涛, 张兴 培养基成分对雷公藤不定根生长和次生代谢产物含量的影响[期刊论文]-林业科学 2013(5)
2. 田鹏, 李刚强, 王楠, 刘德虎 药用丹参的基因工程改良研究现状与展望[期刊论文]-中草药 2009(8)
3. 李汉伟, 苏秀红, 董诚明, 王伟丽 氮源和碳源对冬凌草愈伤组织生长及迷迭香酸的积累的影响[期刊论文]-时珍国医国药 2010(6)
4. 董诚明, 苏秀红, 王伟丽 氮碳源对冬凌草再生植株生长及次生代谢产物的影响[期刊论文]-西北植物学报 2009(3)
5. 高文远, 肖培根 生物工程技术与药用植物资源保护[期刊论文]-中草药 2008(7)
6. 李翠霞, 李志忠, 张继 外源诱导物对百里香植株再生过程中脂氧合酶活性的影响[期刊论文]-草业科学 2012(9)
7. 杨宁, 李翠霞, 李志忠, 张继 诱导子对百里香再生植株中苯丙氨酸解氨酶活性的影响[期刊论文]-西北植物学报 2012(2)
8. 于晓坤, 廉美兰, 高日, 李慧娟, 朴炫春 贯叶连翘不定根悬浮培养的初步研究[期刊论文]-中国农学通报 2012(19)
9. 邓建平, 杨国顺, 黄益鸿, 李益锋, 周杰良 培养基成分对葡萄愈伤组织生长和白藜芦醇含量的影响[期刊论文]-北方园艺 2010(11)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zcy200706046.aspx