

粗茎秦艽组织培养及再生植株

兰州大学生物系(730000) 孟玉玲* 贾敬芬

摘要 用粗茎秦艽 *Gentiana crassicaulis* 子叶和下胚轴为材料。在MS+2mg/L 2, 4-D+0.5 mg/L BA的培养基上进行培养, 子叶及下胚轴的出愈率为100%。愈伤组织继代培养于MS+0.5 mg/L 2,4-D+0.5mg/L BA+0.5mg/L NAA+500mg/L LH+3倍MS有机物和维生素的培养基上生长旺盛。愈伤组织转入分化培养基MS+1mg/L NAA+2mg/LBA+3mg/L ZT+3 mg/L GA+500mg/L LH+6%蔗糖+3倍MS有机物和维生素+3倍FeSO₄(Na₂-EDTA)上培养, 其中40%形成体细胞胚。体细胞胚在无激素MS培养基上发育成苗。

关键词 秦艽 组织培养 体细胞胚胎发生 再生植株

秦艽是国家重点保护野生药材之一。秦艽以根入药, 能祛风湿, 退虚热, 止痹痛^[1]。秦艽主要含龙胆苦甙等生物碱, 秦艽生物碱对抗风湿性关节炎有显著作用^[2]。粗茎秦艽属龙胆科植物, 组织培养成功的龙胆科植物只有龙胆草 *Gentiana scabra* Bunge^[3]和东北龙胆 *G. manshurica* Kitag^[4]。粗茎秦艽的组织培养在国内外尚未见报道⁵。粗茎秦艽为国家药典规定的4种商品秦艽之一。近年来野生资源大量减少, 应用组织培养方法繁殖和保存野生药用植物种质已成为必需。今通过体细胞胚胎途径获得粗茎秦艽再生苗, 具有诱导周期短、再生苗频率高、无玻璃化苗、苗具有健壮的根等优点。为粗茎秦艽的人工繁殖, 选育药用成分含量高的突变系提供可靠的实验基础。

1 材料和方法

粗茎秦艽种子经70%乙醇浸泡30s, 0.1%升汞浸泡8~10min, 无菌水冲洗3~4次, 接入无激素MS培养基中, 生长至子叶完全展开, 苗高约2cm, 将子叶及下胚轴切成段, 然后分别接入各种诱导培养基(表1)上诱导形成愈伤组织(图, 1、2)3周后统计形成愈伤组织的外植体数, 并计算出愈率。出愈率%=形成愈伤组织的外植体数/接入外植体数×100%。形成的愈伤组织继代保存于MS+0.5mg/L 2, 4-D+0.5mg/L BA+0.5mg/L NAA+500mg/L LH+3倍MS有机物和维生素的培养基上。将形成的白色松软愈伤组织切割为直径3~4mm的小块, 分别放在不同培养基(表2, 3)上进行对比实验。3周后统计在愈伤组织上形成体细胞胚的情况。体细胞胚诱导率%=形成体细胞胚的愈伤组织块数/接种的愈伤组织块数×100%。体细胞胚在实体显微镜OPTON上观察并照相(图, 4)。形成体细胞的愈伤组织块转入无激素MS培养基上, 在光照1500~2000lx下培养, 2周后就形成具有根的健壮苗(图, 5)。培养基均以MS为基本培养基, 用1mol/L NaOH调pH5.8~6.2, 0.8%琼脂固化。在昼夜温度25℃/18℃, 光强800~1000lx, 光暗交替14/10h的条件下培养。所有统计数据是3次重复的平均值。

2 结果和讨论

2.1 粗茎秦艽愈伤组织的诱导: 子叶及下胚轴诱导形成愈伤组织的实验结果见表1。在含2mg/L 2, 4-D和0.5mg/L BA的培养基上, 下胚轴经大约7d培养后在其切口处形成白色松软愈伤组织; 相比较, 子叶切块形成愈伤组织较迟缓, 形成的愈伤组织稍带黑色而且具粘性, 生长缓慢。无2, 4-D时, 出愈率为零; 只加1mg/L 2, 4-D出愈率上升到30%~44%。

*Address: Meng Yuling, Department of Biology, Lanzhou University, Lanzhou

表1 激素对秦艽子叶及下胚轴愈伤组织诱导的影响

激素 (mg/L)		子 叶			下 胚 轴		
2,4-D	BA	形成愈伤组织的 外植体数	接入 外植体数	出愈率 (%)	形成愈伤组织的 外植体数	接入 外植体数	出愈率 (%)
0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	11	38	30	20	45	40
2	0.5	35	35	100	47	47	100
0	1	0	49	0	0	38	0
0.5	2	2	35	6	1	27	4

表2 激素对秦艽子叶愈伤组织及下胚轴愈伤组织体细胞胚胎发生的影响

激素(mg/L)		子叶愈伤组织体 细胞胚胎诱导率		下胚轴愈伤组织 体细胞胚胎诱导率	
NAA	BA	ZT	GA	(%)	(%)
1	1	1	0	6	5
1	2	3	3	12	20
1	2	5	3	13	15
2	3	5	5	11	17

ZT-玉米素 GA-赤霉素

表3 蔗糖、水解乳蛋白(LH)、MS有机物和FeSO₄(Na₂-EDTA)对下胚轴愈伤组织体细胞胚胎发生的影响

蔗糖 (%)	LH (mg/L)	MS有机物和 维生素倍数	FeSO ₄ (Na ₂ - EDTA)倍数	体细胞 胚胎诱导率(%)
3	0	1	1	20
6	0	1	1	42
3	500	1	1	26
3	0	3	1	22
3	0	1	3	28
6	500	3	3	51

2,4-D对秦艽形成愈伤组织极为重要。BA单独使用,出愈率为零,提高BA浓度仍无效果。0.5mg/L BA与2mg/L 2,4-D配合使用,出愈率达100%,表现出激素的交互作用效应。

2.2 愈伤组织继代培养:诱导形成的愈伤组织继代培养于2,4-D含量高于2mg/L的培养基上,愈伤组织易发黑死亡。降低2,4-D浓度至0.5mg/L并附加0.5mg/L BA和0.5mg/L NAA,愈伤组织可在此培养基上旺盛生长,愈伤组织呈白色松软状。向培养基中再加入500mg/L LH和3倍MS有机物和维生素可进一步改善培养物的生长状况。

2.3 体细胞胚的诱导及再生植株的形成:

2.3.1 激素对体细胞胚的诱导作用:激素对体细胞胚发生的影响结果见表2。我们发现2,4-D的加入不利于体细胞胚的形成。仅0.5mg/L 2,4-D就导致已形成的胚性愈伤组织逆转为非胚性愈伤组织。这与茶花[5]

体细胞胚的诱导结果类似,作者发现2,4-D对茶花体细胞胚的发生不必须,高浓度2,4-D不利于体细胞胚的形成。据Evans[8]的不完全统计,2,4-D作为一种主要激素在他所统计的所有成功地诱导体细胞胚发生的事例中占51.7%。我们的结果与大多数事例相悖,其原因



图 秦艽愈伤组织和再生苗的形成

1-子叶诱导形成愈伤组织 2-下胚轴诱导形成愈伤组织 3-非胚性愈伤组织 4-胚性愈伤组织 5-体细胞胚萌发形成幼苗 6-通过体细胞胚途径的再生植株

可能与供试的植物种类和诱导材料有关。细胞分裂素对体细胞的诱导有较为显著的促进作用,1mg/L BA与1mg/L ZT配合,诱导率为5%~6%这与红豆草^[6]体细胞胚的诱导结果相一致。1mg/L NAA+2mg/L BA+3mg/L ZT+3mg/LGA₃配合使用,可将诱导率提高到12%~20%,达到最佳诱导效果。在体细胞胚的发生中激素起着非常重要的作用,这一点已由大量的报道所证实。但对于不同的植物种类及不同的诱导材料来说,诱导体细胞胚所要求的激素种类、组合和用量都不相同。

2.3.2 蔗糖、水解乳蛋白(LH)、MS有机物和维生素及FeSO₄(Na₂-EDTA)对体细胞胚发生的影响:以下胚轴来源的愈伤组织为材料,选用诱导效果最好的激素组合,然后分别加入蔗糖等4类物质,结果见表3。蔗糖浓度从3%提高到6%,可使体细胞胚诱导率从20%提高到42%。效果极为显著。已有报道阐明高浓度蔗糖对体细胞胚的发生有显著的促进作用^[9]。500mg/L LH,3倍MS有机物和维生素和3倍FeSO₄(Na₂-EDTA)的加入对体细胞胚的发生有明显的促进作用。4种物质配合使用,可使诱导率提高到51%。复合添加物质对体细胞胚发生的促进作用已在许多实验中得到证实^[6]。培养基中常常加入各种生长辅助物质如肌醇、烟酸、VB₁、VB₆等,对培养未分化的幼胚是必须的^[7]。

2.3.3.体细胞胚植株的形成:将形成体细胞胚的愈伤组织转入无激素的MS培养基中,2周后成形1cm左右的具根小苗(图,5)。外源激素的加入对体细胞胚的进一步发育不利。Al-Abta等^[10]认为从细胞决定到球形胚阶段依赖于外源激素的存在,但球形胚以后的发育受到外源激素的抑制。粗茎秦艽的体细胞胚的发育符合上述规律,形成的体细胞胚在无激素的MS培养基上分化成苗率可达90%以上。

致谢:粗茎秦艽种子由西北高原生物研究所刘建全同志赠送,在此深表谢意。

参 考 文 献

- 1 王晓燕.中草药,1993,24(4):189
- 2 宋振玉,等.生理学报,1958,22:201
- 3 张治国,等.浙江人民卫生实验院报,1983(34):217
- 4 刘伟华,等.遗传,1992,14(5):27
- 5 庄承纪,等.实验生物学报,1985,18(3):275
- 6 谷祝平,等.实验生物学报,1988,21(2):149
- 7 胡适宜,著.被子植物胚胎学.北京:人民教育出版社,1983.198
- 8 Evans D A, et al. Planta Tissue Culture, Methods and Application in Agriculture. New York: Academic Press, 1981.45
- 9 Lu C Y, et al. J. Planta Physiol, 1984, 115:237
- 10 Al-Abta S, et al. New Physiologist, 1979,82:29

(1994-05-16收稿)

(上接第523页)

5.1 紫外吸收光谱图一致,层析图谱,除了冷浸正丁醇萃取、硅胶柱层析外,其余层析图谱一致。因此,用甲醇冷浸法一步提取就可作为葛根总黄酮的提取工艺。

5.5 通过对葛根总黄酮薄层析中,5种展开溶媒的比较说明,以氯仿-甲醇-水(7:2.5:0.25)为最佳展开溶媒。因此,可作为葛根总黄酮分离时的展开溶媒。

参 考 文 献

- 1 李树珍,等.中草药,1994,25(9):496
- 2 郭建平,等.中草药,1995,26(3):163
- 3 顾学裘主编.药物制剂注解.北京:人民卫生出版社,1981.163
- 4 Kinjo J F, et al. Chem Pharm Bull, 1981,35(12):4846
- 5 中国医学科学院药物研究所.药学通报,1980,15(7):40
- 6 野原稔弘,他.现代东洋医学,1992,18(3):79
- 7 中国药典,1990.299

(1995-02-15收稿)

Effect of *Gynostemma pentaphyllum* Makino extract on the vitality and life-span of thorny nude belly water flea was studied. Results showed that all 0.0125%, 0.0250%, 0.0500% and 0.1000% extract of *G. pentaphyllum* significantly effected the growth, development, reproduction and life span of the water flea.

(Original article on page 527)

Effect of Jinyingzi (*Rosa laevigata*) Aqueous Extract on Urinary System

Lu Yin, Sun Zhiguang, Xu Huiqi, et al

Jinyingzi is the dry ripe fruit of *Rosa laevigata* Michx.. It contains mainly tannic acid, malic acid, citric acid, vitamin C and saponins. Its effect on urinary system was studied on mouse pollakiuria model by severing hypogastric nerve. Results showed that the water extract of *R. laevigata* can decrease the frequency and prolong the interval of urination and increase the quantity of each urination. The said extract can inhibit the automatic contraction of isolated rabbit jejunal smooth muscle and antagonize the spasmodic contraction aroused by acetylcholine and barium chloride of isolated rabbit jejunal smooth muscle, and isolated vesical smooth muscle of mouse, and antagonize reaction of contractility aroused by noradrenalin on isolated thoracic aorta strips of rabbit. All of the three inhibitions of smooth muscle contraction showed significant dose-response curve.

(Original article page 529)

Influence of Safflower (*Carthamus tinctorius*)

on Ca^{2+} Transmembrane Influx in Rat Aorta

Mo Shangwu, Chen Zhiheng, et al

Influence of *Carthamus tinctorius* L. has been studied on Ca^{2+} transmembrane influx in rat aorta when its extract was used at 5, 50, 500 $\mu\text{g/ml}$. It was shown that the resting ^{45}Ca influx in rat aorta ring was not altered by *C. tinctorius* but the ^{45}Ca influx evoked by norepinephrine (1.2×10^{-6} mol/L) and KCl solution (100mmol/L) was inhibited in a concentration-dependent manner. The results demonstrated that the receptor-operated Ca^{2+} channel (ROC) and potential-dependent Ca^{2+} channel (PDC) in cell membrane of smooth muscle could be blocked by *C. tinctorius* as well as by verapamil.

(Original article on page 532)

Tissue Culture of Thickstem Gentian (*Gentiana crassicaulis*)

and Plant Regeneration Through Somatic Embryogenesis

Meng Yuling, Jia Jingfen

Callus of *Gentiana crassicaulis* was initiated from hypocotyl and cotyledon on MS medium supplemented with 2mg/L 2,4-D and 0.5 mg/L BA. Induction frequencies of callus were 100%. Somatic embryos were formed on MS medium containing 2mg/L BA, 3mg/L ZT, 1mg/L NAA, 3mg/L GA, three time MS organics and vitamins, 6% sucrose and 500 mg/L LH and three time FeSO_4 (Na_2EDTA) .40% Callus produced somatic embryos. It developed into complete plants on hormon-free MS medium.

(Original article on page 537)