

• 药材与资源 •

怀区地黄遗传多样性的 ISSR 鉴定

周延清^{1,4}, 景建洲^{2,3}, 李振勇², 张宝华⁵, 王天亮⁵, 贾敬芬^{1*}

- (1. 西北大学生命科学学院, 陕西 西安 710069; 2. 华美生物工程公司 博士后工作站, 河南 洛阳 471003;
3. 清华大学 生物科学与技术系, 北京 100084; 4. 河南师范大学生命科学学院, 河南 新乡 453007;
5. 温县农业科学研究所, 河南 温县 454881)

摘要:目的 利用 ISSR 标记技术对怀区地黄的 8 个品种和 2 个茎尖培养脱毒系进行了遗传多样性分析。方法 用 44 条 ISSR 引物进行初选, 然后用其中适合的 10 个 ISSR 引物进行 ISSR 分析。结果 10 条 ISSR 引物共扩增出 110 条带。基于这些条带, 用 SPSS10.0 软件分析, 建立了遗传 Jaccard 相关系数矩阵, 构建了分子树状图, 将怀区地黄的 8 个品种和 2 个组培系分为 2 类: 其中一类群含有 6 个材料, 包括组培 85.5、大田 85.5、组培 9302、大田 9302、金状元和金白地黄; 另一类群含有 4 个材料, 包括北京 1 号、大红袍、地黄 9104 和野生地黄。而且主成分分析结果支持上述的聚类分析结果; 用 POPGENE32 软件分析知, 多态性指数为 0.377 5, 有效等位基因数为 1.403 7, 多态性比率为 71.82%; 用一个 ISSR6 引物建立了 10 个供试地黄样品的 DNA 指纹图谱并且能将其彼此区分出来。结论 ISSR 标记适合于构建怀区地黄的 DNA 指纹图谱、品种鉴定和遗传多样性分析。

关键词: 怀区地黄; ISSR; 遗传多样性; 遗传相似性

中图分类号: R282.71

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)02-0257-05

ISSR identification of genetic diversity of *Rehmannia glutinosa* in Huai zoneZHOU Yan-qing^{1,4}, JING Jian-zhou^{2,3}, LI Zhen-yong², ZHANG Bao-hua⁵,
WANG Tian-liang⁵, JIA Jing-fen¹

- (1. College of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069, China; 2. Postdoctoral Programme, Sino-American Biotechnology Company, Luoyang 471003, China; 3. Department of Biological Bio science and Technology, Tsinghua University, Beijing 100084, China; 4. College of Life Science, Henan Normal University, Xinxian 453007, China; 5. Wenxian Institute of Agricultural Science, Wenxian 454881, China)

Abstract: Objective In order to characterize eight cultivars and two virus-free lines micro-propagated by tip tissue culture of *Rehmannia glutinosa* in Huai zone and to assess their genetic diversities by inter-simple sequence repeat (ISSR) technique. **Methods** Ten appropriate ISSR primers were selected from a total of 44 ISSR ones for ISSR PCR amplification. **Results** The ten primers could amplify one hundred and ten bands. Based on them, a Jaccard's genetic similarity matrix and a dendrogram for these ten cultivars were established using SPSS 10.0 software. In this dendrogram, they could be divided into two groups: group 1 contained six individuals, such as Zupei 85.5, Datian 85.5, Zupei 9302, Datian 9302, Jinzhuangyuan, and Jinbai Dihuang; group 2 consisted of four ones such as Beijing No. 1, Dahongpao, Dihuang 9104, and wild Dihuang. Furthermore, principal coordinate analysis (PCA) supported the above cluster analysis; Shannon's information index (I) is 0.377 5, effective number of alleles (N_e) is 1.403 7, the percentage of polymorphic loci is 71.82% by means of POPGENE32 software; a DNA fingerprint was developed with a single primer, ISSR6, in which each of ten tested individuals had its unique fingerprint pattern and was distinguished from each other. **Conclusion** The results reveal that ISSR method is suitable for DNA fingerprinting, identification, and genetic diversity analysis of *R. glutinosa* in Huai zone

Key words: *Rehmannia glutinosa* Libosch. in Huai zone; inter-simple sequence repeat (ISSR); genetic diversity; genetic similarity

DNA 分子标记为植物的遗传和物理图谱的建立、基因的定位与克隆、数量性状位点的遗传分析、

收稿日期: 2004-04-28

作者简介: 周延清(1963—), 男, 河南邓州人, 副教授, 在读博士, 硕士生导师, 主要从事植物细胞工程研究。

Tel: (0379) 4338900-8601 E-mail: luckyqing2003@yahoo.com.cn

* 通讯作者 Tel: (029) 88303484 E-mail: WANGXL@nwu.edu.cn

遗传多样性评估、物种起源和分子标记辅助育种等遗传学研究提供了有价值的工具。在众多的 DNA 分子标记中,简单重复间序列 (ISSR) 在植物遗传多样性研究中获得了成功。ISSR 是由 Zietkiewicz 等发明的一种类似 RAPD 的分子标记技术^[1]。它利用重复锚定引物扩增 SSR (简单重复序列) 之间的片段,具有重复性好、稳定性高、多态性丰富等优点^[2,3]。它所使用的引物与基因组中的微卫星序列 (MS) 互补,并且具有和基因组重复序列 5' 端或者 3' 端退火的短寡聚核苷酸锚定序列,长约 17~22 个碱基。迄今,ISSR 标记主要用于小麦、水稻等大田作物和苹果、柑橘等果树的研究。在中药中 ISSR 标记研究很少,仅见有关百合^[4]和五味子^[5]品种鉴定的研究报道。目前尚未见利用 ISSR 标记对地黄进行上述诸方面研究的报道。

地黄为玄参科地黄属 (*Rehmannia* Libosch. ex Fisch. et Mey.) 植物,全世界共有 6 种。地黄是一种中药材,根茎入药。生地黄味甘、苦,性寒,无毒,能清热凉血、生津养阴;熟地黄味甘、微苦,性温,无毒,能滋阴补肾、补血调经^[6]。其年需求量高于 1.5×10^7 kg^[7]。地黄全国各地均有栽培,但以河南怀地黄品质佳、疗效好,享誉国内外。怀地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. f. *hueichingensis* (Chao et Schih) Hsiao 是驰名中外的四大怀药之一。因产于河南怀庆府而得名。河南每年都有大量地黄产品销往国内市场、出口东南亚和日本等国。地黄已经成为河南产区重要的经济来源之一。所以,国内外市场对怀地黄的品质、纯度和道地性提出更高要求。然而,目前市场上地黄产品来源比较复杂,优劣品种混杂,仍采用传统的形态特征和系谱来源对其分类研究和遗传分析。为准确鉴定和使用怀地黄药材,克服传统鉴定方法不易区分品种的不足,为其新品种选育和育种提供分子依据,本实验利用 ISSR 分子标记技术对 10 个怀区地黄材料进行了种质多样性鉴定。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂:Beckman Avanti™ J—25 离心机;TG16—W 微量高速离心机 (长沙湘仪离心机仪器有限公司);Beckman Du530 DNA/Protein Analyzer;立可得照相机 (Polaroid MP-4 Land Camera 和 Transilluminator UV);DYY—Ⅲ 8A 型稳压稳流定时电泳仪 (北京六一仪器厂);JY2002 上皿电子天平 (上海精密科学仪器有限公司)。

Taq DNA 聚合酶 (华美生物工程公司);dNTPs (Pharmacia 公司);引物 (上海生工合成);

Biowest agarose (Shanghai Yito Enterprise Company);CTAB BRO361/100 g (华美生物工程公司,进口分装);EB (10 mg/mL,华美生物工程公司)。

1.2 材料:2003 年 5 月 20 日在河南省温县农业科学研究所地黄田采集 8 个地黄品种的幼叶,在其日光温室采集 2 个经过茎尖脱毒的地黄品种的幼叶。名称为:①组培 85-5,②大田 85-5,③组培 9302,④大田 9302,⑤ 9104,⑥金状元,⑦野生地黄,⑧北京一号,⑨大红袍,⑩金白地黄。在每份材料的群体中随机选取 10 株幼苗的幼叶,用自来水洗干净,晾干,混匀,装入 50 mL 干燥洁净的离心管中,置于装有液氮的液氮罐内速冻。

1.3 方法

1.3.1 总 DNA 的提取和浓度的测定:称取 3~5 g 经液氮冷冻后捣碎的叶片粉末,用 CTAB 法^[8]提取 DNA。分别用 RNA 酶 A 进行纯化,用 Beckman Du530 DNA/Protein Analyzer 测定 DNA 的紫外吸光值,用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检查 DNA 的大小和完整性。DNA 分子量标准为 λ DNA/*Hind* III。

1.3.2 ISSR 及其产物检测:选取 1 份材料进行预试验,从 44 个 ISSR 引物 (根据 British Columbia 大学公布的序列设计,由上海生工合成) 中选出 10 个能够获得清晰条带,反应稳定的 ISSR 引物 (表 1)。PCR 反应体系为 25 μ L,包括 1.5~1.0 U Taq DNA 聚合酶,3.0 mmol/L Mg^{2+} , $1 \times$ Taq DNA 聚合酶缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L KCl, 0.1% Trion X-100, pH9.0), 60 ng 模板 DNA, 0.4 μ mol/L 引物, dATP、dGTP、dCTP 和 dTTP 各 0.4 mmol/L 与 2% 去离子甲酰胺。PCR 反应在 PE 公司的 9600 PCR 扩增仪上进行,扩增程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 7 min 一个循环;94 $^{\circ}$ C、45 s, 50 $^{\circ}$ C or 53 $^{\circ}$ C or 55 $^{\circ}$ C、90 s, 72 $^{\circ}$ C、120 s, 45 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min 一个循环。反应产物以 λ DNA/*Eco*RI+*Hind* III DNA Marker 或者 100 bp ladder 为分子量标记,在含有 0.5 μ g/mL EB 的 1.4% 琼脂糖凝胶中电泳检测,在紫外光透射仪 Transilluminator UV 下观察,用 Polaroid MP-4 Land Camera 照相。

1.3.3 数据统计与分析:ISSR 扩增产物以 0.1、9 统计建立 ISSR 数据库。每个可辨带代表 1 个变异,在相同迁移位置,有带记为 1,无带记为 0,扩增失败或缺失数据记为 9。用 SPSS10.0 分析软件的 Jaccard 方法计算样品间的遗传相似系数 (genetic similarity, GS),用 Within-group linkage 聚类分析,建

立样品间的亲缘关系树系图。利用 POPGENE32 计算 ISSR 扩增产物的 Shannon 多样性指数 PIC (polymorphism information content)。其中 $PIC = 1 - \sum p_i^2$, p_i 为产物条带的表型; 标记系统的有效等位基因数 (effective number of alleles, NE) 按公式 $NE = 1 / \sum p_i^2$ 计算。

2 结果和分析

2.1 扩增产物的多态性: 10 个 ISSR 引物共扩增出 110 条带。基于这些条带, 用 SPSS10.0 软件和 POPGENE32 软件分析得: 多态性指数为 0.377 5, 有效等位基因数为 1.403 7, 多态性比率为 71.82% (表 1)。扩增条带的分子量从 200~1 600 bp 不等 (图 1~3)。

表 1 ISSR 引物及其碱基序列和多态性分析

Table 1 List of ISSR primers and their sequences and analysis of ISSR-generated banding patterns

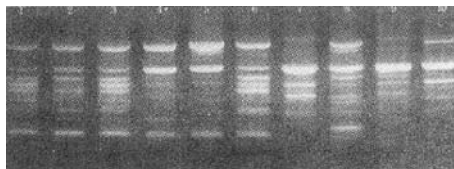
引物	碱基序列 (5'-3')	扩增带 数/条	多态性条 带/条	条带 大小	多态性 比率/%	多态性有效等位 指数	基因数
ISSR1	BDB(CA) ₆	10	7		70		
ISSR6	(CT) ₈ RC	18	—		—		
ISSR11	CCA(GTG) ₄	12	6		50		
ISSR14	GGA(GTG) ₄	10	4		60		
ISSR19	(TC) ₈ G	7	6		85.7		
ISSR20	(GA) ₈ YT	10	7		70		
ISSR28	(AG) ₈ G	9	5		55.6		
ISSR29	(GA) ₈ C	10	8		80		
ISSR33	T(GA) ₈	15	—		—		
ISSR34	(GA) ₈ C	9	7		77.8		
总数		110		200~1 600 bp	71.82	0.377 5	1.403 7

B=C, G, T; D=A, G, T; R=A, G; Y=C, T;

—: 因为加 DNA 标准分子量而缺失的 DNA 条带

—: indicates missed individual's bands replaced by DNA standard molecular weight marker

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



1-大田 85.5 2-组培 85.5 3-组培 9302 4-大田 9302
5-9104 6-金状元 7-野生地黄 8-北京 1 号
9-大红袍 10-金白地黄

1-Datian 85.5 2-Zupe 85.5 3-Zupe 9302 4-Datian 9302
5-9104 6-Jinzhuan 85.5 7-wild Dihuang 8-Beijing No. 1
9-Dahongpao 10-Jinbai Dihuang

图 1 引物 ISSR6 对 10 个怀区地黄品种的扩增指纹图
Fig. 1 ISSR fingerprints of ten cultivars of *R. glutinosa* in Huai zone generated by Primer ISSR6

另外, 基于 ISSR 扩增所产生的 110 条 DNA 带, 获得了 10 个怀地黄材料的 Jaccard 相似系数矩阵 (表 2)。从表 2 可以看出, 大田 85.5 与组培 85.5 两个地黄品种之间的遗传相似系数最大, 为 0.979; 野生地黄和大田 9302 两品种之间的遗传相似系数最小, 为 0.557, 计算得出平均遗传相似系数为 0.665。

2.2 ISSR 指纹图谱的建立: 利用筛选得到的 10 条 ISSR 引物分别对供试材料进行 PCR 扩增, 建立了相应的 DNA 指纹图谱 (图 2、3)。而且从这些引物中筛选出一条 ISSR6 引物能够区分地黄的 10 个供试品种 (系), 见图 1。该引物扩增的 10 个怀区地黄材料的 DNA 电泳图谱为鉴定品种的真实性及其品种的苗期鉴定提供了科学依据。

2.3 品种间的 ISSR 聚类分析: 10 个怀区地黄品种间的树状图见图 4。从树状图可以看出, 所有材料

表 2 10 个怀区地黄品种 (系) 的 Jaccard 相似系数矩阵

Table 2 Jaccard's similarity matrix for ten cultivars of *R. glutinosa* in Huai zone

品种	组培 85.5	大田 85.5	组培 9302	大田 9302	金状元	地黄 9104	野生地黄	北京 1 号	大红袍	金白地黄
组培 85.5	1.000									
大田 85.5	0.979	1.000								
组培 9302	0.900	0.918	1.000							
大田 9302	0.649	0.661	0.638	1.000						
金状元	0.650	0.661	0.695	0.678	1.000					
地黄 9104	0.629	0.613	0.619	0.603	0.606	1.000				
野生地黄	0.610	0.593	0.627	0.557	0.613	0.619	1.000			
北京 1 号	0.621	0.603	0.610	0.567	0.571	0.772	0.696	1.000		
大红袍	0.607	0.589	0.596	0.607	0.583	0.732	0.685	0.915	1.000	
金白	0.746	0.729	0.705	0.585	0.588	0.642	0.651	0.717	0.678	1.000

可以明显地划分为 2 组。第 1 组含有 6 个体, 包括组培 85.5、大田 85.5、组培 9302、金白地黄、金状元和大田 9302。第 2 组含有 4 个体, 包括北京 1 号、大红袍、地黄 9104 和野生地黄。

2.4 主成分分析: Kaiser-Meyer-Olkin Measure of Sampling Adequacy (KMO) 检验表明, ISSR 标记的 KMO 为 0.806, 大于 0.5, 适合于主成分分析。结果表明 10 个材料的分组结果支持聚类分析的结果

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9



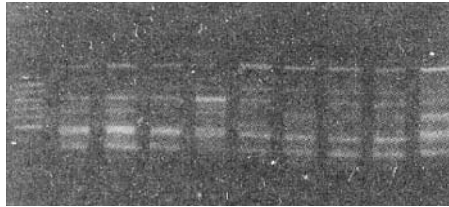
1-大田 85.5 2-组培 9302 3-大田 9302 4-金状元 5-9104
6-野生地黄 7-北京 1 号 8-大红袍 9-金白地黄 M- λ DNA
EcoR I + *Hind* III 标准分子量;引物大小(bp):21 227,5 148,
4 973,4 268,3 530,2 027,1 904,1 584,1 375,947,831,564,125
(从上到下)

1-Datian 85.5 2-Zupei 9302 3-Datian 9302 4-Jinzhuan-
yuan 5-9104 6-wild Dihuang 7-Beijing No.1 8-Dahongpao
9-Jinbai Dihuang M- λ DNA *EcoR* I + *Hind* III fragment sizes
(bp): 21 227, 5 148, 4 973, 4 268, 3 530, 2 027, 1 904,
1 584, 1 375, 947, 831, 564, 125 (from top to bottom)

图 2 引物 ISSR6 对 9 个怀地黄品种的扩增指纹图

Fig. 2 ISSR fingerprints of nine cultivars of *R. glutinosa* in Huai zone generated by Primer ISSR6

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9



1-大田 85.5 2-组培 85.5 3-大田 9302 4-金状元 5-9104
6-野生地黄 7-北京 1 号 8-大红袍 9-金白地黄 M-100 bp
Ladder, 引物大小 (bp): 1 000,900,800,700,600,500,400,
300,200,100 (从上到下)

1-Datian 85.5 2-Zupei 85.5 3-Datian 9302 4-Jinzhuan-
yuan 5-9104 6-wild Dihuang 7-Beijing No.1 8-Dahongpao
9-Jinbai Dihuang M-100 bp Ladder, primer sizes (bp): 1 000,
900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100

(from top to bottom)

图 3 引物 ISSR33 对 9 个怀区地黄品种的扩增指纹图

Fig. 3 ISSR fingerprints of nine cultivars (lines) of *R. glutinosa* in Huai zone generated by Primer ISSR33

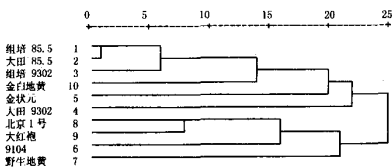
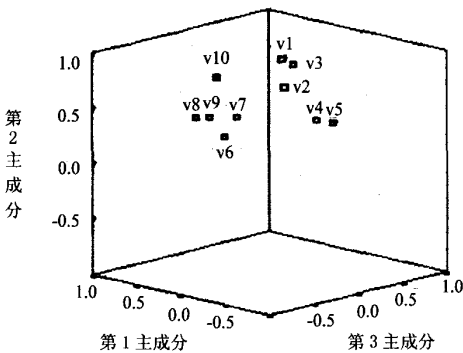


图 4 10 个怀区地黄品种间的 ISSR 聚类分析树状图

Fig. 4 Dendrogram of cluster analysis for ten cultivars of *R. glutinosa* in Huai zone based on ISSR markers



v1-组培 85.5 v2-大田 85.5 v3-组培 9302

v4-大田 9302 v5-金状元 v6-9104 v7-野生地黄

v8-北京 1 号 v9-大红袍 v10-金白地黄

v1-Zupei 85.5 v2-Datian 85.5 v3-Zupei 9302 v4-Datian

9302 v5-Jinzhuan-yuan v6-9104 v7-wild Dihuang

v8-Beijing No.1 v9-Dahongpao v10-Jinbai Dihuang

图 5 怀区地黄样品基于 ISSR 标记的主要成分分析 (平均正交旋转法)

Fig. 5 Principal coordinate analysis using ISSR markers and Equamax (component plot in rotated space)

果。图 5 是利用每组分析中提取的前 3 个主成分得出的分布图。

3 讨论

3.1 在本研究聚类分析结构中,北京 1 号和大红袍分在同一组,而且他们与 85 系列分在不同族类的结果与以前报道的 RAPD 鉴定结果一致^[4]。这说明 ISSR 技术与 RAPD 技术的一致性。

3.2 ISSR 对 PCR 反应的敏感性比 RAPD 低,但是,它的稳定性仍然受到 Mg^{2+} 浓度、引物浓度、退火温度等因素的影响。因此,实验条件的优化^[10]和采用统一的 PCR 反应条件是非常必要的。另外,ISSR 引物含有重复序列,与它结合的基因组 DNA 内的靶序列在 DNA 复制过程中存在滑动和不等交换现象,是它们在不同品种或个体之间的重复次数差异较大,易引起引物结合位点和两结合位点之间的片段长度差异^[3]。然而,这种滑动也容易引起 PCR 产物电泳时背景模糊和条带拖尾。在 ISSR-PCR 反应体系中加入 2% 去离子甲酰胺在一定程度上能够降低模糊背景,使条带清晰。这与前人的研究结果相似^[11]。

3.3 ISSR 标记能够检测出更多的 DNA 多态性,而且一套引物可以在多种植物中通用,提高了其利用率,故在遗传关系研究方面有更广阔的应用前景。Charters 等用 2 个引物获得 56 个多态条带,可以区分他们使用的 12 个油菜品种^[12]。Huang 等^[13]用 15

个引物对40个番薯植物品种扩增出2 071个ISSR片段,其中62.2%的片段为多态性的。本研究也揭示了ISSR标记的多态性。在10个地黄品种中,用10个ISSR引物扩增110条带,多态性比率为71.82%。仅用一个引物ISSR6可以鉴别出本实验所用的10个怀区地黄品种。

总之,ISSR技术是一种鉴定怀地黄种质的有效和实用的工具。它能够检测到较高的多态性。用它所得到的多态带对同物异名、同名异物地黄品种的识别,对地黄生产育种组合亲本的选择;对杜绝生产中假冒伪劣品种造成危害,以及对重要地黄种质的利用都有很大指导意义。

致谢:本研究在华美生物工程公司完成,由河南温县农业科学研究所张宝华所长提供实验材料,得到了华美生物工程公司各级领导和全体员工以及在博士后工作站进行研究的研究生们的大力支持与热情帮助。

References:

- [1] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. *Genomes*, 1994, 20: 176-183.
- [2] Li J B, Jiang L R, Li C H, et al. Comparisons of genetic analysis based on ISSR and SSR in PGMS and TGMS rice lines [J]. *Mol Plant Breed* (分子植物育种), 2003, 1(1): 42-47.
- [3] Qian W, Ge S, Hong D Y, et al. Genetic variation within and among populations of a wild rice *Oryza granulata* from China detected by RAPD and ISSR markers [J]. *Acta Bot*

Sin (植物学报), 2000, 42(7): 741-750.

- [4] Yamagishi M, Abe H, Nakano M, et al. PCR-based molecular markers in Asiatic hybrid lily [J]. *Sci Hortic*, 2002, 96: 225-234.
- [5] Sun Y, Li J P, Jin Y C, et al. Identification of south and north *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. and *Schisandra sphenanthera* Rehd et Wils by ISSR marker [J]. *Acta Chin Med Pharmacol* (中医药学报), 2003, 31(1): 29-30.
- [6] Zhou J Y. Study on chromosomes of *Rehmannia glutinosa* [J]. *Shandong Sci* (山东科学), 2002, 15(1): 20-22.
- [7] Wen X S, Zhao H Y, Li X N, et al. Symptom of viruses among different *Rehmannia glutinosa* varieties [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2002, 27(3): 225-227.
- [8] Wang G L, Fang H J. *Plant Gene Engineering Principles and Methods* (植物基因工程原理与技术) [M]. Beijing: Science Press, 1998.
- [9] Chen J L, Huang L Q, Shao A J, et al. RAPD analysis on different varieties of *Rehmannia glutinosa* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2002, 27(7): 505-506.
- [10] Zhou Y Q, Jing J Z, Li Z Y, et al. Optimization of ISSR-PCR amplification in Huai *Rehmannia glutinosa* [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin* (西北植物学报), 2004, 24: 6-11.
- [11] Qin Y X, Fu C X, Kong H H. Inter-simple sequence repeat (ISSR) analysis of different cultivars in *Myrica rubra* [J]. *J Agric Biotech* (农业生物技术学报), 2002, 10(4): 343-346.
- [12] Charters Y M, Robertson A, Wilkinson M J, et al. PCR analysis of oilseed rape cultivars (*Brassica napus* L. ssp. *oleifera*) using 5'-anchored simple sequence repeat (SSR) primers [J]. *Theor Appl Genet*, 1996, 92: 442-447.
- [13] Huang J C, Sun M. Genetic diversity and relationships of sweet potato and its wild relatives in *Jpomoea series* Batatas (Convolvulaceae) as revealed by ISSR and restriction analysis of chloroplast DNA [J]. *Theor Appl Genet*, 2000, 100: 1050-1060.

药用植物青叶胆的组织培养

黄衡宇

(湖南吉首大学生态研究所,湖南 吉首 416000)

摘要:目的 针对青叶胆野生资源受到严重破坏的情况,系统地探讨了通过组织培养为手段进行人工繁殖的方法。方法 以幼茎和老叶为外植体,在MS培养基上添加不同的激素配比,改变培养方式。结果 在所有实验方案中,对叶片来说,较适宜诱导愈伤组织的激素组合是Zt 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L+IBA 0.1 mg/L或BA 0.5 mg/L+2,4-D 0.1 mg/L+IBA 0.1 mg/L;对幼茎来说,较适宜的诱导愈伤组织的激素组合则是BA 0.02 mg/L+Kt 0.04 mg/L+IBA 0.05 mg/L;对于芽的增殖,较适宜的激素组合是BA 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L或BA 2.0 mg/L+IBA 0.1 mg/L;而根的诱导则在MS+Kt 0.01 mg/L+IBA 0.5 mg/L+NAA 1.0 mg/L培养基上进行。结论 采用组织培养方式可进行青叶胆的快速繁殖,为确保这一珍稀药用植物资源的保护和可持续利用提供有效途径。

关键词:青叶胆;组织培养;愈伤组织;芽丛

中图分类号:R282.13

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2005)02-0261-05