

绞股蓝叶片分化与植株再生

赵瑞强¹, 凌征柱², 罗育¹, 李雄英¹, 蒋军富¹, 吴耀生^{1*}

(1. 广西医科大学, 广西南宁 530021; 2. 广西药用植物园, 广西南宁 530023)

摘要:目的 建立高效稳定的绞股蓝受体系统, 为绞股蓝基因转化研究奠定基础。方法 以五叶绞股蓝 *Gynostemma pentaphyllum* 叶片作为外植体, 采用不同配比激素的MS培养基进行诱导培养获得丛生芽, 进而生根获得再生植株。结果 采用MS+6-BA 1.0 mg/L培养基时, 绞股蓝叶片分化频率最高(40%), MS+6-BA 1.0 mg/L适合绞股蓝丛生芽继代增殖, 1/2 MS适宜诱导生根获得健全再生植株。结论 为利用根癌农杆菌介导法进行绞股蓝基因转化建立了稳定的直接分化再生系统。

关键词:绞股蓝; 叶片分化; 植株再生**中图分类号:**R282.21**文献标识码:**A**文章编号:**0253-2670(2008)05-0757-03Blade differentiation and plantlet regeneration of *Gynostemma pentaphyllum*ZHAO Rui-qiang¹, LING Zheng-zhu², LUO Yu¹, LI Xiong-ying¹, JIANG Jun-fu¹, WU Yao-sheng¹

(1. Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2. Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plants, Nanning 530023, China)

Abstract: **Objective** To construct a stably-performing and high-efficiency regeneration system of *Gynostemma pentaphyllum* and lay a foundation for the gene transformation of it. **Methods** The blades of five-leaf *G. pentaphyllum* were used as the explants and cultured in MS media with different portions of hormone to induce fascicled-bud, root and plantlet regeneration. **Results** The medium suitable for inducing the blade differentiation of *G. pentaphyllum* was MS+6-BA 1.0 mg/L and for the frequency of blade differentiation could reach 40%. The cultural medium MS+6-BA 1.0 mg/L was suitable for the sub-multiplication of fascicled-bud and the medium 1/2 MS for root inducement and the plantlet regeneration. **Conclusion** A stably-performing acceptor system of the direct differentiation for *Agrobacterium tumefaciens* mediated gene transformation of *G. pentaphyllum* blades is constructed.

Key words: *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino; blade differentiation; plantlet regeneration

绞股蓝 *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino 为葫芦科绞股蓝属的草质藤本植物, 是五加科以外植物中发现含有人参有效成分的为数不多的一种植物药。对绞股蓝的化学成分研究证实, 绞股蓝含有80余种单体皂苷, 均属达玛烷醇类结构, 可视为人参二醇或人参三醇的异构体。其中绞股蓝皂苷Ⅲ、Ⅳ、Ⅶ、Ⅺ, 绞股蓝皂苷元V-AH分别与人参皂苷Rb₁、Rb₃、Rd、F₂、Rg₃为同一化合物。绞股蓝皂苷I酶解可得人参皂苷K。全世界已发现13个绞股蓝品种, 中国占11种, 主产于中国秦岭山区和江南各省, 尤其是西南地区, 绞股蓝资源极为丰富, 被誉为“南方人参”。经国内近年来药理和临床方面的研究证明, 绞股蓝有如下药理作用: ①抗肿瘤; ②抗应激

作用; ③抗心肌缺血、缺氧作用; ④降低血脂、抑制肥胖作用; ⑤清除皮质激素副作用, 增强机体免疫功能; ⑥抗衰老、延长寿命; ⑦护肝作用; ⑧抗突变作用; ⑨镇静、止痛、抗紧张等作用^[1]。国内学者对绞股蓝离体分化培养做了不少研究, 但大多是用于快速繁殖上的茎尖或器官培养^[2~4], 而通过分化途径再生植株的报道不多。笔者以五叶绞股蓝叶片为材料建立分化频率高且培养方法简单的再生体系, 旨在为利用转基因技术进行品种改良打下基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料: 绞股蓝无菌苗(由广西药用植物园凌征柱教授提供)叶片作为外植体。

1.2 试验方法

收稿日期: 2007-07-30

基金项目: 广西区自然科学基金(桂科基0575065); 中科院植物生理生态研究所开放课题

作者简介: 赵瑞强(1976—), 男, 河南洛阳人, 硕士研究生, 从事药用植物分子生物学研究。 E-mail: ruiqiang1223@sina.com.cn

* 通讯作者 吴耀生 Tel: (0771) 5358817 E-mail: wuyaosheng03@sina.com

1.2.1 不同激素组合的培养基对叶片分化的诱导: 绞股蓝的茎尖^[3]、有节茎段^[4]、带腋芽茎段^[5]组织培养采用MS培养基并配合使用6-BA与NAA,所以应用MS培养基为基本培养基,激素以6-BA、NAA为主,考虑到细胞分裂素的种类对不同植物的敏感性不同,再设置3种培养基,包含ZT或KT。将所选绞股蓝叶片在无菌条件下做不同部位切口并转入7种固体培养基中,见表1。T系列培养基中,含蔗糖3%,琼脂0.8%。每种培养基15个培养皿,每皿2块叶片,培养温度(25±1)℃,采用日光灯照明,光照时间:16 h/d,光照强度:30~40 μmol/(m²·s)。

1.2.2 不同BA浓度对叶片分化的诱导:在1.2.1实验结果的基础上,将绞股蓝叶片在无菌条件下从叶柄处切开并将切口部位插入培养基中,设置7种培养基,见表2。

表1 不同激素组合的培养基

Table 1 Media combined with different hormones

培养基编号	培养基组成	培养基编号	培养基组成
T ₁	MS + BA 1.0 mg/L + NAA 0.05 mg/L	T ₅	MS + BA 2.0 mg/L + KT 2.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L
T ₂	MS + BA 2.0 mg/L	T ₆	MS + ZT 0.5 mg/L + KT 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L
T ₃	MS + BA 2.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L	T ₇	MS + ZT 1.0 mg/L + KT 1.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L
T ₄	MS + BA 2.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L		

表2 不同6-BA浓度诱导培养基

Table 2 Media induced of 6-BA in different concentration

培养基编号	培养基组成	培养基编号	培养基组成
S ₁	MS0	S ₅	MS + BA 3.0 mg/L
S ₂	MS + BA 0.5 mg/L	S ₆	MS + BA 4.0 mg/L
S ₃	MS + BA 1.0 mg/L	S ₇	MS + BA 5.0 mg/L
S ₄	MS + BA 2.0 mg/L		

S系列培养基中,含蔗糖3%,琼脂0.8%。每种培养基15瓶,每瓶2片叶片,培养温度(25±1)℃,采用日光灯照明,光照时间:12 h/d,光照强度:20~25 μmol/(m²·s)。培养40 d左右统计不定芽分化情况。

1.2.3 丛生芽的继代增殖:根据离体培养结果,将诱导产生的芽丛带叶片转入新鲜继代培养基(MS+BA 1.0 mg/L)中培养。

1.2.4 分化苗生根:继代增殖培养后,一部分材料用于继续增殖继代培养,一部分壮芽苗分成单株转接到1/2 MS培养基生根。

2 结果

2.1 叶片分化:对转入各培养基的叶片进行观察,约30 d后在T₂(MS+BA 2.0 mg/L)培养基中有2

个叶片分化出芽(图1)。出芽部位位于叶柄根部,见图1中画圈所示。

2.2 不同BA浓度对叶片分化的诱导:经过45 d左右的诱导培养,在叶片叶柄根部长出芽丛,见图2。通过BA不同质量浓度试验,筛选出效果最好的培养基为MS+BA 1.0 mg/L。由表3可见,几种培养基都可以诱导叶片分化,S₃号培养基优于其他几种培养基。表明绞股蓝的叶片分化诱导对BA的质量浓度有较宽的适应范围。

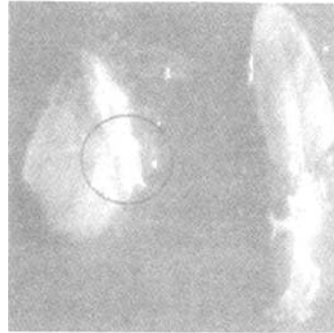


图1 绞股蓝叶片分化(诱导30 d)画圈所示为分化部位
Fig. 1 Blade differentiation of *G. pentaphyllum* (induced for 30 d), position of differentiation: showing as red circle

图2 绞股蓝叶片分化(诱导45 d)

Fig. 2 Blade differentiation of *G. pentaphyllum* (induced for 45 d)

2.3 丛生芽的继代增殖:60 d后芽丛增生见图3。将从生芽切割成小芽丛,转入新鲜继代培养基,约30 d后,芽丛增生,随后长满培养基表面,如此再将丛生芽在相同成分的新鲜培养基上,不断切分继代,芽的数量即能得到大量的增殖,见图4。

2.4 分化苗生根:试验中,以1/2 MS的生根培养基最好,发根及成苗壮苗的速度最快,见图5。其他培养基包括继代培养基,如不及时转瓶,也能获得生根苗,但速度慢。表明绞股蓝比较容易诱导生根。

表3 不同6-BA浓度对叶片分化的影响

Table 3 Effect of 6-BA at different concentration on blade differentiation

培养基代号	培养基成分/(mg·L ⁻¹)	外植体数	30 d后分化叶片数	分化率/%
S ₁	MS0	28	0	0
S ₂	MS+BA 0.5	30	4	13
S ₃	MS+BA 1.0	30	12	40
S ₄	MS+BA 2.0	26	3	11
S ₅	MS+BA 3.0	30	3	10
S ₆	MS+BA 4.0	24	3	12.5
S ₇	MS+BA 5.0	28	2	7

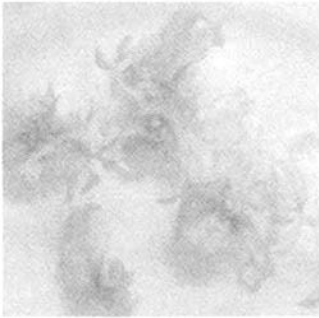


图3 绞股蓝叶片分化(诱导60 d)

Fig. 3 Blade differentiation of *G. pentaphyllum* (induced for 60 d)



图4 绞股蓝继代培养

Fig. 4 Secondary culture of *G. pentaphyllum*



图5 绞股蓝生根培养

Fig. 5 Rooting of tissue culture of *G. pentaphyllum*

2.5 移栽:当生根苗根系发达,苗高5~7 cm时,即可出瓶移栽。炼苗2~3 d和不炼苗直接移栽成活率一样^[4]。

3 讨论

自20世纪70年代末,日本竹本常松教授报道了70余种绞股蓝皂苷的分离与鉴定,为绞股蓝的药用研究奠定了基础。绞股蓝的慢性毒性研究显示其水提取物在实验期间未产生明显的毒性^[6],绞股蓝的药用价值愈加显现。利用生物技术育种手段将不断加快绞股蓝的育种工作,但从目前人们的研究结果来看,这方面的进展并不尽如人意,其原因之一在于缺乏高效的组织培养再生体系。通过本实验初步建立了绞股蓝的离体再生系统,对于进行绞股蓝的遗传转化等研究具有重要的参考价值。下一步可以利用转基因技术将人参等五加科植物次生代谢物代谢途径中的关键酶转入绞股蓝中,使其人参皂苷等有效成分合成增加。但目前分化效率仍只有40%左右,用于转化体系还不够理想,因此在今后的实验中需要进一步优化培养基条件,提高分化效率。

致谢:本研究得到中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所植物分子遗传国家重点实验室开放课题的资助,并得到陈晓亚老师领导的植物次生代谢调控和棉花生物化学研究组的大力支持,王凌健老师给予具体指导。

参考文献:

- [1] 张 素,王明霞. 绞股蓝的研究与利用 [J]. 北京中医药大学学报, 1991, 14(4): 46-49.
- [2] 朱素芹,谢焕松,曹云英,等. 绞股蓝快速繁殖的新方法 [J]. 种子, 2004, 23(11): 96.
- [3] 刘松青,武成荣. 绞股蓝茎尖组织培养和植株再生研究 [J]. 中国野生植物资源, 2000, 19(6): 60-61.
- [4] 刘晓燕. 绞股蓝的茎段培养及试管繁殖 [J]. 耕作与栽培, 2000(1): 46-47.
- [5] 陈德海,杨觉民. 绞股蓝组织培养的研究 [J]. 亚热带植物科学, 1993, 22(1): 28-33.
- [6] Attawish A, Chivapat S. Chronic toxicity of *Gynostemma pentaphyllum* [J]. *Fitoterapia*, 2004, 75(6): 539-551.

绞股蓝叶片分化与植株再生

作者：[赵瑞强](#), [凌征柱](#), [罗育](#), [李雄英](#), [蒋军富](#), [吴耀生](#), [ZHAO Rui-qiang](#), [LING Zheng-zhu](#), [LUO Yu](#), [LI Xiong-ying](#), [JIANG Jun-fu](#), [WU Yao-sheng](#)

作者单位：[赵瑞强, 罗育, 李雄英, 蒋军富, 吴耀生, ZHAO Rui-qiang, LUO Yu, LI Xiong-ying, JIANG Jun-fu, WU Yao-sheng \(广西医科大学, 广西南宁, 530021\)](#), [凌征柱, LING Zheng-zhu \(广西药用植物园, 广西, 南宁530023\)](#)

刊名：[中草药](#) 

英文刊名：[CHINESE TRADITIONAL AND HERBAL DRUGS](#)

年, 卷(期): 2008, 39 (5)

被引用次数: 1次

参考文献(6条)

1. [张素;王明霞](#) [绞股蓝的研究与利用](#) 1991 (04)
2. [朱素芹;谢焕松;曹云英](#) [绞股蓝快速繁殖的新方法](#)[期刊论文]-[种子](#) 2004 (11)
3. [刘松青;武成荣](#) [绞股蓝茎尖组织培养和植株再生研究](#) 2000 (06)
4. [刘晓燕](#) [绞股蓝的茎段培养及试管繁殖](#) 2000 (01)
5. [陈德海;杨觉民](#) [绞股蓝组织培养的研究](#) 1993 (01)
6. [Attawish A;Chivapat S](#) [Chronic toxicity of Crynostemma pentaphyllum](#)[外文期刊] 2004 (06)

本文读者也读过(10条)

1. [袁国华](#), [魏锦](#), [周京国](#), [郭晓兰](#), [杨明辉](#), [YUAN Guohua](#), [WEI Jin](#), [ZHOU Jingguo](#), [GUO Xiaolan](#), [YANG Minghui](#) [绞股蓝诱导人肝细胞瘤细胞凋亡](#)[期刊论文]-[中德临床肿瘤学杂志 \(英文版\)](#) 2006, 5 (3)
2. [刘贤铭](#), [王铁僧](#) [绞股蓝及其混淆品种的鉴别](#)[期刊论文]-[时珍国医国药](#) 2006, 17 (4)
3. [刘世彪](#), [陶民](#), [姜业芳](#), [黄衡宇](#), [LIU Shi-Biao](#), [TAO Min](#), [JIANG Ye-Fang](#), [HUANG Heng-Yu](#) [五柱绞股蓝的组织培养和快速繁殖](#)[期刊论文]-[植物生理学通讯](#) 2007, 43 (2)
4. [何雍琴](#), [迟淑娟](#), [杨正安](#), [王仕玉](#), [邵珠华](#), [张应华](#), [HE Yong-qin](#), [CHI Shu-juan](#), [YANG Zheng-an](#), [WANG Shi-yi](#), [SHAO Zhu-hua](#), [ZHANG Ying-hua](#) [不同浓度6-BA和AgNO3对甘蓝叶片不定芽分化的影响](#)[期刊论文]-[云南农业大学学报](#) 2011, 26 (3)
5. [钟卫干](#), [韦玉兰](#), [刘靖](#), [贺菽嘉](#), [ZHONG Wei-gan](#), [WEI Yu-lan](#), [LIU Jing](#), [HE Shu-jia](#) [广西地区人群AGT基因多态性与2型糖尿病肾病关系的研究](#)[期刊论文]-[广西中医学院学报](#) 2007, 10 (4)
6. [赵瑜](#), [肖娅萍](#), [ZHAO Yu](#), [XIAO Ya-ping](#) [不同处理对绞股蓝种子萌发的影响](#)[期刊论文]-[中草药](#) 2007, 38 (11)
7. [吴登攀](#) [壮药绞股蓝对神经系统影响的研究进展](#)[期刊论文]-[中国民族医药杂志](#) 2008, 14 (9)
8. [罗育](#), [李雄英](#), [吴耀生](#), [蒋军富](#), [赵瑞强](#), [曾麒燕](#), [LUO Yu](#), [LI Xiong-ying](#), [WU Yao-sheng](#), [JIANG Jun-fu](#), [ZHAO Rui-qiang](#), [ZENG Qi-yan](#) [RAPD在绞股蓝种类鉴别应用上的条件摸索](#)[期刊论文]-[时珍国医国药](#) 2008, 19 (2)
9. [张建军](#), [吴海清](#), [龚祝南](#), [石泽](#), [杨永康](#) [不同类群绞股蓝的形态学研究](#)[期刊论文]-[江苏农业研究](#) 2000, 21 (4)
10. [周娟](#), [罗育](#), [吴耀生](#), [李科志](#), [蒋军富](#), [徐鹏](#), [Zhou Juan](#), [Luo Yu](#), [Wu Yaosheng](#), [Li Kezhi](#), [Jiang Junfu](#), [Xu Peng](#) [8份广西产绞股蓝种质的RAPD引物筛选及其遗传多样性分析](#)[期刊论文]-[基因组学与应用生物学](#) 2010, 29 (2)

引证文献(1条)

1. [李玉萍](#), [胡雪燕](#), [胡业华](#), [孙利珍](#), [韩笑](#), [吴江涛](#) [绞股蓝组织培养技术研究进展](#)[期刊论文]-[江苏农业科学](#) 2012 (9)