

噻重氮苯基脲对贯叶金丝桃胚性愈伤诱导和分化的影响

汪福源¹, 唐 宁², 宋东杰²

(1. 中国药科大学 高等职业技术学院, 江苏 南京, 211198; 2. 南京晓庄学院 生物化工与环境工程学院, 江苏 南京, 211171)

摘 要:系统研究了不同浓度噻重氮苯基脲(TDZ)对贯叶金丝桃胚性愈伤的诱导和植株再生的影响。结果表明:诱导胚性愈伤的最适外植体为叶柄,诱导率可达100%。在诱导胚性愈伤和分化的最适培养基MS+0.05 mg/L TDZ+0.2 mg/L NAA上,不定芽分化率为55%。第1代培养基上,愈伤增殖迅速,绿色的胚性细胞团数目从原来的单个生长提高为平均5.6个。经2、3代培养,愈伤停止生长,胚性细胞团数量逐渐减少。

关键词:贯叶金丝桃;噻重氮苯基脲(TDZ);愈伤组织;不定芽

中图分类号:S 567.23⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)03-0163-03

贯叶金丝桃(*Hypericum perforatum* L.)属藤黄科多年生草本植物,有疏肝解郁、清热利湿、消肿通乳等功效^[1]。1984年,Suzuki等^[2]首次发现贯叶金丝桃具有抗抑郁作用,疗效显著、副作用小。随着研究的深入,贯叶金丝桃的抗抑郁、抗病毒、抗肿瘤等作用越来越受到人

们的关注^[3]。其提取物是近年来欧美最畅销的植物药之一,美国《草药典》(American Herbal Pharmacopoeia)和德国《DAC》也收载此植物药。现有文献对贯叶金丝桃的研究主要集中在提取工艺、含量测定和药理活性方面,在离体培养再生植株方面报道较少。

噻重氮苯基脲(N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea, Thidiazuron, TDZ)是一种新型高效的生物调节剂,具有细胞分裂素和生长素的双重作用^[4],魏岳荣等^[5]研究发现,0.2 μmol/L TDZ可有效地改善香蕉体细胞

第一作者简介:汪福源(1978-),男,博士,讲师,现主要从事中药生物技术研究工作。

收稿日期:2011-11-23

[4] 梁敬钰,冯锋,叶文才,等.天然药物化学与指导[M].北京:中国医药科技出版社,2003.

[5] 甄汉深,莫绥恒,周燕园,等.青天葵化学成分定性鉴别的试验研究[J].广西中医学院学报,2007;10(1):53-55.

[6] 白洁,王艳英,帕提古丽·马合木提,等.天山花楸全株化学成分定性研究[J].食品科学基础研究,2009,30(3):71-73.

[7] 四川省绵阳市食用菌研究所.黄绿蜜环菌的相关资料及其研究[EB/OL].http://www.chinavivers.com/html/298.html.

[8] 北京中医学院.中药化学[M].上海:上海人民出版社,1976.

[9] 谢平,罗永明.天然药物化学实验技术[M].1版.南昌:江西科学技术出版社,1993.

术出版社,1993.

[10] Weinges K, Schick H, Schilling G, et al. Compisition of an anthocyan concentrate from *Aroniam elanocarpa* Elliot X-ray analysis of tetraacetyl par-rasorboside [J]. Eur J Org Chem, 1998(1):189-192.

[11] Krolikowska M, Kamecki J. Phytochemical analysis of the iflurescence of mountain ash(rowan tree), *Sorbus aucuparia*[J]. RocZChem, 1973, 47(7/8):1375.

[12] 新疆维吾尔自治区卫生厅.新疆中草药[M].乌鲁木齐:新疆人民出版社,1975.

Qualitative Analysis on Active Ingredients of *Armillaria luteo-virens*

BAI Shi-jun, BAO Jin-yuan

(College of Chemistry and Life Science, Qinghai Nationality University, Xining, Qinghai 810007)

Abstract: Water extraction, alcohol extraction and petroleum ether extraction were used in qualitative analysis on chemical ingredients of *Armillaria luteo-virens*. The results showed that *Armillaria luteo-virens* was rich in protein, amino acids, sugars, alkaloids and meanwhile a small amount of organic acids, flavone, cardiac glycosides, steroids, triterpenes, glycosides and saponins, yet just very small amount of naphtha, coumarin terpenes, tannins and phenols. The active ingredients of *Armillaria luteo-virens* were analyzed and served as reference of full utilization of its nutritional, medical and economic value.

Key words: *Armillaria luteo-virens*; active ingredients; qualitative analysis

胚的萌发率和植株转换率,可以促进植物芽的再生和繁殖。现以贯叶金丝桃的叶柄、叶片和茎段为外植体,用 TDZ 诱导胚性愈伤的产生,并观察胚性愈伤分化不定芽的情况,旨在探索 TDZ 在贯叶金丝桃离体培养中对胚性愈伤的诱导能力和分化能力,为该植物的优良品种选育打下良好基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验用贯叶金丝桃原植物采集于贵州金沙,引种至南京方山地区试验苗圃内,经中国药科大学遗传育种研究室鉴定为藤黄科植物 *Hypericum perforatum* L.。所用试剂 6-苄基嘌呤(6-Benzylaminopurine, BAP)、吲哚乙酸(Indolylacetic acid, IAA)、萘乙酸(Naphthaleneacetic Acid, NAA)、TDZ 为 Sigma 公司产品,其它试剂均为国产化学纯或分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 试验设计 以试管苗的叶柄、叶片和茎段为外植体,以 MS 为基本培养基(含蔗糖 3%, pH 5.8),在其基础上添加不同浓度的 TDZ 和 NAA 诱导愈伤组织和不定芽增殖,培养 30 d,观察切口愈伤形成和不定芽分化情况,统计愈伤诱导率、愈伤大小、愈伤分化率、不定芽萌发率 and 不定芽增殖率。

1.2.2 无菌材料的获得 选取 1.5~2.0 cm 大小的贯叶金丝桃外植体幼芽,经 0.1% HgCl₂ 消毒 15 min,无菌水冲洗 5 次后,接种在含 BAP 1.0 mg/L+IAA 0.1 mg/L 的 MS 培养基上,得到无菌试管苗作为试验材料。培养条件:每天光照 14 h,光照强度 1 500 Lx,培养温度(25±1)℃。

1.3 统计分析

试验数据使用 Spss 18.0 分析软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同外植体诱导愈伤组织的效果

将叶柄、叶片和茎段分别接种在 MS+0.05 mg/L TDZ +0.2 mg/L NAA 培养基上,10 d 后多数材料切口处产生淡绿色愈伤组织。20 d 后有明显变化,叶柄周身被绿色胚状体覆盖;叶片切口处由边缘至中心部分形成胚性愈伤,部分愈伤组织发白,有玻璃化现象;茎段大部分发白,其上偶有绿色芽点点缀。30 d 后,叶柄、叶片和茎段均可不同程度地诱导出愈伤组织,其中叶柄可 100% 诱导产生愈伤组织,茎段的诱导率仅为 53%。另外,茎段诱导出的愈伤组织分散发白,不能分化为不定芽,叶柄和叶片诱导出的愈伤组织则有不同的分化率,同时叶柄的生长率明显高于叶片,且其诱导出的愈伤组织分化成不定芽的百分率也最高(表 1)。因此,认为贯叶金丝桃的叶柄是诱导胚性愈伤的最佳外植体。

表 1 贯叶金丝桃不同外植体诱导愈伤的结果比较

外植体	接种外植体数/块	愈伤发生数/块	愈伤组诱导率/%	接种外植体数/块	愈伤组分化率/%	接种量/g	收获量/g	生长率/%
叶柄	40	40	100	22	55	0.089±0.012	2.148±0.327	23.13
叶片	40	36	90	5	12.5	0.092±0.013	1.449±0.190	14.75
茎段	40	21	53	0	0	0.098±0.010	0.985±0.101	9.05

2.2 不同浓度 TDZ 对愈伤组织诱导和分化的影响

以叶柄为外植体,接种到添加不同浓度 TDZ 的 MS 培养基上,观察愈伤诱导和分化情况。由表 2 可知,TDZ 的浓度对贯叶金丝桃叶柄诱导愈伤组织和分化影响很大。浓度过高或过低均影响愈伤的诱导和分化,浓度为 0.04~0.07 mg/L 时均能达到 100% 的诱导率,但愈伤颜色和质量差别较大,低浓度时愈伤颜色发白,高浓度时褐化严重,均不利于分化,0.05 mg/L 时能够达到较好的分化率。

表 2 TDZ 浓度对愈伤诱导和不定芽分化的影响

TDZ 浓度/ mg·L ⁻¹	接种外植体数/块	愈伤发生数/块	愈伤组诱导率/%	接种外植体数/块	愈伤组分化率/%	愈伤生长情况
0	40	0	0	0	0	无愈伤产生
0.01	40	2	5.0	0	0	愈伤较少,颜色发白
0.02	40	18	45.0	4	10	颜色发白,有少量绿色胚状体产生
0.03	40	33	82.5	7	17.5	颜色发白,有少量绿色胚状体产生
0.04	40	40	100.0	11	27.5	有部分绿色胚状体产生
0.05	40	40	100.0	15	37.5	绿色胚状体较多,有利于分化
0.06	40	40	100.0	14	35.0	有褐化现象,有绿色胚状体产生
0.07	40	40	100.0	9	22.5	有褐化现象
0.08	40	37	92.5	5	12.5	分化率低,褐化严重
0.09	40	33	82.5	1	2.5	质地变硬,褐化严重
0.10	40	30	75.0	0	0	质地变硬,褐化严重

2.3 TDZ 和 NAA 对愈伤组织诱导和分化的影响

由表 3 可知,在含 0.05 mg/L TDZ 的 MS 培养基上再添加不同浓度的 NAA 对愈伤组织的诱导影响不大,均能达到 100% 的诱导率,但对分化率有显著影响。NAA 小于 0.1 mg/L 或高于 0.4 mg/L 时,不定芽稀少,生长缓慢,不利于丛生芽的扩繁。在设计的 6 种培养基中,MS+0.05 mg/L TDZ +0.2 mg/L NAA 较为适宜,在此培养基上接种的贯叶金丝桃叶柄 30 d 后能够达到较为理想的诱导率和分化率。

2.4 TDZ 多代培养对愈伤生长和胚性的影响

叶柄接种在胚性愈伤诱导培养基(MS+TDZ 0.05 mg/L+NAA 0.2 mg/L)上,7~10 d 在切口形成愈伤组织,10~15 d 为愈伤迅速增长期,15~20 d 为缓慢增长期,20 d 后开始出现不定芽。以 20 d 为继代周期,切取具有单个芽点的愈伤块在相同培养基上进行连续 3 代培养,诱导获得的初代表面呈绿色;第 1 代培养基上,10 d 后表面生长出黄绿色胚性愈伤,20 d 后愈伤生长迅速,愈伤中胚性细胞团数量平均达 5.6 个,30 d 后胚性细胞团分化为不定芽。经 2、3 代培养,愈伤停止生长,愈伤表面绿色胚性细胞团数量逐渐减少,最后褐化死亡(图 1)。

表3 TDZ 和不同浓度 NAA 配比对愈伤诱导和不定芽分化的影响

TDZ 浓度 /mg · L ⁻¹	NAA 浓度 /mg · L ⁻¹	接种外 植体数 /块	愈伤发 生数 /块	愈伤组 织诱导 率/%	接种外 植体数 /块	愈伤组 织分化 率/%	不定芽生长情况
0.05	0	40	40	100	15	37.5	稀少,生长缓慢
0.05	0.1	40	40	100	18	45.0	稀少,生长较旺盛
0.05	0.2	40	40	100	22	55.0	较多,生长旺盛
0.05	0.3	40	40	100	20	50.0	较少,生长较旺盛
0.05	0.4	40	40	100	10	25.0	稀少,生长缓慢
0.05	0.5	40	40	100	6	15.0	稀少,矮小,生长缓慢

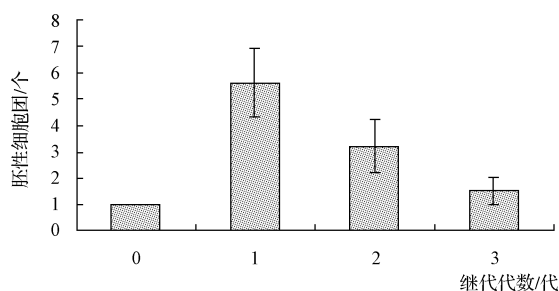


图1 愈伤组织在相同培养基上继代生长

3 结论与讨论

关于贯叶金丝桃的组织培养研究曾有报道^[6],但大多数研究通常使用 BAP 和 NAA 诱导胚性愈伤和不定芽分化,使用 TDZ 的报道较为少见^[7]。该试验探索了 TDZ 对贯叶金丝桃离体培养过程中外植体诱导胚性愈伤组织和不定芽分化的影响,结果表明,诱导胚性愈伤的最适外植体为叶柄,诱导胚性愈伤产生的最适培养基组成为 MS+0.05 mg/L TDZ+0.2 mg/L NAA。

单独使用 TDZ 能够使叶柄产生愈伤组织,浓度低于 0.03 mg/L 时愈伤颜色发白,质地疏松,不利于分化,可以考虑将其作为细胞悬浮培养的诱导培养基;浓度高于 0.08 mg/L 时愈伤质地坚硬,同时褐化严重,抑制愈

伤的分化;适宜的愈伤诱导和分化的 TDZ 浓度为 0.05 mg/L。但整体来说,单独使用 TDZ 的愈伤分化率依然较低,有研究报道 TDZ 与 NAA 配合使用效果理想^[8]。试验表明,在 MS 培养基中添加 0.05 mg/L TDZ 和 0.2 mg/L NAA 后,能使贯叶金丝桃的愈伤分化率从 37.5% 提高到 55%。

胚性愈伤的诱导是植株再生的关键。该试验通过 TDZ 的合理使用获得了胚性愈伤并实现胚性愈伤的分化再生,目前单块愈伤最高可获得 10 个不定芽。该试验只有部分胚性细胞团实现再生,这可能与使用材料是组培苗,诱导的胚性愈伤发育和生长不完全,胚性细胞的活力不强等原因有关^[9]。提高胚性愈伤的再生率是进一步值得研究的问题。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010.
- [2] 李艳, 曹学丽, 付鹏, 等. 贯叶金丝桃活性成分及其分离纯化与检测方法的研究进展[J]. 药学进展, 2007, 32(1): 15-20.
- [3] 胡倩, 刘晓惠, 王林泉, 等. 贯叶金丝桃的药理作用及临床应用进展[J]. 中医研究, 2006, 19(7): 56-58.
- [4] 任如意, 王书臻, 司徒琳莉, 等. 噻重氮苯基脲对文冠果愈伤组织诱导与分化的影响[J]. 北方园艺, 2011(6): 127-129.
- [5] 魏岳荣, 杨护, 黄秉智, 等. Picloram, ABA 和 TDZ 对香蕉体细胞胚胎发生的影响[J]. 园艺学报, 2007, 34(1): 81-86.
- [6] 王亦非, 陆瑞菊, 周润梅, 等. 贯叶连翘无菌苗茎尖诱导变异体研究[J]. 中国农学通报, 2007, 23(6): 157-159.
- [7] 张娜. 贯叶连翘植株再生体系的建立及 *Hyp* 基因表达的初步研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2005: 23-28.
- [8] Charchoglyana, Abrahamiana, Fujii I, et al. Differential accumulation of hyperforin and secohyperforin in *Hypericum perforatum* tissue cultures[J]. Phytochemistry, 2007, 68(21): 2670-2677.
- [9] 裘珍飞, 曾炳山, 李湘阳, 等. TDZ 对巨尾桉 (GL9) 胚性愈伤组织诱导和再生的影响[J]. 林业科学研究, 2009, 22(5): 740-743.

Effects of Different Concentrations of TDZ on Embryogenic Callus Induction and Differentiation of *Hypericum perforatum* L.

WANG Fu-yuan¹, TANG Ning², SONG Dong-jie²

(1. School of Higher Vocational and Technical, China Pharmaceutical University, Nanjing, Jiangsu 211198; 2. School of Biochemistry and Environmental Engineering, Nanjing Xiaozhuang College, Nanjing, Jiangsu 211171)

Abstract: The embryogenic callus induction and shoot regeneration of *Hypericum perforatum* L. were studied systematically through different concentrations of TDZ. The results indicated that the most suitable part for inducing embryogenic callus was the petiole. The inducing rate reached as high as 100%. The optimized medium for inducing embryogenic callus and plant regeneration was MS + 0.05 mg/L TDZ + 0.2 mg/L NAA. The adventitious buds differentiating rate was 55%. The size of callus can increase greatly in the first subculture on the optimized inducing medium and the average number of green-coloured masses of embryogenic cells on each callus was 5.6. On the second and third subculture, callus stopped growing further and the number of masses of embryogenic cells decreased gradually.

Key words: *Hypericum perforatum* L.; TDZ; callus; adventitious bud