

夏天无愈伤组织诱导的初步研究

王 飞, 朱小兰, 何莎莎, 廖 燕, 黄胜和

(南昌大学 抚州医学院, 江西 抚州 344000)

摘 要:以传统中药夏天无为试材,研究了不同消毒方法、不同外植体和不同激素配比对其愈伤组织诱导的影响。结果表明:叶片消毒以 0.1%氯化汞浸泡 10 min 较好,块茎、叶柄以消毒 8 min 为好;叶柄作为外植体比块茎、叶片更适合;叶片诱导愈伤组织的最佳激素配比为 0.5 mg/L NAA+1.5 mg/L 6-BA,诱导率为 43.3%,而叶柄诱导愈伤组织的最佳激素配比为 1.0 mg/L NAA+1.5 mg/L 6-BA,诱导率高达 80%。

关键词:夏天无;组织培养;愈伤组织

中图分类号:S 567.23⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)15-0125-03

夏天无是罂粟科紫堇属多年生草本植物伏生紫堇(*Corydalis decumbens* (Thunb.) Pers.)的干燥块茎,主产地为江西、湖南、浙江、江苏,其中以江西产质量最佳,具有通络、活血祛瘀、行气止痛、降压解痉的功效,可以松弛平滑肌、抑制血小板聚集、抗心律失常、镇痛、消炎、保肝、抗疟,并对突触体、囊泡摄取多巴胺具有抑制作用,用于治疗高血压、中风偏瘫、跌打损伤、半身不遂和风湿性关节炎等症^[1-3],其主要有效成分为生物碱,包括原阿片碱(Pro)、延胡索乙素(THP)等 20 余种叔胺类和季胺类生物碱^[4-6]。目前,夏天无在临床应用上已开发出夏天无片、夏天无注射液、夏天无眼药水等,而且一些新剂型不断涌现^[7-8],致使夏天无药材需求量日益增大。人们除收购野生品种外,还进行了大量的人工栽培,但仍满足不了市场需求。传统的人工栽培以块茎繁殖,用种量大,成本较高,且易传播病害和引起品种退化,还消耗了一部分药材资源,加大了供需矛盾^[9]。因而夏天无栽培急需进行组织培养、种质育种和分子生物学等研究,但相关研究尚鲜见报道。因此,该研究以传统中药夏天无为试材,研究了不同消毒方法、不同外植体和不同激素配比对其愈伤组织诱导的影响,以期为夏天无优质种苗工厂化生产、药用成分的发酵及分子生物学研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

夏天无种苗取自江西天施康中药股份有限公司育

苗基地。NAA、6-BA 购自上海生工生物工程有限公司,MS 基本培养基购自青岛海博生物技术有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 不同消毒方法的效果比较 将夏天无块茎、叶片、叶柄用清水冲洗干净,块茎剥去外皮。材料置于超净工作台上用 70%的酒精浸泡 30 s,无菌水冲洗 2 次,随后分别设置 4、6、8、10、12 min 5 个时间段用 0.1%氯化汞浸泡,无菌水冲洗 4 次,无菌滤纸吸干,叶柄切成约 0.5 cm 长的小段,叶片切成约 0.5 cm×0.5 cm 的小片,块茎切成约 0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm 的小块。切好的材料分别接种于 MS+0.1 mg/L NAA+1.0 mg/L 6-BA 和 MS+0.1 mg/L NAA+1.5 mg/L 6-BA 的培养基中,每处理 30 个材料。光照培养箱中培养 7 d 后统计污染率。

1.2.2 不同外植体对愈伤组织诱导的影响 分别以块茎、叶片、叶柄为外植体,以 MS 为基本培养基,附加蔗糖 30 g/L、琼脂 7 g/L, pH 5.8,每处理 30 个材料,研究外植体对愈伤组织诱导的影响。

1.2.3 不同激素配比对愈伤组织诱导的影响 激素配比见表 1(Z1~Z16 为激素配比编号),研究不同激素配比对愈伤组织诱导的影响。培养温度为(25±1)℃,光照强度 2 000 lx,光照时间 12 h/d,培养 30 d 后计算诱导率。

表 1 培养基中的激素配比

6-BA /mg·L ⁻¹	NAA/mg·L ⁻¹			
	0.0	0.1	0.5	1.0
0.5	Z1	Z2	Z3	Z4
1.0	Z5	Z6	Z7	Z8
1.5	Z9	Z10	Z11	Z12
2.0	Z13	Z14	Z15	Z16

1.3 项目测定

污染率=污染外植体数/接种外植体数×100%;诱

第一作者简介:王飞(1980-),男,硕士,讲师,研究方向为药学。

责任作者:黄胜和(1977-),男,博士,研究方向为植物分子生物学与基因工程。E-mail:hsh712@163.com。

基金项目:江西省抚州市科技资助项目(20126215)。

收稿日期:2013-04-10

导率=形成愈伤组织的外植体数/接种外植体数×100%。

2 结果与分析

2.1 外植体的消毒效果比较

由表2可知,块茎、叶片、叶柄消毒时间短,污染较严重;随消毒时间延长,污染率较低,但不利于后续试验。块茎、叶柄以0.1%氯化汞消毒8 min为好,叶片以浸泡10 min较好。

表2 0.1%氯化汞处理外植体不同时间的消毒效果

氯化汞处理时间 /min	块茎			叶片			叶柄		
	接种数 /个	污染数 /个	污染率 /%	接种数 /个	污染数 /个	污染率 /%	接种数 /个	污染数 /个	污染率 /%
4	60	5	8.3	60	14	23.3	60	10	16.7
6	60	7	11.7	60	7	11.7	60	4	6.7
8	60	2	3.3	60	7	11.7	60	2	3.3
10	60	1	1.7	60	3	5.0	60	1	1.7
12	60	1	1.7	60	4	6.7	60	2	3.3

2.2 不同外植体对愈伤组织诱导的影响

由于块茎内部带菌,接种20 d后污染率高达60%以上,而且伤口褐化,所以只得到了以叶片和叶柄为外植体的数据。从表3可以看出,叶片的诱导率最高为43.3%,而叶柄的诱导率高达80.0%,所以叶柄更适合作为外植体诱导愈伤组织。

表3 不同外植体与不同激素配比对愈伤组织诱导的效果

激素配比	叶片			叶柄		
	接种数 /个	愈伤数 /个	诱导率 /%	接种数 /个	愈伤数 /个	诱导率 /%
Z1	30	0	0.0	30	0	0.0
Z2	30	0	0.0	30	4	13.3
Z3	30	0	0.0	30	5	16.7
Z4	30	0	0.0	30	16	53.3
Z5	30	0	0.0	30	0	0.0
Z6	30	0	0.0	30	6	20.0
Z7	30	5	16.7	30	9	30.0
Z8	30	7	23.3	30	14	46.7
Z9	30	0	0.0	30	1	3.3
Z10	30	0	0.0	30	15	50.0
Z11	30	13	43.3	30	22	73.3
Z12	30	2	6.7	30	24	80.0
Z13	30	0	0.0	30	0	0.0
Z14	30	1	3.3	30	22	73.3
Z15	30	3	10.0	30	19	63.3
Z16	30	1	3.3	30	15	50.0

2.3 不同激素比对愈伤组织诱导的影响

在激素配比方面,由于不同因素之间存在互作作用,所以,以叶片为外植体的最佳激素配比为0.5 mg/L NAA+1.5 mg/L 6-BA(Z11),诱导率达43.3%;而叶柄诱导愈伤组织的最佳激素配比为1.0 mg/L NAA+1.5 mg/L 6-BA(Z12),诱导率高达80.0%,其次是

0.5 mg/L NAA+1.5 mg/L 6-BA(Z11)和0.1 mg/L NAA+2.0 mg/L 6-BA(Z14),此时诱导率均为73.3%。

3 结论与讨论

国家质检总局批准江西余江夏天无为余江县地理标志产品(国家质检总局,2008,第138号公告),而江西天施康中药股份有限公司完成的国家“十五”重点科技攻关项目“江西中药材规范化(GAP)种植基地—中药材夏天无种植研究”,一定程度上提高了药材品质和单产量,但仍然满足不了夏天无药材的市场需求。而包含愈伤组织诱导的组织培养不受地区、季节和温度的限制,而且繁殖速度快,为大量快速地获得种苗提供了一条高效的途径,在培育植物新种质、资源离体保存以及人造种子也有较高的应用价值^[10-11]。因此,该研究以夏天无为试材,探索了不同消毒方法、不同外植体和不同激素比对愈伤组织诱导的影响,其中叶片以0.1%氯化汞浸泡10 min较好,块茎、叶柄以消毒8 min为好;叶柄作为外植体比块茎、叶片更适合;叶片诱导愈伤组织的最佳激素配比为0.5 mg/L NAA+1.5 mg/L 6-BA,而叶柄诱导愈伤组织的最佳激素配比为1.0 mg/L NAA+1.5 mg/L 6-BA,诱导率高达80.0%。当然,对夏天无组织培养的研究还需进一步开展,例如愈伤组织诱导中其它激素(2,4-二氯苯氧基(2,4-D)、激动素(KT)等)的影响、芽和根的诱导以及一步成苗等。

参考文献

- [1] 周巧霞.夏天无的实验研究和临床应用进展[J].中国野生植物资源,2004,23(3):4-10.
- [2] 马宏达,史国兵.夏天无药理作用研究进展[J].中国药房,2008,19(36):2867-2869.
- [3] 穆军山,夏向南.复方夏天无片治疗偏头痛的临床疗效观察[J].中华保健医学杂志,2011,13(1):57-58.
- [4] Liao J, Liang W Z, Tu G S. Isolation and identification of eleven tertiary alkaloids in *Corydalis decumbens* [J]. J Chin Pharm Sci, 1995, 4(2): 57.
- [5] 曾文亮,张玲,尚立霞.夏天无化学成分的研究[J].中草药,2005,36(5):665-666.
- [6] Jeong E K, Lee S Y, Yu S M, et al. Identification of structurally diverse alkaloids in *Corydalis* species by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2012, 26: 1661-1674.
- [7] 徐卫国,李秀梅.夏天无及其制剂近10年研究进展[J].中国药业,2005,14(1):80-81.
- [8] 胡亚坤.夏天无的应用研究概述[J].辽宁中医药大学学报,2007,9(3):221-222.
- [9] 杜安,赵增吉,杜江.中药材夏天无的高产栽培技术[J].江西农业学报,2006,18(2):121.
- [10] Thorpe T. History of plant tissue culture [J]. Methods Mol Biol, 2012, 877: 9-27.
- [11] Yadav K, Singh N, Verma S. Plant tissue culture: a biotechnological tool for solving the problem of propagation of multipurpose endangered medicinal plants in India [J]. Journal of Agricultural Technology, 2012, 8(1): 305-318.

紫花苜蓿组织培养高频再生体系的建立

段亚楠, 卢福荣, 茹 艺, 李曹娜, 韩 阳

(辽宁大学 生命科学院, 辽宁 沈阳 110036)

摘 要:以紫花苜蓿品种“甘农 1 号”的子叶为外植体,研究了不同培养基和不同浓度激素对紫花苜蓿愈伤组织诱导、分化及生根的影响。结果表明:最佳愈伤组织诱导培养基为 NSH+2,4-二氯苯氧基(2,4-D) 4 mg/L+6-苄氨基嘌呤(6-BA) 0.4 mg/L+3%蔗糖+0.7%琼脂;最佳诱导愈伤组织分化培养基为 MS+2%蔗糖+0.7%琼脂;最佳诱导无根苗生根培养基为 1/2MS+萘乙酸(NAA) 0.2 mg/L+1%蔗糖+0.7%琼脂;再生植株适宜的移栽基质为营养土:草炭:蛭石=1:2:1。该研究建立了一个紫花苜蓿稳定的高频再生体系,为其作为转基因受体奠定了基础。

关键词:紫花苜蓿;子叶;组织培养;植株再生

中图分类号:S 541+.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)15-0127-03

紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)是多年生豆科牧草,也是我国乃至世界上种植最多的牧草品种。由于其具有适应性强、产量高、品质好等优点,素有“牧草之王”之美称。紫花苜蓿含有大量的粗蛋白、维生素、矿物质等营养素,具有较高的营养价值,传统的苜蓿利用中,以牲畜饲料为主,近年来苜蓿已作为天然保健食品被广泛应用。苜蓿生物技术研究,国际上始于 20 世纪 70 年代初,我国始于 20 世纪 80 年代初^[1]。通过组织培养得到一个高效的、稳定的再生体系对于通过生物技术手段改

良紫花苜蓿品质是必不可少的。Saunders 等^[2]首先从紫花苜蓿的愈伤组织上获得了再生植株,此后,开展了对苜蓿再生的广泛研究。虽然目前对紫花苜蓿再生体系的研究较多,但是已建立的再生体系的可重复性差,不符合紫花苜蓿作为转基因受体的条件,因此对紫花苜蓿再生体系的研究仍具有重要意义。由于“甘农 1 号”稳定性好,再生性强^[3],因此国内对于“甘农 1 号”的研究是比较多的,但是对其研究大多是以下胚轴^[4]、子叶节^[5]作为外植体,而利用子叶,通过诱导愈伤组织分化获得胚状体,进而获得再生植株尚鲜见报道。该研究以“甘农 1 号”紫花苜蓿的子叶为外植体,通过研究不同培养基和不同浓度激素对紫花苜蓿再生体系的影响,旨在建立一个高效的、通过胚状体途径获得植株的紫花苜蓿再生体系,为实现外源基因的转化奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试植物材料为“甘农 1 号”紫花苜蓿。

第一作者简介:段亚楠(1987-),女,山东聊城人,硕士研究生,研究方向为植物分子生物学。E-mail: dyn87219@126.com.

责任作者:韩阳(1962-),女,博士,教授,硕士生导师,研究方向植物生物技术。E-mail: hanyang_0802@163.com.

基金项目:辽宁省教育厅重点实验室资助项目(LS2010070);辽宁省自然科学基金资助项目(201202083)。

收稿日期:2013-04-08

Preliminary Study on Callus Induction of *Corydalis decumbens*

WANG Fei, ZHU Xiao-lan, HE Sha-sha, LIAO Yan, HUANG Sheng-he
(Fuzhou Medical College, Nanchang University, Fuzhou, Jiangxi 344000)

Abstract: Taking *Corydalis decumbens* (Thunb.) Pers. as material, the effect of different disinfection methods, explants and hormone proportion on callus induction were studied. The results indicated that the better disinfection treatment was 10 min with 0.1% HgCl_2 for blade, but 8 min for tuber and leafstalk. As an explants, leafstalk was superior to tuber and blade. The induction rate (43.3%) was the highest in the MS medium with 0.5 mg/L NAA+1.5 mg/L 6-BA for blade, but the induction rate (80.0%) was the highest if the leafstalk was put in the MS medium with 1.0 mg/L NAA+1.5 mg/L 6-BA.

Key words: *Corydalis decumbens* (Thunb.) Pers.; tissue culture; callus