

高寒藏药——抱茎獐牙菜组织培养研究 及其愈伤组织有效成分的测定*

向凤宁¹ 邢梅青^{1**} 夏光敏¹ 胡风祖² 李毅²

(1. 山东大学, 济南 250100) (2. 中科院西北高原生物研究所, 西宁 810001)

摘 要 从抱茎獐牙菜的胚轴、幼叶及未成熟种子诱导出愈伤组织并再生植株, 试验选用 MS、B₅ 和 N₆ 三种培养基, 其中以附加 2.4 - D 3.0mg/L + 6 - BA 0.5mg/L 的 MS 培养基诱导率最高; 以附加 6 - BA 0.5mg/L + NAA 0.2mg/L 的 MS 培养基分化苗频率最高; 以附加 2.4 - D 2.0mg/L + 6 - BA 0.5mg/L 的 MS 培养基愈伤组织的生长最好。结果表明, 外植体, 培养基, 激素等对愈伤组织诱导、继代和分化均有明显影响。采用高压液相色谱法 (HPLC) 测定抱茎獐牙菜愈伤组织中齐墩果酸含量的结果表明, 愈伤组织中齐墩果酸含量因培养基、继代培养时间的不同而有所差异。

关键词 抱茎獐牙菜; 组织培养; 齐墩果酸

TISSUE CULTURE AND ANTIHEPATITIS CONSTITUENT IN CALLI OF SWERTIA FRANCHETIANA H. SMITH

Xiang Feng - ning¹ Xing Mei - qing^{1**} Xia Guang - min¹ Hu Feng - zu² Li Yi²

(1. Shandong University, Jinan 250100)

(2. Northwest Plateau Institute of Biology, Academia Sinica, Xining 810001)

Abstract Calli and the regenerative plants were induced from young leaves, immature seeds and hypocotyl of *Swertia franchetiana* H. Smith. Three kinds of media, MS, B₅ and N₆ were set up in the experiment. Calli were established with the highest frequency onto MS medeium containing 3mg/L 2,4 - D and 0.5mg/L 6BA. The regenerative plants are obtained with the highest frequency onto MS medeium, Containing 0.5mg/L 6 - BA and 0.2mg/L NAA. The induction and maintenence and differentia-

* 山东大学微生物技术国家重点实验室资助课题

** 现工作单位山东省实验中学

tion of the calli were affected markedly by the basic media and compound 2,4-D and 6-BA in the media etc. The Oleanolic acid content in calli of *Swertia franchetiana* H. Smith were determined by HPLC method.

Key words *Swertia franchetiana* H. Smith; Tissue culture; Oleanolic acid

藏药植物——抱茎獐牙菜(*Swertia franchetiana* H. Smith),别名藏茵陈,藏名斗大,系龙胆科植物(Gentianaceae),在青海省生于海拔 2200-3600 米的高寒地区,一年生草本,全草入药,有清热解毒,舒肝利胆之功效,与同科植物川西獐牙菜(*Swertia mussotii* Franch)同等入药^[1]。专治黄胆型肝炎,病毒型肝炎。目前,其野生资源不能满足医药生产的需要,抱茎獐牙菜的组织培养国内外尚无报道。因此,我们对其进行组织培养,以期探索其无性快速繁殖的新路子,解决其药量不足的问题。

前人报道,川西獐牙菜和抱茎獐牙菜的抗肝炎有效成分为齐果墩酸和芒果甙^[2,3],为探索抱茎獐牙菜诱导的愈伤组织是否含有抗肝炎有效成分,我们采用高压液相色谱法测定了其愈伤组织的齐果墩酸含量。

1 材料和方法

1.1 愈伤组织诱导:供试材料为野生品种抱茎獐牙菜,采自青海省西宁市和大通县。外植体为未成熟种子(未形成种皮、1mm 左右、淡黄色),幼叶和胚轴,接种时,将未成熟种子浸入 0.1% 升汞溶液中 5~7min,无菌水冲洗 3 次,用吸管分别吸入备好的诱导培养基中和无激素 MS 培养基上萌发出苗,待种子出苗后,截取 4~5mm 小段的胚轴和 0.5mm² 小块幼叶于诱导培养基上。

培养基以 MS 为基本培养基,还试用了 B5、N6 两种培养基,附加生长素和 6-苄基腺嘌呤,其浓度组合见下文。蔗糖 3%,琼脂 0.6%,PH 调至 5.8,在 137.3kPa 压力下灭菌 20min,在温度 25±2℃,光强 1000~1200Lux,每日光照 10hr 或无光下培养。

1.2 愈伤组织继代 愈伤组织继代 6 次日龄为 30d 时,转至 MS 和 B5 培养基上,激素组合为 2.4-D 2.0mg/L + 6-BA 1.0mg/L,每种接种 10 瓶,培养 30d 后,测定愈伤组织鲜重。其他不同激素组合的愈伤组织鲜重按同法测定,培养条件同上。愈伤组织每月继代一次,进行转移培养。培养细胞生长量以细胞鲜重的增长倍数表示。即接种后若干天细胞鲜重与接种时细胞鲜重之比。

1.3 愈伤组织分化 将诱导的愈伤组织继代培养 6 次后转入分化培养基上,分化培养基为附加 6-BA 0.5mg/L + NAA 0.2mg/L 的 MS 培养基,壮苗培养基为 1/2MS + 0.1mg/L NAA,培养条件同上。

1.4 抱茎獐牙菜原植物和愈伤组织中齐墩果酸含量测定 (1) 样品提取:先将抱茎獐牙菜原植物研磨成细粉,称取 100mg;然后分别取已继代培养 1、3、6、12 个月的愈伤组织(未成熟种子所诱导 100mg,置索氏提取器中,加 10ml 氯仿回流提取 3hr,过滤,残渣用氯仿洗涤 2 次,合并后蒸去氯仿,残留物用甲醇溶解后转至 10ml 容量瓶中定溶。(2) HPLC 法:仪器 Waters 600E 高压液相色谱仪、C18 柱、UV 检测、220nm、746 数据处理机。移动相:甲醇—水(80%)。标准品溶液:齐墩果酸配制成 0.013mg/ml 甲醇溶液。样品溶液:上述各提取液,制成 10mg/ml 甲醇液。齐墩果酸标准品由中国药品生物制品检定所提供,样品分析:

取样品 10ul 重复进样,记录谱峰及积分值,并分别根据响应因子计算含量($\mu\text{g/g}$ 鲜重)。取标准品液 5 μl ,记录标准图谱及积分值,重复进样 5 次,至获得的谱峰积分值($r\% < 5\%$),计算其响应因子。

2 实验结果

2.1 愈伤组织的诱导 培养 1 周后,胚轴两端切口处膨大;2 周左右,未成熟种子整体膨胀或先出苗再从幼叶和胚轴处整体膨胀(图版 1);4 周左右,幼叶从叶脉周围处膨胀,开始形成愈伤组织。

2.1.1 影响愈伤组织诱导率的因素

培养基:在同样附加 2.4 - D3mg/L + 6 - BA0.5mg/L 的 MS、B₅、N₆ 三种培养基上,未成熟种子、幼叶和胚轴均诱导出愈伤组织,但三种培养基对不同外植体诱导愈伤组织的频率有一定差异。从表 1 可见,培养基中,以 MS 表现最好,B₅ 次之,N₆ 较差。表明不同培养基对不同外植体愈伤组织诱导有明显影响。

表 1 不同培养基愈伤组织的诱导率

Table 1 Frequency of calli induced from different media

| 项 目 item | 培养基 medium | | | 培养基 medium | | | 培养基 medium | | |
|-----------------------------|-----------------|-------------------------|-----------------------|-----------------|-------------------------|-----------------------|-----------------|-------------------------|-----------------------|
| | 外植体 explant | | | 外植体 explant | | | 外植体 explant | | |
| | 胚轴 hypocotyl | 未熟种 immature seed | 幼叶 young leaves | 胚轴 hypocotyl | 未熟种 immature seed | 幼叶 young leaves | 胚轴 hypocotyl | 未熟种 immature seed | 幼叶 young leaves |
| 接种数 No. of inoculation | 21 | 72 | 14 | 16 | 65 | 19 | 18 | 45 | 15 |
| 成愈数 No. of calli formed | 21 | 70 | 4 | 16 | 61 | 4 | 13 | 32 | 1 |
| 诱导率 % freq. of induction | 100 | 97.2 | 28.6 | 100 | 93.8 | 21.1 | 72.2 | 68.9 | 6.6 |

外植体:抱茎獐牙菜的未成熟种子、幼叶和胚轴在 MS + 2.4 - D3mg/L + 6 - BA0.5mg/L 的同一种培养基上,愈伤组织诱导率见表 2。结果表明,胚轴最易诱导,其次是未成熟种子,叶片最难诱导。

激素组合:以 MS 基本培养基添加不同激素组合,胚轴、未成熟种子和幼叶都诱导出愈伤组织。单加生长素(2.4 - D)的培养基 I 形成愈伤组织较少,兼用生长素加 6 - 苄基腺嘌呤的培养基 II、III、IV、V 不但愈伤组织诱导率高,生长也较快,其中以培养基 IV 诱导率最高。同时添加 NAA 和 6 - BA,愈伤组织易长出不定根(表)。

2.2 愈伤组织的继代培养

2.2.1 培养基 在抱茎獐牙菜愈伤组织继代培养半年后,观察了其在 MS 和 B₅ 培养基上生长的情况,结果(表 3)表明,MS 培养基比 B₅ 培养基更适于其愈伤组织的生长。在两种培养基上生长的愈伤组织,仔细比较发现即使同一外植体诱导的愈伤组织,在继代培养过程中也有变化。长势有强有弱,颜色有深有浅。培养半年时,愈伤组织颜色多为黄色,少数为浅黄色或白色质地变硬(图版 2)。

表 2 不同激素愈伤组织的诱导率

Table 2 Frequency of calli induced from different hormone

| 代号 | 培养基 附加激素 medium (mg/L) | 培 养 材 料 material of culture | | | | | | | | |
|-----|---------------------------------|------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| | | 胚轴 hypocotyl | | | 幼叶 young leaves | | | 未成熟种子 immature seed | | |
| | | 接种数 No. of inoculation | 成愈数 No. of calli formed | 诱导率 % Freq. of induction | 接种数 No. of inoculation | 成愈数 No. of calli formed | 诱导率 % Freq. of induction | 接种数 No. of inoculation | 成愈数 No. of calli formed | 诱导率 % Freq. of induction |
| I | 2.4 - D3.0 | 18 | 11 | 61.1 | 5 | 1 | 20.0 | 41 | 24 | 58.5 |
| II | 2.4 - D1.0 + 6 - BA1.5 | 38 | 35 | 92.1 | 36 | 4 | 11.1 | 51 | 41 | 80.4 |
| III | 2.4 - D2.0 + 6 - BA1.0 | 40 | 40 | 100 | 38 | 10 | 26.3 | 60 | 57 | 95.0 |
| IV | 2.4 - D3.0 + 6 - BA0.5 | 21 | 21 | 100 | 14 | 4 | 28.6 | 72 | 70 | 97.2 |
| V | NAA 0.4 + 6 - BA0.5 | 35 | 35 | 100 | 31 | 4 | 12.9 | 53 | 51 | 96.2 |

表 3 培养基对愈伤组织生长的影响

Table 3 Effect of different media on growth calli

| 培养基 medium | 接种量(克/瓶) ammount of inoculation | 月增殖量(克/瓶) amount of proliferation/ month | 增殖倍数(倍/月) proliferation times |
|----------------|------------------------------------|---|----------------------------------|
| MS | 0.4 | 3.2 | 8.0 |
| B ₅ | 0.4 | 1.7 | 4.25 |

为 10 瓶平均数

2.2.2 激素组合 不同处理下培养一个月的愈伤组织称重(表 4),可以看出,在 2.4 - 2.0mg/L + 6 - BA0.5mg/L 的处理下,愈伤组织增殖最差;在 2.4 - D2.0mg/L + 6 - BA1.0mg/L 时愈伤组织的增殖最快,同时瘤状愈伤组织的增殖效果也最好。表明在相同的 2.4 - D 浓度下,6 - BA 浓度增加到 1.0mg/L 时,愈伤组织的生长速度和生长状况均最好。当 0.2mg/L 的 NAA 分别同 0.4mg/L 的 6 - BA 和 0.2mg/L 的 KT 组合时,生长速度均明显降低,分化出大量不定根。

2.3 愈伤组织的分化 在 6 - BA0.5mg/L + NAA0.2mg/L 的 MS 培养基上,未成熟种子,幼胚和胚轴所诱导的愈伤组织的均可产生小苗(图版 3),但再生苗频率明显不同(表 5)。结果表明,愈伤组织分化苗频率与其外植体有关,未成熟种子的分化苗频率最高(73.0%),而幼叶仅为 49.3%。另外,继代培养时间对愈伤组织分化苗频率也有影响。从表 5 可见,随着继代时间的增加,分化苗频率也逐渐降低,并且畸形苗(图版 4)比例增高。及时把 1 ~ 2cm 高的小苗转移到壮苗培养基上,可获得健壮小苗。小苗长至 6 ~ 7cm 高时,便可移栽于花盆。

表 4 不同激素组合对愈伤组织生长的影响

Table 4 Effect of different hormone on growth calli

| 培养基(mg/L) medium | 增殖倍数 proliferation times | 愈伤组织生长情况 Condition of growth calli |
|-----------------------------|--------------------------------|--|
| MS + 2.4 - d1.0 + 6 - BA0.5 | 4.57 | 多数浅黄色,少数白色或褐色,较疏松 light yellow (most), white and brown (some), more soft |
| MS + 2.4 - D1.0 + 6 - BA1.0 | 9.1 | 多数浅黄色,少数白色,较紧密。有颗粒状结构 light yellow (most), white (some), more compact, granulated structure |
| MS + 2.4 - D2.0 + 6 - BA0.5 | 1.11 | 多数灰白色,有粘稠物分泌,非常疏松 grey and white (most), very soft |
| MS + 2.4 = D2.0 + 6 - BA1.0 | 10.8 | 浅黄色,多为颗粒状结构,较紧密 light yellow, granulated structure (most), more compact |
| MS + NAA0.2 + 6 - BA0.4 | 2.4 | 浅黄色,有粒根分化(平均 4.4 条/瓶),疏松 light yellow, some root, soft |
| MS + NAA0.2 + KT0.2 | 2.2 | 浅黄色,有粒根分化(平均 1.6 条/瓶),疏松 light yellow, some root, soft |

表 5 外植体和继代时间对愈伤组织分化苗的影响

Table 5 Effect of different explant and subculture on differentiated calli

| 外植体 explant | 未成熟种子愈伤组织 calli of immature seeds | | | 胚轴愈伤组织 calli of hypocotyl | | | 幼叶愈伤组织 calli of young leaves | | |
|----------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--|-------------------------------|--------------------------------------|--|---------------------------------|--------------------------------------|--|
| | 转移块数 No. of subcultured | 分化苗块数 No. of calli regenerated | 分化苗频率 Freq. of regenerated seedling | 转移块数 No. of subcultured | 分化苗块数 No. of calli regenerated | 分化苗频率 Freq. of regenerated seedling | 转移块数 No. of subcultured | 分化苗块数 No. of calli regenerated | 分化苗频率 Freq. of regenerated seedling |
| 继代时 间(月) | | | | | | | | | |
| 1 | 141 | 103 | 73.0 | 138 | 92 | 66.7 | 83 | 41 | 49.3 |
| 6 | 158 | 102 | 64.6 | 149 | 83 | 55.7 | 75 | 24 | 32.0 |
| 12 | 144 | 60 | 41.7 | 122 | 41 | 33.6 | 84 | 19 | 22.6 |

表 6 培养基对齐果墩酸含量的影响

Table 6 Effect of different media on Oleanolic acid content in calli

| 培养基 medium | MS | B ₅ | 原植物(对照) species (control) |
|--|------|----------------|------------------------------|
| 齐果墩酸含量(μg/g) percent of oleanolic acid (μg/g) | 0.34 | 0.27 | 0.40 |

2.5 愈伤组织中齐墩果酸含量的变化,未成熟种子诱导的愈伤组织在 MS 和 B₅ 培养基上培养 1 个月时,愈伤组织中齐墩果酸的含量见表 6,结果表明,在 MS 培养基上,愈伤组织中齐墩果酸含量比 B₅ 培养基上稍高。愈伤组织在两种培养基上的齐墩果酸含量均低于原植

物(对照),看来,在继代初期,愈伤组织合成齐墩果酸的能力较弱。在不同继代培养时间中,未成熟种子诱导的愈伤组织中齐墩果酸含量的变化见表 7。愈伤组织在 MS 继代培养基上继代到 3 个月和 6 个月时,齐墩果酸含量比继代 1 个月时有所增高,同对照原植物相比,含量略高,但到 12 个月时,其含量又稍减,且低于原植物。结果表明抱茎獐牙菜愈伤组织中齐墩果酸含量在继代过程中有差异,与对照原植物相比,含量有所变化。可见,愈伤组织在继代培养过程中均具有合成齐墩果酸的能力,只是程度上有所差异。

表 7 继代时间对愈伤组织中齐果墩酸含量的影响

Table 7 Effect of different subculture time on Oleanolic acid content in calli

| 愈伤组织继代时间 time of subculture calli | 齐果墩酸含量($\mu\text{g/g}$) percentent of oleanolic acid ($\mu\text{g/g}$) |
|--------------------------------------|---|
| 1 | 0.34 |
| 3 | 0.44 |
| 6 | 0.43 |
| 12 | 0.28 |
| 原植物(对照) Species (control) | 0.40 |

3 讨 论

抱茎獐牙菜愈伤组织诱导受外植体、培养基、激素组合的影响。不同外植体接种在相同或不同培养基上,愈伤组织的诱导差异明显。总的情况是,容易产生愈伤组织的部位,无论在哪一中培养基上诱导率都较高,如胚轴。及之则较低,如幼叶。在 MS、B₅ 和 N₆ 三种培养基中,以 MS 附加 2.4 - D3.0mg/L + 6 - BA0.5mg/L 的诱导效果最好。本实验观察到,生长素对诱导抱茎獐牙菜愈伤组织是必需的。6 - BA 不仅能提高愈伤组织诱导频率,而且可改善愈伤组织质量,有利于致密愈伤组织的形成。可见,兼用生长素和 6 - BA 增效作用很明显。这一结果与一些报道不一致^[4],但与 Flick 等的报道一致^[5]。

抱茎獐牙菜愈伤组织的生长速度受培养基和激素的影响。MS 和 B₅ 培养基相比,MS 更适于抱茎獐牙菜愈伤组织生长。在不同激素组合处理下,愈伤组织生长速度不同,在相同 2.4 - D 下,6 - BA 对愈伤组织生长起主要作用,6 - BA 浓度低时,愈伤组织生长差,较高时则促进其生长。在愈伤组织继代培养中,一小部分愈伤组织易变为黄褐色,黄褐色愈伤组织生活力较弱,继代转移时必须将其剔除。

断代培养时间对愈伤组织分化再生能力有明显影响。实验表明随着继代时间的延长,分化苗频率逐渐下长。关于分化问题,Gautheret^[6]认为分化是受特殊质质决定的,分化能力的丧失是由于在培养过程中耗尽了在原有母体组织中存在的与分化有关的物质。也有的认为在继代过程中分化能力的逐渐丧失,只是遗传潜能表现的丧失。许智宏^[7]认为植物激素在分化中有着明显的调节作用,它们以直接或间接的方式影响基因的活性。分析抱茎獐牙菜愈伤组织分化再生能力的降低,似乎与外源激素的种类和浓度有关。同时,内源激素是否平衡也可能直接影响到愈伤组织的分化。

抱茎獐牙菜愈伤组织中测定出抗肝炎有效成分齐墩果酸,并且齐果墩酸的含量同川西獐牙菜愈伤组织相近,从而确证了抱茎獐牙菜抗肝炎的特性,对进一步开发其中药品种提供

了科学依据。同时可以作为川西獐牙菜的代用品同等入药。因此其愈伤组织中齐墩果酸含量的测定具有一定的实践意义。

参 考 文 献

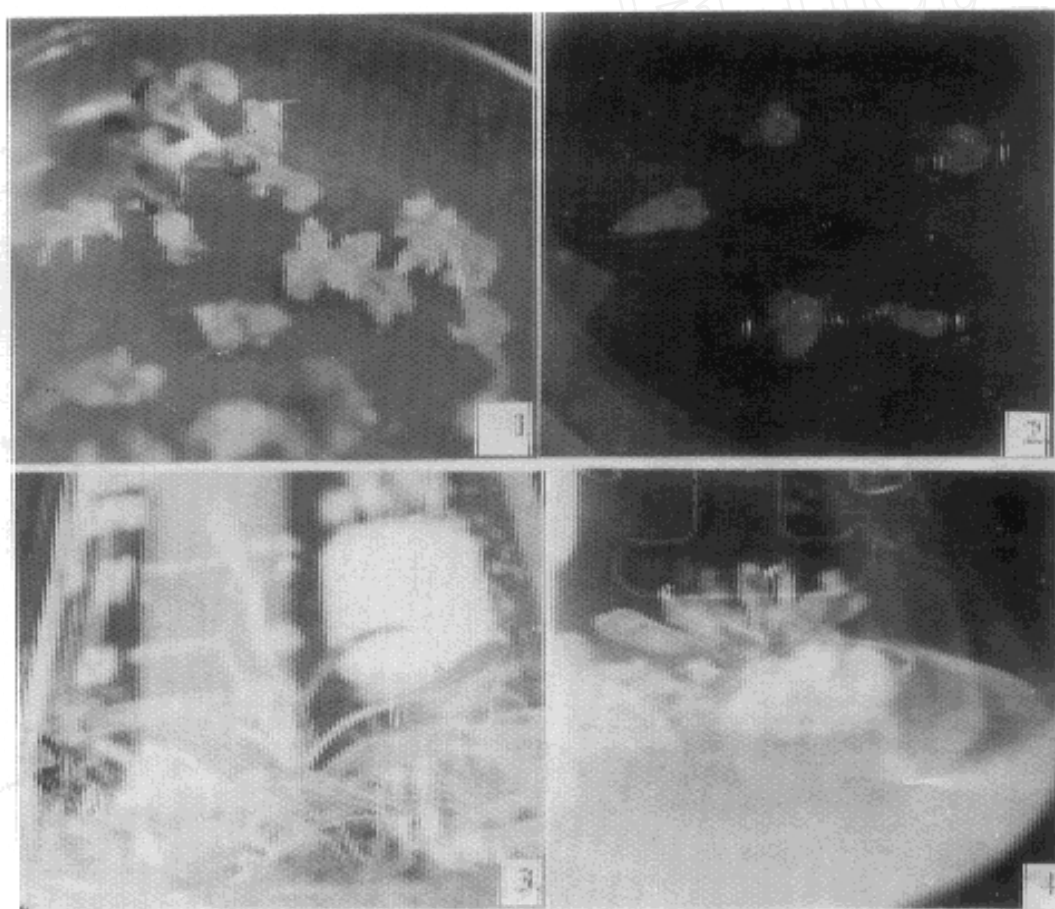
1. 邹寒雁,高承仁等. 青海中药资源和开发利用研究. 北京:东方出版社,1990
2. 丁径发等. 藏茵陈抗肝炎有效成分的研究. 中草药,1980,11(9):391~392
3. 孙洪发,樊淑芬,丁径业等. 青海产六种“藏茵陈”生物中齐墩果酸含量测定. 高原生物学集刊,1987,6(6):243~244
4. 陈惠民等. 小麦幼叶愈伤组织的诱导及器官形成. 植物学报,1980,22(2):112~114
5. Flick C. E. Organogenesis. In: Handbook of plant cell culture Macmillan co, New York, 1983
6. Gautheret RJ. In: Cell differentiation anaad morphogenesis. North Holland publ. Co Amsterdam, 1966
7. 许智宏. 植物的细胞分化. 植物生理学通讯,1979,(3):66~75

图 版 说 明

图版 1. 示未成熟种子诱导下整体愈伤化;2. 示继代培养的愈伤组织(颗粒状,黄色或黄绿色);3. 再生植株;4. 丛生苗。

Explanation of Plate

Plate 1. Calli were induced from immature seeds; 2. Subcultural calli; 3. Regenerated plants; 4. Clump plant.



See explanation at the end of text