

· 技术方法 ·

## 药用植物栀子的组织培养

张庆红<sup>1</sup>, 汤丽云<sup>2</sup>, 司徒少金<sup>3</sup>, 王莎<sup>3</sup>, 何国振<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>广州中医药大学中药学院, 广州 510006; <sup>2</sup>华南农业大学生命科学学院, 广州 510642

<sup>3</sup>广州白云山明兴制药有限公司, 广州 510250

**摘要** 栀子(*Gardenia jasminoides*)为药用木本植物。以栀子果皮、种子团和种子为外植体, 研究不同激素配比及不同培养方式对愈伤组织诱导和芽分化的影响。研究结果表明, 培养基成分为MS+0.5 mg·L<sup>-1</sup>2,4-D+0.25 mg·L<sup>-1</sup>6-BA较适宜果皮和种子愈伤组织的诱导, 诱导率分别为83.3%和88.5%; 培养基成分为MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup>2,4-D+1.0 mg·L<sup>-1</sup>6-BA较适宜种子团愈伤组织的诱导, 诱导率为78.1%。3种外植体诱导的愈伤组织中, 只有种子愈伤组织能通过液体培养分化出芽; TDZ对芽分化有明显的促进作用; 最佳的芽分化培养基为MS+0.05 mg·L<sup>-1</sup>NAA+0.10 mg·L<sup>-1</sup>TDZ, 其愈伤组织分化率为8.75%。该研究以栀子种子为外植体, 并获得了再生植株, 为药用植物栀子转基因体系的建立奠定了基础。

**关键词** 愈伤组织, 栀子, 液体培养, 再生, 组织培养

张庆红, 汤丽云, 司徒少金, 王莎, 何国振 (2014). 药用植物栀子的组织培养. 植物学报 49, 331–336.

栀子(*Gardenia jasminoides*)为茜草科(Rubiaceae)常绿灌木, 其干燥成熟果实具有泻火除烦、清热利尿和凉血解毒等功效(国家药典委员会, 2010), 是《中华人民共和国药典》(2010版)(第1部)收录的临床常用中药材, 也是生产清开灵和安宫牛黄丸等33种中成药的重要原料。栀子的活性成分包括栀子苷、西红花苷(也是天然色素栀子黄色素的主要成分)和绿原酸等。培养植物细胞可以获得次级代谢产物, 满足人们日益增长的对中药材的需求, 且能有效地保护自然资源和生态环境(袁晓凡等, 2005)。然而, 培养的细胞来源不同, 获得的次级代谢产物的种类和含量也不一样。选择目的次级代谢产物含量高的植物组织作培养材料往往可获得高含量的目的次级代谢产物(姚文兵, 2010)。栀子全果实、种子及果皮中栀子苷和西红花苷的含量较高(蒋珍藕, 1995; 王春芳和鲁静, 1997), 以这些器官为外植体进行细胞培养, 有可能获得高含量的活性成分。迄今为止, 有关栀子组织培养的报道大致可分为3类: 第1类是以栀子带腋芽茎段为外植体, 直接增殖芽获得无菌苗(George et al., 1993; 马文景和米受恩, 1993; 陆斐等, 2000; 王育选等, 2008); 第2类是以胚轴、胚根、子叶、花苞、未成熟果实及成熟果实为外植体, 诱导产生愈伤组织, 未见

对再生植株的研究(钟青萍等, 1994); 第3类以叶片为外植体, 诱导愈伤组织并获得再生植株(Al-Juboory et al., 1998; 肖潇等, 2005)。本研究以未成熟的果皮、种子团(由胎座和未成熟种子组成)和种子为外植体, 成功地诱导出愈伤组织, 并从来源于种子的愈伤组织中分化出芽, 诱导生根, 获得了再生植株。

## 1 植物材料

栀子(*Gardenia jasminoides* Ellis)采自广东省梅州市平远县中药材生产基地。将开花后3个月的青色未成熟新鲜栀子果实分割为果皮、种子团和种子3部分, 用自来水冲洗, 直至色素冲洗干净(2–3小时)。在超净工作台上将3种外植体放入70%乙醇中浸泡30秒, 再用0.1%HgCl<sub>2</sub>浸泡9分钟, 之后用无菌水冲洗5–6次, 转移至消毒后的无菌滤纸上, 吸干表面水分备用。

## 2 培养基成分和培养条件

### 2.1 培养基成分

以MS培养基为基本培养基, 附加浓度为30 g·L<sup>-1</sup>的蔗糖, pH5.8–6.0。各种培养基是在基本培养基中分别添

收稿日期: 2013-05-31; 接受日期: 2013-10-15

基金项目: “重大新药创制”科技重大专项(No.2011ZX09401-404)

\* 通讯作者。E-mail: hegouzhen@yahoo.com

加2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D)、 $\alpha$ -萘乙酸( $\alpha$ -naphthalene acetic acid, NAA)、6-苄基腺嘌呤(6-benzyladenine, 6-BA)和N-苯基-N'-1,2,3-噻二唑-5-脲(N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea, TDZ)等(表1, 表2)。其中, 2,4-D、NAA和6-BA购自上海阿拉丁化学有限公司; TDZ购自上海源聚生物科技有限公司。固体培养基含琼脂( $7.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 液体培养基不含琼脂。

## 2.2 愈伤组织的诱导

在无菌条件下将消毒的果皮和种子团切成大小约 $5\text{ mm} \times 5\text{ mm}$ 的小块; 从种子团中挑出饱满、白色且大小约1–2 mm的未成熟种子, 剥去种皮, 随机切成2块。将3种外植体分别接种到愈伤组织诱导培养基中(表1), 果皮和种子团每瓶接种1块, 种子每瓶接种5块。每种材料各接种20瓶。重复3次。在温度( $25\pm2$ ) $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度40%–60%的条件下进行暗培养。30天后, 筛选出浅黄绿色的愈伤组织, 继代培养3次, 获得适合液体培养的浅黄绿色疏松的愈伤组织。

## 2.3 愈伤组织的分化

将继代培养得到的愈伤组织块接种到液体培养基中(表2), 培养30天。液体培养条件: 温度( $25\pm2$ ) $^{\circ}\text{C}$ , 光周期为13小时光照/11小时黑暗, 光照强度为( $20.1\pm4.0$ )  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 转速为100  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

## 2.4 芽的增殖

液体培养30天后, 将带芽愈伤组织块转移至芽增殖培养基中进行固体培养。每瓶接种4块, 30天继代1次。芽增殖培养基为MS+ $0.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA+ $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA。

## 2.5 生根培养

将长1–2 cm的芽从基部切下, 转接至生根培养基(MS+ $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA+ $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA)中诱导生根。培养条件: 温度( $25\pm2$ ) $^{\circ}\text{C}$ , 相对湿度40%–60%, 光照

**表1** 不同植物生长调节剂组合对3种外植体愈伤组织诱导的影响

**Table 1** Effects of different plant growth regulator combinations on the callus induction from three kinds of explants

Medium	2,4-D ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	6-BA ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Pericarp		Placenta with seeds		Seed	
			Callus induction rate (%)	Initial time of callus forma- tion (d)	Callus induction rate (%)	Initial time of callus forma- tion (d)	Callus induction rate (%)	Initial time of callus formation (d)
MS-A	0.5	0.25	83.3	9–12	0	–	88.5	10–15
MS-B	1.0	0.5	52.5	10–15	0	–	82.5	10–15
MS-C	0.75	0.5	38.5	10–15	20.0	17–25	52.9	14–20
MS-D	1.0	1.0	18.6	12–17	78.1	15–20	43.4	14–20
MS-E	1.5	1.5	0	–	19.1	20–25	5.5	17–20

**表2** 不同植物生长调节剂组合对种子愈伤组织芽分化的影响

**Table 2** Effects of different plant growth regulator combinations on the bud differentiation from seed-derived calli

Medium	Plant growth regulator concentration ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )			Number of calli	Number of calli differentiated	Callus differentiation rate (%)
	NAA	TDZ	6-BA			
Y-A	0.05	0.05	–	80	2	2.50
Y-B	0.05	0.10	–	80	7	8.75
Y-C	0.05	0.15	–	80	3	3.75
Y-D	0.05	–	–	80	2	2.50
Y-E	0.05	–	0.5	80	0	0.00
Y-F	0.05	–	1.0	80	0	0.00
Y-G	0.05	–	2.0	80	2	2.50

强度( $33.6\pm0.7$ )  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。

## 2.6 结果统计

### 2.6.1 愈伤组织诱导率

分别在外植体培养第10、20、30和40天观察愈伤组织的诱导情况，并统计诱导率(诱导率=(出愈外植体数/接种外植体总数)×100%)。

### 2.6.2 愈伤组织分化率

于液体培养30天统计愈伤组织的分化率(分化率=(分化出芽的愈伤组织块数/愈伤组织总块数)×100%)。

### 2.6.3 芽增殖系数

液体培养后，将芽转移至固体培养基中继续培养30天，并继代1次，分别统计每次固体培养的全部芽数，计算芽增殖系数(芽增殖系数=全部增殖芽数/接种芽数)。

## 3 结果与讨论

### 3.1 愈伤组织的诱导

不同培养基对3种外植体愈伤组织诱导的结果见表1。适当浓度的2,4-D和6-BA配比，对梔子果实各部分愈伤组织的诱导具有一定的促进作用。MS-A培养基可使果皮和种子脱分化并形成愈伤组织，二者的出愈时间大致相同，在培养9–10天后开始从切口边缘长出浅黄色的愈伤组织，诱导率分别为83.3%和88.5%；MS-D培养基可使种子团形成愈伤组织，种子团的出愈时间比果皮和种子稍长，15天后才开始从切口面长出浅黄色的愈伤组织，诱导率为78.1%。3种外植体形成愈伤组织的质量不同。果皮出愈时间虽短，但极易褐化，较难进行继代培养；种子出愈时间虽与果皮相似，但愈伤组织生长状态很好，且不易褐化；种子团出愈时间最迟，愈伤组织的生长状态却很好，也不易褐化(图1A–C)。

### 3.2 愈伤组织的分化

将来源于3种外植体的愈伤组织进行芽分化培养，采用不同的固体培养基进行了多次实验，都没有分化出芽。后使用液体培养，仅来自种子的愈伤组织可再生出芽(图1D)。种子愈伤组织在不同的植物生长调节剂

组合下进行液体培养，除Y-E和Y-F外，都能不同程度地分化出芽，但愈伤组织的分化率均较低，说明种子的愈伤组织较难分化。Y-B培养基上的分化率最高，为8.75%。在5种可分化的培养基中，含TDZ的有3种，含6-BA的有1种，可见与6-BA相比，TDZ能更好地促进芽分化，并呈现出浓度效应(表2)。值得注意的是，在没有添加TDZ和6-BA的Y-D培养基中也有一定比例的芽分化，但此部分芽在增殖过程中，生长状况不理想。

### 3.3 再生芽的增殖

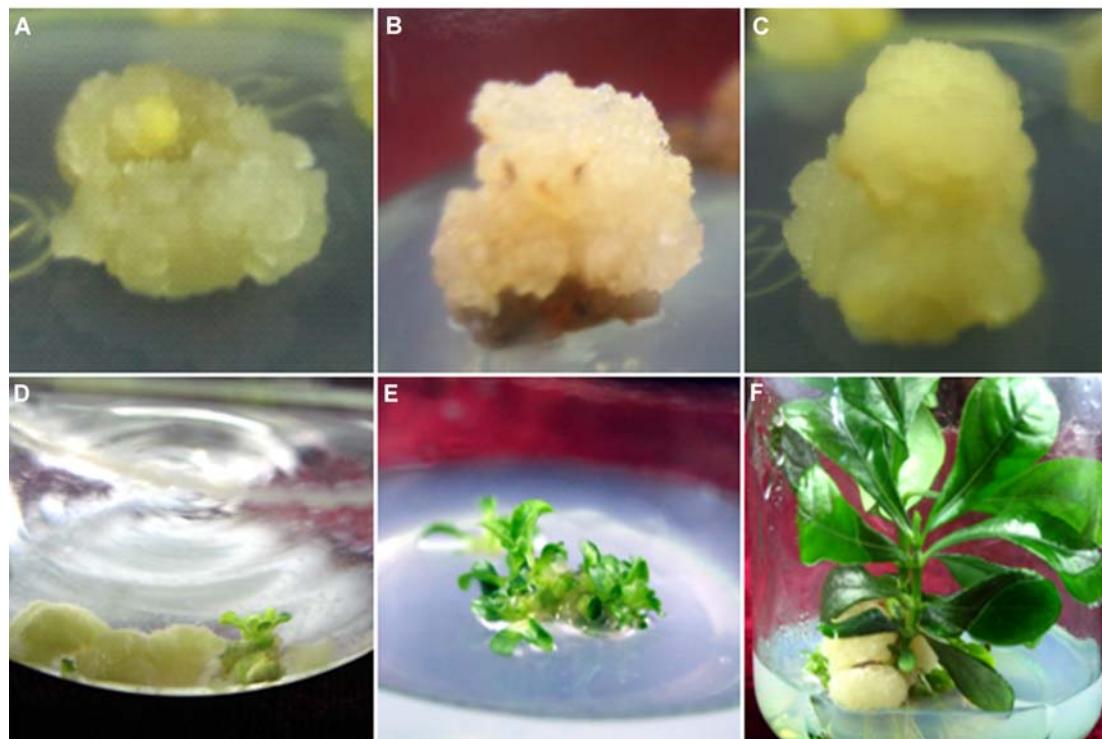
为了获得更多的再生芽，将芽转移至固体培养基中繁殖，结果见表3。第1次固体培养30天后，来源于Y-C和Y-G的芽各有1个枯萎死亡，芽增殖系数低于1。继代培养后，来源于不同液体培养基的芽增殖系数差异较大。来源于Y-G培养基的增殖系数最大，为7；来源于Y-D培养基的增殖系数最小，为1.5，且芽的颜色均呈黄色，在进一步的增殖继代培养中枯萎死亡。来源于Y-B培养基的芽，在进一步的增殖继代培养中生长良好，且数量多(图1E)。综合分化率和增殖系数分析表明，Y-B培养基是分化和芽增殖的最佳培养基。通过芽增殖培养，可以弥补愈伤组织分化率低导致的再生植株少的问题。

### 3.4 生根培养

增殖培养继代1次后，可获得一定数量且生长状况良好的芽。将芽从基部切下，转移至生根培养基中培养。15天后，在切口处出现白色的突起；30天后，长成粗壮的根(图1F)，获得再生植株。

### 3.5 讨论

6-BA、TDZ和2,4-D是诱导梔子产生愈伤组织的有效激素(肖潇等, 2005)。目前，只有Al-Juboory等(1998)和肖潇等(2005)报道了从梔子叶片的愈伤组织中分化出芽。本研究使用6-BA和2,4-D有效地从梔子果皮、种子团和种子中诱导出愈伤组织，并从来源于种子的愈伤组织中成功地分化出再生芽，液体培养和TDZ在芽分化中起着重要作用。液体培养能促进梔子愈伤组织分化的原因可能是调整了愈伤组织细胞的状态，使之适宜分化。本研究愈伤组织诱导培养基中的生长素含量比分化培养基高10倍，推测可能由于液体培养



**图1** 桔子愈伤组织的诱导和植株再生

(A) 果皮愈伤组织; (B) 种子团愈伤组织; (C) 种子愈伤组织; (D) 种子愈伤组织在悬浮培养中分化的芽; (E) 种子愈伤组织在Y-B培养基中的增殖芽; (F) 再生植株

**Figure 1** The callus induction and plant regeneration of *Gardenia jasminoides*

(A) Callus induced from pericarp; (B) Callus induced from placenta with seeds; (C) Callus induced from seed; (D) Buds differentiated from seed calli by liquid culture; (E) Bud proliferation on Y-B medium; (F) Regenerated plantlets

**表3** 不同植物生长调节剂组合对再生芽增殖系数的影响

**Table 3** Effects of different plant growth regulator combinations on the bud proliferation coefficient

Medium	Plant growth regulator concentration ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )			Number of buds on solid culture 1 <sup>st</sup>	Number of buds proliferated on solid culture 1 <sup>st</sup>	Proliferation coefficient at solid culture 1 <sup>st</sup>	Number of buds on solid culture 2 <sup>nd</sup>	Number of buds proliferated on solid culture 2 <sup>nd</sup>	Proliferation coefficient at solid culture 2 <sup>nd</sup>
	NAA	TDZ	6-BA						
Y-A	0.05	0.05	—	2	2	1	2	10	5
Y-B	0.05	0.10	—	8	8	1	8	36	4.5
Y-C	0.05	0.15	—	4	3	0.75	3	8	2.7
Y-D	0.05	—	—	2	2	1	2	3	1.5
Y-G	0.05	—	2.0	2	1	0.5	1	7	7

使细胞较充分地接触培养基, 进而降低了细胞的生长素含量和固体培养方式下细胞与培养基接触面累积的不利于分化的物质。TDZ是一种人工合成的高效生物调节剂, 具有生长素和细胞分裂素的双重作用, 能诱导外植体从愈伤组织形成到体细胞胚胎发生的一

系列不同反应(王关林等, 1997; 徐晓峰和黄学林, 2003; Başalma et al., 2008)。TDZ对木本植物的再生最有效(Baker and Bhatia, 1993)。1998年, Al-Juboory等首次将TDZ用于桔子外植体的再生诱导。本研究结果表明, 虽然愈伤组织的分化率因TDZ浓度的不同而

有差异, 但均能促进栀子芽的分化, 这与Al-Juboory等(1998)和肖潇等(2005)的研究结果一致。

一般认为, 从目的次生代谢产物含量高的外植体诱导出的愈伤组织的次生代谢产物含量也高(李琰等, 2004; 姚文兵, 2010)。栀子的药效成分是栀子苷(国家药典委员会, 2010), 其在种子中含量较高(蒋珍藕, 1995; 王春芳和鲁静, 1997)。本研究建立的从种子诱导愈伤组织并分化成苗, 有望构建高药效成分含量的转基因实验技术平台。

本研究以栀子果皮、种子团和种子为外植体, 在含有不同植物生长调节剂配比的MS培养基上诱导愈伤组织; 并采用固体和液体培养相结合的方法, 诱导芽及根的分化, 获得栀子再生苗, 为进一步通过细胞培养获得栀子高含量有效成分及其转基因研究奠定了基础。

## 参考文献

- 国家药典委员会 (2010). 中国药典(第1部). 北京: 化学工业出版社. pp. 231–232.
- 蒋珍藕 (1995). 山栀子和水栀子中栀子甙的含量分析. 广西中医药 **18**, 50, 53.
- 李琰, 董娟娥, 姜在民, 唐锐 (2004). 杜仲愈伤组织中次生代谢产物积累动态研究. 西北植物学报 **24**, 2033–2037.
- 陆斐, 刘宝光, 刘玉波, 张弼弘, 王佰华 (2000). 栀子的组织培养快速繁殖技术. 北华大学学报(自然科学版) **1**, 533–535.
- 马文景, 米受恩 (1993). 栀子组织培养适宜培养基的研究. 甘肃农业大学学报 **28**, 77–81.
- 王春芳, 鲁静 (1997). 高效液相色谱法测定栀子中藏红花素的含量. 药物分析杂志 **17**, 321–323.
- 王关林, 方宏筠, 那杰 (1997). 高活性细胞激动素TDZ在植物组织培养中的应用. 植物学通报 **14**, 47–53.
- 王育选, 石晓荟, 王玉国 (2008). 栀子组织培养及快速繁殖研究. 山西农业大学学报(自然科学版) **28**, 260–262.
- 肖潇, 唐琳, 贾勇炯, 陈放 (2005). 悬浮培养促进栀子再生的研究. 四川大学学报(自然科学版) **42**, 1243–1245.
- 徐晓峰, 黄学林 (2003). TDZ: 一种有效的植物生长调节剂. 植物学通报 **20**, 227–237.
- 姚文兵 (2010). 生物技术制药概论(第2版). 北京: 中国医药科技出版社. pp. 121–121.
- 袁晓凡, 赵兵, 王玉春 (2005). 稀土元素在药用植物细胞和组织培养中的应用. 植物学通报 **22**, 115–120.
- 钟青萍, 杨宁生, 陈米慧 (1994). 栀子愈伤组织生长和黄色素合成影响因素的研究. 南昌大学学报(理科版) **18**, 256–262.
- Al-Juboory KH, Skirvin RM, Williams DJ (1998). Callus induction and adventitious shoot regeneration of gardenia (*Gardenia jasminoides* Ellis) leaf explants. *Sci Hortic* **72**, 171–178.
- Baker BS, Bhatia SK (1993). Factors effecting adventitious shoot regeneration from leaf explants of quince (*Cydonia oblonga*). *Plant Cell Tissue Organ Cult* **35**, 273–277.
- Başalma D, Uranbey S, Mirici S, Kolsarıcı Ö (2008). TDZ x IBA induced shoot regeneration from cotyledonary leaves and *in vitro* multiplication in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Afr J Biotechnol* **7**, 960–966.
- George PS, Ravishankar GA, Venkataraman LV (1993). Clonal multiplication of *Gardenia jasminoides* Ellis through axillary bud culture. *Plant Cell Rep* **13**, 59–62.

## Tissue Culture of the Medicinal Plant *Gardenia jasminoides*

Qinghong Zhang<sup>1</sup>, Liyun Tang<sup>2</sup>, Shaojin Situ<sup>3</sup>, Sha Wang<sup>3</sup>, Guozhen He<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

<sup>2</sup>College of Life Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

<sup>3</sup>Guangzhou Baiyunshan Mingxing Pharmaceutical Company Limited, Guangzhou 510250, China

**Abstract** *Gardenia (Gardenia jasminoides)* is a woody medicinal plant with geniposide, chlorogenic acid and crocin-1 as its bioactive compounds. To establish an experimental system for gene transformation to obtain high-content bioactive compounds, we studied the effects of different plant regulators and cultural modes on the callus induction and shoot regeneration from explants of pericarps, placentas with seeds, and seeds of gardenia. The optimal medium for callus induction from pericarp and seed was MS+0.5 mg·L<sup>-1</sup>2,4-D+0.25 mg·L<sup>-1</sup>6-BA. However, for callus induction from placentas with seeds, the optimal medium was MS+1.0 mg·L<sup>-1</sup>2,4-D+1.0 mg·L<sup>-1</sup>6-BA. The rates of callus induction were 83.3%, 88.5% and 78.1% from explants of pericarp, seed, and placenta with seeds, respectively. Buds regenerated from seed callus by liquid culture but not from the other 2 kinds of calli. TDZ (*N*-phenyl-*N'*-1,2,3-thidiazol-5ylurea), a phenylurea compound with auxin and cytokinin activities, stimulated bud differentiation. The optimal medium for bud differentiation was MS+0.05 mg·L<sup>-1</sup>NAA+0.10 mg·L<sup>-1</sup>TDZ with highest differentiation rate of 8.75%. We established a plant tissue culture system with gardenia seeds as explants, which can serve as a technical platform for gene transformation.

**Key words** callus, *Gardenia jasminoides*, liquid culture, regeneration, tissue culture

Zhang QH, Tang LY, Situ SJ, Wang S, He GZ (2014). Tissue culture of the medicinal plant *Gardenia jasminoides*. *Chin Bull Bot* **49**, 331–336.

---

\* Author for correspondence. E-mail: heguozhen@yahoo.com

(责任编辑: 孙冬花)