

DOI:10.11913/PSJ.2095-0837.2016.20308

米丽菊, 张霁, 杨天梅, 金航, 王元忠, 李富生. 傅里叶变换红外光谱 (FTIR) 技术对滇龙胆组织培养的研究 [J]. 植物科学学报, 2016, 34 (2): 308-315

Mi LJ, Zhang J, Yang TM, Jin H, Wang YZ, Li FS. Study on the tissue culture of *Gentiana rigescens* Franch. ex Hemsl. by Fourier transform infrared spectroscopy [J]. *Plant Science Journal*, 2016, 34(2): 308-315

傅里叶变换红外光谱 (FTIR) 技术对滇龙胆组织培养的研究

米丽菊^{1,2}, 张霁^{1,3}, 杨天梅^{1,3}, 金航^{1,3}, 王元忠^{1,3*}, 李富生^{2*}

(1. 云南省农业科学院药用植物研究所, 昆明 650200; 2. 云南农业大学农学与生物技术学院, 昆明 650201;

3. 云南省省级中药原料质量监测技术服务中心, 昆明 650200)

摘要: 野生药用植物资源的不断减少, 使得寻找其原植物的合适替代品显得尤为重要。利用组培材料代替野生药用植物作为药源已取得重大进展, 但利用傅里叶变换红外光谱 (Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR) 技术筛选合适的组培材料作为野生药用植物替代资源方面的应用鲜有报道。本研究采用 FTIR 结合偏最小二乘判别分析 (partial least squares discriminant analysis, PLS-DA) 对滇龙胆组织培养形成的愈伤组织 (肉质部、茎、叶)、增殖苗 (肉质部、茎、叶)、生根苗 (根、茎、叶) 进行比较。结果显示: (1) 从原始 FTIR 光谱图上看, 滇龙胆肉质部和根部峰形相似, 茎和叶峰形相似; (2) 二阶导数光谱图扩大了样品间的差异。在龙胆苦苷的主要吸收峰 1612 cm⁻¹ 附近, 吸收峰强度依次为: 生根苗叶 > 增殖苗叶和生根苗茎 > 增殖苗茎 > 愈伤组织叶, 愈伤组织茎及肉质部、增殖苗肉质部和生根苗根部在该处无吸收峰; (3) PLS-DA 得分图表明, 同一组培阶段相同组织部位样品聚集在一起, 而愈伤组织、增殖苗、生根苗及其各组织部位能够较好的分开。其中: 肉质部、根部与茎叶之间距离较远, 表明其化学成分和含量可能差异较大; 肉质部和根部样品间距离较近, 茎和叶样品间距离也较近。二阶导数光谱图显示, 组培材料有望代替其原植物满足药用需求; 若以龙胆苦苷含量为评价对象, 生根苗叶则可能具有更大的开发潜能, 有望代替野生滇龙胆以缓解其资源稀缺局面。本研究结果表明, 采用傅里叶变换红外光谱法可以简便有效地对药用植物不同组培阶段不同组织部位的替代潜力及开发利用进行初步评估。

关键词: 傅里叶变换红外光谱; 药用植物; 组织培养; 偏最小二乘判别分析; 滇龙胆

中图分类号: Q946

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2016)02-0308-08

Study on the Tissue Culture of *Gentiana rigescens* Franch. ex Hemsl. by Fourier Transform Infrared Spectroscopy

MI Li-Ju^{1,2}, ZHANG Ji^{1,3}, YANG Tian-Mei^{1,3}, JIN Hang^{1,3},
WANG Yuan-Zhong^{1,3*}, LI Fu-Sheng^{2*}

(1. Institute of Medicinal Plants, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650200, China;

2. College of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

3. Yunnan Technical Center for Quality of Chinese Materia Medica, Kunming 650200, China)

Abstract: It is important to find suitable alternatives for medicinal plants due to the gradual decline of wild resources. Tissue culture exhibits significant advantages in achieving medicinal plant substitutes. However, few studies have reported on the application of Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy to select appropriate material. In this research, FTIR combined with partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) was used to compare calli (fleshy

收稿日期: 2015-10-10, 退修日期: 2015-11-11。

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81260608); 云南省自然科学基金 (2013FZ150)。

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (81260608) and Natural Science Foundation of Yunnan Province (2013FZ150).

作者简介: 米丽菊 (1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向为药用植物资源评价 (Email: mlijztld@163.com)。

* 通讯作者 (Author for correspondence. E-mail: boletus@126.com; lfs810@sina.com)。

part, stem and leaf), proliferation plantlets (fleshy part, stem and leaf) and regenerated plantlets (root, stem and leaf) of *Gentiana rigescens* Franch. ex Hemsl. formed by tissue culture. Results showed that: (1) FTIR spectra of the fleshy parts and roots of *G. rigescens* samples were alike, as were the stems and leaves; (2) Second derivative spectra showed clear differences among the samples. Around the main characteristic absorption peak (1612 cm^{-1}) of gentiopicroside, the intensities of absorption peak was, in turn, the regenerated plantlet leaf, proliferation plantlet leaf and regenerated plantlet stem, proliferation plantlet stem. However, the stem and fleshy part of the callus, fleshy part of the proliferation plantlet and the root of the regenerated plantlet had no spectral peaks in this position; (3) Results of PLS-DA demonstrated that samples of the same part and at the same tissue culture stage could be grouped together. The fleshy parts and roots differed from the stems and leaves of the samples. Thus, the chemical constituents and content of the stems and leaves of *G. rigescens* could be differentiated from the fleshy parts and roots, with the fleshy parts similar to the roots and the stems similar to the leaves. Second derivative spectra showed that material formed by tissue culture could be a viable alternative to the original plants for medical use. In addition, regenerated plantlet leaves exhibited great potential for exploitation based on gentiopicroside, and may replace wild *G. rigescens* to relieve resource scarcity. Our study showed that FTIR can be used as a simple and effective method for the preliminary assessment of the substitution potential and utilization of different parts of medicinal plants during different stages in tissue culture.

Key words: Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy; Medicinal plants; Tissue culture; Partial least squares discriminant analysis; *Gentiana rigescens* Franch. ex Hemsl.

药用植物在治疗疾病和保护人类健康方面起着非常重要的作用^[1]。随着人类社会的发展、生态环境的持续恶化,药用植物资源日益减少,植物组织培养技术以其不受季节、环境条件、时间、空间限制等优势已渗透到人类的生产、生活、科学研究等领域^[2,3],尤其是在野生珍稀濒危药用植物保护和有效利用方面占有重要地位^[4],利用该技术已实现了人参皂甙^[5,6]、紫杉醇^[7]、紫草素^[8]等的规模化生产及商业化应用。Su等^[9]研究表明雷公藤(*Tripterygium wilfordii* Hook. F.)经细胞悬浮培养后其活性成分雷公藤甲素和南蛇藤醇含量显著提高,更具有开发利用价值;赵志莲等^[10]采用高效液相色谱法筛选滇龙胆(*Gentiana rigescens* Franch. ex Hemsl.)种质资源,并以龙胆苦苷含量较高的茎尖为外植体,研究了培养基、培养温度对滇龙胆离体培养的影响;张洁等^[11]以野生滇龙胆为材料建立了无性繁殖培养体系。

通过药用植物组织培养技术得到的愈伤组织、增殖苗、生根苗等材料在代替其原植物满足药用需求方面具有广阔的应用前景。目前,相关的研究主

要集中在比较组培材料与野生苗中有效成分含量及活性差异。Gaikwad等^[12]研究表明,经乙醇提取的穿心草(*Canscora decussata* Schult)组培苗中乙酰胆碱酯酶抑制活性稍低于野生苗,但其作为具有多种治疗效果尤其是缓解神经疾病的奇药,穿心草组培苗作为一种替代资源是可行的;小新塔花(*Ziziphora tenuior* L.)组培苗的水提取物清除自由基能力显著强于其野生苗^[13];Guo等^[14]研究表明,天山雪莲(*Saussurea involucreata* Kar. et Kir.)组培苗和野生苗含有的植物化学成分相似,且组培苗中绿原酸含量高于野生苗。以上这些研究采用的检测技术主要是高效液相色谱法,但该方法存在样品处理较复杂、分析时间长、有机溶剂使用量大、污染环境等不利因素^[15]。傅里叶变换红外光谱(FTIR)具有取样量小、重现性好、简便迅速、节约成本、多组分同时测定、环境友好等优势,并已在中药研究领域广泛应用^[16-18],然而利用该技术对药用植物组织培养的研究鲜有报道。

滇龙胆为龙胆科(*Gentianaceae*)龙胆属多年生、须根肉质草本植物,习称坚龙胆,药用部位为

根和根茎，是中药龙胆基原植物之一；主要分布在云南、贵州、四川、广西、湖南等地，适于海拔 1100 ~ 3000 m 的山坡草地、林下、灌丛及山谷中^[19]。滇龙胆味苦、性寒，归肝、胆经，用于湿热黄疸、肝火目赤、耳鸣耳聋、惊风抽搐等病症的治疗^[20]，其主要活性成分是以龙胆苦苷为代表的环烯醚萜苷类化合物，该类物质具有抗炎镇痛、抗细胞凋亡、预防肝衰竭、利胆、抗真菌、抗甲亢等多种功效^[21-23]；此外，Gao 等^[24]在滇龙胆中还分离出一系列具有抗阿兹海默病的 2,3-二羟基苯甲酸酯类化合物。滇龙胆种子萌发时对生境条件要求苛刻，常需要高温和高湿，在野外条件下其自然萌发率仅有 0.3%，再加上滇龙胆的分蘖繁殖能力低（每丛每年萌生 1 ~ 2 支茎）^[25,26]，导致野生种群数量渐减。滇龙胆为云南地道药材，野生资源分布甚广，但因其野生种群在自然状态下零星分布且通过自然繁殖实现群体的更新速度很慢，以及人们对滇龙胆野生资源无节制的采挖，导致其分布面积锐减，目前已濒临灭绝的境地，现已被列为国家重点保护野生药材物种（三级）、云南 10 个重要濒危药用植物之一^[27]。近年来，在云南省部分地区已开展了大面积的滇龙胆人工栽培，其中临沧市种植面积已达 5200 hm²，但因受到以炭疽病为主的各类病害的严重侵染，且随种植年数的增加，病菌积累更多，危害程度更大^[28]。因此，为解决因滇龙胆自身繁殖缺陷、易受病害侵染、人为掠夺性采挖等造成的资源短缺问题，寻找滇龙胆野生资源的合适替代品已迫在眉睫。本研究采用傅里叶变换红外光谱法对滇龙胆愈伤组织、增殖苗及生根苗的各个组织部位进行分析，了解其不同生长阶段各组织部位

的成分组成及含量变化，以期寻找滇龙胆野生资源的合适替代品，同时也为珍稀濒危药用植物提供一种筛选合适替代资源的新途径，保证药用植物资源的可持续利用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

不同组培阶段的滇龙胆样品(图 1)由云南中医学院黄衡宇副教授提供，其培养条件：温度为 (23 ± 2)℃，光照强度为 1500 ~ 2000 lx，光周期为 10 h 光照/14 h 黑暗。分析样品按组培阶段及组培苗不同组织部位分为 9 份，主要包括：愈伤组织肉质部(Y-R)、愈伤组织茎(Y-J)、愈伤组织叶(Y-Y)、增殖苗肉质部(Z-R)、增殖苗茎(Z-J)、增殖苗叶(Z-Y)、生根苗根(S-G)、生根苗茎(S-J)和生根苗叶(S-Y)。龙胆苦苷标准品(b)购自中国食品药品检定研究院(批号：110770-201313)。

1.2 实验方法

1.2.1 仪器

Frontier 型傅里叶变换红外光谱仪(Perkin Elmer)，配备 DTGS 检测器；YP-2 压片机(上海山岳科学仪器有限公司)；CS101 型电热鼓风干燥箱(浙江余姚温度仪表四厂)。

1.2.2 样品制备

不同组培阶段的样品按不同组织部位分别采收、干燥(60℃)磨碎后装于密封袋。进行红外光谱测定前需将 KBr 置于烘箱 105℃条件下烘干 4 h，然后取 0.0015 g 样品与 0.1000 g KBr 放入玛瑙研钵中，充分研磨、混匀后通过 YP-2 压片机做成透明的 KBr 压片，待测。

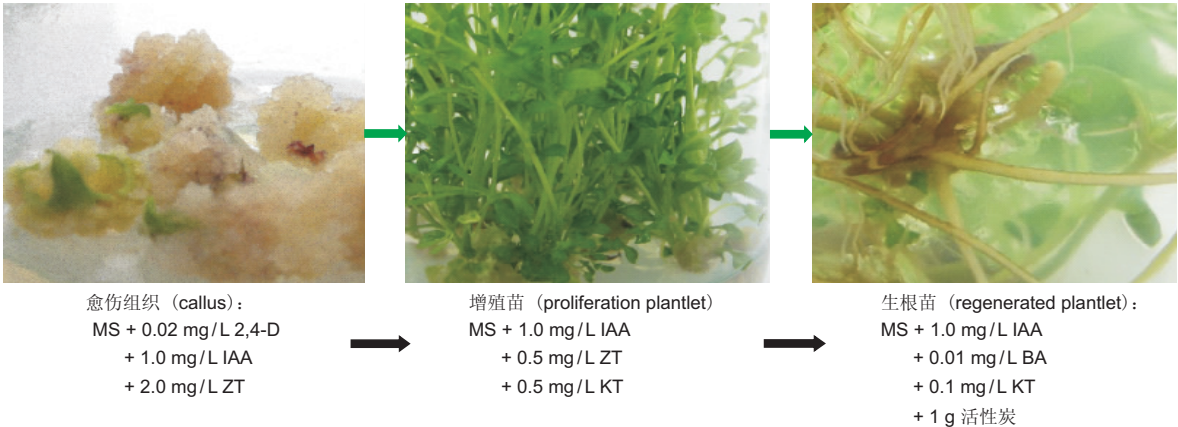


图 1 滇龙胆组织培养流程图
Fig. 1 Flowcharts of *Gentiana rigescens* tissue culture

1.2.3 采集光谱图

光谱扫描范围为 $4000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$, 累计扫描次数为 16 次, 分辨率为 4 cm^{-1} 。为防止 KBr 压片变白, 保持空气相对湿度约为 40%。采集过程中出现 CO_2 吸收峰(2400 cm^{-1} 附近)时, 及时用 KBr 扣除背景。

1.2.4 FTIR 光谱图预处理

原始光谱图由 OMNIC 8.2 分析软件进行预处理: (1)自动平滑+纵坐标归一化+自动基线校正光谱图; (2)原始光谱图经自动基线校正+自动平滑+纵坐标归一化+Norris 平滑(5:5)+二阶求导预处理光谱图。

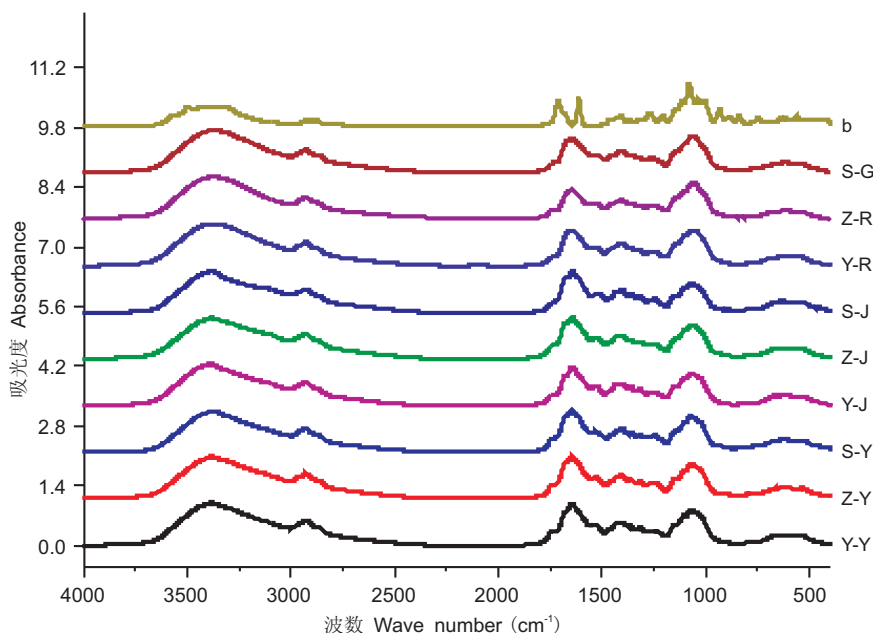
2 结果与分析

2.1 FTIR 光谱图表征及解析

滇龙胆愈伤组织(肉质部、茎、叶)、增殖苗(肉质部、茎、叶)、生根苗(根、茎、叶)及龙胆苦苷标准品的红外光谱图和二阶导数光谱图详见图 2 和图 3。从原始 FTIR 光谱图(图 2)上看, 肉质部和根部峰形相似, 茎和叶峰形相似, 且难以进一步找出它们之间峰位置、峰强度的差异。二阶导数光

谱图可以明显提高光谱图的分辨率, 使许多被掩盖或重叠的光谱峰显现出来^[29], 滇龙胆不同组培阶段的不同组织部位在 2968、2926、2851、1744、1683(1676)、1642(1636)、1462、1404、1313、1238、1154、1108、1070、925、528 cm^{-1} 附近有多个共有峰(图 3)。其中: 2968、2926 cm^{-1} 附近的吸收峰分别为 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2$ 的 C-H 反对称伸缩振动峰; 2851 cm^{-1} 附近微弱的吸收峰为 $-\text{CH}_2$ 的 C-H 对称伸缩振动峰; 1744 cm^{-1} 附近的吸收峰为 C=O 伸缩振动峰, 表明滇龙胆中含有酯类成分^[30]; 3700 \sim 3000 cm^{-1} 为 O-H 伸缩振动^[31]; 1462 cm^{-1} 附近的吸收峰为亚甲基剪式振动峰; 1430 \sim 1300 cm^{-1} 的 C-H 弯曲振动表明饱和烷基的存在; 1154、1070 cm^{-1} 附近的吸收峰是糖苷键 C-O-C 伸缩振动峰, 以 1070 cm^{-1} 附近为最强吸收峰的 1200 \sim 1000 cm^{-1} 处 C-O、C-O-C 吸收带主要为糖苷类成分的特征峰^[32], 滇龙胆中龙胆苦苷、獐芽菜苷、獐牙菜苦苷等都有此结构^[33]。

由图 3 可见, 滇龙胆样品的二阶导数光谱图在峰位、峰形和峰强度上具有一定差异: (1)茎和叶在 1681 cm^{-1} 附近出现强的吸收峰, 生根苗根部(S-



b: 龙胆苦苷标准品; S-G: 生根苗根; Z-R: 增殖苗肉质部; Y-R: 愈伤组织肉质部; S-J: 生根苗茎; Z-J: 增殖苗茎; Y-J: 愈伤组织茎; S-Y: 生根苗叶; Z-Y: 增殖苗叶; Y-Y: 愈伤组织叶。下同。
b: Gentiopicroside standard; S-G: Regenerated plantlet root; Z-R: Proliferation plantlet fleshy part; Y-R: Callus fleshy part; S-J: Regenerated plantlet stem; Z-J: Proliferation plantlet stem; Y-J: Callus stem; S-Y: Regenerated plantlet leaf; Z-Y: Proliferation plantlet leaf; Y-Y: Callus leaf. Same below.

图 2 龙胆苦苷标准品及滇龙胆不同组培阶段不同组织部位的红外光谱图

Fig. 2 FTIR spectra of gentiopicroside and different parts of *Gentiana rigescens* during growth stages in tissue culture

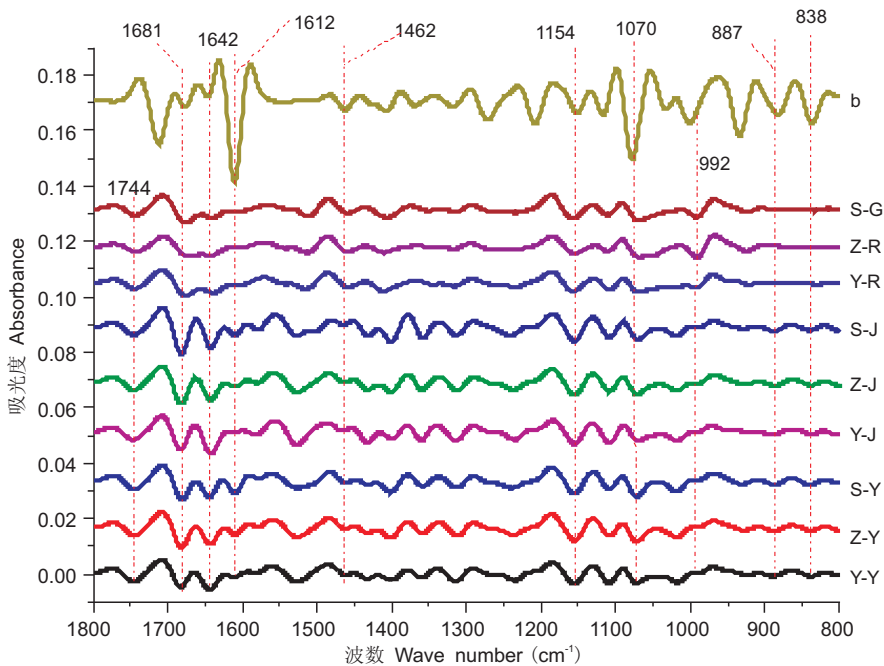


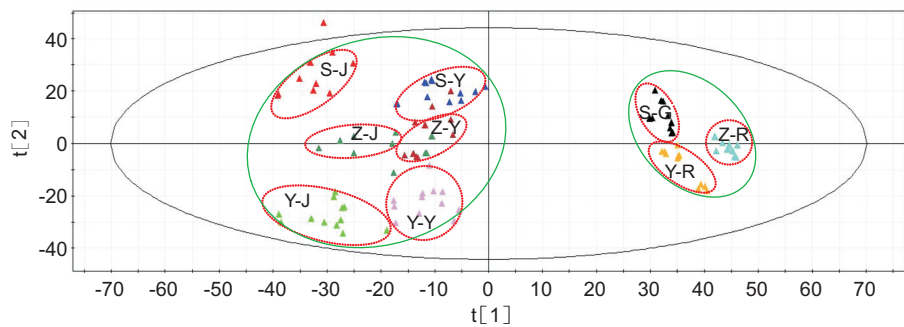
图 3 龙胆苦苷标准品和滇龙胆不同组培阶段不同组织部位的二阶导数光谱图
Fig. 3 Second derivative FTIR spectra of gentiopicroside and different parts of *Gentiana rigescens* during growth stages in tissue culture

G)、增殖苗肉质部(Z-R)和愈伤组织肉质部(Y-R)发生红移,并在 1674 cm^{-1} 附近出现微弱的吸收峰,该峰的出现可能是羰基与双键共轭,导致羰基键长增加,从而降低了羰基双键性;(2)茎和叶在 1642 cm^{-1} 附近出现强的吸收峰,而根和肉质部在此处的吸收峰较弱,该峰为 O-H 弯曲振动峰;(3)根和肉质部在 1511 cm^{-1} 附近有弱吸收峰,茎和叶发生蓝移,并在 1578、1525 cm^{-1} 附近有吸收峰、1525 cm^{-1} 附近有宽的吸收峰;(4)茎和叶在 1430 cm^{-1} 附近有弱的吸收峰;(5)在 1355 cm^{-1} 附近,茎和叶的吸收峰强于生根苗根部,增殖苗肉质部和愈伤组织肉质部在该处几乎无吸收峰;(6)992 cm^{-1} 附近的吸收峰为 $=\text{CH}_2$ 变形振动(端烯氢)^[34],根和肉质部在该处有吸收峰,且生根苗根部、增殖苗肉质部在该处的吸收峰强于愈伤组织肉质部,茎、叶发生蓝移并在 1016 cm^{-1} 附近出现吸收峰,这可能与根、肉质部和茎、叶中烯烃双键上所连原子或基团有关;(7)茎和叶在 889 cm^{-1} (β -构型糖端基 $\delta_{\text{C-H}}$)、838 cm^{-1} (α -构型糖端基 $\delta_{\text{C-H}}$) 附近均有弱吸收峰,愈伤组织肉质部只在 887 cm^{-1} 附近有极弱吸收峰,增殖苗肉质部、生根苗根部只在 838 cm^{-1} 附近有极弱吸收峰;(8)在龙胆苦苷的主要吸收峰 1612 cm^{-1} 附近,根、肉质部以及愈伤

组织茎(Y-J)在该处无吸收峰,生根苗茎和叶(S-J, S-Y)、增殖苗茎和叶(Z-J, Z-Y)以及愈伤组织上长出的叶片(Y-Y)在该处吸收峰强度从大到小依次为:生根苗叶 > 增殖苗叶和生根苗茎 > 增殖苗茎 > 愈伤组织叶;(9)1642、1611(1600、1580、1525、1511)、1430 cm^{-1} 附近的吸收峰为芳环的骨架振动吸收峰。

2.2 PLS-DA

偏最小二乘判别分析 (partial least squares discriminant analysis, PLS-DA) 是一种有监督的模式识别判别分析,可通过强化组间差异、降低组内差异使样品按原始类别进行分组,从而达到了解样品数据整体特征的目的^[35]。多元散射校正 (multiplicative signal correction, MSC) 和标准正态变量 (standard normal variate, SNV) 可以修正和有效去除光散射、样品颗粒不均匀、路径长度等无关变量的干扰^[36,37]。原始光谱经自动基线校正 + 自动平滑 + 纵坐标归一化 + Norris 平滑(5:5) + 二阶求导预处理后导入 SIMCA-P⁺ 10.0 软件,再经 MSC 和 SNV 预处理后进行 PLS-DA 分析(图 4)。结果显示:(1)滇龙胆同一组培阶段相同组织部位的样品能很好的聚在一起,说明其化学成分可能较为相似;(2)愈伤组织肉质部(Y-R)、增殖苗肉质部(Z-



t[1] 和 t[2] 分别代表第一主成分和第二主成分。
t[1] and t[2] means the first and second principal components, respectively.

图 4 滇龙胆不同组培阶段不同组织部位的偏最小二乘判别分析得分图

Fig. 4 PLS-DA score plot of different parts of *Gentiana rigescens* during growth stages in tissue culture

R)与生根苗根(S-G)距离较近,茎、叶距离相对近,而肉质部、根与茎、叶距离较远,即愈伤组织肉质部、增殖苗肉质部与生根苗根在化学成分及含量方面都较为接近,茎、叶部位所含物质在一定程度上接近,根、肉质部与茎、叶差异明显,说明根、肉质部与茎、叶化学成分差异较大,这与光谱图解析的结果是一致的。

2.3 光谱图检索

根据光谱图表征及解析结果发现,生根苗叶(S-Y)在代替滇龙胆野生资源方面具备更大的可能性,故本实验以生根苗叶的二阶导数光谱图(平均光谱图)为参照建检索谱库,并利用 OMNIC 8.2 软件进行匹配度分析。匹配值越大说明匹配程度越高。由表 1 可见,与生根苗叶匹配最好的是增殖苗

示,在龙胆苦苷的主要特征吸收峰 1612 cm⁻¹处峰强度从大到小依次是:生根苗叶 > 增殖苗叶和生根苗茎 > 增殖苗茎 > 愈伤组织叶,愈伤组织肉质部、愈伤组织茎、增殖苗肉质部及生根苗根在该处均未观察到吸收峰。这与 Pan 等^[38]采用液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)对滇龙胆不同生长阶段的组培材料及成熟植株中代谢物含量的变化基本一致,即生根苗叶中龙胆苦苷的含量最高。朱宏涛等^[39,40]研究发现,坚龙胆组培生根苗(生根后 30 d)叶中龙胆苦苷的含量(9.75%) > 野生苗根(9.68%) > 生根苗茎(4.34%) > 野生苗茎(2.3%) > 生根苗根(0.0%)。据此可推测,滇龙胆中龙胆苦苷可能是在叶和茎中合成且主要集中在叶部,同时叶和茎也具有储存功能,滇龙胆成熟植株根部龙胆苦苷的积累可能是在叶和茎合成后经维管束向下运输的结果。Gao 等^[41]对滇龙胆提取物中具有新颖结构的 2,3-二羟基苯甲酸酯类化合物的研究发现,该类物质具有促进 PC12 细胞增殖和保护神经细胞的作用,是一类潜在的抗阿兹海默病的新药先导化合物。本研究 FTIR 光谱图显示,在 3469(3446)、2920、1671、1469、1311(1300)、1155(1120)、1071 cm⁻¹ 附近有吸收峰,表明滇龙胆愈伤组织、增殖苗及生根苗中可能含有 2,3-二羟基苯甲酸酯类化合物成分,具有提取高效低毒的抗老年痴呆中药活性成分的潜力。

采用傅里叶变换红外光谱法对滇龙胆组织培养形成的愈伤组织(肉质部、茎、叶)、增殖苗(肉质部、茎、叶)、生根苗(根、茎、叶)进行研究,发现滇龙胆不同组培阶段不同组织部位中有效成分的含量有差异;二阶导数光谱图及 PLS-DA 分析也显

表 1 样品平均光谱图与参照光谱图的匹配值
Table 1 Matching values of the average sample and reference

Sample codes	S-J	S-G	Z-Y	Z-J	Z-R	Y-Y	Y-J	Y-R
S-Y	92.87	73.61	97.77	94.55	57.57	93.31	85.09	72.01

叶,两者的匹配值达 97.77;与其匹配较好的是增殖苗茎、愈伤组织叶和生根苗茎,匹配值依次为 94.55、93.31、92.87;生根苗叶与愈伤组织茎、增殖苗肉质部、生根苗根及增殖苗肉质部匹配度较低。表明生根苗根、愈伤组织肉质部、增殖苗肉质部与茎、叶在化学成分及含量方面差异明显,愈伤组织茎与生根苗、增殖苗茎叶也有一定差异。

3 讨论

本研究傅里叶变换红外光谱图解析的结果显

示,根部、肉质部与茎叶之间差异较大。揭示组织培养有望为滇龙胆资源的持续利用提供一条有效途径,同时利用植物组织培养技术获取药用成分来代替原植物具有广阔的开发前景;傅里叶变换红外光谱法以其整体宏观的指纹特性,在对药用植物组织培养形成的愈伤组织、增殖苗、生根苗等所含活性成分的整体分析及合适替代品的筛选方面有其独特的优势。

参考文献:

- [1] Hong LY, Guo ZY, Huang KH, Wei SJ, Liu B, Meng SW, Long CL. Ethnobotanical study on medicinal plants used by Maonan people in China[J]. *J Ethnobiol Ethnomed*, 2015, 11(1): 1–35.
- [2] Sharma H, Vashistha BD. Plant tissue culture: a biological tool for solving the problem of propagation of medicinally important woody plants – A review[J]. *Int J Adv Res*, 2015, 3(2): 402–411.
- [3] Guo LF, Xue FD, Guo JF, Na R. Plant tissue culture: a recent progress and potential applications[J]. *Agr Sci Tech*, 2014, 15(12): 2088–2095.
- [4] Gonda S, Kiss-Szikszai A, Szűcs Z, Máthé C, Vasas G. Effects of N source concentration and $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ ratio on phenylethanoid glycoside pattern in tissue cultures of *Plantago lanceolata* L.: A metabolomics driven full-factorial experiment with LC-ESI-MS³ [J]. *Phytochemistry*, 2014, 106: 44–54.
- [5] Hibino K, Ushiyama K. Commercial production of ginseng by plant tissue culture technology[M]//Fu TJ, Singh G, Curtis WR, eds. *Plant Cell and Tissue Culture for the Production of Food Ingredients*. New York: Springer US, 1999: 215–224.
- [6] Wu J, Zhong JJ. Production of ginseng and its bioactive components in plant cell culture: current technological and applied aspects[J]. *J Biotechnol*, 1999, 68(2): 89–99.
- [7] Roberts SC, Shuler ML. Large-scale plant cell culture[J]. *Curr Opin Biotech*, 1997, 8(2): 154–159.
- [8] Fujita Y. Shikonin: production by plant (*Lithospermum erythrorhizon*) cell cultures[M]//Bajaj YPS, ed. *Medicinal and Aromatic Plants I*. Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1988: 225–236.
- [9] Su P, Cheng QQ, Wang XJ, Zhang M, Tong YR, Li F, Gao W, Huang LQ. Characterization of eight terpenoids from tissue cultures of the Chinese herbal plant, *Tripterygium wilfordii*, by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. *Biomed Chromatogr*, 2014, 28(9): 1183–1192.
- [10] 赵志莲, 李海峰, 张德全, 段宝忠. 滇龙胆种质资源筛选及离体培养的初步研究[J]. *北方园艺*, 2013(8): 168–172.
- Zhao ZL, Li HF, Zhang DQ, Duan BZ. Preliminary study on the screening of germplasm resources and the *in vitro* propagation for *Gentiana rigescens*[J]. *Northern Horticulture*, 2013(8): 168–172.
- [11] 张洁, 刘红美. 贵州产坚龙胆组织培养体系的建立[J]. *湖北农业科学*, 2013, 52(17): 4250–4252.
- Zhang J, Liu HM. Establishment of tissue culture system of *Gentiana rigescens* from Guizhou Province[J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2013, 52(17): 4250–4252.
- [12] Gaikwad NK, Moon UR, Bhadoria PS, Mitra A. *In vitro* propagation of *Canscora decussata* Schult. and comparative assessment of anti-cholinesterase and antioxidant capacities of wild-harnessed and *in vitro*-grown plant extracts[J]. *Plant Cell Tiss Org*, 2015, 122: 509–516.
- [13] Dakah A, Zaid S, Suleiman M, Abbas S, Wink M. *In vitro* propagation of the medicinal plant *Ziziphora tenuior* L. and evaluation of its antioxidant activity[J]. *Saudi J Biol Sci*, 2014, 21(4): 317–323.
- [14] Guo B, Gao M, Liu CZ. *In vitro* propagation of an endangered medicinal plant *Saussurea involucrata* Kar. et Kir [J]. *Plant Cell Rep*, 2007, 26(3): 261–265.
- [15] Fernández-González A, Montejo-Bernardo JM, Rodríguez-Prieto H, Castaño-Monllor C, Badía-Laiño R, Díaz-García ME. Easy-to-use analytical approach based on ATR-FTIR and chemometrics to identify apple varieties under Protected Designation of Origin (PDO) [J]. *Comput Electron Agr*, 2014, 108: 166–172.
- [16] Musingarabwi DM, Nieuwoudt HH, Young PR, Eyéghè-Bickong HA, Vivier MA. A rapid qualitative and quantitative evaluation of grape berries at various stages of development using Fourier-transform infrared spectroscopy and multivariate data analysis[J]. *Food Chem*, 2016, 190: 253–262.
- [17] Cheng CQ, Liu J, Zhang CJ, Cai MZ, Wang H, Xiong W. An overview of infrared spectroscopy based on continuous wavelet transform combined with machine learning algorithms: application to Chinese medicines, plant classification, and cancer diagnosis[J]. *Appl Spectrosc Rev*, 2010, 45(2): 148–164.
- [18] 曲楠, 朱明超, 窦森. 近红外与中红外光谱技术在土壤分析中的应用[J]. *分析测试学报*, 2015, 34(1): 120–126.
- Qu N, Zhu MC, Dou S. Application of near- and mid-infrared diffuse reflectance spectroscopic techniques in soil analysis[J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2015, 34(1): 120–126.
- [19] 何延农, 刘尚武, 吴庆如. 中国植物志: 第62卷[M]. 北京: 科学出版社, 1988: 100.
- He YN, Liu SW, Wu QR. *Flora of China*: Vol. 62[M]. Beijing: Science Press, 1988: 100.
- [20] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 89–90.
- Chinese Pharmacopoeia Commission. *Pharmacopoeia of*

- the People's Republic of China: Part 1[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2010: 89–90.
- [21] 陈雷, 王海波, 孙晓丽, 孙文基. 龙胆苦苷镇痛抗炎药理作用研究[J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20(5): 903–906.
- Chen L, Wang HB, Sun XL, Sun WJ. Study on the analgesic and anti-inflammatory activities of gentiopicroside[J]. *Natural Product Research and Development*, 2008, 20(5): 903–906.
- [22] Lian LH, Wu YL, Wan Y, Li X, Xie WX, Nan JX. Anti-apoptotic activity of gentiopicroside in D-galactosamine/Lipopolysaccharide-induced murine fulminant hepatic failure[J]. *Chem-Biol Interact*, 2010, 188(1): 127–133.
- [23] Zhao YL, Zhang J, Jin H, Zhang JY. Discrimination of *Gentiana rigescens* from different origins by Fourier transform infrared spectroscopy combined with chemometric methods[J]. *J Aoac Int*, 2015, 98(1): 22–26.
- [24] Gao L, Li J, Qi J. Gentsides A and B, two new neuritogenic compounds from the traditional Chinese medicine *Gentiana rigescens* Franch[J]. *Bioorgan Med Chem*, 2010, 18(6): 2131–2134.
- [25] 唐荣平, 苏汉林. 濒危植物滇龙胆草的生态学、生物学特性研究[J]. 湖北农业科学, 2013, 52(14): 3364–3366.
- Tang RP, Su HL. Study on the ecological and biological features of endangered plant *Gentiana rigescens*[J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2013, 52(14): 3364–3366.
- [26] Tang RP, Su HL. Introduction and reproductive technique of endangered medical plant *Gentiana rigescens*[J]. *Agr Sci Tech*, 2014, 15(8): 1326–1327.
- [27] 李智敏, 刘莉, 李晚谊, 张金渝, 金航. 滇龙胆的药用资源研究与开发进展[J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2009(S1): 485–487.
- Li ZM, Liu L, Li WY, Zhang JY, Jin H. Progress on research and development of *Gentiana rigescens* as a raw material[J]. *Journal of Yunnan University: Natural Sciences Edition*, 2009(S1): 485–487.
- [28] 赵振玲, 张金渝, 金航, 杨美权, 杨维泽, 杨雁, 杨天梅, 石娅娜, 杨绍兵, 刘莉. 云南栽培滇龙胆病害种类及生态治理[J]. 中药材, 2012, 35(1): 6–11.
- Zhao ZL, Zhang JY, Jin H, Yang MQ, Yang WZ, Yang Y, Yang TM, Shi YN, Yang SB, Liu Li. Species and ecological control of disease on cultivated *Gentiana rigescens* in Yunnan[J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2012, 35(1): 6–11.
- [29] Czarnecki MA. Resolution enhancement in second-derivative spectra[J]. *Appl Spectrosc*, 2015, 69(1): 67–74.
- [30] Krafft C, Neudert L, Simat T, Salzer R. Near infrared Raman spectra of human brain lipids[J]. *Spectrochim Acta A*, 2005, 61(7): 1529–1535.
- [31] 王栋, 刘卉, 王伯涛. 矿物药金礞石的红外光谱分析[J]. 分析测试学报, 2011, 30(5): 577–581.
- Wang D, Liu H, Wang BT. FTIR analysis of mineral medicine *Lapis Micae Aureus*[J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2011, 30(5): 577–581.
- [32] 黎耀东, 闫素雅, 李晓瑾, 许长华, 刘素丽, 孙素琴. 昆仑雪菊的红外光谱产地鉴别[J]. 现代仪器, 2012, 18(6): 71–73.
- Li YD, Yan SY, Li XJ, Xu CH, Liu SL, Sun SQ. Discrimination of Kunlun chrysanthemum from different regions by infrared spectroscopy[J]. *Modern Instruments*, 2012, 18(6): 71–73.
- [33] Xu M, Wang D, Zhang YJ, Yang CR. A new secoiridoidal glucoside from *Gentiana rigescens* (Gentianaceae)[J]. *Acta Bot Yunnan*, 2006, 28(6): 669–672.
- [34] Miskolczi N, Bartha L, Dedk G, Jover, B. Chemical recycling of waste polyethylene and polypropylene[J]. *Petrol Coal*, 2003, 45(3/4): 125–130.
- [35] 李伟星, 刘刚, 赵兴祥, 王小龙, 汪小华. 红外光谱结合化学计量学对朝天椒和涮涮辣的研究[J]. 光散射学报, 2015, 27(1): 69–73.
- Li WX, Liu G, Zhao XX, Wang XL, Wang XH. Infrared spectroscopy combined with chemometrics to study *capsicum frutescens* var and shuanshuan pepper[J]. *The Journal of Light Scattering*, 2015, 27(1): 69–73.
- [36] Viscarra Rossel RA. ParLeS: Software for chemometric analysis of spectroscopic data[J]. *Chemometr Intell Lab*, 2008, 90(1): 72–83.
- [37] Li C, Yang SC, Guo QS, Zheng KY, Wang PL, Meng ZG. Geographical traceability of *Marsdenia tenacissima* by Fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics[J]. *Spectrochim Acta A*, 2016, 152: 391–396.
- [38] Pan Y, Zhang J, Zhao YL, Wang YZ, Huang HY. Investigation of metabolites accumulation in medical plant *Gentiana rigescens* during different growing stage using LC-MS/MS and FT-IR[J]. *Bot Stud*, 2015, 56(1): 14.
- [39] 朱宏涛, 张颖君, 许敏, 王东, 赵平, 杨崇仁. 一种富含龙胆苦苷的坚龙胆组织培养方法[P]. 中国专利: 101658136. 2010–03–03.
- Zhu HT, Zhang YJ, Xu M, Wang D, Zhao P, Yang CR. A method of tissue culture on *Gentiana rigescens* with rich gentiopicroside[P]. Chinese patent: 101658136. 2010–03–03.
- [40] 朱宏涛, 郑传伟, 赵平, 李元, 杨崇仁, 张颖君. 野生坚龙胆及其组培苗中龙胆苦苷的含量分析[J]. 天然产物研究与开发, 2011, 23(3): 482–485.
- Zhu HT, Zheng CW, Zhao P, Li Y, Yang CR, Zhang YJ. Content analysis of gentiopicroside in wild and tissue culture seedlings of *Gentiana rigescens*[J]. *Natural Product Research and Development*, 2011, 23(3): 482–485.
- [41] Gao LJ, Xiang L, Luo Y, Wang GF, Li JY, Qi JH. Gentsides C-K: Nine new neuritogenic compounds from the traditional Chinese medicine *Gentiana rigescens* Franch[J]. *Bioorgan Med Chem*, 2010, 18(19): 6995–7000.