

诱导成功,就可通过扩增用于大规模生产。

References:

- [1] Shao H, Zhang L Q, Li J M, et al. Advances in research of *Dendrobium officinale* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(1): 109-113.
- [2] Peres L E P, Kerbauy G B. High cytokinin accumulation following root tip excision changes the endogenous auxin-to-cy-

tokinin ratio during root-to-shoot conversion in *Catasetum fimbriatum* Lindl. (Orchidaceae) [J]. *Plant Cell Reports*, 1999, 18: 1002-1006.

- [3] Kerbauy G B. *In vitro* conversion of *Cattleya* root tip cells into protocorm-like bodies [J]. *J Plant Physiol*, 1991, 138: 248-257.
- [4] West M A L, Harada J J. Embryogenesis in higher plants: an overview [J]. *Plant Cell*, 1993, 5: 1361-1369.

甘草愈伤组织培养中激素优化组合的研究

刘颖,魏景芳,李冬杰

(河北科技大学生物科学与工程学院,河北 石家庄 050018)

摘要:目的 选择甘草愈伤组织诱导和继代培养的最佳激素组合。方法 以甘草无菌苗的胚根为外植体设计正交试验考察不同浓度的激素组合对愈伤组织诱导和继代的影响。结果 以诱导率为指标,NAA 对甘草细胞脱分化影响最显著;以相对生长速率为指标,6-BA、2,4-D、NAA 对甘草细胞生长分裂影响最显著。结论 甘草愈伤组织诱导及继代的最佳激素组合为 2,4-D 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+KT 0.3 mg/L。

关键词:甘草;愈伤组织;正交试验法;激素组合

中图分类号:R282.2 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2006)06-0931-03

Optimum combinations of plant hormone in callus culture of *Glycyrrhiza uralensis*

LIU Ying, WEI Jing-fang, LI Dong-jie

(College of Bioscience and Bioengineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, China)

Key words: *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.; callus; orthogonal test; hormone combinations

甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 为豆科多年生草本植物,其根和根茎为常用中药,具有补气健脾、清热解毒、润肺止咳、缓急止痛、调和药性之功效。这些年来,甘草自然生产量逐年锐减,因此,利用组织培养技术对甘草进行无性快繁,加快甘草次生代谢活性物质的提取已迫在眉睫。目前,有一些关于甘草组织培养方面的报道^[1],但在这些研究中,所用培养基中植物激素的组合是否最佳难以比较。本研究采用正交试验设计法考察 2,4-D、NAA、6-BA、KT 4 种植物激素对甘草愈伤组织诱导和生长产生的影响,确立最佳的激素组合,为进一步稳定培养物的有效生长速率和提高其中含有效成分的量,建立稳定高产的甘草次生代谢产物生产体系奠定实验基础。

1 材料与方法

新疆甘草无菌苗的胚根切成 1 cm 长的小段,均匀接种在培养基表面。所用基本培养基为 MS (120 ℃, 0.1 MPa, 灭菌 20 min),培养条件采用暗

培养,(25±1) ℃。

1.1 愈伤组织诱导及继代培养:本试验采用正交设计考察植物激素对甘草愈伤组织诱导及生长的影响。综合分析了生长素和细胞分裂素对愈伤组织诱导的影响^[1],在 MS 基本培养基中添加 2,4-D、NAA、6-BA、KT 4 种不同质量浓度的激素, $L_{16}(4^4)$ 试验设计见表 1。

表 1 因素水平

Table 1 Factors and levels

水平	因素			
	A 2,4-D/ (mg · L ⁻¹)	B NAA/ (mg · L ⁻¹)	C 6-BA/ (mg · L ⁻¹)	D KT/ (mg · L ⁻¹)
1	0	0	0	0
2	0.5	0.5	0.5	0.1
3	1.0	1.0	1.0	0.3
4	2.0	2.0	2.0	0.5

外植体接种 7 d,胚根肿胀、膨大,20 d 胚根表面产生分散的愈伤组织,颜色淡黄色、质地疏松,统计不同浓度的激素组合对甘草胚根愈伤组织诱导率

收稿日期:2005-09-27

基金项目:河北省科学技术研究与发展计划项目(02245512D)

作者简介:刘颖(1980—),河北新河人,硕士,主要从事药用植物次生代谢产物的研究工作。

Tel: (0311)88632167 E-mail:llp327@163.com

的影响情况。筛选质地疏松、生长旺盛的优异愈伤组织进行继代增殖培养,30 d 后测定愈伤组织增殖后的鲜质量,计算愈伤组织相对生长速率。

1.2 结果统计:愈伤组织诱导率^[2]=诱导出愈伤组织的外植体块数/接种的外植体块数×100%。

$$\text{相对生长速率}^{[3]}(Rr)=t^{-1}\ln\frac{W_2}{W_1}$$

其中:W₁ 接种时愈伤组织鲜重;W₂ 收获时愈伤组织鲜重;t 愈伤组织培养时间

2 结果与分析

2.1 正交试验设计安排及极差分析:采用正交试验,进行 16 组处理,每个处理组设计 3 个样本,以甘草胚根愈伤组织的诱导率和相对生长速率为指标,试验安排见表 2。

表 2 正交设计中植物激素对愈伤组织诱导及其生长的影响

Table 2 Effect of phytohormones on callus induction and its growth of *G. uradensis* in orthogonal design

试验号	A	B	C	D	诱导率/%	Rr
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0.5	0.5	0.1	41.3	0.030 4
3	0	1.0	1.0	0.3	46.7	0.035 1
4	0	2.0	2.0	0.5	45.5	0.036 2
5	0.5	0	0.5	0.3	40.9	0.040 2
6	0.5	0.5	0	0.5	40.0	0.019 0
7	0.5	1.0	1.0	0	88.5	0.046 2
8	0.5	2.0	2.0	0.1	60.6	0.048 5
9	1.0	0	1.0	0.5	36.5	0.039 1
10	1.0	0.5	2.0	0.3	75.5	0.046 6
11	1.0	1.0	0	0.1	86.3	0.037 5
12	1.0	2.0	0.5	0	76.2	0.045 0
13	2.0	0	2.0	0.1	50.2	0.033 3
14	2.0	0.5	1.0	0	72.1	0.035 0
15	2.0	1.0	0.5	0.5	69.7	0.051 2
16	2.0	2.0	0	0.3	67.3	0.028 0
诱导率	K ₁	133.5	126.2	193.6	236.8	以诱导率为指标,因素主次 BACD,优化组合 B ₃ A ₃ D ₃ C ₃
	K ₂	238.6	228.9	226.7	238.4	
	K ₃	274.5	291.2	243.8	239	
	K ₄	259.3	249.6	231.8	191.7	
	R	141	165	50.2	47.3	
相对生长速率	K ₁ '	0.101 7	0.112 6	0.084 5	0.126 2	以相对生长速率为指标,因素主次 CABD,优化组合 C ₃ A ₃ B ₃ D ₃
	K ₂ '	0.159 3	0.131 0	0.156 8	0.149 7	
	K ₃ '	0.168 2	0.170 0	0.165 4	0.149 9	
	K ₄ '	0.147 5	0.157 7	0.164 6	0.145 5	
	R'	0.066 5	0.057 4	0.080 9	0.023 7	

经过 4 种不同质量浓度的植物激素的正交试验,发现各种组合对甘草愈伤组织诱导和相对生长速率的影响差别较大,对实验结果直观分析,发现以诱导率为指标,4 种植物激素对甘草胚根脱分化影响力大小依次是 NAA>2,4-D>KT>6-BA,较好的给合为 NAA 1.0 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L+KT 0.3 mg/L+6-BA 1.0 mg/L。在甘草胚根细胞脱分

化过程中,生长素起主导作用。在继代培养中,以相对生长速率为指标,4 种植物激素对甘草胚根细胞生长分裂的影响依次为 6-BA>2,4-D>NAA>KT,较好的给合为 6-BA 1.0 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L+KT 0.3 mg/L。结果表明在甘草细胞继代生长过程中,细胞分裂素 6-BA 的质量浓度变化影响较大。为了进一步反映各因素之间的差异,以便寻求最佳质量浓度的激素组合,进行方差分析。

2.2 方差分析:对极差分析的结果进行方差分析,结果见表 3、4。

表 3 方差分析(诱导率)

Table 3 Variance analysis with inducing rate as index

方差来源	自由度	平方和	均方和	F
A	3	40.459 6	13.486 5	5.269 *
B	3	51.908 3	17.301 3	6.760 **
C	3	2.340 3	0.780 1	0.305
D	3	14.178 2	4.726 1	1.847
e	12	30.713 4	2.559 5	

$$* F_{0.05}(3,16)=3.24 \quad ** F_{0.01}(3,16)=5.29$$

表 4 方差分析(相对生长速率)

Table 4 Variance analysis with relative growth rate as index

方差来源	自由度	平方和(×10 ⁻⁴)	均方和(×10 ⁻⁴)	F
A	3	6.2	2.10	26.25 **
B	3	5.0	1.67	20.88 **
C	3	1.1	0.37	45.25 **
D	3	0.9	0.3	3.75 *
e	12	1	0.08	

$$* F_{0.05}(3,16)=3.24 \quad ** F_{0.01}(3,16)=5.29$$

由表 3、4 方差分析结果可知,因素 B(NAA)对甘草愈伤组织诱导作用极显著,因素 A(2,4-D)影响作用较显著。而 A(2,4-D)、B(NAA)、C(6-BA)、D(KT)4 种因素对甘草愈伤组织相对生长速率均有较显著的影响。其中,C、A、B 3 因素作用极显著,因素 D 作用较显著。4 种激素对愈伤组织的诱导作用大小依次为 B、A、D、C,对相对生长速率的作用依次为 C、A、B、D。

2.3 激素浓度最佳水平的选择:综合考虑极差分析和方差分析的结果,以甘草愈伤组织诱导率和相对生长速率为指标,得到最佳的激素组合为 A₃B₃C₃D₃。采用这种激素组合对甘草胚根愈伤组织进行多次继代培养,获得了质地疏松、淡黄色、分裂旺盛的优异愈伤组织,见图 1。

3 讨论



图 1 甘草胚根愈伤组织

Fig. 1 Callus of *G. uralensis* radicle

植物细胞进行脱分化(愈伤组织诱导)是一个复杂的生理生化过程,植物激素的作用极大,随着分子生物学的发展,人们已经证明植物激素是通过与植物细胞内的受体蛋白结合而起作用,即植物激素必须与靶细胞中的受体结合,才能调节植物的生长发育^[4]。不同的植物激素对靶细胞的识别能力有差别,质量浓度不同与靶细胞结合的概率也不同,宏观表现上是不同种类、不同质量浓度的植物激素组合影响愈伤组织的诱导和继代生长。

植物生长素在植物细胞脱分化、形成愈伤组织

的过程中是必不可少的物质。植物细胞在诱导期,由于生长素的作用,细胞代谢开始活化,启动植物细胞脱分化的进行,因此在愈伤组织诱导阶段,生长素发挥了重要作用,正交试验结果表明 NAA 对甘草愈伤组织的诱导影响显著。植物细胞分裂素的作用是使已经脱分化的细胞或细胞团保持有丝分裂,从而使细胞团能够进行继代培养^[5],在甘草细胞继代培养过程中,6-BA 的浓度变化对细胞相对生长速率影响显著。因此,综合分析本试验的结果,选择 2,4-D 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+KT 0.3 mg/L 为甘草愈伤组织诱导和继代的最佳激素组合。

References:

- [1] Pei Y X, Hao J P. Tissue culture of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. [J]. *Inner Mongol Agric Sci Technol* (内蒙古农业科技), 1999 (3): 16.
- [2] Hu H Y, Wu X Y, Liang X H. Induced cultivation of *Glycyrrhiza inflata* Batal callus [J]. *Pharm Biotech* (药用生物技术), 2004, 11(3): 171.
- [3] Jin Y, Tao W X. Enhancement of catharanthine productivity by *catharanthus roseus* callus after UV mutation [J]. *J Wuxi Univ Light Ind* (无锡轻工大学学报), 1997, 16(2): 32.
- [4] Zhou W Y. *Engineering Principle and Technology of Plant Cell* (植物细胞工程原理与技术) [M]. Beijing: China Agricultural University Press, 2001.
- [5] Pan Y Z. *Plant Physiology* (植物生理学) [M]. Beijing: Higher Education Press, 2001.

徐长卿地上部分扫描电镜的观察研究

张永清^{1,2}, 周凤琴², 李 佳², 高德民², 王建成², 李 萍^{1*}

(1. 中国药科大学, 江苏 南京 210009; 2. 山东中医药大学, 山东 济南 250014)

摘 要:目的 观察徐长卿植株地上部分叶片、果实、种子等器官各部位的表面超微形态,为徐长卿植株品种鉴定与生物学特性研究提供依据。方法 采用扫描电子显微镜技术进行观察。结果 徐长卿植株叶片上、下表皮,内、外果皮,种皮和花粉块表面的超微形态各异,并各具特征。结论 各部位表面超微形态可作为徐长卿植株生物学特性研究、药材与品种鉴定的重要依据。

关键词:徐长卿;地上部分;超微形态;扫描电镜

中图分类号:R282.7

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2006)06-0933-03

Observation of above-ground part of *Cynanchum paniculatum* by scanning electron microscope

ZHANG Yong-qing^{1,2}, ZHOU Feng-qin², LI Jia², GAO De-min², WANG Jian-cheng², LI Ping¹

(1. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; 2. College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China)

收稿日期:2005-12-30

基金项目:国家“十五”重大科技专项“创新药物和中药现代化”项目(2001BA701A62-08)

作者简介:张永清(1962—),男,山东平邑人,山东中医药大学药学院副院长、教授、硕士生导师,长期从事药用植物栽培的教学、科研工作,在该领域已发表论文 60 余篇,出版专著 6 部,获省部级奖 1 项、厅局级奖 6 项。

Tel: (0531)82613080 Fax: 82613554 E-mail: zyq622003@yahoo.com.cn

* 通讯作者 李 萍 Tel: (025)85322256 Fax: (025)85322448 E-mail: lipingli@public.ptt.js.cn