

胀果甘草愈伤组织诱导培养

胡海英, 吴晓玲, 梁新华

(宁夏大学生命科学学院, 宁夏 银川 750021)

摘要 试验以甘草的子叶和下胚轴为外植体, 分别接种在不同激素组合的 MS 培养基上, 黑暗条件下培养, 诱导愈伤组织。结果表明: 诱导甘草子叶愈伤组织的最适培养基为 MS+2,4-D(1 mg/L)+BA(1 mg/L), 其愈伤组织诱导率达 100%, 而且其愈伤组织鲜重与接种外植体重的比值达到 15.37 倍; 诱导甘草下胚轴愈伤组织的最佳培养基为 MS+2,4-D(0.5 mg/L) 和 MS+2,4-D(0.5)+NAA(0.5), 通过在这两种培养基上进行愈伤组织的增殖培养, 也得到了十分可观的增殖效果, 其相对生长量分别达到了 381.52% 和 498.80%。

关键词 甘草; 组织培养; 愈伤组织

中图分类号: S567.7+1

文献标识码: A

文章编号: 1005-8915(2004)03-0170-03

胀果甘草(*Glycyrrhiza inflata* Batal) 为豆科植物, 是中药材中的第一大品种, 其根及根茎入药, 有补气健脾、清热解毒、润肺止咳、缓急止痛、调和药性之功效^[1]。现代医学认为甘草含有多种活性成分, 具有抗溃疡、抗病毒、抗炎、解痉止痛、调节免疫和内分泌功能, 对抗癌药有解毒作用, 对糖尿病的并发症有预防作用, 能诱导干扰素的产生^[2]。目前, 人工栽培作为甘草生产的主要途径, 在一定时期内, 其不仅不能满足市场需求, 而且品质保证方面也存在一些问题, 同时也大大限制了甘草有效成分的深度开发和利用。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, 一是利用组织培养技术加大甘草优质无毒种苗的生产, 二是通过细胞大量培养系统进行甘草有效成分的生产。对甘草愈伤组织培养及有效成分含量分析已有报道^[3], 但甘草愈伤组织生长量的调控方面的研究报道很少, 文章通过筛选甘草诱导愈伤组织的最佳培养基配方和提高愈伤组织相对生长量的最适配方, 为进一步稳定培养物的有效生长速率和提高其中的有效成分含量, 建立稳定高产的甘草次生代谢产物生产体系, 奠定前期的实验基础。

1 材料与方法

1.1 甘草无菌苗的培养

试验材料取自宁夏盐池县, 挑选饱满的甘草种子, 用水洗净, 吸干水分, 置于超净台上, 用 75% 的酒精浸泡 40 s, 再用 0.1% 升汞消毒 10 min, 无菌水冲洗数次并浸泡 4~5 h, 接种到 MS 基本培养基上, 在暗中培养, 待种子萌发后, 转入光下培养, 得到无菌苗, 培养温度为 (25±1)℃; 光照: 10 h/d; 光强: 1 000 lx

1.2 甘草愈伤组织的诱导与培养

1.2.1 培养基的选择与试验设计 基本培养基选择为 MS^[4] 培养基。其中琼脂 10 g/L, 蔗糖 30 g/L, 培养基的 pH 值 5.8, 选择生长素和细胞分裂素作为激素配比, 即 2,4-二硝基苯氧乙酸(2,4-D)、萘乙酸(NAA) 和 6-苄基腺嘌呤(6-BA), 设置不同水平的处理如表 1、表 2 所示:

Tab 1 The hormones medium of the inducing cotyledon callus

Hormone(mg/L)	M1	M2	M3	M4	M5
2,4-D	0.0	0.0	0.0	1.0	0.5
6-BA	0.5	1.0	2.0	1.0	1.0
NAA	0.5	0.5	0.5	0.0	0.5

Tab 2 The hormones medium of induced hypocotyl callus

Hormone(mg/L)	N1	N2	N3	N4	N5
2,4-D	0.5	0.5	0.5	0.5	1.0
6-BA	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0
NAA	0.5	0.0	0.0	0.5	0.0

收稿日期: 2003-10-24 修回日期: 2003-12-17

基金项目: 宁夏教委资助高校基金项目, 宁夏大学一般基金项目

作者简介: 胡海英, 1976 年生, 女, 宁夏人, 见习研究员, 主要从事植物组织培养技术研究。

1.2.2 试验方法 切取无菌苗子叶、胚轴切段(0.5 cm),接种于愈伤组织诱导培养基上,称重接种材料。培养温度为 $(25\pm 1)^{\circ}\text{C}$,暗培养,相对湿度为70%~80%,供氧充足。

1.3 结果统计

愈伤组织诱导率^[5] = 诱导出愈伤组织的外植体块数/接种的外植体块数 $\times 100\%$

愈伤组织相对生长量^[6] = (愈伤组织增殖后的鲜重-接种愈伤组织鲜重)/接种愈伤组织鲜重 $\times 100\%$

2 结果

接种4 d后材料均有肿胀、膨大现象,子叶开始卷曲,叶片增厚肥大;下胚轴膨胀呈粗棒状。1 w后在切口及材料边缘均有愈伤组织产生,呈淡绿色或松软的淡黄色,或泛白絮状物。

2.1 不同激素配比对甘草子叶愈伤组织诱导率的影响

经20 d培养后,对子叶培养物进行称重,计算愈伤组织诱导率及鲜重^[5]。

Tab 3 Effect of different hormones on inducing of cotyledon callus

No. of medium	No. of inoculated explants	No. of induced callus	Induction rate of callus(%)	Weight of explants inoculated(g)	Weight of callus (g)
M1	9	2	22.2	0.17	0.19
M2	9	5	55.6	0.12	1.21
M3	10	7	70.0	0.17	2.39
M4	6	6	100.0	0.08	1.23
M5	6	5	83.3	0.07	0.96

从表3可以看出在对子叶进行愈伤组织诱导的不同配比的培养基中,以MS+2,4-D(1 mg/L)+6BA(1 mg/L)产生的愈伤组织数目最多,其愈伤组织诱导率达100%。所以,此培养基(M4)的激素配比为子叶诱导愈伤组织的最佳组合,也是愈伤组织继代增殖培养的首选配方。而且在这5种配方中,有2,4-D存在的激素配比对愈伤组织诱导均比其他的效果好,其诱导率高出3.7个百分点(M4与M1相比)。各处理的愈伤组织鲜重也表明,在诱导愈伤组织及其生长共20 d,愈伤组织形成和生长初期的细胞分裂和生长速度非常快,如M4处理,愈伤组织鲜重与接种材料重的比值最高,达到15.37倍。

2.2 不同激素比对甘草下胚轴愈伤组织诱导率的影响

经20 d初代诱导培养后,统计不同激素比对甘草下胚轴愈伤组织诱导率的影响情况。再进行继代增殖培养,15 d后测定愈伤组织增殖后的鲜重,计算愈伤组织相对生长量。

Tab 4 Effect of different hormones on inducing callus of hypocotyl

No. of Medium	Inductive rate(%)	Weight of inoculated callus	Weight of growth callus(g)	Relation growth rate(%)
N1	77	0.79	3.14	297.47
N2	75	0.85	3.44	304.71
N3	100	0.92	4.43	381.52
N4	100	0.83	4.97	498.80
N5	83	0.89	4.11	361.80

从表4可见,不同激素比对甘草下胚轴愈伤组织诱导有很大的影响,即诱导率 $N3=N4>N5>N1>N2$,其中N3和N4达到了100%。即MS+2,4-D(0.5)和MS+2,4-D(0.5)+NAA(0.5)是诱导甘草下胚轴的最适培养基配方。通过在这两种培养基上进行愈伤组织的增殖培养,也得到了十分可观的增殖效果,其相对生长量分别为381.52%和498.80%。在此5种激素配比中,均使用了2,4-D或与其他激素进行配合使用,从中可见,各配比中的愈伤组织诱导率都比较高,而且2,4-D与NAA配合效果最好(M4)。但2,4-D的浓度增加反而使愈伤组织诱导率和相对生长量有所下降(M3与M5比较)。

3 讨论

(1) 作者在预实验时采用光照培养,发现各培养基中均有愈伤化的现象发生,但20 d后,几乎有90%的愈伤组织或接种的外植体褐化死亡,造成没有可统计的实验结果。在此后的正式实验中,采用暗培养,几乎没有褐化的现象,但愈伤组织形成后不宜长时间培养(时间不能超过30 d),培养时间或继代时间过长也会出现褐化的现象。

(2) 试验结果表明,2,4-D在诱导愈伤组织过程中有着决定性的作用,与适合浓度的6-BA或NAA配合使用效果更好。而且2,4-D的浓度不易过高,在诱导愈伤组织初期应保持在0.5~1.0 mg/L的浓度范围。同时,下胚轴作为外植体

进行愈伤组织的诱导,实验效果比子叶较好。

(3) 此实验结果得出了比较高的甘草愈伤组织诱导率与相对生长量,可为进一步测定甘草愈伤组织大量培养系统中的生长量和有效成份含量提供前期实验参考和储备。

参考文献

- [1] 叶时泉,唐秀英. 甘草在医药学方面的研究现状[J]. 时珍国药研究,1997,8(1):75.
- [2] 李铁民,梁再赋. 甘草提取物及其衍生物的抗病毒研究现状[J]. 中草药,1994,25(12):655.
- [3] 梁玉玲,管延英,阳丽,等. 胀果甘草愈伤组织培养及甘草酸

含量分析[J]. 河北大学学报(自然科学版),2000,20(4):365.

- [4] 潘瑞炽,施和平. 植物组织培养[M]. 广州:广东高等教育出版社. 2000, 3.
- [5] 李浚明. 植物组织培养教程[M]. 北京:中国农业大学出版社. 2000.40.
- [6] 陈刚,贾敬芬,金红,等. 草木樨状黄芪高频离体再生体系的建立[J]. 西北植物学报. 2001,21(1):136.
- [7] 曹孜义,刘国民. 实用植物组织培养技术教程[M],兰州:甘肃科学技术出版社. 1996,80.
- [8] 中国医学科学院药物研究所,南京药学院,江苏生物研究所,等编. 中药志(第一册)[M]. 北京:人民卫生出版社. 1959,546.

Induced Cultivation of *Glycyrrhiza Inflata* Batal Callus

HU Hai-ying, WU Xiao-ling, LIANG Xin-hua

(Life Science Institute, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

Abstract Callus was induced and cultured after inoculating cotyledon and hypocotyls of *Glycyrrhiza inflata* Batal on MS medium with adding different kinds of hormones under dark situation respectively. The results showed that the preference medium to induce and culture callus by using cotyledon as explants was MS+2,4-D(1 mg/L)+6BA(1 mg/L) with 100% inductive rate, at the same time, the ratio of both callus weight and explants weight was 15.37 times. In this experiment, the preference medium to induce and culture hypocotyls callus were MS+2,4-D(0.5 mg/L) and MS+2,4-D(0.5 mg/L)+NAA(0.5 mg/L), the relation growth rate of callus under above two mediums were 381.52% and 498.80% respectively.

Key words *Glycyrrhiza inflata*, Tissue culture, Callus tissue

• 信 息 •

2004-B-266 一种口含干扰素冰块及其制法和用途-预防非典型肺炎

2004-B-267 PCT 基于肝素、葡糖胺聚糖或类肝素的制剂以及这种制剂和制剂基质的应用

2004-B-268 PCT 制备含有胆汁酸的澄清水溶液剂型

2004-B-269 一种难溶性药物片剂及其制备方法

2004-B-270 一种用木糖醇作等渗调节剂的门冬氨酸钾镁输液

2004-B-271 一种重组人碱性成纤维细胞生长因子的高效表达

2004-B-272 PCT 非肠道的疫苗制剂及其应用

2004-B-273 PCT 生产重组人的甲状旁腺激素的酵母转化株及其用于生产激素的方法

2004-B-274 基因重组人溶菌酶针对冠状病毒 SARS 在制药中的新用途