

长春花叶片愈伤组织的诱导过程中发生的生物碱代谢类型的变化机制有重要价值,因为这一变化最终导致组织培养的方法不能生产文多灵,长春碱。本文仅是一部分初步的工作,仍需进一步努力探索。

参考文献

1 Moreno PRH, *et al.* Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1995,42:1

- 2 Schlatmann JE, *et al.* Biochnology and Bioengineering, 1993,41:253
- 3 Shanks JV, *et al.* Biotechnology and Bioengineering, 1998,58:333
- 4 赵 剑,等. 生物物理学报,1996,12(3):517
- 5 赵 剑,等. 药学报,1999,34(7):
- 6 Morris P. Planta Medica, 1986,:127

(1998-11-23 收稿)

Regulation of Indole Alkaloids Synthesis and Related Enzymes During Callus Initiation and Culture of Madagascar Periwinkle Leaves (*Catharanthus roseus*)

Zhao Jian, Wang Wenke, Zhu Weihua, *et al.* (Institute of Materia Medica of PUMC & CAMC, Beijing 100050)

Abstract Leaf calluses of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don were initiated in four different media under illumination or in dark. Visible callus began to form within 10 to 15 days. The ordinarily high contents of vindoline and catharanthine in the leaf declined rapidly, while the lower ajmalicine and serpentine contents increased markedly during callus initiation. At the same time, acidic and alkaline peroxidase showed a tendency to increase their activities, especially the activity of alkaline peroxidase was more closely related with the synthesis of serpentine and ajmalicine. Results also showed that illumination improved occurrence of leaf callus in advance and stimulated peroxidase activity, beneficial for the synthesis of vindoline, catharanthine and serpentine. 2,4-D represses biosynthesis of indole alkaloids and peroxidase activity in all cultures.

Key words *Catharanthus roseus* (L.) G. Don leaf callus initiation indole alkaloid peroxidase activity

正交设计在何首乌组织培养中的应用[△]

广州中医药大学中药学院(510407) 杜 勤* 王振华 张俊荣

摘 要 用正交设计法考察了4种激素对何首乌嫩茎、叶诱导愈伤组织产生的影响。方差分析结果显示:2,4-D、IBA作用极显著,6-BA作用显著,NAA作用不显著,它们作用大小依次为:2,4-D > IBA > 6-BA > NAA,诱导何首乌愈伤组织产生的最佳激素配比为:MS+2,4-D 1mg/L(以下单位同)+6-BA 1+IBA 0.5。

关键词 正交设计 何首乌 组织培养 愈伤组织

何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 为蓼科植物,是常用传统中药,为广东十大道地药材之一。药用块根,具有补肝

肾,益精血,乌须发,强筋骨等功效。目前关于何首乌组织培养方面的报道较少^[1,2],而在这些研究中,所用培养基中植物激素的组合是

* Address: Du Qin, College of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica, Guangzhou

杜 勤 1990年河南中医学院中药专业本科毕业,1995年江西中医学院中药及天然药物人工培养专业硕士研究生毕业。现任广州中医药大学中药学院药植、鉴定学教研室讲师,从事药用植物学等课程的教学任务。主要研究方向为药用植物资源及人工培养。目前承担广东省中医药管理局课题两项和广州中医药大学课题一项。近5年发表论文12篇。

△ 本文为广东省中医药管理局课题B96-31的一部分研究内容

否最佳难以比较。

本实验采用正交实验设计法考察了激素 2,4-D、6-BA、NAA、IBA 对诱导何首乌愈伤组织产生的影响。一方面分析不同浓度植物激素对何首乌组织培养的影响,另一方面旨在探索减少实验次数,提高培养基优选的工作效率。

1 材料与方 法

1.1 取材及培养条件:何首乌外植体均采自广州中医药大学药圃。取何首乌幼嫩茎、叶,自来水冲洗干净,用滤纸吸干表面水分,再用 75%酒精漂洗 0.5 min,然后用 0.1%升汞浸泡 10 min,无菌水冲洗 5 次,无菌滤纸吸干表面水分,最后叶片切成 1 cm×1 cm 的小块;茎切成 1 cm 长的小段,均匀接种在培养基的表面。所用基本培养基为 MS(120℃ 灭菌 15 min)。

培养条件:光照强度 2 500 lx,每日光照时间 8~10 h,培养温度 25℃±2℃

1.2 正交实验设计:根据以往的工作经验,选取 2,4-D、6-BA、NAA、IBA 4 种激素进行实验,每种激素取 3 个水平(浓度均为 mg/L)。选用 $L_9(3^4)$ 正交表,考察上述 4 种激素对何首乌愈伤组织诱导的影响。因为因子数与列数相等,故做有重复的 4 因素 3 水平正交试验。根据设计安排组织 9 次试验,因子水平安排见表 1,实验结果见表 2。

表 1 $L_9(3^4)$ 因子水平表

水平	A	B	C	D
	2,4-D	6-BA	NAA	IBA
1	0	0.5	0	0
2	1	1	0.5	0.5
3	2	1.5	1	1

2 实验结果与分析

2.1 2,4-D、6-BA、NAA、IBA 对愈伤组织诱导率的影响:外植体接种 1 周后,叶表面、茎切段两端开始膨大,至 3 周时,叶表面产生分散的愈伤组织,质地疏松,茎段两端产生块状的愈伤组织,质地致密,其颜色均为淡黄白色,接种 4 周即可进行统计。

经过 2,4-D、6-BA、NAA、IBA 4 种激素

3 个水平 9 个浓度组合的正交实验,发现各种组合对何首乌愈伤组织诱导的影响差异很大,对实验结果进行极差分析,结果见表 3。

表 2 实验安排及结果

实验号	因 子				愈伤组织诱导率(%)		$\sum X$
	A	B	C	D	x_1	x_2	
1	0	0.5	0	0	56.7	60.0	116.7
2	0	1	0.5	0.5	66.7	71.4	138.1
3	0	1.5	1	1	46.2	41.2	87.4
4	1	0.5	0.5	1	76.2	73.9	150.1
5	1	1	1	0	95.2	95.8	191.0
6	1	1.5	0	0.5	91.3	92.3	183.6
7	2	0.5	1	0.5	96.3	100.0	196.3
8	2	1	0	1	78.8	80.0	158.8
9	2	1.5	0.5	0	54.5	76.0	130.5

注:每组接种 12 瓶,每瓶接种 4 块

表 3 $L_9(3^4)$ 极差分析

K_{ij}	愈伤组织诱导率(%)			
	2,4-D	6-BA	NAA	IBA
K_1	342.2	463.1	459.1	438.2
K_2	524.7	487.9	418.7	518.0
K_3	485.6	401.5	474.0	396.3
R	182.5/3	86.4/3	55.3/3	121.7/3

由表 3 进行直观分析,因子 A(2,4-D)和因子 D(IBA)对实验结果影响较大。为了进一步反映各因子之间的差异,以便寻求最佳水平,我们进行了方差分析。

2.2 方差分析:对表 2 的结果进行方差分析,结果见表 4。由表 4 知,因子 A(2,4-D)和因子 D(IBA)作用极显著**,因子 B(6-BA)作用显著*,因子 C(NAA)作用不显著。4 种激素对愈伤组织的诱导作用大小依次是:2,4-D>IBA>6-BA>NAA。

表 4 方差分析

方差来源	l_0	r	MS	F
A	0.3078	2	0.1539	25.27**
B	0.0660	2	0.0330	5.48*
C	0.0278	2	0.0139	2.282
D	0.1274	2	0.0637	10.460**
误差	0.0548	9	0.0061	
总误差	0.5560	17		

* $F_{0.05}(2,8)=4.26$ ** $F_{0.01}(2,8)=8.02$

2.3 2,4-D、6-BA、NAA、IBA 浓度最佳水平的选择:由表 3 知,诱导何首乌愈伤组织

产生的最佳激素配比为: A2B2C0D2, 即 2, 4-D 1+6-BA 1+IBA 0.5。我们用这种配比的培养基进行验证实验, 愈伤组织诱导快, 且生长较好, 诱导率达 100%。证明实验所得结果是正确的。

3 讨论

植物的细胞分化是一个复杂的生理生化过程。大量实验表明, 植物激素和植物生长调节物质的种类、浓度以及它们之间的组合直接影响着愈伤组织的诱导。从本实验来看, 何首乌的组织培养过程中, 必须要有植物激素和植物生长调节物质。如果没有, 就不能诱导出愈伤组织。

实验按照正交设计进行了 2, 4-D、6-BA、NAA、IBA 4 种激素 3 个水平组合的 9 次实验, 每种组合均能诱导出愈伤组织。但如果得到较理想的结果, 培养基中激素就必须按一定浓度进行配比, 2, 4-D 1+6-BA 1+IBA 0.5。对何首乌的组织培养具有一定的指导意义。我们的研究工作也说明, 正交实验

设计与数据分析方法对于反映植物激素与愈伤组织诱导结果间的关系、选择最佳实验方案, 都是十分有效的工具, 其优越性在于能大量减少实验次数。本研究若进行全部实验, 必须采用 $3^3=27$ 种配方, 而正交实验只需做 9 种, 节省了 3 倍工作量。由于相互间水平搭配得均衡, 因此较少次数的正交实验大体能反映全部组合实验的效果。目前在植物组织培养领域中, 大量研究工作限于人力、物力, 只能对个别植物激素和植物生长调节物质实施部分组合实验。可以预料, 若能广泛应用正交实验设计和分析, 其工作效率及实验结果的正确性和可靠性将能得到较大程度的提高。

参考文献

- 1 袁维纲, 等. 中草药, 1987, 18(2):29
- 2 于荣敏, 等. 中国药物化学, 1995, 5(2):131
- 3 倪宗瓚, 等. 医学统计学. 北京: 人民卫生出版社, 1990:86

(1998-08-10 收稿)

Application of Orthogonal Design in Tissue Culture of Tuber Fleeceflower (*Polygonum multiflorum*)

Du Qin and Wang Zhenhua (Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510470)

Abstract Effects of 2, 4-D, 6-BA, NAA and IBA on calli inducement of *Polygonum multiflorum* Thunb. were studied by $L_9(3^4)$ orthogonal design. The experimental results showed that the actions of 2, 4-D and IBA were extremely remarkable, that of 6-BA was remarkable, while NAA was least effective. The order of their efficiencies was 2, 4-D > IBA > 6-BA > NAA. The best medium for calli inducement was MS + 2, 4-D, 1 mg/L + 6-BA, 1 mg/L + IBA, 0.5 mg/L.

Key words orthogonal design *Polygonum multiflorum* Thunb. tissue culture callus

(上接第 532 页)

参考文献

- 1 徐淑云, 等. 药理实验方法学. 北京: 人民卫生出版社, 1991:1201
- 2 Bloom B R, et al. Immunol Today, 1992, 13(4):131
- 3 吴昌升, 等. 上海免疫学杂志, 1997, 17(1):34
- 4 Liu M C, et al. Am Rew Respir Dis. 1991, 144:51
- 5 Zhang Xiu-zhen, et al. CJIM, 1995, 1(3):171
- 6 潘 泽, 等. 国外医学-内科学分册, 1999, 26(3):111
- 7 吴敏毓, 等. 医学免疫学. 合肥: 中国科学技术大学出版社, 1993:96
- 8 平奎云, 等. 中国免疫学杂志, 1997, 13(1):61

(1999-03-02 收稿)