

长受抑,黄芩苷的量也显著减低(5.76 mg/g)。因此,适宜的氮源浓度为 60 mmol/L (其中 NH_4^+ : NO_3^- 为 1 : 1)

2.6 磷酸盐对黄芩愈伤组织生长和黄芩苷积累的影响:见图 5。可以看出,当 KH_2PO_4 在小于 0.5 mmol/L 时,生物量随着 KH_2PO_4 浓度的增加而明显增大,在 0.5~2.5 mmol/L 时增加幅度不大。黄芩苷的量在 1.5 mmol/L 时达到最大值(26.73 mg/g)。因此, KH_2PO_4 的浓度不宜过高,以 0.5~1.5 mmol/L 较为适宜。

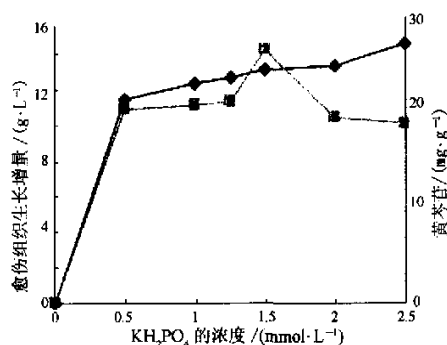


图 5 不同浓度的 KH_2PO_4 对愈伤组织生长和黄芩苷量的影响

Fig. 5 Effects of various concentrations of KH_2PO_4 on callus growth and baicalin

3 讨论

黄芩愈伤组织的生长和黄芩苷的积累并不同步,而是先生长后合成。蔗糖对黄芩苷的合成具有明显的调节作用,在小于 3% 时,能有效促进愈伤组织的生长,但对黄芩苷的合成没有刺激作用,当蔗糖在 3%~8% 时愈伤组织表现出明显的生长和次生代谢功能,黄芩愈伤组织的生长及黄芩苷合成明显增加,

到 8% 时二者均达到最大值。黄芩是一种两年生的中药,其黄芩苷的大量合成在次年进行,这可能与体内光积累和蔗糖浓度有关,实验结果与天然状态下黄芩苷的积累情况相似。另外,黄芩愈伤组织生长和黄芩苷积累还受多种因子的调控作用,本研究结果表明,黄芩愈伤组织生长和黄芩苷积累的优势培养条件:在基本培养基 MS 中氮源浓度为 60 mmol/L (NH_4^+ : NO_3^- 为 1 : 1), KH_2PO_4 浓度 0.5~1.5 mmol/L 时,附加 80 g/L 蔗糖,0.3 mg/L IAA、2 mg/L 6-BA 和 200 mg/L 蛋白胨(25±1) °C,暗培养。愈伤组织培养 40 d,生物量达 28.7 g/L,黄芩苷量 167.4 mg/g,明显高于野生黄芩的量。

References:

- [1] Ch P (中国药典) [S]. Vol 1. 2005.
- [2] Yoshino M, Murakami K. Interaction of Iron with polyphenolic compounds application to antioxidant characterization [J]. *Anal Biochem*, 1998, 257: 40-44.
- [3] Li B Q, Fu T, Yao D Y, et al. Flavonoid baicalin inhibits HIV-1 infection at the level of viral entry [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 276(2): 534-538.
- [4] Kitamura K, Honda M, Yoshizaki H, et al. Baicalin, an inhibitor of HIV-1 production in vitro [J]. *Antiviral Res*, 1998, 37: 131-140.
- [5] Gao Z H, Huang K X, Yang X L, et al. Free radical scavenging and antioxidant activity of flavonoids extracted from the radix of *Scutellaria baicalensis* Geogi [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1472: 643-650.
- [6] Teresa K, Bao Q L, Howard A Y. The flavonoid baicalin inhibits superantigen-induced inflammatory cytokines and chemokines [J]. *FEBS Lett*, 2001, 500: 52-55.
- [7] Ishimaru K, Nishikawa K, Omoto T, et al. Two flaone 2-glucosides from *scutellaria baicalensis* [J]. *Phytochemistry*, 1995, 40(1): 279-281.
- [8] Li H B, Yue J, Chen F. Separation methods used for *Scutellaria baicalensis* active components [J]. *Chromatogr Abstr*, 2004, 812: 277-290.
- [9] Gao S L, Chen B J. Optimization on cloning rapid-propagation technology by tissue culture in *Scutellaria baicalensis* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(3): 312-315.
- [10] Nishikawa K, Furukawa H, Fujii H, et al. Flavone production in transformed root cultures of *Scutellaria baicalensis* Geogi [J]. *Phytochemistry*, 1999, 52: 885-889.

铁皮石斛根尖诱导丛生芽研究

詹忠根

(浙江经贸职业技术学院, 浙江 杭州 310018)

摘要:目的 探索铁皮石斛根尖再生丛生芽的适宜条件及类原球茎的起源。方法 切取 0.3~0.5 cm 的根尖为外植体,以 B5 为基本培养基,附加不同种类和质量浓度的植物生长调节剂进行培养。结果 诱导根尖形成了愈伤组织、类原球茎或直接转化成芽且获得再生植株。通过细胞学观察认为铁皮石斛的类原球茎是单细胞起源的体细胞胚。结论 为铁皮石斛组织快繁建立新的体系。

关键词:铁皮石斛;愈伤组织;类原球茎;体细胞胚发生

收稿日期:2005-10-12

作者简介:詹忠根(1971—),男,浙江江山人,硕士研究生,主要从事组织培养研究。

Tel: (0571) 85919482 E-mail: zhgz9321@tom.com

中图分类号: R 282.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)06-0928-04

Cluster shoots induction from root-tip segments of *Dendrobium officinale*

ZHAN Zhong-gen

(College of Zhejiang Economic and Trade Polytechnic, Hangzhou 310018, China)

Key words: *Dendrobium officinale* Kimura et Migo; callus; protocorm-like bodies (PLBs); somatic embryogenesis

铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo 是国家一级保护植物,具有益胃生津、滋阴清热之功效。近年来,铁皮石斛的离体培养主要集中于原球茎增殖及苗的分化,所用的外植体有种子、无菌苗幼苗茎段、原球茎及人工种子等^[1]。本研究以根尖分生组织为外植体,通过组织切片研究其愈伤组织诱导和再生植株的细胞学过程,以期建立新的组织快繁体系及遗传转化受体系统,为通过基因工程改良铁皮石斛品系提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 外植体:选择生长健壮、根长为 3 cm 左右的铁皮石斛无菌苗,用刀片小心切除根冠后,取长约 0.3~0.5 cm 的根尖分生组织平放于培养基中培养。

1.2 培养条件:根尖诱导、不定芽增殖及生根的基本培养基为 B5,通过调整植物激素的组合与配比、改变天然附加物及微量元素的量等方法研究根尖分生组织在不同培养条件下的生长发育状况。以上所有培养基中均加入蔗糖 30 g/L,琼脂 6.1 g/L, pH 5.8;培养条件为(25±1)℃,光照强度为 800 lx,持续光照。

1.3 组织切片与扫描电镜观察:冷冻切片:在 37℃ 下,材料先用 4% 的阿拉伯树胶浸泡 9 h,再移入 10% 的阿拉伯树胶浸泡 10 h 后进行切片;石蜡切片:材料用 FAA 固定,常规切片,厚度为 8 μm,1% 番红染色;扫描电镜:材料用戊二醛固定,常规制样。

2 结果与分析

2.1 植物激素对根尖培养的影响:为了全面考察植物生长调节剂的组合与配比、天然附加物及培养基中微量元素的量等因素对根尖离体培养的影响,共设计了 20 种培养基(表 1),8 周后统计愈伤组织诱导率、类原球茎诱导率及直接成芽率。

2.1.1 愈伤组织的诱导:根尖在 1~8 号培养基中培养后,其生长点细胞经多次分裂形成浅绿色、表面较光滑的致密愈伤组织(图 1-1)。通过比较根尖在 1~8 号培养基中的生长状况,认为低质量浓度的 2,4-D(0.2~1.0 mg/L)能诱导愈伤组织的形成,只是

表 1 植物激素等因素对根尖形成愈伤组织及原球茎的影响

Table 1 Effect of plant hormone on callus and PLBs of root-tip formation

培养 基号	植物生长激素 (mg·L ⁻¹)			天然附 加物	愈伤组织 诱导率/%	类原球茎 形成率/%	芽形成 率/%
	2,4-D	NAA	6-BA				
1	0.2				2.9	0	0
2	0.5				15.8	0	0
3	1.0				16.2	0	0
4	0.5	0.5			22.3	0	0
5	0.5	1.0			29.5	0	0
6	0.5	3.0			35.8	0	0
7	0.2	0.5	3.0		12.3	10.4	1.3
8	0.5	0.5	3.0		28.4	25.3	3.4
9		0.2			0	4.6	3.7
10		0.5			0	5.9	2.2
11		1.0			0	4.8	1.8
12		0.5	0.5		0	8.8	0
13		0.5	1.0		0	10.6	0
14		0.5	3.0		0	13.9	0
15					0	0	4.4
16				增加 1 倍	0	0	0
17				减为 1/3	0	0	5.5
18				减为 1/3 1% 芋头汁	0	0	6.7
19		0.1		减为 1/3 1% 椰子汁	0	0	2.2
20		0.5		减为 1/3 1% 马铃薯汁	0	0	1.9

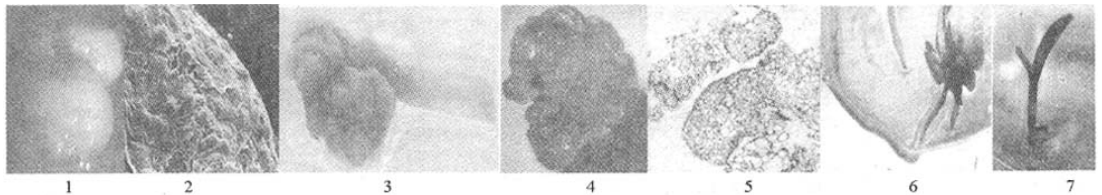
诱导率较低(2.9%~16.2%),若在培养基中添加适当质量浓度的 6-BA 能明显提高愈伤组织的诱导率,而加入 NAA 则促进根尖伸长,不利于愈伤组织的诱导。从根尖在 9~20 号培养基中的生长情况可知,2,4-D 对于愈伤组织的诱导是必不可少的,在不含 2,4-D 的培养基中均未能诱导愈伤组织产生。

2.1.2 类原球茎的形成:形成类原球茎的途径有两条,一是通过愈伤组织分化得到。1~6 号培养基中诱导产生的愈伤组织生长缓慢,若继续在原培养基中培养或继代到相同成分的新培养基中,则绝大多数愈伤组织出现褐化现象,极少数幸存下来的愈伤组织经多次继代后也未见分化出类原球茎。2,4-D 表现出促进愈伤组织的生长而抑制类原球茎形成,这种阶段效应可能是它在某种程度上破坏了内源生长素的极性分布,从而抑制了胚胎的进一步发育和

成熟。若将愈伤组织转接到 B5+NAA 0.5 mg/L+6-BA 3.0 mg/L 中培养或者根尖直接培养在 7、8 号培养基中,则愈伤组织生长较快,其表层细胞会进行平周分裂,内层细胞进行垂周分裂,致使整个组织形成不规则的突起(图 1-2)。而后,靠近表层的部分愈伤组织细胞体积增大、细胞质变浓、细胞壁加厚,与周围细胞形成明显的界限,即部分愈伤组织细胞开始转变为胚性细胞。胚性细胞经多次分裂后可形成球形细胞团,并进一步发育成绿色的类原球茎(图 1-3~5)。二是由根尖分生组织直接分化产生(图 1-6)。培养在 9~14 号培养基中的根尖,其生长点细胞能直接转变成胚性细胞。通过冰冻切片可观察到这些细胞的第 1 次分裂是不均等的,即先分裂成 1 个基细胞和 1 个顶细胞,继而发育成类似于胚胎发育或胚状体形成时的早期原胚期阶段的球形细胞团。随着发育的继续,这种胚性细胞团的基部细胞开始伸长、增大,逐渐失去分生能力,而顶端的细胞分裂能力仍很活跃,致使整个组织形成不规则的突起,这些突起逐渐长成卵圆形后形成类原球茎。可见,铁皮

石斛的类原球茎是单细胞起源的体细胞胚。实验表明,NAA 和 6-BA 在类原球茎的形成过程中,不仅可诱导愈伤组织分化为类原球茎,也可以诱导根尖不经过愈伤组织阶段而直接产生类原球茎,这可能是由于内源细胞分裂素的积累导致 IAA 与 Cks 的比例下降引起的^[2]。

2.1.3 根尖直接再生芽:培养在 9~11 号培养基中的根尖,除产生一定比例的类原球茎外,还出现根尖分生组织直接分化成芽的现象(图 1-7),由于高等植物根和芽的分生组织是分别由高度决定的细胞所构成的,在胚胎时期,甚至在整个生命过程中都有明显不同,所以根芽之间的转化非常困难,转化的频率相当低^[3,4]。在实验中发现降低微量元素的质量浓度(15~17 号培养基),同时低质量浓度的芋头汁(18~20 号培养基)能在一定程度上提高直接再生芽的比率。若在培养基中添加 NAA 则不仅使成芽的比率下降也使成芽的时间大大延长(9~11 号培养基),而在同时含有 NAA 和 6-BA 的培养基中根尖分生组织只分化成类原球茎而不能直接再生芽。



1-根尖分生组织诱导产生愈伤组织 2-愈伤组织表面产生突起 3-愈伤组织分化成类原球茎 4-类原球茎

5-类原球茎纵切 6-根尖分生组织直接分化成类原球茎 7-离体根直接再生芽

1-callus were induced from root-tip 2-tuber from callus' surface 3-PLBs differentiation from callus 4-PLBs

5-longitudinal section of PLBs 6-PLBs from root tip directly 7-regeneration bud from isolated root-tip directly

图 1 铁皮石斛根尖诱导丛生芽

Fig. 1 Cluster shoots induction from root-tip segments of *D. officinale*

2.2 植株再生:将类原球茎转接到 B5+NAA 0.5 mg/L+10%椰子汁的培养基中进行培养,类原球茎逐渐变长,其顶端分生组织先分化出芽,然后叶原基进一步发育成幼叶。稍后,在其基部出现根原基,根原基细胞分裂延伸为根,内部分化出维管束,最后形成完整的幼苗。类原球茎在分化的同时,也会不断增殖,产生许多新的类原球茎,最后逐渐形成丛生小芽。两种不同途径产生的类原球茎的分化能力有明显不同,由根尖直接产生的类原球茎在分化培养基中绝大多数都能分化成小苗,而由愈伤组织分化而来的类原球茎分化能力很弱,大多数最终褐化死亡。

3 结论

本研究以根尖为外植体进行铁皮石斛的组织快繁研究。实验表明,在不同的培养条件下,根尖可经

体细胞胚发生途径再生植株,发生方式有两种:一是间接发生途径,即通过脱分化形成愈伤组织后,由愈伤组织的某些细胞转化为胚性细胞并继续分裂形成多细胞原胚以及不同发育时期的体细胞胚。适宜培养基是 B5+2,4-D 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L+6-BA 3.0 mg/L;二是直接发生途径,即直接从外植体某些部位的特定细胞诱导分化出体细胞胚,适宜培养基是 B5+NAA 0.5 mg/L+6-BA 3.0 mg/L。另外,根尖也可以经器官发生途径再生植株,即根尖分生组织经培养后直接形成芽,进而发育成完整的植株,适宜培养基是 B5(微量元素减为 1/3 倍)+1%芋头汁。虽然用根尖诱导生产类原球茎的频率还有待进一步提高,但由于铁皮石斛类原球茎的增殖与分化频率很高,相应技术也已相当成熟,所以一旦

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:R283.2

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, $L_9(4^4)$ 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