

- tra-dried seeds [J]. *Chin J Tropic Agric* (热带农业科学), 2003, 23(3): 73-76.
- [3] Lu X X, Chen X L. Progress of conservation and research of crop germplasm resources in China [J]. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2003, 36(10): 1125-1132.
- [4] Cheng H Y, Song S Q, Zhu C, et al. Cytological, physiological and biochemical basis of storability of ultra-dry seeds [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 2005, 27(1): 11-18.
- [5] Hu X R, Hu C L, Zhang Y L, et al. Study on the methods of pre-humidification of ultra-dry seeds of kenaf [J]. *Seed* (种子), 1999, 102(3): 23-24.
- [6] Hu J X, Zeng G. Storage tolerance and aging-resistance of ultra-dried safflower seeds [J]. *J Zhejiang Univ: Agric Life Sci* (浙江大学学报: 农业与生命科学版), 2000, 26(6): 653-656.
- [7] Li Y H, Dui S H, Chen P, et al. Studies on ultra-dry of pepper seeds [J]. *Acta Bot Boreali-Occident Sin* (西北植物学报), 2003, 23(4): 663-666.
- [8] Zhang S J, Chen R Z. Effects of ultra-dry storage on seed viability and seed vigor of lettuce [J]. *Seed* (种子), 2002, 126(6): 37-40.
- [9] Zhang S J, Chen R Z. Effects of ultra-dry storage on seed viability and seed vigor of cabbage mustard [J]. *Plant Physio* (植物生理学通讯), 2003, 39(2): 101-104.
- [10] Zheng X Y, Li X Q, Chen K. Effect of different ultra-drying methods on vegetable seeds for long term storage [J]. *Acta Horticult Sin* (园艺学报), 2001, 28(2): 123-127.

老瓜头愈伤组织诱导培养技术的研究

胡海英, 叶芳芳

(宁夏大学生命科学学院, 宁夏 银川 750021)

摘要:目的 为老瓜头 *Cynanchum komarovii* 资源利用提供前期的生物技术实验参考。方法 以老瓜头的根段、茎段和叶片为外植体, 采用正交试验方法, 筛选诱导愈伤组织产生的最适培养基; 进行愈伤组织增殖培养过程中, 测定了不同时间愈伤组织的鲜、干质量, 绘制愈伤生长曲线; 同时进行了愈伤组织分化培养基的实验筛选。结果 不同外植体诱导愈伤产生, 其根诱导效果最好, 各处理诱导率达 90%~100%, 茎段和叶片愈伤组织诱导最佳配方分别为 MS+2, 4-D 1.0 mg/L + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L 和 MS+2, 4-D 0.5 mg/L + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.5 mg/L, 茎段比叶片较容易诱导, 各处理诱导出的愈伤组织质地松散, 颜色鲜黄, 几乎无褐化现象。愈伤组织继代生长在第 10 天进入对数生长期, 愈伤鲜生长量最大达 4.961 g, 干质量 0.496 g。愈伤组织的分化率很低, 很难生芽, 易分化出钉状根。结论 对于诱导愈伤形成, 根段是最佳的外植体, 筛选出了茎段和叶片诱导愈伤的最适配方, 愈伤组织生长量较大, 但分化困难。

关键词:老瓜头; 愈伤组织; 生长量; 分化

中图分类号: R282.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)11-1716-04

Inducing and culturing technology of callus in *Cynanchum komarovii*

HU Hai-ying, YE Fang-fang

(School of Life Science, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

Abstract: **Objective** To provide the initiative experimental reference for resource utilization of *Cynanchum komarovii* by biological technology. **Methods** Using root, stem, and leaf of *C. komarovii* as explants, the proper media for inducing of callus were optimized by orthogonal test. In culturing process for proliferation of callus, the fresh and dry weights were determined at various times and callus growth curve was drawn. Meanwhile, division test of callus was taken. **Results** Root callus test showed the best effect in successful inducing percentage of 90%~100%. The best media combination of stem and leaf were MS+2, 4-D 1.0 mg/L+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L and MS+2, 4-D 0.5 mg/L+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L. The stem segment was more easily induced than leaf. The callus induced by various treatments is in loose character and fresh yellow colour with no brown phenomenon. At day 10 the growth entered the exponent period of callus offspring, the maximal fresh weight to 4.961 g and the dry weight to 0.496 g. The division rate of callus was rather low and not easy to shoot. However, the nail root was commonly seen in the test. **Conclusion** The root is proved to be the best explants in the test of inducing callus, which shows the best medium of stem and leaf for forming the callus. The growth of callus is bigger,

收稿日期: 2007-01-16

基金项目: 宁夏大学自然科学基金资助项目(NS0505)

作者简介: 胡海英(1976—), 女, 硕士, 讲师, 主要从事植物生物技术方面的研究。E-mail: haiying.hu@163.com

but the division is not easy.

Key words: *Cynanchum komarovii* Al. Iljinski; callus; growth; differentiation

老瓜头 *Cynanchum komarovii* Al. Iljinski 系萝藦科鹅绒藤属植物,其别名为牛心朴子、芦芯草、瓢柴等。老瓜头全草可入药,性温,味苦,有毒。据报道,老瓜头含有的两种主要生物碱 7-脱甲氧娃儿藤次碱和氧化脱氧娃儿藤次碱均具有细胞毒作用,其体内化合物牡丹酚在临床上具有镇痛作用,槲皮素具有抗炎及止咳、祛痰作用^[1];又是一种较好的蜜源植物,其蜂蜜质量为中上等^[2]。因此,可作为药用资源利用。老瓜头广泛分布于次生沙漠中的半固定沙丘和荒漠流沙区。为强旱生适阳植物,喜光,极为耐旱、耐高温。有人认为老瓜头是在沙化进程中,适应其环境而保存下来的沙漠生态型植物,是土地严重沙质荒漠化的指示植物之一,也是草原逆行演替过程中最后阶段的指示种^[2]。有关老瓜头组织培养方面的文献报道很少,曲玲等^[3]以其茎段作为外植体,对老瓜头的组织培养及快繁技术进行了初步研究。本实验从老瓜头愈伤组织诱导及增殖培养方面入手,对其愈伤组织最适诱导培养基、愈伤组织增殖生长规律和愈伤组织的分化 3 个方面进行了较详细的实验研究,以其为老瓜头体细胞胚胎发生、细胞成分开发等生物工程技术奠定基础 and 提供參考。

1 材料与方法

1.1 材料:供试材料为老瓜头 *Cynanchum komarovii* Al. Iljinski, 采自宁夏盐池县郊区野生老瓜头种子。

1.2 方法

1.2.1 种子处理:选取生长健壮、无病虫害的老瓜头种子,用肥皂水浸泡,多次冲洗,用无菌水浸泡 1~2 h,置于超净操作台,先用 75% 的酒精消毒 1 min 后倒出,倒入 0.1% 升汞浸没振荡 10~12 min,后用无菌水反复冲洗 6~8 次,在无菌滤纸上吸干水分。将消毒好的种子接种在培养基 MS+6-BA 0.1 mg/L+NAA 0.02 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 6 g/L,使其发芽。

1.2.2 愈伤组织的诱导:以老瓜头无菌苗的叶片和茎段为外植体,接种到愈伤组织诱导培养基,放置在 (24±1) °C 温度条件下暗培养,3 d 后观察现象,生长一个月后统计愈伤诱导率、颜色、大小、质地等。诱导培养基以 MS 为基本培养基,采取正交试验设计,比较 2,4-D (0.05、0.5、1.0 mg/L), 6-BA (0.5、1.0、2.0 mg/L), NAA (0.05、0.5、1.0 mg/L) 3 种激素 3 种质量浓度水平组合对愈伤组织诱导的影响。

1.2.3 愈伤组织生长量的测定^[4]:选取由无菌苗诱导所得的愈伤组织,要求色泽鲜黄、疏松,无白化、无褐化状态好的愈伤组织,接种到 MS+6-BA 2.0 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L 和 MS+2,4-D 0.5 mg/L+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L 增殖培养基上进行增殖培养,20 d 后选取色泽鲜黄、疏松的愈伤组织转接到上述增殖效果较好的培养基中,进行生长量的测定,每 5 天测其鲜、干质量,进行 5 个重复。由此绘出愈伤组织生长曲线图。培养条件为温度 (24±1) °C,暗培养。

1.2.4 愈伤组织的分化:选择色泽黄亮、松散易碎的老瓜头愈伤组织转接到不同激素质量浓度的培养基中进行分化培养,以 MS 为基本培养基,采取正交试验设计比较 6-BA (0.5、2.0、4.0 mg/L), KT (0.2、1.0、2.0 mg/L), NAA (0.02、0.1 mg/L) 3 种激素 3 种质量浓度水平下对愈伤组织分化的影响。培养条件为温度 (24±1) °C,光照 16 h/d,光强 3 000 lx。

愈伤组织鲜、干质量测定方法^[4]:无菌称取一定量的愈伤组织接种在新鲜培养基上,每隔 5 d 取出愈伤组织,称鲜质量,后置于已知质量的滤纸在 60 °C 恒温烘箱 24 h 左右至恒重,称干质量,重复 5 次。

1.2.5 实验结果统计方法^[5,6]:利用 SPSS 软件对愈伤组织诱导培养实验数据进行方差分析。利用 Excell 软件绘制愈伤组织生长曲线图。

2 结果与讨论

2.1 不同激素对比对诱导老瓜头不同外植体产生愈伤组织的影响:老瓜头的愈伤组织很容易被诱导,以根和茎段为外植体明显优于叶片。根的茎段材料在不同培养基上几天后均膨大并逐渐长出突起,30 d 后为浅黄、疏松状态的愈伤组织。但在不同培养基中愈伤组织的形态和质地没有明显的差异。结果见表 1。

实验设计 9 种配方的诱导率差异很大。以根作为外植体,其诱导率几乎为 100% (除 1 号培养基)。以茎段为外植体,在 3 号、7 号、9 号培养基上诱导培养,愈伤组织诱导率均达 100%,且诱导出的愈伤组织质地松散,颜色鲜亮,是下一步增殖和悬浮培养的最佳材料。以叶片为外植体进行愈伤组织诱导效果较差,最高的诱导率为 55.6%。由于对根诱导愈伤化最为有效,不同浓度激素作用之间无明显差异,不进行方差分析,只以茎段和叶片为外植体对以上实

表1 不同激素对比对诱导老瓜头愈伤组织的影响

Table 1 Effect of different hormones combinations on inducing for callus of *C. komarovii*

处理	激素/(mg·L ⁻¹)			诱导率/(%)		
	2,4-D	6-BA	NAA	茎	叶	根
1	0	0.5	0.05	5	0	90
2	0	1.0	0.5	83.3	5	100
3	0	2.0	1.0	100	55.6	100
4	0.5	0.5	0.5	77.8	50	100
5	0.5	1.0	1.0	83.3	44.4	100
6	0.5	2.0	0.05	72.2	50	100
7	1.0	0.5	1.0	100	38.9	100
8	1.0	1.0	0.05	94.4	27.8	100
9	1.0	2.0	0.5	100	11.1	100

验结果进行 $L_9(3^3)$ 方差分析, 分析结果见表2。

直观分析可以比较出3因素的影响力, 含有2,4-D的配方中愈伤组织诱导率较高, 只含有6-BA和NAA两种激素的配方中, 激素质量浓度越低, 其诱导率就越低。用方差分析的方法可知: 在实验所选的水平范围内, 在显著性水平 $\alpha=0.05$ 下因素2,4-D、6-BA、NAA对实验指标均无显著影响。在这个过程中, 3种激素的重要性主次顺序为2,4-D>6-BA>NAA, 通过重复实验, 综合因素考虑, 将2,4-D 1.0 mg/L+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L作为诱导茎段愈伤产生最适培养基; 诱导叶片愈伤化的适宜培养为2,4-D 0.5 mg/L+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L。

表2 不同激素对比对诱导老瓜头茎段、叶片愈伤组织的影响方差分析表

Table 2 Variance analysis of different hormone combinations on callus of stem and leaf of *C. komarovii*

变异来源	茎 段				叶 片			
	自由度	平方和	均方	F值	自由度	平方和	均方	F值
2,4-D	2	189.0	94.5	1.438	2	130.5	65.2	1.291
6-BA	2	158.1	79.0	1.203	2	274.1	137.0	0.271
NAA	2	233.1	116.5	1.773	2	101.8	50.9	1.007
误差	2	131.4	65.7		2	101.1	50.5	
总和	8	711.8			8	361.0		

$$F_{0.05}(2,2)=19.00, F_{0.01}(2,2)=99.01$$

2.2 老瓜头愈伤组织生长量的测定: 经诱导培养后, 所得愈伤组织在培养基2,4-D 1.0 mg/L+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L上进行增殖培养。同时进行愈伤组织生长量的测定并以此绘制愈伤组织生长曲线。测定不同培养时间的愈伤组织鲜、干质量, 以培养时间为横坐标, 分别以细胞的鲜质量和干质量为纵坐标绘制愈伤组织生长曲线图, 见图1。

从图1可见, 老瓜头愈伤组织生长增重的变化

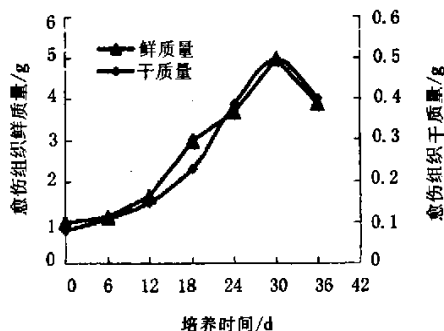


图1 不同培养时间老瓜头愈伤组织的生长情况

Fig. 1 Callus growth of *C. komarovii* in different culturing times

情况表现为S形曲线, 第1周愈伤细胞生长相对滞后, 生长缓慢, 在1周后, 愈伤组织增殖明显, 约第10天才进入对数生长期; 尤其在第2周至第3周愈伤组织生长最快, 几乎呈现直线生长。愈伤鲜生长量达到4.961 g, 干质量达0.496 g。经过第30 d后, 由于培养基中某些营养物质已经耗尽, 或是由于有毒代谢产物的积累^[7], 增长逐渐缓慢, 最后进入静止期, 增长几乎停滞。所以, 通过对老瓜头愈伤组织增殖培养可以初步确定其增殖生长规律, 即35 d为一生长增殖周期, 在30 d左右应尽快进行继代培养; 若要保持旺盛增殖, 可在3周后继代, 使愈伤细胞一直保持对数生长^[8]。

2.3 老瓜头愈伤组织的分化: 老瓜头外植体诱导出愈伤组织, 经过1次继代培养后, 设计了愈伤组织分化实验。共设计3种因素3个水平, 现象表明, 老瓜头愈伤组织不易分化成芽, 出现了略泛红色的钉状根, 只有一种处理分化出2株芽。30 d后统计结果, 见表3。

表3 不同激素对比对老瓜头愈伤组织分化的影响

Table 3 Effect of different hormone combinations on callus differentiation of *C. komarovii*

处理	激素/(mg·L ⁻¹)			分化率/%	
	6-BA	KT	NAA	根	芽
1	0.5	0.2	0	27.78	0
2	0.5	1.0	0.02	11.11	11.11
3	0.5	2.0	0.1	0	0
4	2.0	0.2	0.02	11.11	0
5	2.0	1.0	0.1	0	0
6	2.0	2.0	0	5.56	0
7	4.0	0.2	0.1	0.00	0
8	4.0	1.0	0	5.56	0
9	4.0	2.0	0.02	22.22	0

对结果分析表明, 6-BA、KT、NAA3因子在设计3种质量浓度水平下对愈伤组织分化根和芽中, 3种激素影响均不显著。可见设计的激素种类和

质量浓度水平未能达到预期结果,为了获得愈伤分化再生植株,设计将分化出的钉状根上诱导芽再生。或者对愈伤组织直接分化出丛生芽的培养基激素和浓度水平做进一步的筛选试验^[9]。

3 讨论

用采来的老瓜头植株的叶片和茎段做外植体,通过表面消毒,可以获得无菌材料,但再生芽的生长速度慢,丛生芽容易玻璃化,用无菌播种的方法获得的材料,植株生长快而旺盛,实生根发达,进行老瓜头愈伤组织的诱导可操作性强,而且不受污染的影响,大大提高了诱导率。本实验中以根和茎段作为外植体,加入适量的激素配比,很容易诱导出愈伤组织,且愈伤组织状态比较好,在诱导过程中无褐化现象发生,其增殖的生长量较大,在25 d后仍然呈现淡黄鲜亮疏松状态,增殖时间过长会有絮状老化、黄褐色的现象发生。在实验中发现,愈伤组织能够分化出钉状根,钉状根放到只有IBA的培养基上,伸长很快,呈盘曲状。从很多研究文献中发现老瓜头的根系发达,主要的有效成分来自于根部。通过以上实验结果及现象,认为可以从老瓜头的根入手,深入研究其根段产生的愈伤组织有效成分的量,而且可以设计用毛状根的培养方法进一步研究其发根的有效成

分组成及量,最终为开发利用野生老瓜头资源提供技术手段和理论基础。

References:

- [1] Qi L M, Yang J, Li K. Comparative analysis of alkaloid components in rhizoma and folium of *Cynanchum komarovii* Al. Iljinski [J]. *J Ningxia Univ, Nat Sci* (宁夏大学学报:自然科学版), 2002(4): 359-360.
- [2] Qi L M, Yang J, Jia J R. Study on alkaloids of *Cynanchum komarovii* Al. Iljinski widely grown in Ningxia [J]. *J Ningxia Med Coll* (宁夏医学院学报), 2002(5): 336-339.
- [3] Qu L, Chao Y L. Study on tissue culture and rapid propagation technology of *Cynanchum komarovii* Al [J]. *Gansu Agric Sci Technol* (甘肃农业科技), 2002(4): 42-45.
- [4] Zhou W Y. *Theory and Technology of Plant Cell Engineering* (植物细胞工程原理与技术) [M]. Beijing: China Agriculture University Press, 2002.
- [5] Li C X, Wang Z H, Wang W L. *Biometrics* (生物统计学) [M]. Beijing: Science Press, 2002.
- [6] Cheng R X, Zhang Y F. *Experiment Design and Data Processing* (实验设计与数据处理) [M]. Harbin: Northeast University Press, 2003: 59-130.
- [7] Kiceran P M, MacLoughlin P F, Malone D M. Plant cell suspension culture, some engineering consideration [J]. *Biotechnology*, 1997, 59: 5.
- [8] Lee W L, Chan L K. Establishment of *Orthosiphon stamineus* cell substation culture for cell growth [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 2004, 78: 101-106.
- [9] Wang W, Cui S X, Zhang C L. Plant regeneration from embryogenic suspension cultures of dune reed [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 2001, 67: 11-17.

长春花突变细胞生理特征的研究

张秀省¹, 聂莉莉², 向蓓蓓², 王淑芳², 朱晔荣^{2*}, 王 勇²

(1. 聊城大学农学院, 山东 聊城 252000; 2. 南开大学生命科学学院, 天津 300071)

摘要:目的 研究以秋水仙碱处理的长春花突变细胞在继代培养过程中的生长规律、吲哚生物碱积累的规律及营养成分的适宜浓度等方面的特征,期望得到适于工业化细胞培养的理想材料。方法 将突变细胞培养于MS固体培养基上,定期称取其鲜质量,用有机溶剂萃取吲哚生物碱,应用RP-HPLC法检测药用成分阿玛碱和长春质碱。结果 突变细胞培养至第30代时,生长速度和吲哚总碱积累得最快,培养至第45代时,两者均明显下降。而药用成分的量于第20代达到最高;在培养基中添加适量的色氨酸能提高药用成分的量;培养基中Ca²⁺和Zn²⁺的质量浓度分别为1 760和12.6 mg/L时,明显促进了药用成分的积累。结论 长春花突变细胞可能是一种适于工业化细胞培养的理想材料。

关键词:长春花;突变细胞;阿玛碱;长春质碱

中图分类号:R286.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)11-1719-04

Physiological characters of *Catharanthus roseus* mutant cells

ZHANG Xiu-sheng¹, NIE Li-li², XIANG Bei-bei², WANG Shu-fang², ZHU Ye-rong², WANG Yong²

(1. College of Agronomy, Liaocheng University, Liaocheng 252000, China; 2. College of Life Science, Nankai University, Tianjin 300071, China)

收稿日期:2007-03-10

基金项目:山东省科技攻关项目(2005GG4402011);南开大学科技创新基金

*通讯作者 朱晔荣 E-mail: zhuyr@nankai.edu.cn Tel: (022)23504382

老瓜头愈伤组织诱导培养技术的研究

作者：[胡海英](#)，[叶芳芳](#)，[HU Hai-ying](#)，[YE Fang-fang](#)
作者单位：[宁夏大学生命科学学院, 宁夏, 银川, 750021](#)
刊名：[中草药](#) [ISTIC](#) [PKU](#)
英文刊名：[CHINESE TRADITIONAL AND HERBAL DRUGS](#)
年，卷(期)：2007, 38 (11)
被引用次数：3次

参考文献(9条)

1. [Qi L M;Yang J;Li K](#) [Comparative analysis of alkaloid components in rhizoma and folium of Cynanch komarovii Al. Iljinski](#)[期刊论文]-[宁夏大学学报（自然科学版）](#) 2002 (04)
2. [Qi L M;Yang J;Jia J R](#) [Study on alkaloids of Cynanchumkomarovii Al. Iljinski widely grown in Ningxia](#) [期刊论文]-[宁夏医学院学报](#) 2002 (05)
3. [Qu L;Chao Y L](#) [Study on tissue culture and rapid propagation technology of Cynanchum komarovii Al](#) 2002 (04)
4. [Zhou W Y](#) [植物细胞工程原理与技术](#) 2002
5. [Li C X;Wang Z H;Wang W L](#) [生物统计学](#) 2002
6. [Cheng R X;Zhang Y F](#) [实验设计与数据处理](#) 2003
7. [Kiceran P M;MacLoughlin P F;Malone D M](#) [Plant cell suspension culture:some engineering consideration](#) 1997
8. [Lee W L;Chan L K](#) [Establishment of Orthosiphon stamineus cell substantion culture for cell growth](#) [外文期刊] 2004 (2)
9. [Wang W;Cui S X;Zhang C L](#) [Plant regeneration from embryogenic suspension cultures of dune reed](#)[外文期刊] 2001 (1)

引证文献(3条)

1. [胡海英](#). [朱维宁](#) [老瓜头悬浮细胞培养及基质消耗规律的初探](#)[期刊论文]-[安徽农业科学](#) 2008 (33)
2. [谢亚军](#). [胡海英](#). [李鹏](#) [老瓜头悬浮细胞培养及其生长特性的研究](#)[期刊论文]-[江苏农业科学](#) 2008 (6)
3. [周立彪](#). [闫兴富](#). [石淳](#). [方苏](#) [苦豆子浸提物对老瓜头种子萌发的化感作用](#)[期刊论文]-[江苏农业科学](#) 2011 (5)

本文链接：http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zcy200711041.aspx