

表2 不同激素配比不定芽的诱导率

Table 2 Adventitious shoot inducing rates from cotyledon and hypocotyl with different hormone combinations

培养基/(mg·L ⁻¹)	子叶		下胚轴	
	产生不定芽的外植体数	不定芽诱导率/%	产生不定芽的外植体数	不定芽诱导率/%
MS+NAA0.5+6-BA7	7	17.50	0	0.00
MS+NAA0.5+6-BA3	4	10.00	0	0.00
MS+IAA0.3+6-BA12	15	37.50	20	50.00
MS+IAA0.3+6-BA4	27	67.50	5	12.50
MS+2,4-D2	0	0.00	0	0.00
MS+2,4-D1	10	25.00	3	7.50
MS+KT2+NAA0.5	10	25.00	24	60.00
MS+KT2+NAA0.2	27	67.50	25	62.50

mg/L,诱导率分别为90%和95%,适宜子叶不定芽诱导的激素组合是MS+IAA 0.3 mg/L+6-BA 4 mg/L,适宜下胚轴不定芽诱导的激素组合是MS+KT 2 mg/L+NAA 0.2 mg/L。生根培养均采用1/2MS+NAA 0.1 mg/L,7 d后生根率为100%。实验中MS+KT 2 mg/L+NAA 0.5 mg/L可诱导菊花子叶和下胚轴愈伤组织直接出苗,成苗周期大大缩短,不定芽生长健壮。

在本实验中,随着2,4-D质量浓度的升高,愈伤组织诱导率增大,但其诱导的愈伤组织普遍呈现出紫红色,在其后期的生长过程中出现严重褐化现象,这可能是由于2,4-D易引起培养物突变的结果^[8]。鉴于2,4-D的高诱导率,在不定芽诱导中,可以选择其他的激素配合2,4-D使用,以充分利用其诱导率高的优点。但在菊花愈伤组织诱导时,不宜添加2,4-D,以防止褐化发生。

参考文献:

- [1] 中国药典[S].一部.2005.
- [2] 凌文达,李曙轩.利用菊花花瓣组织培养获得新类型[J].浙江农业大学学报,1983,9(3):243-246.
- [3] 李玉芬.几种菊花花器官培养及愈伤组织分化频率研究[J].生物技术,1997,7(2):24-26.
- [4] 薛建平,张爱民,常 玮.安徽药菊叶片直接再生技术的研究[J].中国中药杂志,2004,29(2):132-134.
- [5] 王仓山,孙 彤,李惠娟.枸杞耐盐变异体的筛选及植株再生[J].遗传,1995(6):60.
- [6] 齐 飞,巩振辉,黄 玮.利用组织培养技术筛选辣椒抗病毒变异体[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2006,34(2):83-88.
- [7] Zhang T, Wan X Y, Cao Z Y. Plant regeneration *in vitro* directly from cotyledon and hypocotyls explants of *Perilla frutescens* and their morphological aspects [J]. *Biologia Plantarum*, 2005, 49(3): 423-426.
- [8] 刘忠荣,洪 波.培养因素对菊花组织培养的影响[J].广西农业科学,2004(1):19-21.

叶下珠愈伤组织的诱导与培养

常 莉^{1,2},薛建平^{1,2*}

(1. 淮北煤炭师范学院生命科学学院,安徽 淮北 235000; 2. 资源植物生物学安徽省重点实验室,安徽 淮北 235000)

摘要:目的 建立叶下珠愈伤组织培养方法。方法 采用组织培养方法,比较不同外植体、蔗糖、植物生长物质及其配比对叶下珠愈伤组织诱导的影响。结果 茎段的诱导率最高,为55.56%,叶片诱导不出愈伤组织。6-BA是叶下珠愈伤组织形成的主要影响因素,2,4-D、NAA、蔗糖次之。结论 叶下珠愈伤组织诱导及继代的适宜培养基为MS+2,4-D 0.5 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L+蔗糖 10 g/L。

关键词:叶下珠;组织培养;愈伤组织

中图分类号:R282.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2008)11-1723-04

Callus induction and cultivation of *Phyllanthus urinaria*CHANG Li^{1,2}, XUE Jian-ping^{1,2}

(1. Department of Biology, Huaibei Coal Industry Teacher's College, Huaibei 235000, China; 2. Anhui Key Laboratory of Plant Resources and Biology, Huaibei 235000, China)

Abstract: Objective To establish culture method for *Phyllanthus urinaria*. **Methods** To study the possible effective factors of culture condition by comparing with different explants, sucrose, plant growth substance, and its ratio. **Results** The inductivity of stem was the highest about 55.56%, but callus of

收稿日期:2008-01-14

基金项目:国家农业成果转化基金项目(05EFN213400124);淮北市重大专项(06085)

作者简介:常 莉(1981—),女,安徽砀山人,讲师,硕士,主要从事组织培养技术研究。

* 通讯作者 薛建平 Tel:(0561)3802025 E-mail:xuejp2000@yahoo.com.cn

leaves could not be induced. 6-BA was the most important factor on callus induction, followed by 2,4-D NAA and sucrose. **Conclusion** The optimal medium to induce and subculture is MS+2,4-D 0.5 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L+sucrose 10 g/L.

Key words: *Phyllanthus urinaria* L.; tissue-culture; callus

叶下珠 *Phyllanthus urinaria* L. 为大戟科叶下珠属植物,全草入药,有清肝明目、收敛利水、解毒消积等功效。现代研究表明,其主含酚类、萜类、黄酮、生物碱以及脂类化合物,其中已初步证实短叶苏木酚酸甲酯等成分具明显的抗乙肝病毒的活性和护肝作用^[1]。近年来国内外对叶下珠的研究较深入,并报道有抗艾滋病病毒逆转录酶活性^[2]。叶下珠全草还有利尿、降血糖、降压作用,能显著降低患者收缩压,其有效成分鞣花酸、短叶苏木酚酸甲酯、乙酯,均具有醛糖还原酶抑制活性^[3]。由于人们对这类药物需求的不断增长,野生资源在不断减少,通过采收野生资源的方式已经不能满足社会需求的发展^[4],因而通过组织培养方式进行快速繁殖是解决这一问题的有效方法。而近年来许多学者对叶下珠的研究多集中在研究其药理方面^[5,6],在组织培养快繁方面的研究还很少^[7]。本实验主要通过研究激素和蔗糖等对叶下珠愈伤组织形成的影响,从而更好地满足植物化学和药理学进一步研究及制药工业日益增长的需要。

1 材料和方法

1.1 材料:叶下珠为淮北煤炭师范学院资源生物学安徽省重点实验室提供的无菌苗,经安徽大学生命科学学院何家庆教授鉴定为大戟科叶下珠属植物叶下珠 *Phyllanthus urinaria* L.。不同外植体比较研究取叶片和茎段为试验材料;不同质量浓度蔗糖和植物生长物质的正交试验研究取茎段作为试验材料。

1.2 方法

1.2.1 试管苗的培养:在超净台上,将无菌试管苗的茎段和叶片分别接种到 L₉(3⁴)正交试验表设计的培养基(表1),每种处理接种20瓶,每瓶接3个外植体,重复3次,定期观察记录,30 d后统计愈伤组织的诱导率。

表1 正交试验因素水平表 L₉(3⁴)

Table 1 Factors and levels of L₉(3⁴) orthogonal test

水平	因素			
	2,4-D(A)/ (mg·L ⁻¹)	6-BA(B)/ (mg·L ⁻¹)	NAA(C)/ (mg·L ⁻¹)	蔗糖(D)/ (g·L ⁻¹)
1	0.5	0	0	10
2	1.5	1	0.1	30
3	2.5	2	0.5	50

1.2.2 愈伤组织的褐化分析:褐化程序采用目视法,根据每块愈伤组织的褐化程度大小分为5级,用+表示,+越多表示褐化程度越大,-表示无褐化。

1.3 培养基及培养条件:以MS为基本培养基,用0.6%的琼脂固化,pH5.8~6.0,附加不同质量浓度的蔗糖和植物生长物质,分装于100 mL的三角烧瓶中,在121℃湿热灭菌15~20 min。材料接种后放在光照培养箱中培养,温度(25±1)℃,愈伤组织诱导期间不用光照。

2 结果与分析

2.1 不同外植体对愈伤组织诱导的影响:由表2可知,茎段的诱导率高,为55.56%,而叶片诱导率为0%。8 d左右发现愈伤组织从茎段伤口处长出来。12 d左右发现茎段外植体两端不同程度膨大并呈不对称哑铃形(图1-A)。但是叶片在20 d时只是有稍微卷曲,叶片颜色泛白,仍没有愈伤组织出现。从材料来源的可取性分析叶下珠愈伤组织诱导是茎段优于叶片。

表2 不同外植体对愈伤组织诱导的影响

Table 2 Effect of different explants on callus induction

外植体	出愈最早时间/d	接种数	愈伤组织数	愈伤组织诱导率/%
叶片	—	540	0	0
茎段	8	540	300	55.56



A-哑铃形愈伤组织 B-褐化的茎段 C-白色愈伤组织 D-继代的愈伤组织
A-dumbbell-shaped calli B-browning stems C-white calli D-subculture calli

图1 诱导与培养形成的不同叶下珠愈伤组织

Fig. 1 Induction and cultivation of different callus of *P. urinaria*

2.2 不同培养条件对茎段愈伤组织诱导的影响

2.2.1 正交试验极差分析:从表3可以看出,因子B的极差最大,因子D的极差最小。即6-BA的诱导能力最大,而蔗糖质量浓度的影响最小。各因子对叶下珠愈伤组织诱导作用大小依次为6-BA>2,4-D>NAA>蔗糖。正交表中均值越大,则说明代表该因子的某水平越好,从诱导率的角度看,极差分析的结果可以认为叶下珠愈伤诱导的培养基以A₁B₂C₂D₁为最优组合,即2,4-D 0.5 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L+蔗糖 10 g/L。试验观察发现,6-BA质量浓度为0的1、4和7号培养基,茎段刚开始可以诱导出愈伤组织,渐渐褐化,直至枯死(图1-B)。其中2号和9号培养基中愈伤生长最好,愈伤白色疏松(图1-C),诱导率分别达到100%和95.83%。

表3 叶下珠茎段愈伤组织诱导正交试验结果

Table 3 Orthogonal test on callus induction of stems from *P. urinaria*

试验号	因素				诱导率/%	褐化程度
	A	B	C	D		
1	0.5	0	0	10	20.83	+++++
2	0.5	1.0	0.1	30	100	-
3	0.5	2.0	0.5	50	83.33	+
4	1.5	0	0.1	50	8.33	++++
5	1.5	1.0	0.5	10	58.33	+
6	1.5	2.0	0	30	50	+
7	2.5	0	0.5	30	8.33	+++++
8	2.5	1.0	0	50	75	+
9	2.5	2.0	0.1	10	95.83	-
K ₁	68.053	12.497	48.610	58.330		
K ₂	38.887	77.777	68.053	52.777		
K ₃	59.720	76.387	49.997	55.553		
R	29.166	65.280	19.443	5.553		

2.2.2 方差分析:为了进一步反映各因子之间的差异,以便寻求最佳水平,笔者进行了方差分析。结果表明(表4),因子B(6-BA)对愈伤组织的诱导率有极显著差异,因子A对愈伤组织诱导显著,因子C和D对愈伤组织的诱导作用不显著。由此可见,6-BA和2,4-D是影响叶下珠愈伤组织诱导率大小的主要因素,而且此结果与极差分析的结果相吻合。

2.2.3 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,正交设计是一种均一性设计,不可能含有所有处理组合,所以A₁B₂C₂D₁在实验中没有显示出来。用此种配比的培养基进行了验证实验和多次继代培养,愈伤质地疏松、白色、愈伤组织诱导快、生长量大、诱导率高,从而证明试验结果是

表4 叶下珠茎段愈伤组织诱导的方差分析

Table 4 Variance of analysis on callus induction of stems from *P. urinaria*

变异来源	偏差平方和	自由度	F值	显著性
A	1 354.167	2	29.274	P<0.05
B	8 345.343	2	180.405	P<0.01
C	706.009	2	15.262	
D(误差)	46.259	2		
总和	10 498.04	10		

P_{0.05}(2,2)=19.00, P_{0.01}(2,2)=99.00

正确的。

3 讨论

3.1 外植体类型对叶下珠组织培养的影响:根据细胞全能性理论,植物任何器官都可以用作外植体,但不同组织器官培养成功的难易程度是不同的,同一种植物不同的组织和器官再生能力也有很大差异,接种材料的组织部位、植株年龄、取材季节以及植株的生理状态等都会直接影响培养效果^[9]。在叶下珠组织培养的快速繁殖和愈伤组织诱导过程中,正确的选择外植体的部位极其重要。

本研究采用叶下珠叶片、茎段作为培养材料,茎段诱导愈伤组织效果最好,叶片诱导不出愈伤组织。这与其他植物^[9]叶片诱导效果高于茎段不同,可能是所选的激素及其激素的浓度配比对叶片诱导愈伤组织不适宜;也可能就是叶下珠与其他植物的不同之处。

3.2 植物生长物质对叶下珠组织培养的影响:叶下珠茎段接种8d左右后,发现愈伤组织从茎段伤口处长出来。12d左右发现茎段外植体两端不同程度膨大并呈不对称哑铃形。生长调节物质和蔗糖对叶下珠茎段愈伤组织的诱导有非常重要的影响,添加不同的激素和蔗糖对愈伤组织的形成是不同的。在叶下珠茎段离体培养研究中,研究了NAA、6-BA、2,4-D 3种植物生长物质和蔗糖共4个因素3个水平组合的9次实验,每种组合均能诱导出愈伤组织。本实验筛选出叶下珠茎段愈伤组织诱导和继代的最佳组合为MS+2,4-D 0.5 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L+蔗糖 10 g/L。

试验发现,6-BA在叶下珠茎段愈伤组织形成中的作用最大,同时发现如果培养基中没有6-BA,愈伤组织褐化严重,直至愈伤枯死。2,4-D、NAA作用次之,蔗糖的作用最小。本试验条件下产生的愈伤组织在以后的继代繁殖过程中发现有红色、淡黄色、淡绿色的愈伤组织(图1-D)出现,不同颜色可能跟药

用成分有关。由于我国是乙肝病毒高发地区,对叶下珠的需求与日俱增,加之对叶下珠的组织培养技术研究还甚少,利用叶下珠愈伤组织培养技术来提取愈伤组织药用有效成分有待于进一步研究,能否进一步通过器官分化途径再生出完整的植物,正在试验中,以期减少对自然资源的采挖压力。

参考文献:

[1] 方雷,任丽娟.叶下珠属植物化学和药理研究概况[J].国外医药:植物药分册,1992,7(6):249.
 [2] 韩晓玲,秋小冬,王冰雪,等.叶下珠茎节组织培养与快速繁殖[J].植物生理学通讯,2006,42(4):679.
 [3] 马新宇,裴俊俊.叶下珠药理研究综述[J].齐鲁药事,2006,25

(2):104-105.
 [4] 彭建明,管志斌,张丽霞,等.苦味叶下珠家化种植技术[J].现代中药研究与实践,2005,19(4):18-19.
 [5] 沈志强,陈蓬,段理,等.叶下珠有效部位对凝血系统的影响[J].中草药,2004,35(5):539-542.
 [6] Thyagarajan S P, Subramanina S, Thirunalasundari T, et al. Effect of *Phyllanthus amarus* on chronic carriers of hepatitis B virus [J]. *Lancet*,1998,331(12):764.
 [7] David W U. Callus induction in *Phyllanthus species* and inhibition of viral DNA polymerase and reverse transcriptase by callus extracts [J]. *Plant Cell Rep*,1991,10(9):461-466.
 [8] 江苏省植物组织培养研究协会.经济植物组织培养实用技术[M].南京:江苏科学技术出版社,1988.
 [9] 马林,杨国涛,李军.黄山药愈伤组织的诱导与分化[J].广西植物,2006,26(1):97-100.

空心莲子草的高效毛细管电泳指纹图谱研究

师磊,朱红,王佳馨,马卓,刘焱文*

(湖北中医学院 中药资源与中药复方省部共建教育部重点实验室,湖北 武汉 430061)

摘要:目的 利用高效毛细管电泳技术建立空心莲子草药材的指纹图谱。方法 采用60 cm×75 μm毛细管柱,以50 mmol/L 硼砂溶液-50 mmol/L 磷酸盐溶液为缓冲液,运行电压为20 kV,检测波长220 nm,柱温25 ℃。结果 建立的指纹图谱中共有18个共有峰,且方法学考察符合规定的标准。结论 该法准确简便,可作为控制空心莲子草药材内在质量的有效手段。

关键词:空心莲子草;高效毛细管电泳;指纹图谱

中图分类号:R282.7 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2008)11-1726-04

HPCE Fingerprint of *Alternanthera philoxerodes*

SHI Lei, ZHU Hong, WANG Jia-xin, MA Zhuo, LIU Yan-wen

(Province and Ministry Co-Established Key Laboratory of Resource Science and Complex Prescription in Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Hubei College of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, China)

Abstract: **Objective** To investigate the high performance capillary electrophoresis (HPCE) fingerprint of *Alternanthera philoxerodes*. **Methods** Separation was performed on a 60 cm × 75 μm uncoated capillary with 50 mmol/L borate solution-50 mmol/L phosphate solution (pH 8.76) as HPCE buffer. The running voltage was 20 kV, the detection wavelength was 220 nm and temperature 25 ℃. **Results** Fingerprint was established with 18 common peaks. **Conclusion** The method is accurate, simple, and suitable to the quality control of *A. philoxerodes*.

Key words: *Alternanthera philoxerodes* (Mart.) Griseb.; HPCE; fingerprint

空心莲子草 *Alternanthera philoxerodes* (Mart.) Griseb. 为苋科莲子草属 (*Alternanthera* Forst.) 多年生宿根草本植物,又名空心苋、螃蜞菊、水花生等^[1]。曾收载于《中国药典》1997年一部,具有清热解毒、凉血利尿的功效。现代药理研究表明,空心莲子草具有抗流感病毒^[2]、流行性出血热病

毒^[3]、抗乙型肝炎病毒^[4]等多种抗病毒药理作用。空心莲子草药材在我国资源丰富,分布广泛,各地品质差异较大。然而,到目前为止,对于空心莲子草药材的品质研究尚未见报道,本实验室运用高效毛细管电泳技术对采自湖南、湖北、江苏、浙江、江西、福建等6个省份10个不同地市的空心莲子草进行指纹图

收稿日期:2008-03-06

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30470194)

作者简介:师磊(1981—),男,河南安阳人,现为湖北中医学院在读硕士研究生,主要从事中药及其制剂有效成分的研究。

Tel:(027)88920834 E-mail:shilei2967627@163.com

*通讯作者 刘焱文,教授,博士生导师。Tel:(027)62623577 E-mail:ywliu@puplic.wh.hb.cn