

· 资源 ·

三角叶黄连愈伤组织诱导和培养条件的优化

徐瑞超, 马云桐*, 陈新, 严铸云, 马庆, 吴清华

(成都中医药大学药学院 中药资源系统研究与开发利用省部共建
国家重点实验室培育基地, 成都 611137)

[摘要] 目的:对三角叶黄连愈伤组织的培养条件进行优化,建立三角叶黄连组织培养的技术体系。方法:采用响应面方法(RSM)中的 Box-Behnken 设计方法优化三角叶黄连愈伤组织增殖的最佳激素配比;考察不同培养基、外植体、温度、光照条件对三角叶黄连愈伤组织诱导的影响。结果:以茎尖为外植体愈伤组织诱导率最高,为 12.67%,最佳培养条件为(15±2)℃,暗培养。2,4-D,KT 是影响三角叶黄连愈伤组织形成的主要因素,其次为 NAA。结论:三角叶黄连愈伤组织诱导的最适培养基为 6,7-V + 2,4-D 0.5 mg·L⁻¹ + KT 2.0 mg·L⁻¹,增殖的最适培养基为 6,7-V + 2,4-D 4.6 mg·L⁻¹ + KT 3.8 mg·L⁻¹ + NAA 2.4 mg·L⁻¹。

[关键词] 三角叶黄连;愈伤组织;响应面方法

[中图分类号] R282.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)01-0113-05

Research on Callus Induction and Cultivation of *Coptis deltoidea*

XU Rui-chao, MA Yun-tong*, CHEN Xin, YAN Zhu-yun, MA Qing, WU Qing-hua

(College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicines of Ministry of Education, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To establish callus culture method for *Coptis deltoidea*. **Method:** The possible effective factors of callus condition were studied by comparing with different medium, explants, temperature and light conditions; the response surface methodology (RSM) based on the Box-Behnken design of experiment was used to optimize the optimum hormone combination of callus proliferation. **Result:** The callus induction rate of stem tips was the highest about 12.67%. In the optimum culture conditions, the temperature was(15±2)℃ and it was dark. The main factors affecting the callus proliferation of *C. deltoidea* were 2,4-D and KT, followed by NAA. **Conclusion:** The optimal medium for callus induction of *C. deltoidea* was 6,7-V + 2,4-D 5.0 mg·L⁻¹ + KT 2.0 mg·L⁻¹ + NAA 1.0 mg·L⁻¹. The optimum propagating medium was 6,7-V + 2,4-D 4.6 mg·L⁻¹ + KT 3.8 mg·L⁻¹ + NAA 2.4 mg·L⁻¹.

[Key words] *Coptis deltoidea*; callus; response surface methodology

三角叶黄连为毛茛科黄连属植物,以根茎入药,药材名雅连,为中药黄连的法定来源之一,在国内外

享有盛誉。黄连具有清热燥湿、泻火解毒的功效。据统计^[1],以黄连作原料的中成药有黄连上清丸、复方黄连素片等 108 种,临床应用广泛。由于三角叶黄连种植条件要求苛刻,且为无性繁殖、周期长、产量低,目前资源已面临濒危的局面,种质资源亟待保护,而应用组织培养技术保存三角叶黄连的种质资源是其中一种行之有效的途径。

响应面分析法(response surface methodology, RSM)是近几年来国外药学工作者常用的实验设计

[收稿日期] 20110720(009)

[基金项目] 国家“十一五”支撑计划项目(2007BA140B03)

[第一作者] 徐瑞超,硕士,主要从事中药品质与资源研究,Tel: 13458665714, E-mail: zihuadidingxixi@163.com

[通讯作者] *马云桐,教授,博士学位,从事中药资源与生药的研究, Tel: 13980598196, E-mail: mayuntong06@163.com

和优化法,使用方便,优选条件预测性好^[2-5]。本研究应用响应面法中的 Box-Behnken 设计方法对影响三角叶黄连愈伤组织增殖的培养条件进行优化,建立三角叶黄连组织培养的技术体系,以期为三角叶黄连种质资源保存及育种等方面的后续研究提供依据。

1 材料

三角叶黄连原植物采自四川省洪雅县瓦屋山,经成都中医药大学马云桐副教授鉴定为 *Coptis deltoidea* C. Y. Cheng et Hsiao., 取健康、无病虫害植株为实验材料。

2 方法

2.1 愈伤组织的诱导 材料的处理:取三角叶黄连的茎尖、花萼、叶柄、嫩叶为外植体,用自来水反复冲洗后,依次用 75% 乙醇消毒 30 s, 0.1% 升汞消毒 8 min, 无菌水冲洗 5 次后,切成 0.5 cm 小段用于接种。

培养基配制:琼脂 0.75%, 蔗糖 3.0%, pH 5.8, 分别附加以下激素配比以筛选愈伤组织诱导的最佳培养基。① 2,4-D 5.0 mg·L⁻¹ + KT 4.0 mg·L⁻¹ + NAA 2.0 mg·L⁻¹; ② 2,4-D 5.0 mg·L⁻¹ + KT 2.0 mg·L⁻¹ + NAA 1.0 mg·L⁻¹; ③ 2,4-D 2.5 mg·L⁻¹ + KT 4.0 mg·L⁻¹ + NAA 2.0 mg·L⁻¹; ④ 2,4-D 0.5 mg·L⁻¹ + KT 2.0 mg·L⁻¹。

培养条件:将处理后的材料接种到 6,7-V, MS, B5 培养基,接种后置于(25 ± 2) °C 的培养箱内进行暗培养,相对湿度控制在 60% ~ 75%。

2.2 不同温度和光照条件对愈伤组织诱导的影响 考察不同温度、光照条件对三角叶黄连愈伤组织

诱导的影响(实验方法同 2.1 项)。光照强度 1 500 ~ 2 000 lx, 每日光照 12 h, 相对湿度 60% ~ 75%。采用目视法观察其褐化程度,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。

2.3 不同的激素对愈伤组织增殖的影响 将诱导出的愈伤组织转移到 6,7-V 培养基上,采用响应面方法中的 Box-Behnken 设计,对影响三角叶黄连愈伤组织增殖的关键因素进行研究和探索,以获得增殖最佳的条件参数。基于前期单因素预试验,得知影响三角叶黄连愈伤组织增殖率的激素有 KT, 2,4-D, NAA。本研究以 KT, 2,4-D, NAA 3 种激素的浓度为自变量,每个因素取三水平,以 -1, 0, +1 编码,以三角叶黄连愈伤组织增殖率为响应值,进行试验设计(表 1)。每个试验号分别重复接种 10 瓶,每瓶接种 4 块。以上培养基均含 3% 蔗糖, 0.75% 琼脂, pH 5.8, 培养温度为 18 ~ 20 °C, 相对湿度 60% ~ 75%, 暗室培养。

表 1 Box-Behnken 设计因素与水平

水平 C/mg·L ⁻¹	X ₁ (KT)	X ₂ (2,4-D)	X ₃ (NAA)
-1	2.0	2.5	0.5
0	3.5	4.0	2.0
+1	5.0	5.5	3.5

3 结果与分析

3.1 不同培养基和外植体对愈伤组织诱导的影响 通过考察 6,7-V, MS, B5 3 种不同培养基; 叶片、叶柄、花萼、茎尖不同的外植体对三角叶黄连愈伤组织诱导的影响,结果见表 2。

表 2 不同培养基和外植体对愈伤组织诱导的影响

外植体	6,7-V			B5			MS		
	外植体数/块	诱导率/%	污染率/%	外植体数/块	诱导率/%	污染率/%	外植体数/块	诱导率/%	污染率/%
叶片	47	-	70	45	-	69	51	-	73
叶柄	45	6.05	91	49	3.22	89	43	-	95
花萼	38	8.11	64	35	6.34	67	36	-	69
茎尖	32	12.67	70	29	-	73	28	1.09	65

接种外植体 35 d 左右可见 6,7-V 培养基上外植体开始出现小团块状物,随之可观察到比较疏松的愈伤组织,生长速度快;外植体在 B5 培养基上出愈时间为 43 d 左右,愈伤组织致密、出愈时间长,褐化现象严重;而实验在 MS 培养基上只观察到极少量愈伤组织生成。因此,6,7-V 培养基为三角叶黄连愈伤组织诱导的最佳基本培养基。表 2 显示三角叶黄连不同外植体愈伤组织的诱导率大小依次为茎

尖 > 花萼 > 叶柄 > 叶片。不同外植体愈伤组织质地不同:茎尖诱导的愈伤组织灰黄色,较疏松,根毛少;而叶柄外植体诱导愈伤组织为黄色,较紧密,根毛极少;其次为叶片、花萼。由此可见,诱导三角叶黄连愈伤组织的最佳外植体为茎尖。

3.2 茎尖愈伤组织的诱导 通过选用 3 种常见植物激素 2,4-D, KT, NAA 的不同配比进行实验研究,结果表明,6,7-V + 2,4-D 0.5 mg·L⁻¹ + KT 2.0 mg·

L^{-1} 的激素组合对三角叶黄连的诱导率最高,诱导出的愈伤组织生长状况也较佳,见表3。

表3 不同激素组合对三角叶黄连愈伤组织诱导和生长的影响

激素组合/ $mg \cdot L^{-1}$	诱导率/%	愈伤组织生长状态
6,7-V +2,4-D 5.0 +KT 4.0 +NAA 2.0	12.05	生长较快,黄色,有大量根毛分化
6,7-V +2,4-D 5.0 +KT 2.0 +NAA 1.0	8.47	生长较慢,愈伤组织致密,褐化严重
6,7-V +2,4-D 2.5 +KT 4.0 +NAA 2.0	10.55	生长良好,黄褐色,致密大量根毛分化
6,7-V +2,4-D 0.5 +KT 2.0	13.89	生长较快,黄色,稍疏松,有少量根毛分化

3.3 不同温度和光照条件对愈伤组织诱导的影响

三角叶黄连在温度为 $(15 \pm 2) ^\circ C$,暗培养条件下愈伤组织诱导率最高11.73%(表4),虽有褐化现

象,但与其他温度条件的愈伤组织相比质地疏松,色黄,因此为愈伤组织诱导的最佳温度条件。

表4 不同温度、光照条件对愈伤组织诱导的影响

No.	温度/ $^\circ C$	光照条件	愈伤组织诱导率/%	褐化程度	愈伤组织生长情况
1	15 ± 2	光	7.83	卅	黄色,少数棕黄色,稍疏松
2	15 ± 2	暗	11.73	++	黄色,疏松
3	20 ± 2	光	4.37	卅	致密,黄色
4	20 ± 2	暗	6.30	++	致密,黄色
5	20 ± 2	光	2.18	+	致密,黄褐色
6	20 ± 2	暗	6.09	卅	致密,灰黄色

3.4 不同的激素对愈伤组织增殖的影响

3.4.1 结果及方差分析 利用响应面法对三角叶黄连愈伤组织增殖率的主要激素参数条件进行优化,采用 Design Expert 7.1 统计软件进行试验设计与回归分析,结果见表5~6。从方差分析结果可以看出,KT,2,4-D,NAA 3种不同激素浓度对增殖率的影响均显著,以KT影响最为显著。

3.4.2 模型拟合与优化 以愈伤组织增殖率为响应值,根据表5的试验结果,利用 Design Expert 7.1 统计软件对所得数据进行回归拟合,确立以下回归方程预测模型: $Y = -76.80083 + 27.65317X_1 + 39.58303X_2 + 15.06245X_3 + 0.20619X_1X_2 - 1.7649X_1X_3 + 1.53649X_2X_3 - 3.18919X_1^2 - 4.78202X_2^2 - 3.18047X_3^2$ 。回归方程高度显著,相关系数 $R^2 = 99.06\%$,说明响应值的变化有99.06%来源于所选变量。因此回归方程可以较好地描述各因素与响应值之间的真实关系,可以利用该回归方程确定3种激素的最佳水平。

由回归方程所作的响应曲面图及其等高线图,见图1~3。通过该组图即可对任何两因素交互影响愈伤组织增殖率的效应进行分析与评价,并从中确定最佳因素水平范围。

由 Design Expert 软件分析得最大响应值(Y)时 X_1, X_2, X_3 值分别为3.8,4.6,2.4,即3种激素的质量浓度为KT 3.8 $mg \cdot L^{-1}$, 2,4-D 4.6 $mg \cdot L^{-1}$,

表5 Box-Behnken 试验设计与结果

No.	X_1	X_2	X_3	增殖率/%
1	-1	0	1	74.1803
2	1	-1	0	61.1277
3	-1	1	0	68.0033
4	-1	0	-1	55.3963
5	0	-1	1	55.1992
6	0	0	0	84.0702
7	0	-1	-1	59.0991
8	1	0	-1	71.0276
9	0	0	0	83.7845
10	0	0	0	82.8274
11	1	0	1	73.9275
12	0	0	0	81.8243
13	1	1	0	76.9846
14	0	1	-1	67.9847
15	-1	-1	0	54.0021
16	0	1	1	77.9132
17	0	0	0	82.3169

NAA 2.4 $mg \cdot L^{-1}$ 。在此水平下,由回归方程预测三角叶黄连愈伤组织的增殖率为85.4281%。

为检验结果的可靠性,采用筛选的最佳激素参数进行验证实验,结果得出三角叶黄连愈伤组织的增殖率为84.6062%,与理论预测值基本一致(偏差

表 6 响应面二次回归方程方差分析

方差来源	自由度	平方和	均方	F	P(Pr > F)	显著性
X_1	1	123.916 3	123.916 3	24.986 95	0.001 6	**
X_2	1	472.131 1	472.131 1	95.202 29	<0.000 1	**
X_3	1	95.997 83	95.997 83	19.357 36	0.003 2	**
X_1X_1	1	216.801 6	216.801 6	43.716 69	0.000 3	**
X_1X_2	1	0.860 906	0.860 906	0.1735 96	0.689 4	
X_1X_3	1	63.076 16	63.076 16	12.718 91	0.009 1	**
X_2X_2	1	487.444 3	487.444 3	98.290 11	<0.000 1	**
X_2X_3	1	47.806 16	47.806 16	9.639 814	0.017 2	*
X_3X_3	1	215.617 4	215.617 4	43.477 9	0.000 3	**
Mode	9	1 825.793 4	202.865 9	40.906 6	<0.000 1	**
误差	4	3.633 2	0.908 3			
总和	16	1 860.508 1				

注: * $R^2 = 98.13\%$, ** $R^2_{Adj} = 95.74\%$ 。

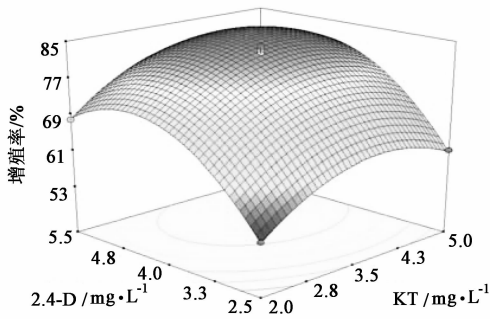


图 1 增殖率对 2,4-D 浓度与 KT 浓度的响应面和等高线

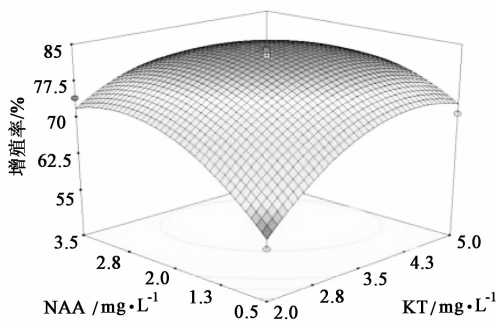


图 2 增殖率对 2,4-D 浓度与 NAA 浓度的响应面和等高线

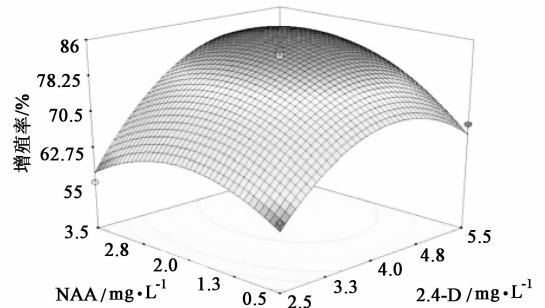


图 3 增殖率对 KT 浓度与 NAA 浓度的响应面和等高线

程中,正确的选择外植体极其重要。本研究采用三角叶黄连叶片、茎段、花萼、茎尖作为培养材料,茎尖诱导愈伤组织效果最好,叶片未能诱导出愈伤组织。试验中还发现不同外植体诱导愈伤组织污染率不同,叶柄污染率最高达 95%,花萼最低达 64%,整体水平偏高,这可能与三角叶黄连茎中空结构,外植体消毒不易有关,也可能与其体内丰富的内生菌群有关。

试验表明三角叶黄连愈伤组织的长势与季节有关:冬、春季长势较好,夏、秋季节长势较差,且愈伤组织随着继代次数的增加极易出现褐变死亡现象,给其组织培养体系的建立增加了难度。为了防止发生褐变死亡,本课题组还在培养基中分别附加维生素 C、活性炭等抗氧化剂,愈伤组织褐变死亡现象虽有减少趋势,但未能制止发生。

植物生长物质对三角叶黄连组织培养的影响:在三角叶黄连茎尖离体培养试验中,研究了 2,4-D,KT,NAA 3 种植物生长物质不同浓度对植物组织的影响,在一定范围内,增殖率均随着 3 种激素浓度的

为 0.96%) ,说明该方程与实际情况拟合很好,充分验证了所建模型的正确性。因此,利用响应面分析法得到的激素参数真实可靠,具有实用价值。

4 讨论

同一种植物不同的组织和器官再生能力差异较大,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^[6]。在三角叶黄连组织培养的快速繁殖和愈伤组织诱导过

湖南地区白花丹参的引种试验研究

杨先国, 刘塔斯*, 林丽美, 舒柯, 李钟, 褚思思
(湖南中医药大学, 长沙 410208)

[摘要] 目的: 探讨从山东莱芜引种到湖南地区的白花丹参药材的产量及质量。方法: 相同条件种植白花丹参和紫花丹参, 计算 2 种丹参根的条数、粗细、根的鲜干质量, 采用高效液相色谱法测定丹参中丹参酮 II_A 和丹酚酸 B 的含量, 并对根横切面的显微特征进行研究。结果: 引种后的白花丹参有效成分含量符合药典标准, 产量显著提高, 二者的根横切面显微特征有明显的差异。结论: 白花丹参适合在湖南种植, 可作为优质的丹参资源在湖南引种并开发利用。

[关键词] 白花丹参; 化学成分; 含量; 产量; 显微特征

[中图分类号] R282 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)01-0117-04

Introduction of *Salvia miltiorrhiza* bge. var. *alba* in Hunan

YANG Xian-guo, LIU Ta-si*, LIN Li-mei, SHU Ke, LI Zhong, CHU Si-si
(Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

[Abstract] **Objection:** To study the yield and quality of *Salvia miltiorrhiza* bge. var. *alba* introduced from Shandong Laiwu, planted in Hunan province. **Method:** *Salvia miltiorrhiza* bge and *S. miltiorrhiza* bge. var. *alba* were planted samely, and the number, size, weight of two plant's radix were counted. The content of tanshinone II_A and salvianolic acid B were determined by high performance liquid chromatography (HPLC), microscopic characters of transverse section of radix were studied. **Result:** The content of chemical constituent accorded with the

[收稿日期] 2011-06-07

[基金项目] 湖南省科技厅科技计划项目(2010sk3013); 湖南省中医药管理局科研基金项目(201105)

[第一作者] 杨先国, 博士研究生, 从事中药资源与质量的研究, Tel: 0731-88458234, E-mail: yxg656@163.com

[通讯作者] * 刘塔斯, 教授, 博士生导师, 从事中药鉴定、中药质量与资源研究, Tel: 0731-88458234, E-mail: liutasi@126.com

增大而增大, 但是随着激素水平的继续增大, 愈伤组织增殖反而受到抑制, 其中 2,4-D 在三角叶黄连愈伤组织形成中的作用最大, 增殖培养中随着继代次数的增多, 愈伤组织出现大量根毛的分化; 在 6,7-V 培养基中, 提高 2,4-D 的浓度不仅可促进愈伤组织的生长, 而且可以抑制根毛的分化; NAA 浓度的增加更有利于根毛的分化; 2,4-D 和 KT 组合诱导的愈伤组织致密, 褐化严重。本实验应用响应面法中的 Box-Behnken 设计方法筛选出三角叶黄连茎尖愈伤组织继代的最适宜培养基为 6,7-V + 2,4-D 4.6 mg·L⁻¹ + KT 3.8 mg·L⁻¹ + NAA 2.4 mg·L⁻¹。

[参考文献]

[1] 兰进, 杨世林, 郑玉权, 等. 黄连的研究进展[J]. 中草药, 2001, 32(12): 1139.

- [2] Banik R M, Pandey D K. Optimizing conditions for oleanolic acid extraction from *Lantana camara* roots using response surface methodology [J]. *Industrial Crops and Products*, 2008, 27: 241.
- [3] 吴伟, 崔光华. 星点设计-效应面优化法及其在药学中的应用[J]. *国外医学·药学分册*, 2000, 27(5): 292.
- [4] Bahar Aliakbarian, Danilo De Faveri, Attilio Converti, et al. Optimisation of olive oil extraltion by means of enzyme processing aids using response surface methodology [J]. *Biochem Eng J*, 2008, 42: 34.
- [5] Baş D, Boyci I H. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology [J]. *J Food Engineering*, 2007, 78: 836.
- [6] 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.

[责任编辑 邹晓翠]