

不同激素配比对远志愈伤诱导及其黄酮积累的影响

李洁, 胡本祥*, 彭亮*, 杨冰月, 罗露, 曹福麟, 赵婷, 安衍茹, 黄涛
(陕西中医药大学药学院, 陕西 咸阳 712046)

[摘要] **目的:**研究不同激素配比对远志根、茎、叶愈伤组织诱导的影响,并对远志根、茎、叶愈伤组织中的黄酮量进行测定分析。**方法:**以MS为基本培养基,分别以远志无菌苗的根、茎、叶为外植体,应用正交试验法确定2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D),萘乙酸(NAA),6-苄氨基嘌呤(6-BA)这3种激素对远志根、茎、叶不同部位愈伤组织诱导及其黄酮积累量的影响。**结果:**2,4-D,NAA,6-BA对远志根、茎、叶愈伤诱导率均有显著影响。叶的最佳愈伤诱导组合为MS+3.0 mg·L⁻¹ 2,4-D+1.0 mg·L⁻¹ NAA+1.5 mg·L⁻¹ 6-BA;茎的最佳愈伤诱导组合为MS+1.0 mg·L⁻¹ 2,4-D+3.0 mg·L⁻¹ NAA+1.5 mg·L⁻¹ 6-BA;根的最佳愈伤诱导组合为MS+1.0 mg·L⁻¹ 2,4-D+1.0 mg·L⁻¹ NAA+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA。2,4-D,NAA,6-BA对远志茎愈伤组织中黄酮积累均影响显著,以MS+3.0 mg·L⁻¹ 2,4-D+1.0 mg·L⁻¹ NAA+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA为最佳黄酮积累组合;NAA,6-BA对远志叶愈伤组织中黄酮积累影响均显著,而2,4-D则无明显影响,以MS+3.0 mg·L⁻¹ 2,4-D+2.0 mg·L⁻¹ NAA+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA为最佳黄酮积累组合;3种激素分别对远志根愈伤组织中黄酮积累无明显影响,以MS+2.0 mg·L⁻¹ 2,4-D+1.0 mg·L⁻¹ NAA+1.5 mg·L⁻¹ 6-BA为最佳黄酮积累组合。**结论:**在该条件下远志根、茎、叶愈伤组织诱导率均达100%,其中尤以远志叶愈伤组织长势最好,其次分别是远志茎和远志根。在该条件下远志根、茎、叶愈伤组织中黄酮量分别达到21.31, 24.56, 23.61 mg·g⁻¹。

[关键词] 远志; 愈伤; 组织培养; 黄酮; 激素

[中图分类号] R284.1;R289;R22;R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)19-0131-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191112

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190221.1132.002.html>

[网络出版时间] 2019-02-21 14:22

Effect of Different Hormone Ratios on Callus Induction and Flavone Accumulation in *Polygala tenuifolia*

LI Jie, HU Ben-xiang*, PENG Liang*, YANG Bing-yue, LUO Lu, CAO Fu-lin,
ZHAO Ting, AN Yan-ru, HUANG Tao
(Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of different hormone ratios on the callus induction of roots, stems and leaves of *Polygala tenuifolia*, and determine and analyze the amount of flavonoids in roots, stems and leaves of *P. tenuifolia*. **Method:** With MS as the basic medium and roots, stems and leaves of *P. tenuifolia* sterile seedlings as explants, the effects of 2, 4-D, NAA and 6-BA on callus induction and flavonoid accumulation in different parts of roots, stems and leaves of *P. tenuifolia* were determined by orthogonal test. **Result:** 2, 4-D, NAA and 6-BA had significant effects on the callus induction rate of roots, stems and leaves of *P. tenuifolia*. The optimal callus induction combination of leaves was MS+3.0 mg·L⁻¹ 2, 4-D+1.0 mg·L⁻¹ NAA+1.5 mg·L⁻¹ 6-BA, the optimal callus induction combination of stems was MS+1.0 mg·L⁻¹ 2, 4-D+3.0 mg·L⁻¹ NAA+1.5 mg·L⁻¹ 6-BA, the optimal callus induction combination for roots was MS+1.0 mg·L⁻¹ 2, 4-D+1.0 mg·L⁻¹

[收稿日期] 20180817(006)

[基金项目] 国家中药标准化项目(ZYBZH-Y-QIN-36;202410001);公益性行业(中医药)科研专项经费项目(201507002-1-08)

[第一作者] 李洁,在读硕士,从事中药质量控制标准研究,E-mail:1822780478@qq.com

[通信作者] *胡本祥,硕士生导师,教授,从事中药质量控制标准研究,E-mail:hbx800823@126.com;

*彭亮,博士,从事中药资源与评价以及中药材质量控制标准研究,E-mail:ppengliang@126.com

NAA + 1.0 mg·L⁻¹ 6-BA. And 2, 4-D, NAA and 6-BA had significant effects on flavonoid accumulation in the stem callus of *P. tenuifolia*, and MS + 3.0 mg·L⁻¹ 2, 4-D + 1.0 mg·L⁻¹ NAA + 0.5 mg·L⁻¹ 6-BA was the best flavonoid accumulation combination. NAA, 6-BA had significant effects on flavonoid accumulation in the leave callus of *P. tenuifolia*, while 2, 4-D had no significant effect, and MS + 3.0 mg·L⁻¹ 2, 4-D + 2.0 mg·L⁻¹ NAA + 1.0 mg·L⁻¹ 6-BA was the optimal flavonoid accumulation combination, the three hormones had no significant effect on the accumulation of flavonoids in the root callus of *P. tenuifolia*, and MS + 2.0 mg·L⁻¹ 2, 4-D + 1.0 mg·L⁻¹ NAA + 1.5 mg·L⁻¹ 6-BA was the best flavonoid accumulation combination. **Conclusion:** Under the conditions, the callus induction rate of roots, stems and leaves of *P. tenuifolia* is 100%, especially, the callus of *P. tenuifolia* leaves was the optimal, which is followed by *P. tenuifolia* stems and *P. tenuifolia* roots. Under the conditions, the amount of flavonoids in roots, stems and leaves of *P. tenuifolia* reach 21.31, 24.56, 23.61 mg·g⁻¹, respectively.

[Key words] *Polygala tenuifolia*; callus; tissue culture; flavonoids; hormone

远志为多年生草本植物,始载于《神农本草经》,2015年版《中国药典》所收录的远志来源为远志科远志属植物远志或卵叶远志的干燥根。远志性温,味苦、辛,具有安神益智、祛痰消肿的功效,临床主要用于心肾不交、失眠多梦等^[1]。远志的主要化学成分为皂苷类、糖酯类和吡啶类,除此之外还有黄酮、木质素、香豆素和生物碱类等化学成分^[2-6]。远志中含有的这些化学成分可以通过改善胆碱能系统功能、抗氧化、清除自由基、保护神经元等多种途径对阿尔茨海默病起到治疗的作用^[7]。黄酮类化合物是植物次生代谢产生的一类多酚化合物,广泛分布于自然植物中,具有显著的生理活性。黄酮类化合物因其结构复杂,类型多样而表现出多种药理作用,能够舒张血管平滑肌、保护血管内皮细胞和抑制血管平滑肌细胞增生,具有抗肝脏毒性、抗炎、调脂、抗菌、抗氧化、抗肿瘤及提高机体免疫力的作用^[8-9],有些黄酮类化学成分还具有止咳、祛痰平喘作用^[10]。SHI等^[11]对远志植物地上部分10个黄酮类成分进行了分离并对其抗氧化活性进行了研究。

远志作为我国的常用中药,随着其市场需求量的增长以及过度采挖,远志的野生资源急剧下降,而远志的人工栽培中存在着种子产量低、种植周期长^[12]、播种后期萌发率低、出苗不整齐^[13]等问题,致使远志的生产无法满足市场的需求,严重影响了远志的可持续发展。而目前植物组织培养技术利用细胞的全能性建立了植物的离体培养技术,其最大的优点在于,以少量植物材料在短时间内进行大量诱导,进而快速繁殖,不受环境如季节的影响^[14],且利用植物愈伤组织培养技术生产黄酮类次生代谢产物已成为近年来发展的新领域。而前人对于利用远志愈伤组织产生黄酮次生代谢产物的研究甚少,

大部分仅限于对其愈伤组织诱导影响的研究,或仅对远志植物中黄酮化合物及其药理作用进行研究。本课题组前期已对远志的种子、种苗质量进行了相关研究^[15-16],而本实验从植物组培方面入手,将激素对远志愈伤组织诱导影响及其对远志愈伤组织中次生代谢产物黄酮积累量的影响结合起来进行研究。以远志无菌苗的根、茎、叶为材料,以MS为基本培养基,以2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D),萘乙酸(NAA),6-苄氨基嘌呤(6-BA)3种激素为考察因素,应用L₉(3⁴)正交表设计培养基,分析了其不同浓度激素配比对远志不同部位愈伤组织诱导及其黄酮量积累的影响,并对其条件进行优化,为后期远志组织培养技术及工业化生产提供一定数据参考。

1 材料

MS基本培养基(北京康倍斯科技有限公司,批号B0017K0315008);2,4-D,6-BA,NAA(上海蓝季生物有限公司,批号分别为B00009,B00004,B00008);芦丁(中国食品药品检定研究院,批号100080-201409,纯度≥98.0%);无水乙醇,硫酸铜,高锰酸钾,次氯酸钠,H₂O₂,升汞,亚硝酸钠,硝酸铝,氢氧化钠(天津市天力化学试剂有限公司);生化培养箱(上海跃进医疗器械有限公司);SW-CJ-1FD型洁净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);GR60DA型立式自动压力蒸气灭菌器(厦门致微仪器有限公司);UV-2550型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司);TDZ5-WS型多管架离心机(湘仪离心机公司);FA2104型电子分析天平(上海民桥精密科学仪器有限公司)。

远志种子采集于陕西省淳化县远志规范化栽培基地,经陕西中医药大学胡本祥教授鉴定为远志 *Polygala tenuifolia* 的种子。

2 方法

2.1 远志无菌苗培养 选取优质饱满、大小基本一致的远志种子 720 粒,轻轻揉搓掉其种子表面的细小绒毛,分为 8 组(即 8 个处理),每个处理 90 粒种子,重复 3 次,每次重复 30 粒种子。每组流水冲洗,再用经过高温灭菌的无菌水浸泡 6 h,将浸泡好的种子置于无菌操作台上进行消毒处理。处理 1:用 75% 乙醇浸泡 30 s,无菌水洗 3~5 次去除乙醇后,用 0.2% 升汞浸泡 10 min,浸泡过程中不断轻摇,再用无菌水洗 3~5 次去除升汞;处理 2~8:分别用 0.2% 升汞,1.0% 升汞,10% H₂O₂,2% 次氯酸钠,10% 次氯酸钠,1.0% 硫酸铜,0.2% 高锰酸钾各处理 10 min,方法同上。将消毒好的远志种子用无菌滤纸吸干其表面水分,接种于不添加任何激素的 MS 固体培养基上,于光照强度 2 000 Lx,光照 12 h·d⁻¹ 的(25±1)℃生化培养箱中培养,7 d 后统计种子污染率,14 d 后统计种子发芽率。无菌培养至苗高 7~8 cm 时,作为诱导远志愈伤组织的外植体备用。
种子污染率 = 污染种子数/接种种子数 × 100%;
种子发芽率 = 发芽种子数/接种种子数 × 100%。

2.2 远志不同外植体的处理 选择生长旺盛的远志无菌苗,于洁净操作台中作如下处理,叶片切为 0.5 cm × 0.5 cm 的方块,茎切为 0.5 cm 的小段,根切为 0.5 cm 的小段,分别接种于不同激素配比的培养基中。每瓶接种 5 块,每组 25 瓶。

2.3 培养条件 以 MS 为基本培养基,以 2,4-D, NAA,6-BA 3 种激素为考察因素,每个因素设置 3 个水平,分别为 2,4-D 1.0,2.0,3.0 mg·L⁻¹; NAA 1.0,2.0,3.0 mg·L⁻¹; 6-BA 0.5,1.0,1.5 mg·L⁻¹; 应用 L₉(3⁴) 正交表设计培养基。培养温度为(25±1)℃,湿度保持在 60%~70%,在黑暗条件下培养,观察统计远志的愈伤诱导率。

2.4 愈伤组织的继代培养 将远志不同部位诱导出的愈伤组织在与诱导培养基激素种类和浓度配比相同的对应培养基中继代培养 3 次后,测定黄酮的含量。

2.5 总黄酮的测定^[17-19] 参照文献方法,采用芦丁标准曲线法测定远志愈伤组织中黄酮含量。

2.5.1 愈伤组织中总黄酮的提取 取愈伤组织于 60℃烘箱中烘至恒重,研细,过 40 目筛,精确称取 0.1 g 至锥形瓶中,精密加入 75% 乙醇 5 mL,浸泡 30 min 后超声处理 45 min,过滤。滤渣中精密加入 75% 乙醇 3 mL 超声 30 min,过滤。合并 2 次滤液,至 10 mL 量瓶中,用 75% 乙醇定容,备用。

2.5.2 检测波长的确定 称取一定量的芦丁对照品,用 75% 乙醇溶解并定容,于紫外-可见分光光度计 200~800 nm 进行扫描。结果芦丁对照品溶液在 420 nm 处具有最大吸收,因此选择 420 nm 为黄酮的测定波长。

2.5.3 愈伤组织中总黄酮的测定 精密吸取待测液 2.6 mL,加入 5% 亚硝酸钠溶液 1 mL,混匀,放置 6 min,加 10% 硝酸铝溶液 1 mL,混匀,放置 6 min,加 10% 氢氧化钠溶液 2.4 mL,摇匀,放置 20 min,以相应试剂为空白。在 420 nm 处测吸光度 A。

2.5.4 标准曲线的绘制 取芦丁对照品溶液 0, 0.2,0.4,0.6,0.8,1 mL,按 2.5.3 项下测定方法,在 420 nm 处检测,并绘制芦丁标准曲线。芦丁的回归方程为 Y=9.841 5X+0.006 1(r=0.999 3)。

2.6 数据处理与分析 所有测定数据 3 次重复,用 Excel 及 SPSS 17.0 软件进行分析。

3 结果与分析

3.1 远志种子灭菌方法 采用不同的消毒处理方法,对其污染率和发芽率进行统计计算,结果见表 1。

表 1 不同处理方法对种子发芽率和污染率的影响

Table 1 Effect of different treatments on germination and contamination rates of seeds %

处理方法	污染率	发芽率
75% 乙醇-0.2% 升汞	0.00 ^f	17.78 ^{bc}
0.2% 升汞	0.00 ^f	18.89 ^b
1.0% 升汞	0.00 ^f	0.00 ^c
10% H ₂ O ₂	21.11 ^d	50.00 ^a
2% 次氯酸钠	38.89 ^c	17.78 ^{bc}
10% 次氯酸钠	10.00 ^e	8.89 ^d
1.0% 硫酸铜	62.22 ^b	16.67 ^c
0.2% 高锰酸钾	66.67 ^a	10.00 ^d

注:接种数均为 90。表中不同字母表示不同处理间具差异显著(P<0.05)(表 3,7 同)。

从表 1 可以看出,不同的消毒处理,对远志种子的污染率和发芽率呈现出不同的效果。以 75% 乙醇-0.2% 升汞,0.2% 升汞和 1.0% 升汞分别对远志种子消毒,污染率均为 0,消毒效果最好;其次为 10% 次氯酸钠,污染率为 10%;10% H₂O₂ 的污染率为 21.11%;2% 次氯酸钠的污染率为 38.89%;1.0% 硫酸铜的污染率为 62.22%;0.2% 高锰酸钾的污染率为 66.67%。其中采用 1.0% 硫酸铜和 0.2% 高锰酸钾为消毒剂时,培养基呈红色和绿色,污染十分严重,不利于远志无菌苗的培养。通过

不同消毒剂对远志种子进行消毒处理,均对远志种子的发芽率产生了一定影响。其中,以 10% H₂O₂ 对远志种子消毒后,其发芽率相对最高,为 50.00%;其次是 0.2% 升汞处理的远志种子,其发芽率为 18.89%;75% 乙醇-0.2% 升汞和 2% 次氯酸钠处理的远志种子,其发芽率均为 17.78%;1.0% 硫酸铜处理的远志种子,其发芽率为 16.67%;0.2% 高锰酸钾处理的远志种子,其发芽率为 10.00%;10% 次氯酸钠处理的远志种子,其发芽率为 8.89%;1.0% 升汞处理的远志种子,其发芽率为 0。对不同消毒处理的远志种子发芽率和污染率进行差异分析,得出采用 10% H₂O₂ 处理的远志种子发芽率明显高于 75% 乙醇-0.2% 升汞,0.2% 升汞,1.0% 升汞,2% 次氯酸钠,10% 次氯酸钠,1.0% 硫酸铜,0.2% 高锰酸钾条件下处理的远志种子发芽率,并且其污染率相对较低。综上结果,远志种子的最佳消毒条件为采用 10% H₂O₂ 处理 10 min,无菌水

洗后吸干其表面水分,接种于不添加任何激素的 MS 固体培养基中。

3.2 远志愈伤组织的诱导 将远志无菌苗的根、茎、叶外植体接种到不同激素的培养基上,接种后第 3 天,远志根外植体开始变得透明,远志茎外植体开始变粗,根、茎、叶 3 种外植体的切口处均有不同称度的膨大。接种后第 8 天,在少许远志根、茎、叶外植体的切口上观察到有少量愈伤细胞形成。接种后第 21 天,远志根、茎、叶 3 种外植体的愈伤组织诱导率达到高峰,其诱导率均达到 100%,长势较好且褐化率低,不同激素对远志根、茎、叶愈伤组织诱导的影响见表 2。远志根的愈伤细胞为浅黄白色偏透明颗粒状,较疏松,见图 1;远志茎和远志叶的愈伤细胞为黄色,但以茎为外植体形成的愈伤细胞颜色较以叶为外植体形成的愈伤细胞颜色稍深,质地较疏松,见图 2,3。以远志叶为外植体诱导的愈伤组织较以远志茎和根为外植体诱导的愈伤组织长势好。

表 2 不同激素对远志根、茎、叶愈伤组织诱导的影响

Table 2 Different hormones on *Polygala tenuifolia* root, stem and blade callus induction

试验组号	出愈数			诱导率%			生长状况			形态特征		
	根	茎	叶	根	茎	叶	根	茎	叶	根	茎	叶
1	115	111	109	92.0	88.8	87.2	+++	++	+++	浅黄白色疏松愈伤	浅黄绿色较致密愈伤	黄绿色较致密愈伤,叶片愈伤面积较小
2	98	102	104	78.4	81.6	83.2	+	++	+++	浅黄白色致密愈伤	浅黄绿色较致密愈伤	黄绿色较致密愈伤,叶片愈伤面积较小
3	108	94	110	86.4	75.2	88.0	++	+	+++	浅黄白色较致密愈伤	浅黄绿色致密愈伤	黄绿色较疏松愈伤,叶片愈伤面积较大
4	92	119	113	73.6	95.2	90.4	+	+++	+++	浅黄白色致密愈伤	浅黄绿色致密愈伤	黄绿色较疏松愈伤,叶片愈伤面积较大
5	104	98	122	83.2	78.4	97.6	++	+	+++	浅黄白色致密愈伤	浅黄绿色较致密愈伤	黄绿色较致密愈伤,少许叶片愈伤面积较小
6	122	118	100	97.6	94.4	80.0	+++	+++	++	浅黄白色疏松愈伤	浅黄绿色较致密愈伤	黄绿色致密愈伤,叶片愈伤面积小
7	114	125	112	91.6	100.0	89.6	+++	+++	+++	浅黄白色较疏松愈伤	浅黄绿色较致密愈伤	黄绿色致密愈伤,叶片愈伤面积大
8	125	107	116	100.0	85.6	92.8	++++	++	++++	浅黄白色较致密愈伤	浅黄绿色较致密愈伤	黄绿色较致密愈伤,少许叶片愈伤面积较小
9	112	114	125	89.6	91.2	100.0	+++	+++	++++	浅黄白色较疏松愈伤	浅黄绿色致密愈伤	黄绿色疏松愈伤,叶片全部形成愈伤

注:“+”表示生长状况,数量越多表示长势越好。接种数均为 125。



图 1 远志根的愈伤情况

Fig.1 Callus growth of *Polygala tenuifolia* roots



图 2 远志茎的愈伤情况

Fig.2 Callus growth of *Polygala tenuifolia* stems

3.3 激素对愈伤诱导的影响 分别对远志的根、茎、叶愈伤诱导率进行直观分析、方差分析和差异分

析,结果见表 3~6。由表 3 可知,不同激素的种类和配比对远志不同部位愈伤诱导率存在显著差异。



图 3 远志叶的愈伤情况

Fig. 3 Callus growth of *Polygala tenuifolia* leaves

各激素对远志根愈伤诱导的影响依次为 2,4-D > NAA > 6-BA, 最佳激素组合为 MS + 1.0 mg · L⁻¹ 2,4-D + 1.0 mg · L⁻¹ NAA + 1.0 mg · L⁻¹ 6-BA; 各激素对远志茎愈伤诱导影响依次为 6-BA > 2,4-D > NAA, 最佳激素组合为 MS + 1.0 mg · L⁻¹ 2,4-D + 3.0 mg · L⁻¹ NAA + 1.5 mg · L⁻¹ 6-BA; 各激素对远志叶愈伤诱导的影响为 NAA > 6-BA > 2,4-D, 最佳激素组合为 MS + 3.0 mg · L⁻¹ 2,4-D + 1.0 mg · L⁻¹ NAA + 1.5 mg · L⁻¹ 6-BA。由表 4 ~ 6 可知, 2,4-D, NAA, 6-BA 对远志根、茎、叶愈伤组织诱导率均有显著影响。根据正交分析所得的远志根、茎、叶愈伤组织诱导最佳激素浓度配比, 分别对其进行愈伤组织诱导的验证实验, 得出在该条件下, 远志根、茎、叶愈伤组织诱导率均达到 100%, 且长势都较好, 褐化率低, 其中尤以叶的愈伤组织生长状况最好, 其次为茎和根。

表 3 远志根、茎、叶愈伤组织诱导的正交试验分析

Table 3 Analysis of orthogonal test results of callus induction from roots, stems and leaves of *Polygala tenuifolia*

组号	激素/mg · L ⁻¹			愈伤诱导率/%		
	2,4-D	NAA	6-BA	根	茎	叶
1	3.0	1.0	2.0	92 ^c	88.8 ^d	87.2 ^f
2	2.0	3.0	1.0	78.4 ^e	81.6 ^f	83.2 ^e
3	2.0	2.0	2.0	86.4 ^e	75.2 ^h	88 ^{ef}
4	3.0	3.0	3.0	73.6 ^h	95.2 ^b	90.4 ^d
5	3.0	2.0	1.0	83.2 ^f	78.4 ^e	97.6 ^b
6	1.0	3.0	2.0	97.6 ^b	94.4 ^b	80 ^h
7	1.0	2.0	3.0	91.6 ^c	100 ^a	89.6 ^{de}
8	1.0	1.0	1.0	100 ^a	85.6 ^c	92.8 ^c
9	2.0	1.0	3.0	89.6 ^d	91.2 ^c	100 ^a

3.4 激素对黄酮积累量的影响 以远志根、茎、叶愈伤组织中黄酮含量为指标, 对其进行直观分析、方差分析和差异分析, 结果见表 7 ~ 10。由表 7 可知, 不同激素的种类和对比对远志不同部位愈伤组织中黄酮积累量存在显著差异。各激素对远志根愈伤组

表 4 远志根愈伤组织诱导方差分析

Table 4 Results of variance analysis of callus induction of *Polygala tenuifolia* roots

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P
2,4-D	960.109	2	480.054	119.622	<0.01
NAA	535.629	2	267.814	66.735	<0.01
6-BA	243.847	2	121.923	30.381	<0.01
误差	80.262	20	4.013		

表 5 远志茎愈伤组织诱导方差分析

Table 5 Results of variance analysis of callus induction of *Polygala tenuifolia* stems

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P
2,4-D	513.707	2	256.853	42.07	<0.01
NAA	161.707	2	80.853	13.243	<0.01
6-BA	870.827	2	435.413	71.317	<0.01
误差	122.107	20	6.105		

表 6 远志叶愈伤组织诱导方差分析

Table 6 Results of variance analysis of callus induction of *Polygala tenuifolia* leaves

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P
2,4-D	85.76	2	42.88	4.853	<0.05
NAA	395.52	2	197.76	22.381	<0.01
6-BA	331.52	2	165.76	18.76	<0.01
误差	158.622	20	8.836		

织中黄酮含量的影响依次为 2,4-D > NAA > 6-BA, 以 MS + 2.0 mg · L⁻¹ 2,4-D + 1.0 mg · L⁻¹ NAA + 1.5 mg · L⁻¹ 6-BA 为最佳黄酮积累组合; 各激素对远志茎愈伤组织中黄酮含量的影响依次为 2,4-D > 6-BA > NAA, 以 MS + 3.0 mg · L⁻¹ 2,4-D + 1.0 mg · L⁻¹ NAA + 0.5 mg · L⁻¹ 6-BA 为最佳黄酮积累组合; 各激素对远志叶愈伤组织中黄酮含量的影响依次为 6-BA > NAA > 2,4-D, 以 MS + 3.0 mg · L⁻¹ 2,4-D + 2.0 mg · L⁻¹ NAA + 1.0 mg · L⁻¹ 6-BA 为最佳黄酮积累组合。由表 8 ~ 10 可知, 2,4-D, NAA, 6-BA 对远志茎愈伤组织中黄酮积累量均有显著影响; NAA, 6-BA 对远志叶愈伤组织中黄酮含量的影响依次为 6-BA > NAA > 2,4-D, 以 MS + 3.0 mg · L⁻¹ 2,4-D + 2.0 mg · L⁻¹ NAA + 1.0 mg · L⁻¹ 6-BA 为最佳黄酮积累组合。由表 8 ~ 10 可知, 2,4-D, NAA, 6-BA 对远志茎愈伤组织中黄酮积累量均有显著影响; NAA, 6-BA 对远志叶愈伤组织中黄酮积累量均影响显著, 而 2,4-D 则无明显影响; 2,4-D, NAA, 6-BA 分别对远志根愈伤组织中黄酮积累量无明显影响, 但根据其显著性差异分析得出, 2,4-D, NAA, 6-BA 3 种激素不同浓度组合诱导出的远志根愈伤组织中黄酮积累量存在显著性差异。根据正交分析所得的远志根、茎、叶愈伤组织黄酮积累量最佳激素浓度配比, 分别对其进行愈伤组织黄酮积累量的验证实验。将 3.2 项下诱导出的愈伤组织转入上述所得愈伤组织黄酮积累量最佳

激素浓度配比中,黑暗条件下继代培养 3 次,测定黄酮含量得根愈伤组织中黄酮积累为 $21.31 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,茎愈伤组织中黄酮积累为 $24.56 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,叶愈伤组织中黄酮积累为 $23.61 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

表 7 远志根、茎、叶愈伤组织黄酮积累量的正交试验分析

Table 7 Analysis of orthogonal test results of flavonoid accumulation in callus of roots, stems and leaves of *Polygala tenuifolia*

组号	激素/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$			黄酮/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$		
	2,4-D	NAA	6-BA	根	茎	叶
1	3.0	1.0	2.0	10.54 ^{de}	11.64 ^d	16.06 ^b
2	2.0	3.0	1.0	11.14 ^d	6.26 ^f	8.56 ^c
3	2.0	2.0	2.0	8.06 ^f	0.29 ^g	19.52 ^a
4	3.0	3.0	3.0	4.96 ^g	19.04 ^b	8.03 ^c
5	3.0	2.0	1.0	13.62 ^c	21.3 ^a	9.05 ^c
6	1.0	3.0	2.0	16.18 ^b	5.94 ^f	7.31 ^c
7	1.0	2.0	3.0	12.53 ^{cd}	13.8 ^c	8.66 ^c
8	1.0	1.0	1.0	8.88 ^{ef}	22.27 ^a	8.85 ^c
9	2.0	1.0	3.0	19.14 ^a	8.81 ^c	4.21 ^d

表 8 远志根愈伤组织黄酮积累量方差分析

Table 8 Results of variance analysis of flavonoid accumulation in root callus of *Polygala tenuifolia*

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P
2,4-D	52.437	2	26.219	1.364	>0.05
NAA	20.695	2	10.348	0.538	>0.05
6-BA	4.554	2	2.277	0.118	>0.05
误差	384.557	20	19.228		

表 9 远志茎愈伤组织黄酮积累量方差分析

Table 9 Results of variance analysis of flavonoid accumulation in stems callus of *Polygala tenuifolia*

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P
2,4-D	716.883	2	358.441	109.842	<0.01
NAA	67.581	2	33.79	10.355	<0.01
6-BA	551.281	2	275.64	84.468	<0.01
误差	65.265	20	3.263		

表 10 远志叶愈伤组织黄酮积累量方差分析

Table 10 Results of variance analysis of flavonoid accumulation in leaves callus of *Polygala tenuifolia*

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P
2,4-D	41.915	2	20.958	2.642	>0.05
NAA	90.236	2	45.118	5.689	<0.05
6-BA	261.473	2	130.736	16.484	<0.01
误差	158.622	20	7.931		

4 讨论

由于远志种子表面有细小的绒毛,容易存菌,并

使得消毒剂难以和种子表层充分接触,从而影响消毒效果。因此在消毒之前需要人工轻轻揉搓掉其种子表层的绒毛,以增强消毒剂的消毒效果。本实验采用升汞对远志种子进行消毒,虽无污染,但其发芽率较低,尤其是采用 1.0% 升汞作为消毒剂时,其发芽率为 0。这可能是因为升汞毒性较强,浸泡时远志种子的种皮松软,升汞渗入远志种子内部所致。通过对远志种子污染率和发芽率进行差异分析得出,当采用 10% H_2O_2 作为消毒剂时,其发芽率相对最高,污染率相对较低,故将 10% H_2O_2 作为远志种子消毒处理的最佳消毒剂。

本实验以远志的无菌苗作为外植体来源诱导愈伤组织,不存在污染的情况。激素作为植物的生长调节剂,对愈伤组织的诱导存在着其特有的调控作用。胡侃^[20]以汾远一号远志的幼叶、茎和根为外植体,以 $\text{MS} + 2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} 2,4\text{-D} + 0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 激动素(KT)为培养基,探讨了外植体种类对愈伤组织的影响,得出汾远一号远志幼根的愈伤诱导率最高,其次是茎,而叶片的诱导率相对较低。曲伟红等^[21]研究了不同浓度配比的 6-BA 和 NAA 对细叶远志子叶愈伤诱导的影响,得出细叶远志子叶愈伤组织的适宜培养基为 $\text{MS} + 1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} 6\text{-BA} + 0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA。本实验通过 2,4-D, NAA, 6-BA 这 3 种激素的不同浓度配比,对远志根、茎、叶 3 种不同部位的外植体进行愈伤组织诱导,虽然不同激素浓度配比对远志根、茎、叶不同部位均能诱导出愈伤组织,但其愈伤组织诱导率存在着明显差异。通过对远志不同部位愈伤组织诱导率的直观分析得,远志根愈伤诱导的最佳激素组合为 $\text{MS} + 1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} 2,4\text{-D} + 1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA + $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} 6\text{-BA}$;远志茎愈伤诱导的最佳激素组合为 $\text{MS} + 1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} 2,4\text{-D} + 3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA + $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} 6\text{-BA}$;远志叶愈伤诱导的最佳激素组合为 $\text{MS} + 3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} 2,4\text{-D} + 1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA + $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} 6\text{-BA}$ 。对远志根、茎、叶诱导出的愈伤组织进行综合比较发现,以远志叶诱导出的愈伤组织质地、长势最好,其次为茎和叶。

在愈伤组织的培养过程中,往往通过在培养基中添加不同浓度配比的激素,来促进愈伤组织次生代谢产物的产量。如胡选萍等^[22]在对银杏愈伤组织次生代谢产物黄酮的研究中发现, $3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} 2,4\text{-D} + 1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA + $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} 6\text{-BA} + 0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KT 组合最有利于黄酮的积累。溥丽华等^[23]在对国槐种胚愈伤组织的研究中发现,6-BA 对国槐种胚愈伤组织中异黄酮含量有明显的促进作用。

用,并且其异黄酮的含量随着 2,4-D 浓度的增加呈先增长后下降的趋势,而 NAA 对其异黄酮含量的促进作用不明显。本实验通过正交设计与分析,得出 2,4-D, NAA, 6-BA 这 3 种激素对远志根、茎、叶愈伤组织中黄酮积累量有显著影响,并以 MS + 2.0 mg·L⁻¹ 2,4-D + 1.0 mg·L⁻¹ NAA + 1.5 mg·L⁻¹ 6-BA 为根愈伤组织中最佳黄酮积累组合;以 MS + 3.0 mg·L⁻¹ 2,4-D + 1.0 mg·L⁻¹ NAA + 0.5 mg·L⁻¹ 6-BA 为茎愈伤组织中最佳黄酮积累组合;以 MS + 3.0 mg·L⁻¹ 2,4-D + 2.0 mg·L⁻¹ NAA + 1.0 mg·L⁻¹ 6-BA 为叶愈伤组织中最佳黄酮积累组合。

根据不同激素浓度对远志不同部位愈伤组织诱导和黄酮积累量的影响发现,最佳愈伤组织诱导的激素浓度组合和最佳愈伤组织中黄酮积累量的激素浓度组合不相一致。因此,实验随后采用 MS + 1.0 mg·L⁻¹ 2,4-D + 1.0 mg·L⁻¹ NAA + 1.0 mg·L⁻¹ 6-BA, MS + 1.0 mg·L⁻¹ 2,4-D + 3.0 mg·L⁻¹ NAA + 1.5 mg·L⁻¹ 6-BA, MS + 3.0 mg·L⁻¹ 2,4-D + 1.0 mg·L⁻¹ NAA + 1.5 mg·L⁻¹ 6-BA 激素组合分别对远志根、茎、叶进行愈伤组织诱导后,转入到 MS + 2.0 mg·L⁻¹ 2,4-D + 1.0 mg·L⁻¹ NAA + 1.5 mg·L⁻¹ 6-BA, MS + 3.0 mg·L⁻¹ 2,4-D + 1.0 mg·L⁻¹ NAA + 0.5 mg·L⁻¹ 6-BA, MS + 3.0 mg·L⁻¹ 2,4-D + 2.0 mg·L⁻¹ NAA + 1.0 mg·L⁻¹ 6-BA 激素组合中进行继代培养,在该条件下远志根、茎、叶的愈伤诱导率均为 100%,愈伤组织中黄酮含量均较高,分别为 21.31, 24.56, 23.61 mg·g⁻¹。远志茎、叶愈伤组织中黄酮含量差异不明显,但以远志叶诱导出的愈伤组织生长状况较好,因此以远志叶为愈伤组织诱导的外植体进行愈伤组织诱导及黄酮积累效果最佳。

实验通过对远志诱导愈伤组织的外植体部位和激素浓度进行筛选,并分析不同浓度激素配比对比远志不同部位愈伤组织中黄酮量积累的影响,优化其培养条件,为后期远志组织培养技术和工业化生产提供一定数据参考。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015.
[2] 刘丽. 中药远志的研究进展概论[J]. 中医临床研究, 2017,9(34):146-148.
[3] 林敬开,闫小平,官仕杰,等. 远志不同炮制品皂苷类成分含量的比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(11):89-91.
[4] 杨改红,程昊,黄群,等. HPLC-MS/MS 快速测定远志

中远志吡酮Ⅲ和 3,6'-二芥子酰基蔗糖的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(24):39-42.
[5] 马菁菁,刘斌,罗跃娥. 远志化学成分和药理活性的研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报,2009,11(12):161-163.
[6] 王丹丹,白璐,许晓双,等. 从农艺性状及化学成分测定分析远志药材商品品规和良种选育的合理性[J]. 中国中药杂志,2016,41(20):3733-3740.
[7] 易东阳,闫磊,张慧,等. 远志的化学成分及治疗阿尔茨海默病的药理作用研究进展[J]. 中国药房,2014,25(11):1049-1051.
[8] 王晓梅,曹稳根. 黄酮类化合物药理作用的研究进展[J]. 宿州学院学报,2007(1):105-107,41.
[9] 曹纬国,刘志勤,邵云,等. 黄酮类化合物药理作用的研究进展[J]. 西北植物学报,2003(12):2241-2247.
[10] 刘蕊. 黄酮类化合物的药理作用研究进展[J]. 黑龙江医药,2010,23(2):234-236.
[11] SHI T X, LI Y G, JIANG Y, et al. Isolation of flavonoids from the aerial parts of *Polygala tenuifolia* Willd. and their antioxidant activities[J]. J Chin Pharmaceut Sci, 2013,22(1):36.
[12] 胡侃. 晋产远志种子萌发、组织培养及根显微结构研究[D]. 太原:山西大学,2008.
[13] 田伟,周巧梅,谢晓亮,等. 远志种子萌发特性的研究[J]. 时珍国医国药,2008,19(7):1709-1710.
[14] 路平. 浅议植物的组织培养[J]. 农技服务,2017,34(5):30.
[15] 彭亮,杨冰月,王媛媛,等. 远志种苗的质量分级标准[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(17):54-59.
[16] 王媛媛,彭亮,肖建玮,等. 远志种子质量分级标准考察[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(17):33-41.
[17] 叶敏,孔维兵,王小英. 追风伞总黄酮提取工艺优选及其体外抗氧化作用考察[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(1):44-46.
[18] 张锦阁,闫玉莹,黄莎,等. 粗毛淫羊藿幼叶愈伤组织诱导及其总黄酮含量[J]. 贵州农业科学,2015,43(5):79-82,87.
[19] 任晓蕾,曹贵阳,初东君,等. 核桃楸不同药用部位总黄酮含量测定及变化规律[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(24):104-106.
[20] 胡侃. 晋产远志种子萌发、组织培养及根显微结构研究[D]. 太原:山西大学,2008.
[21] 曲伟红,赵建国,刘可越. 细叶远志愈伤组织的诱导[J]. 安徽农业科学,2011,39(26):15975-15976.
[22] 胡选萍,张晓娟,任鹏斌,等. 不同激素对银杏愈伤组织黄酮积累的影响[J]. 中成药,2015,37(12):2787-2790.
[23] 溥丽华,刘忠华,魏振园,等. 国槐种胚愈伤组织培养与异黄酮量的分析[J]. 中草药,2013,44(14):1984-1989.

[责任编辑 顾雪竹]