

大花金挖耳无菌外植体的获得及愈伤组织诱导的初步研究^{*}

李玉平^{a, b}, 王永宏^b, 张强^b, 冯俊涛^b, 张兴^b

(西北农林科技大学 a 生命科学学院; b 无公害农药研究服务中心, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 以大花金挖耳(*Carpesium macrocephalum* Franch. et Sav) 种子为材料, 进行了种子消毒和愈伤组织诱导及继代的初步研究。结果表明, 对大花金挖耳种子进行消毒的最佳条件为, 以体积分数70%的乙醇消毒5 min后, 再用50%的NaClO₃处理30 min。在大花金挖耳无菌苗的根形成愈伤组织的正交试验中, 基本培养基对愈伤组织诱导率的影响最大, NAA 次之, 6-BA 影响最小, 对愈伤组织诱导的较优组合是B₅+ NAA 3.0 mg/L + 6-BA 0.2 mg/L, 诱导率为100%; 在优化诱导愈伤组织的激素浓度配比试验中, B₅+ NAA 2.0~3.0 mg/L + 6-BA 0.2~0.4 mg/L 对大花金挖耳愈伤组织的诱导率为100%, 且产生的愈伤组织多为淡黄色、质地疏松、生长势极好、褐化时间长, 适合于大花金挖耳愈伤组织的诱导。在培养基中分别添加500 mg/L VC 和10 000 mg/L PVP 能抑制大花金挖耳愈伤组织的褐变, 且有利于愈伤组织的继代。

[关键词] 菊科; 大花金挖耳; 无菌外植体; 消毒剂; 愈伤组织诱导

[中图分类号] Q 943.1; S682.1⁺ 9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9387(2006)10-0171-07

大花金挖耳(*Carpesium macrocephalum* Franch. et Sav) 是菊科天明精属植物, 主要分布于我国东北、华北及河南、陕西(南部)、甘肃、四川等地, 常见于海拔1 000~2 000 m 的山坡林缘、山谷等灌丛中, 花期7~8月, 果期9~10月。其花和果实可用来提取芳香油, 民间用于治疗吐血^[1]。大花金挖耳含有黄酮、天明精内酯酮等倍半萜内酯及其苷类等多种活性成分^[2-6], 有较高的抗人体肝癌细胞活性和杀菌活性^[7-8]。由于大花金挖耳生长周期长, 生长受到地域和环境因素的限制, 所以从大花金挖耳花等部位化学提取活性成分具有较大的局限性。因此, 对大花金挖耳进行细胞培养, 让其产生有用的次级代谢产物, 以解决其资源保护和开发利用的矛盾很有必要。目前, 国内外关于大花金挖耳的研究主要集中在其化学成分及其医药和农药活性^[2-9]方面, 对其组织、细胞培养等方面的技术研究尚未见报道。本试验以大花金挖耳种子为材料, 探讨获得无菌外植体的条件, 设计正交试验研究大花金挖耳愈伤组织诱导的培养基、激素条件, 并在筛选的基础上进行了NAA 和6-BA 两种激素配比对诱导愈伤组织的优

化试验, 以期为大花金挖耳高产细胞系的筛选、大规模细胞培养生产有用物质以及转基因研究提供良好的材料。

1 材料与方法

1.1 供试材料

大花金挖耳种子, 采自陕西秦岭蒿坪寺。

1.2 方法

1.2.1 大花金挖耳种子消毒试验 首先挑选饱满大花金挖耳种子包于医用纱布中, 用自来水冲洗过夜, 接着分别采用3种方法进行消毒处理: 体积分数70%乙醇消毒5, 10, 30 min; 体积分数70%乙醇消毒5 min后, 再分别用体积分数为6.25%, 10.00%, 12.50%, 20.00%, 25.00%, 50.00%, 100.00%的NaClO₃消毒5, 10, 30 min; 体积分数70%乙醇消毒5 min后, 再分别用质量分数为0.10%和0.50%的HgCl₂消毒5, 10, 30 min。消毒结束后分别用无菌水漂洗5次, 按每瓶4粒接种于盛有无激素的MS固体培养基上, 每处理接种10瓶, 置温度(25±2)℃、光照12 h/d、光照强度1 500~2 000

^{*} [收稿日期] 2006-04-11

[基金项目] 国家科技部“十五”攻关项目“无公害农药关键技术与产品开发”(2002BA516A04); 西北农林科技大学校内青年基金项目“药用植物鹅绒藤、老瓜头、地梢瓜等鹅绒藤植物杀菌活性研究”(232274-080807)

[作者简介] 李玉平(1970-), 男, 宁夏中宁人, 讲师, 在职博士, 主要从事植物学与药用植物资源学研究。

[通讯作者] 张兴(1952-), 男, 陕西周至人, 教授, 博士生导师, 主要从事农药学研究。

lx 的光照培养架上, 7 d 后进行未污染发芽种子率统计分析, 并以 7 d 后所获无菌苗的根(2 cm)为外植体进行愈伤组织诱导试验。

1.2.2 大花金挖耳愈伤组织诱导正交试验 设计 $L_9(3^4)$ 正交试验^[10](表1), 将 1.2.1 所获无菌苗的根切段(长 0.5~1 cm)接种到不同处理的诱导培养基

上, 进行诱导愈伤组织最佳培养基、生长素萘乙酸(NAA)和细胞分裂素 6-苄基腺嘌呤(6-BA)等条件的初步筛选试验。表1中培养基的蔗糖浓度均为 20 g/L、pH 为 5.8, 光照时间为 12 h/d, 光强为 2 000~3 000 lx。每处理接种 10 瓶, 每瓶 4 块外植体, 试验中所用的三角瓶均为 100 mL, 培养基量为 50 mL。

表1 $L_9(3^4)$ 正交试验因素水平编码表

Table 1 Treatment level code of $L_9(3^4)$ orthogonal experiment

水平 Level	因子 Factors			
	培养基 Culture medium A	NAA/ (mg·L ⁻¹) B	6-BA/ (mg·L ⁻¹) C	空闲因子 Vacancy D
1	MS	0.3	0.2	
2	B ₅	1.0	0.6	
3	NT	3.0	1.6	

1.2.3 诱导大花金挖耳愈伤组织激素配比的优化试验 通过 1.2.2 正交试验, 在确定基本培养基的基础上, 以愈伤组织诱导率、颜色、质地和褐化时间为评判指标, 设计 NAA 的浓度为 0, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 和 5.0 mg/L, 6-BA 的浓度为 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 mg/L, 研究两种不同浓度激素组合对大花金挖耳愈伤组织诱导的影响, 培养条件同 1.2.2。

1.2.4 抗氧化剂对大花金挖耳愈伤组织继代培养的影响 将 1.2.2 试验所获得的愈伤组织在 B₅+NAA 2.0 mg/L+6-BA 0.2 mg/L 培养基上继代培养 3 代后, 以 B₅+NAA 2.0 mg/L+6-BA 0.2 mg/L 为基本培养基, 向其分别添加抗坏血酸(Vc)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、活性炭等抗氧化剂, 以不添加任何抗氧化剂作为对照。每处理接种 10 瓶, 培养条件同 1.2.2, 培养 45 d 后统计愈伤组织褐变等级, 比较

不同抗氧化剂对大花金挖耳愈伤组织继代培养中褐变的抑制效果。

1.3 观测项目

外植体接种 6~20 d 后开始产生愈伤组织, 30 d 后对根诱导的愈伤组织进行诱导率和形态指标的统计, 其中诱导率=(产生愈伤组织的外植体块数/总接种块数)×100%。观察愈伤组织的颜色、质地和生长势, 将愈伤组织褐化的程度分为 5 级, 其中 0 级: 外观鲜艳, 黄色; 1 级: 暗黄色, 轻度褐变; 2 级: 黄褐色, 褐变; 3 级: 褐色, 严重褐变; 4 级: 黑色。

2 结果与分析

2.1 大花金挖耳种子的消毒

大花金挖耳种子经体积分数 70% 酒精及 NaClO₃、HgCl₂ 处理后的萌发率和污染率测定结果如表 2 所示。

表2 消毒处理后大花金挖耳种子的萌发率和污染率分析(7 d)

Table 2 Germ ination and contamination rate of seed after sterilized with CH₃CH₂OH, NaClO₃, HgCl₂ %

消毒剂 Disinfectant	消毒时间/min Time					
	5		10		30	
	萌发率 Germ ination rate	污染率 Contamination rate	萌发率 Germ ination rate	污染率 Contamination rate	萌发率 Germ ination rate	污染率 Contamination rate
70% CH ₃ CH ₂ OH	0	100	0	100	10	100
70% CH ₃ CH ₂ OH (5 min)+ 6.25% NaClO ₃	28.30	12.17	45.24	0	57.35	0
70% CH ₃ CH ₂ OH (5 min)+ 10% NaClO ₃	29.63	7.54	36.11	0	45.33	0
70% CH ₃ CH ₂ OH (5 min)+ 12.5% NaClO ₃	48.19	4.81	46.67	0	57.45	0
70% CH ₃ CH ₂ OH (5 min)+ 20% NaClO ₃	63.46	1.08	72.22	0	78.95	0
70% CH ₃ CH ₂ OH (5 min)+ 25% NaClO ₃	61.96	0	70.19	0	83.05	0
70% CH ₃ CH ₂ OH (5 min)+ 50% NaClO ₃	59.46	0	96.43	0	98.80	0
70% CH ₃ CH ₂ OH (5 min)+ 100% NaClO ₃	38.30	0	61.67	0	46.77	0
70% CH ₃ CH ₂ OH (5 min)+ 0.1% HgCl ₂	0	0	0	0	0	0
70% CH ₃ CH ₂ OH (5 min)+ 0.5% HgCl ₂	0	0	0	0	0	0

从表 2 可以看出: 在对大花金挖耳种子进行消毒时, 仅用体积分数 70% 酒精处理 5~ 30 m in, 污染率仍达 100%; 在体积分数 70% 酒精前处理 5 m in 后, 再用体积分数 6 25%~ 100% 的 NaClO₃ 消毒, 当 NaClO₃ 体积分数为 6 25%~ 20% 时, 消毒 5 m in 会引起污染, 随消毒时间的延长, 污染率降低为 0%, 灭菌效果较好; 而用体积分数 25%~ 100% 的 NaClO₃ 处理 5~ 30 m in, 污染率均为 0%, 灭菌效果很好。在相同消毒时间内, 随 NaClO₃ 体积分数的增加, 灭菌效果越好, 但 NaClO₃ 体积分数过高(100%) 会抑制种子的萌发, 其中用体积分数 50% NaClO₃ 消毒 30 m in 的灭菌效果最好, 且大花金挖耳种子的萌发率达 98 80%, 污染率为 0%; 在用体积分数 70% 酒精前处理 5 m in, 再用质量分数 0 1% 和 0 5% HgCl₂ 处理后, 大花金挖耳种子的萌发率和污染率均为 0%。总之, 种子消毒的基本要求是既要杀死种子表面的全部微生物, 使污染率降到最低, 又要不伤害种子, 使种子具有较高的萌发率。由此可知, 体积

分数 70% 酒精消毒 5 m in 后, 再用体积分数 50% NaClO₃ 消毒 30 m in 是大花金挖耳种子消毒的最佳条件。

2 2 大花金挖耳愈伤组织的诱导

由表 3 可见, 以 M S 和 B₅ 为基本培养基的处理 I -1~ I -6 的诱导率均高于 50%, 其中 I -6 处理的诱导率最高, 为 100%。将无菌苗的根段接种到培养基 B₅+ NAA 3 0 mg/L + 6-BA 0 2 mg/L 上, 培养 6 d 后观察发现, 在根段的切口处和根尖处开始形成愈伤组织, 该愈伤组织淡黄色, 质地疏松, 生长势极好。以 NT 为基本培养基的处理 I -7~ I -9 的诱导率均低于 50%, 愈伤组织黄色, 质地致密, 生长势一般。由表 3 还可知, A 因素(基本培养基)对愈伤组织诱导率的影响最大, B 因素(NAA) 次之, C 因素(6-BA) 的影响最小; 根据平均值大小可知最优组合为 A₂B₃C₁, 即 B₅+ NAA 3 0 mg/L + 6-BA 0 2 mg/L 最适合于大花金挖耳愈伤组织的诱导。

表 3 培养基组成对愈伤组织诱导的影响

Table 3 Effect of culture media composition on callus induction

处理 Treatment	培养基 Medium A	NAA/ (mg · L ⁻¹) B	6-BA/ (mg · L ⁻¹) C	空闲因子 Vacancy D	诱导率/% Formation frequency of callus	愈伤组织 Callus		
						颜色 Colour	质地 Quality	生长势 Growth stat
I -1	1 (M S)	1(0 3)	C ₁ (0 2)	1	62 70	黄色 Yellow	致密 Tight	++
I -2	1 (M S)	2(1 0)	C ₂ (0 6)	2	65 35	黄色 Yellow	致密 Tight	++
I -3	1 (M S)	3(3 0)	C ₃ (1 6)	3	83 8	淡黄色 Prim rose yellow	疏松 Loose	+++
I -4	2 (B ₅)	1(0 3)	C ₂ (0 6)	3	77 8	淡黄色 Prim rose yellow	疏松 Loose	+++
I -5	2 (B ₅)	2(1 0)	C ₃ (1 6)	1	75 43	淡黄色 Prim rose yellow	疏松 Loose	+++
I -6	2 (B ₅)	3(3 0)	C ₁ (0 2)	2	100	淡黄色 Prim rose yellow	疏松 Loose	++++
I -7	3 (NT)	1(0 3)	C ₃ (1 6)	2	15 45	黄色 Yellow	致密 Tight	+
I -8	3 (NT)	2(1 0)	C ₁ (0 2)	3	30 33	黄色 Yellow	致密 Tight	+
I -9	3 (NT)	3(3 0)	C ₂ (0 6)	1	45 05	黄色 Yellow	致密 Tight	+
K ₁		211 85	155 95	191 29	183 18			
K ₂		251 49	171 11	188 2	179 06			
K ₃		90 83	227 11	174 68	191 93			
k ₁		70 616 67	51 983 33	63 763 33	61 06			
k ₂		83 83	57 036 67	62 733 33	59 686 67			
k ₃		30 276 67	75 703 33	58 226 67	63 976 67			
R		53 553 3	23 72	5 536 7	4 29			

注: + + + + , + + + , + + , + , - 分别表示愈伤组织生长势极好、好、较好、一般及受到抑制。下表同。K₁, K₂, K₃ 表示水平; k₁, k₂, k₃ 表示水平均值。

Note: + + + + , + + + , + + , + , - indicate the excellent, very good, good, normal and restrain growth status of callus, respectively. K₁, K₂, K₃ refer to sum of level; k₁, k₂, k₃ refer to average

2 3 诱导愈伤组织激素配比的优化

由表 4 可以看出, 在附加不同激素配比的 B₅ 培养基中, 大多数愈伤组织的启动期为 6~ 7 d, 褐化时间一般为 26~ 45 d; 在不加激素的 B₅ 培养基中, 无菌苗的根不能诱导出愈伤组织; 在只添加生长素 NAA

的 II -2~ II -8 处理中, 愈伤组织的诱导率随 NAA 浓度的增加而逐步增大, 生长势逐步增强, 在 NAA 浓度为 1 0~ 2 0 mg/L 时达到最高, 过高的 NAA 浓度(4 0~ 5 0 mg/L) 又会抑制愈伤组织的生长。

表4 B₅培养基中不同NAA, 6-BA 激素对比对愈伤组织诱导的影响Table 4 Effect of multiplication NAA and 6-BA interaction in B₅ medium on callus induction

处理 Treatment	激素浓度/(mg · L ⁻¹) Hormone concentration		启动期/d Days of callus beginning	诱导率/% Percentage of callus induction	愈伤组织 Callus			愈伤组织 褐化时间/d Browning time
	NAA	6-BA			颜色 Colour	质地 Quality	生长势 Grow th status of callus	
II-1	0	0	0	0.00			-	0
II-2	0.25	0	7	81.42	淡黄色 Prim rose yellow	疏松 Loose	+++	35
II-3	0.5	0	7	89.14	淡黄色 Prim rose yellow	疏松 Loose	+++	36
II-4	1.0	0	6	100.00	淡黄色 Prim rose yellow	疏松 Loose	++++	40
II-5	2.0	0	6	100.00	淡黄色 Prim rose yellow	疏松 Loose	++++	35
II-6	3.0	0	8	81.49	淡黄色 Prim rose yellow	疏松 Loose	+++	36
II-7	4.0	0	8	81.49	黄色 Yellow	致密 Tight	+++	36
II-8	5.0	0	8	60.49	黄色 Yellow	致密 Tight	++	30
II-9	0	0.1	18	68.14	黄色 Yellow	致密 Tight	+	33
II-10	0	0.2	20	69.08	黄色 Yellow	致密 Tight	+	32
II-11	0	0.4	0	0.00			-	0
II-12	0	0.8	0	0.00			-	0
II-13	0	1.60	0	0.00			-	0
II-14	0.25	0.1	7	40.00	黄色 Yellow	致密 Tight	+	37
II-15	0.25	0.2	7	41.11	黄色 Yellow	致密 Tight	+	37
II-16	0.25	0.4	7	77.42	黄色 Yellow	致密 Tight	+++	37
II-17	0.25	0.8	7	76.22	黄色 Yellow	致密 Tight	+++	35
II-18	0.25	1.6	7	76.92	黄色 Yellow	致密 Tight	+++	30
II-19	0.5	0.1	6	80.00	黄色 Yellow	致密 Tight	++	37
II-20	0.5	0.2	6	100.00	黄色 Yellow	致密 Tight	+++	37
II-21	0.5	0.4	6	100.00	黄色 Yellow	致密 Tight	+++	37
II-22	0.5	0.8	6	86.22	黄色 Yellow	致密 Tight	+++	30
II-23	0.5	1.6	6	85.71	淡黄色 Prim rose yellow	疏松 Loose	+++	30
II-24	1.0	0.1	6	86.22	淡黄色 Prim rose yellow	疏松 Loose	+++	37
II-25	1.0	0.2	6	84.36	淡黄色 Prim rose yellow	疏松 Loose	+++	37
II-26	1.0	0.4	6	100.00	淡黄色 Prim rose yellow	疏松 Loose	+++	39
II-27	1.0	0.8	6	100.00	淡黄色 Prim rose yellow	疏松 Loose	+++	36
II-28	1.0	1.6	6	80.00	淡黄色 Prim rose yellow	疏松 Loose	+++	30
II-29	2.0	0.1	6	100.00	淡黄色 Prim rose yellow	疏松 Loose	+++	45
II-30	2.0	0.2	6	100.00	淡黄色 Prim rose yellow	疏松 Loose	++++	45
II-31	2.0	0.4	6	100.00	淡黄色 Prim rose yellow	疏松 Loose	++++	45
II-32	2.0	0.8	6	100.00	淡黄色 Prim rose yellow	疏松 Loose	++++	40
II-33	2.0	1.6	6	100.00	淡黄色 Prim rose yellow	疏松 Loose	+++	40
II-34	3.0	0.1	6	100.00	淡黄色 Prim rose yellow	疏松 Loose	+++	45
II-35	3.0	0.2	6	100.00	淡黄色 Prim rose yellow	疏松 Loose	++++	45
II-36	3.0	0.4	6	100.00	淡黄色 Prim rose yellow	疏松 Loose	++++	45
II-37	3.0	0.8	6	100.00	淡黄色 Prim rose yellow	疏松 Loose	+++	38
II-38	3.0	1.6	6	100.00	淡黄色 Prim rose yellow	疏松 Loose	+++	38
II-39	4.0	0.1	6	73.33	淡黄色 Prim rose yellow	疏松 Loose	+++	35
II-40	4.0	0.2	6	76.32	淡黄色 Prim rose yellow	疏松 Loose	+++	35
II-41	4.0	0.4	6	100.00	淡黄色 Prim rose yellow	疏松 Loose	++++	35
II-42	4.0	0.8	6	100.00	淡黄色 Prim rose yellow	疏松 Loose	+++	30
II-43	4.0	1.6	6	97.32	淡黄色 Prim rose yellow	疏松 Loose	+++	29
II-44	5.0	0.1	6	63.33	黄色 Yellow	致密 Tight	++	30
II-45	5.0	0.2	6	66.32	黄色 Yellow	致密 Tight	++	30
II-46	5.0	0.4	6	70.00	黄色 Yellow	致密 Tight	++	30
II-47	5.0	0.8	6	42.50	黄色 Yellow	致密 Tight	++	30
II-48	5.0	1.6	6	35.79	黄色 Yellow	致密 Tight	+	26

由表 4 可知, 只添加 6-BA 不利于愈伤组织的形成, 低浓度(0.1~0.2 mg/L)的 6-BA 可形成少量愈伤组织, 但启动期较晚; 高浓度(0.4~1.6 mg/L)的 6-BA 抑制愈伤组织的形成。从褐化时间上看, NAA

和 6-BA 结合使用较单一使用时的诱导效果好, 尤以 B₅+NAA 2.0~3.0 mg/L+6-BA 0.2~0.4 mg/L 较佳(图 1), 所获愈伤组织淡黄色、疏松且生长势极好, 褐化时间达 45 d。

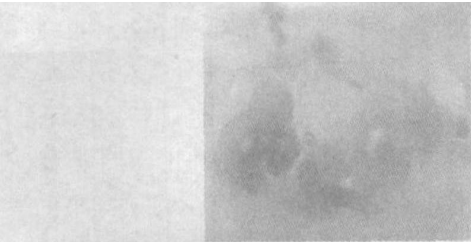


图 1 根段在 B₅+NAA 2.0 mg/L+6-BA 0.2 mg/L 培养基上诱导的大花金挖耳愈伤组(20 d)
Fig. 1 Callus of *Carpesium macrocephalum* Franch. et Sav induced from root in B₅+NAA 2.0 mg/L+6-BA 0.2 mg/L in 20 d

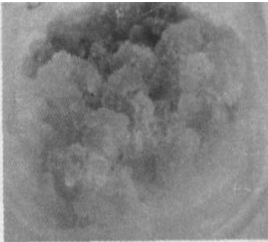


图 2 在 B₅+NAA 2.0 mg/L+6-BA 0.2 mg/L 培养基上生长 45 d 的愈伤组织
Fig. 2 Callus of *Carpesium macrocephalum* Franch. et Sav proliferation in B₅+NAA 2.0 mg/L+6-BA 0.2 mg/L in 45 d

2.4 抗氧化剂对愈伤组织继代培养的影响

据报道^[11], 培养物褐变是由于培养物含有的丰富多酚化合物在多酚氧化酶的作用下氧化所致, 在培

养基中加入抗氧化剂或活性炭, 对防止某些植物培养物的褐变具有一定的效果。本试验发现, 愈伤组织继代培养 45 d 左右会产生不同程度的褐变(图 2, 表 5)。

表 5 不同抗氧化剂对大花金挖耳愈伤组织继代培养的影响

Table 5 Effects of various oxidation-resistant active compounds on calli culture

抗氧化剂 Antioxidant	浓度/(mg·L ⁻¹) Concentration	愈伤组织 Callus		
		接种时鲜质量/(g·瓶 ⁻¹) Inoculation cell FW	净干重/(g·瓶 ⁻¹) Increment cell DW	褐变等级 Browning grade
抗坏血酸 Vc	5	0.45	0.69 e	3
	500	0.45	0.95 b	1
	1 000	0.45	0.75 d	2
聚乙烯吡咯烷酮 PVP	1 000	0.45	0.72 d	2
	5 000	0.45	0.87 c	1
	10 000	0.45	1.04 a	1
活性炭 Active carbon	2 000	0.45	0.58 f	4
	5 000	0.45	0.39 g	4
	10 000	0.45	0.18 h	4
对照 CK		0.45	0.68 e	3

注: 同列数据后标不同字母者表示差异显著($P < 0.05$)。
Note: Datas with different letters indicate significant difference level at 0.05 level

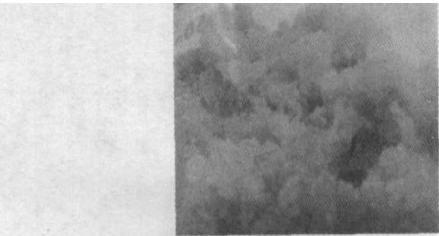


图 3 附加 10 000 g/L PVP 的 B₅+NAA 2.0 mg/L+6-BA 0.2 mg/L 培养基上生长 45 d 的愈伤组织
Fig. 3 Callous of *Carpesium macrocephalum* Franch. et Sav proliferation in B₅+NAA 2.0 mg/L+6-BA 0.2 mg/L+PVP 10 000 g/L in 45 d

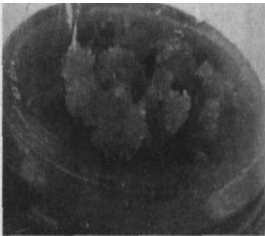


图 4 附加 5 000 mg/L 活性炭的 B₅+NAA 2.0 mg/L+6-BA 0.2 mg/L 培养基上生长 45 d 的愈伤组织
Fig. 4 Callus of *Carpesium macrocephalum* Franch. et Sav proliferation in B₅+NAA 2.0 mg/L+6-BA 0.2 mg/L+active carbon 5 000 mg/L in 45 d

由表5可见,抗坏血酸(V_c)和聚乙烯吡咯烷酮(PVP)具有良好的抑制大花金挖耳愈伤组织褐变的作用(图3)。活性炭对愈伤组织褐变的抑制效果最差,其不但未减轻褐变,反而使愈伤组织变黑死亡(图4)。由愈伤组织净干重及褐变等级可知, V_c 的最适浓度为 500 mg/L ,PVP的最适浓度为 $10\ 000\text{ mg/L}$ 左右。

3 讨论

3.1 正交设计在大花金挖耳愈伤组织诱导中的应用

在植物细胞及组织培养工作中,确定初培养的配方往往是最重要的基础工作。在试验初期阶段若依靠进行多次实验进行筛选,则不仅费时、费力,且试验结果常常并非最佳组合,因而使试验带有一定的盲目性。正交试验虽是一种普通的数学方法,但早在20世纪70年代我国已把正交设计应用于植物的离体培养^[12]。随后,张国治等^[13]、孟玉玲等^[14]用正交试验来筛选培养基,均获得了较为理想的效果。本研究采用正交设计,筛选出了诱导大花金挖耳愈伤组

织的基本培养基和激素组合,即 $B_5 + NAA\ 3\ 0\text{ mg/L} + 6\text{-BA}\ 0\ 2\text{ mg/L}$,缩小了研究范围,为诱导愈伤组织的激素配比优化试验奠定了基础。

3.2 激素对大花金挖耳愈伤组织诱导的影响

在愈伤组织诱导及其培养中,一般常采用外源生长调节剂如生长素和细胞分裂素,而在各种植物激素中,生长素萘乙酸(NAA)和细胞分裂素6-苄基腺嘌呤(6-BA)较为常用。前人^[15-17]已研究了NAA和6-BA在菊科植物组织培养中的作用,由于菊科植物普遍含有较高的内源激素^[17],故本研究结果也表明,较低浓度的NAA和6-BA配比具有较好的组织培养效果,大花金挖耳愈伤组织诱导的最佳配比为 $NAA\ 2\ 0\sim 3\ 0\text{ mg/L} + 6\text{-BA}\ 0\ 2\sim 0\ 4\text{ mg/L}$,用此配比6 d左右即可诱导出愈伤组织,且愈伤组织生长势好,呈淡黄色,质地疏松,褐化时间晚。本试验中有关其他植物生长调节剂对大花金挖耳愈伤组织的诱导效果及液体培养活性细胞系的筛选,还有待于进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] 中国科学院中国植物志编委会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1989: 295-296
- [2] 董云发, 丁云梅. 天明精萆半萜内酯化合物[J]. 植物学报, 1988, 30(1): 71
- [3] Yang C, Shi Y P, Jia Z J. Sesquiterpene lactone, glycosides, eudesmanolides, and other constituents from *Carpesium macrocephalum* [J]. Plant Medica, 2002, 68(7): 626-630
- [4] Maruyama M, Omura S. Carpesiolin from *Carpesium abrotanoides* [J]. Phytochemistry, 1977, 16(4): 782-783
- [5] Maruyama M, Karube A, Sato K. Sesquiterpene lactone from *Carpesium abrotanoides* [J]. Phytochemistry, 1983, 22(12): 2773-2774
- [6] Kim M R, Kim C S, Hwang K H, et al. Isolation and structures of guaianolides from *Carpesium macrocephalum* [J]. Journal of Natural Products, 2002, 65(4): 583-584
- [7] 李玉平, 龚宁, 江志利, 等. 大花金挖耳杀菌活性的进一步研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2004, 32(2): 35-38
- [8] 杨小虹, 周小平. 大花金挖耳提取物的血小板凝聚作用[J]. 人参研究, 2000, 12(1): 20-21
- [9] 李玉平, 龚宁, 慕小倩, 等. 菊科植物资源及其开发利用研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2003, 31(增刊): 150-155
- [10] 何少划, 文竹青, 姜涛. 试验设计与数据处理[M]. 长沙: 国防科技大学出版社, 2002: 62-101
- [11] 颜昌敬. 植物组织培养手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1990
- [12] 广东省植物研究所遗传室, 广东师范学院数学系. 用正交与不完全区组试验法提高籼稻花药培养成功率[J]. 广东师范学院学报, 1976(1): 100-112
- [13] 张国治, 严霄, 王凤仙, 等. 正交设计在组织培养研究中的应用[J]. 植物生理学通讯, 1985, 21(5): 46-48
- [14] 孟玉玲, 谷祝平. 正交设计在诱导植物体细胞胚胎发生中的应用[J]. 西北植物学报, 1995, 13(1): 10-15
- [15] 刘蓁, 高山林. 白花除虫菊组织培养研究[J]. 药物生物技术, 2005, 12(6): 370-374
- [16] 薛建平, 于森, 张爱民. 安徽药菊叶片愈伤组织诱导及植株再生技术的研究[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(3): 213-216
- [17] 鄧慧, 高山林. 杭白菊茎尖组织培养及试管苗繁殖技术研究[J]. 植物资源与环境学, 2004, 13(1): 24

Study on the obtaining of sterile explants and callus induction of *Carpesium macrocephalum* Franch. et Sav

L I Yu-ping^{a,b}, WANG Yong-hong^b, ZHANG Qiang^b, FENG Jun-tao^b, ZHANG Xing^b

(a College of Life Sciences; b Biotechnological Pesticides Research and Development Center,

Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: It was the first time to induce the callus of *Carpesium macrocephalum* Franch. et Sav by taking its root as the explants from its seeds in this paper. The results indicated that the aseptis germination rate of seed amounted to 98.80% when its seeds were sterilized with 70% alcohol for 5 min, then 50% NaClO₃ for 30 minutes. It also showed that such factors as basic media, types and concentration of hormones had a great effect on the induction rate, growth and browning time of the callus. The proper callus induction media were selected by orthogonal design, moreover, the kind and suitable level of hormone were ascertained. The basic media were the critical factors to callus induction, then NAA, the optimum medium for callus induction of *Carpesium macrocephalum* Franch. et Sav was B₅ + NAA 3.0 mg/L + 6-BA 0.2 mg/L. Moreover the best effects were obtained by using NAA of 2.0-3.0 mg/L + 6-BA 0.2-0.4 mg/L in B₅ solid mediums. The induction rate of the callus was 100%, and the callus was primrose yellow and loose. By adding 500 mg/L Vc or 10 000 mg/L PVP, the callus kept primrose yellow and vigorous.

Key words: compositae plant; *Carpesium macrocephalum* Franch. et Sav; explant; disinfectant; callus induction

(上接第170页)

Abstract ID: 1671-9387(2006)10-0164-CA

Ethanol fermentation from cellulose by expression of cellobiase gene and disruption of *GPD1* in *Saccharomyces cerevisiae*

ZHANG Lian^a, SHI Gui-yang^a, WANG Zheng-xiang^b, ZHANG Ke-chang^a

(a Laboratory of Biomass Resources, School of Biotechnology; b The Key Laboratory of Industry Biotechnology,

Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi, Jiangsu 214036, China)

Abstract: According to homologous recombination theory, β -glucosidase gene *bgII* from *Trichoderma reesei* was integrated into the key enzyme gene *GDP1* of the glycerol metabolism pathway from industrial *Saccharomyces cerevisiae* chromosome DNA. And multi-copy recombinants were screened through increasing G418 concentration in the medium. It was shown, based on the study, that cellobiose utility capability of the recombinants was increased, glycerol productivity of that was decreased, and the *bgII* gene expression was stable in the host cell. No impact on the cell character appeared after the introduction of extrinsic gene, but the cells fluctuated when growing. When compared with parent industrial *S. cerevisiae* Y to ferment with microcrystalline cellulose for raw material incorporation cellulase, ethanol strength increased by 69% and cellobiose accumulation decreased.

Key words: β -glucosidase; cellobiose; cellulose utility; ethanol fermentation