

朱砂根愈伤组织培养及悬浮细胞系建立

邓素芳^{1,2}, 杨旻^{1,3}, 赖钟雄^{1*}

(1. 福建农林大学园艺植物生物工程研究所, 福州 350002; 2. 福建省农业科学院农业生态研究所, 福州 350013; 3. 泉州福源工贸发展有限公司, 福建 泉州 362800)

摘要: 以朱砂根(*Ardisia crenata* Sims.) 无菌苗的茎段、叶片、胚轴和胚根为外植体进行愈伤组织诱导研究。结果表明: 胚根在含有 2,4-D 的培养基中的诱导率最高, 在添加 $5 \text{ mg L}^{-1} \text{ AgNO}_3$ 的 MS + 2,4-D 0.5 mg L^{-1} + KT 0.01 mg L^{-1} 培养基中继代培养的增殖系数高达 8 倍以上。培养中获得了 5 种类型的愈伤组织(I-白色湿软状、II-白色冰砂状、III-淡黄色颗粒状、IV-黄绿色块状和 V-绿色块状), 其中 II 和 III 型愈伤组织可以成功建立悬浮细胞系, 用 MS + 2,4-D 0.5 mg L^{-1} + KT 0.01 mg L^{-1} 培养基进行固-液轮回培养, 可以较好地保持悬浮细胞系。

关键词: 朱砂根; 愈伤组织; 悬浮细胞系

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2012.01.006

Callus Induction and Establishment of Suspension Cell Line of *Ardisia crenata* Sims.

DENG Su-fang^{1,2}, YANG Yang^{1,3}, LAI Zhong-xiong^{1*}

(1. Institute of Horticultural biotechnology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. Agricultural Ecology Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, China; 3. Quanzhou Fuyuan Industry & Development Co. Ltd., Quanzhou 362800, China)

Abstract: Stems, leaves, hypocotyls and radicles from aseptic seedlings of *Ardisia crenata* Sims. used as explants were cultured on different mediums to induce callus. The results showed that radicles of *A. crenata* cultured on mediums with 2,4-D had the highest callus induction rate. The callus subcultured on MS + 2,4-D 0.5 mg L^{-1} + KT 0.01 mg L^{-1} supplemented with $5 \text{ mg L}^{-1} \text{ AgNO}_3$ had more than 8 times proliferation coefficient. Five types of callus, such as white, wet and soft callus (I), white gibraltar-like callus (II), yellow granular callus (III), yellow green nubby callus (IV), and green nubby callus (V) were obtained. Among which callus II and III could successfully establish suspension cell system, and the callus could be well maintained cultured on MS + 2,4-D 0.5 mg L^{-1} + KT 0.01 mg L^{-1} by solid-liquid transition.

Key words: *Ardisia crenata* Sims.; Callus; Suspension cell system

朱砂根(*Ardisia crenata* Sims.)又名富贵籽、黄金万两等,属紫金牛科(Myrsinaceae)紫金牛属常绿小灌木^[1]。因其富含岩白菜素而具有止咳平喘、抗炎抑菌、抗生育、抗病毒、抗肿瘤和驱虫、杀虫的作用^[2-7]。传统上是利用朱砂根干燥根作为药物或提取原料^[8-11],不仅浪费人力、物力和土地,而且自然生长的根中的有效药用成分含量低,这些都严重影

响了朱砂根的药物利用。已有研究表明朱砂根的愈伤组织也有合成岩白菜素的能力^[12]。因此,如果能建立朱砂根的高效愈伤组织培养体系,提高愈伤组织的岩白菜素合成效率,达到工厂化生产,将为岩白菜素的生产分离开辟新途径。同时,近年来朱砂根还作为观赏植物利用,其愈伤组织高效再生体系的建立,将为今后利用基因工程的方法进行观

收稿日期: 2011-03-21 接受日期: 2011-09-20

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2007BAD07B03)资助

作者简介: 邓素芳(1982 ~), 女, 硕士, 研究方向为园林植物生物技术, email: d.sufang@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, email: Laizx01@163.com

赏性状的改良和育种提供良好试验体系。然而,目前对朱砂根愈伤组织的研究较少,仅彭光天等用朱砂根幼苗不同部位作外植体,研究了不同激素组合对愈伤组织诱导的影响^[12]。因此,本试验以朱砂根无菌幼苗的茎段、叶片、胚轴和胚根为材料,进行了愈伤组织诱导、增殖和保持的研究,以期建立朱砂根愈伤组织和悬浮细胞培养体系,为朱砂根次生代谢产物岩白菜素的工厂化生产奠定理论基础和技术支持,也为朱砂根体胚的诱导、突变体筛选、遗传转化和体细胞杂交研究提供试验体系。

1 材料和方法

1.1 材料

从福建省武平县罗盛金花卉场选择性状一致的朱砂根(*Ardisia crenata* Sims.)优良单株上采集果实,经无菌处理后,接种在 MS 培养基中直接萌发成苗,取具有 2~3 节的健壮无菌实生苗为材料。所有试验培养基的蔗糖浓度为 30 g L⁻¹,琼脂为 6 g L⁻¹,pH 调至 5.8,培养基均在 121℃、1.1 kg cm⁻²下灭菌 15~20 min。遮光培养,培养温度为(25±2)℃。

1.2 愈伤组织的诱导

分别取无菌实生苗的茎段、叶片、胚轴和胚根直接接种于以下 4 种培养基中,每种培养基接 10 瓶,每瓶接 3 个外植体,接种后 30 d 观察统计愈伤组织诱导率。愈伤组织诱导培养基分别为 Y1: MS+0.5 mg L⁻¹ 2,4-D+0.01 mg L⁻¹ KT, Y2: MS+0.5 mg L⁻¹ NAA+0.01 mg L⁻¹ KT, Y3: MS+1.0 mg L⁻¹ 2,4-D+0.01 mg L⁻¹ KT, Y4: MS+1.0 mg L⁻¹ NAA+0.01 mg L⁻¹ KT。

1.3 愈伤组织的增殖与保持

取由胚根诱导出的白色冰砂状愈伤组织进行增殖培养,每次继代培养取生长势强、无褐变的愈伤组织。25 d 为一代,观察连续培养 3 代的增殖效果,确定长期继代的培养基组合。愈伤组织的增殖培养基为 Y5: MS+0.5 mg L⁻¹ 2,4-D+0.01 mg L⁻¹ KT, Y6: MS+0.5 mg L⁻¹ 2,4-D+0.01 mg L⁻¹ KT+5 mg L⁻¹ AgNO₃, Y7: MS+0.5 mg L⁻¹ 2,4-D, Y8: MS+1.0 mg L⁻¹ 2,4-D, Y9: MS+2.0 mg L⁻¹ 2,4-D, Y10: MS+0.1 mg L⁻¹ 2,4-D+100 mg L⁻¹ 肌醇, Y11: MS+0.2 mg L⁻¹ 2,4-D+100 mg L⁻¹ 肌醇。

1.4 愈伤组织悬浮细胞系的建立与保持

悬浮细胞系的建立 挑取 1 g 愈伤组织置于 MS+0.5 mg L⁻¹ 2,4-D+0.01 mg L⁻¹ KT+6% 椰子汁的液体培养基(10 mL)中,在 25℃、120 r min⁻¹下振荡培养,观察比较愈伤组织类型对悬浮细胞系建立的影响。

生长曲线的绘制 选取来源相同的悬浮细胞分成 5 瓶并编号,每瓶鲜重 0.5 g,分别加入 MS+0.5 mg L⁻¹ 2,4-D+0.01 mg L⁻¹ KT 液体培养基 10 mL 进行培养,从培养第 2 天开始依序吸取 1 mL 的培养液滤去水分称鲜重,以培养时间为横坐标,悬浮培养物的鲜重为纵坐标,绘制悬浮细胞系的生长曲线。

悬浮细胞系的保持 用液体培养基建立悬浮培养系后,继代 7~8 次后转入相同成分的固体培养基上继代培养,20~25 d 继代 1 次。需要时将愈伤组织转入液体培养基,即可重新建立悬浮细胞系,依此轮回。

1.5 数据处理

愈伤组织诱导率(%)=诱导出的愈伤组织的外植体数/接种外植体数×100%

增殖系数=接种 30 d 后愈伤组织增重/接种时愈伤组织鲜重

试验数据采用 SPSS 软件进行统计分析,以平均值±标准误差(SD)表示,以邓肯氏新复级差测验法(Duncan)进行差异显著性分析。

2 结果和分析

2.1 愈伤组织的诱导

用朱砂根无菌幼苗的茎段、叶片、胚轴和胚根均能诱导产生愈伤组织,但诱导率有明显差异(表 1),胚根诱导率最高,其次是胚轴,最差的是叶片。此外,各部位诱导出的愈伤组织质地、颜色和发生量也有所不同:胚根和胚轴诱导出的愈伤组织均为白色,前者诱导的愈伤组织干且松散,似冰砂状(图 1:1),后者诱导出的愈伤组织湿且软,似树莓状(图 1:2),而且胚根的愈伤组织发生量要比胚轴的大;用叶片诱导出的愈伤组织结构紧密,质地坚硬,呈黄绿色(图 1:3),仅在叶片边缘呈圈状发生;茎段诱导的愈伤组织主要见于切口处,质地湿软,类似于胚轴诱导产生的愈伤组织,但颜色较黄(图 1:4)。

此外,生长素 2,4-D 和 NAA 对朱砂根愈伤组织的诱导也存在显著差异:添加 2,4-D 的培养基对愈伤组织的诱导能力明显较添加 NAA 的强,前者是

后者的 5 ~ 10 倍。然而,添加 0.5 mg L⁻¹ 和 1.0 mg L⁻¹ 2,4-D 对愈伤组织的诱导率没有显著差异,但不同浓度 2,4-D 诱导的愈伤组织形态有差异,0.5 mg L⁻¹ 2,4-D 诱导的愈伤组织结构较紧密,生

长状况较好,基本无褐变产生;而 1.0 mg L⁻¹ 2,4-D 诱导的愈伤组织松软、白色透明,质量轻,细胞内含物少,基部有褐变现象。可见,低浓度的 2,4-D 有利于朱砂根愈伤组织的诱导和生长。

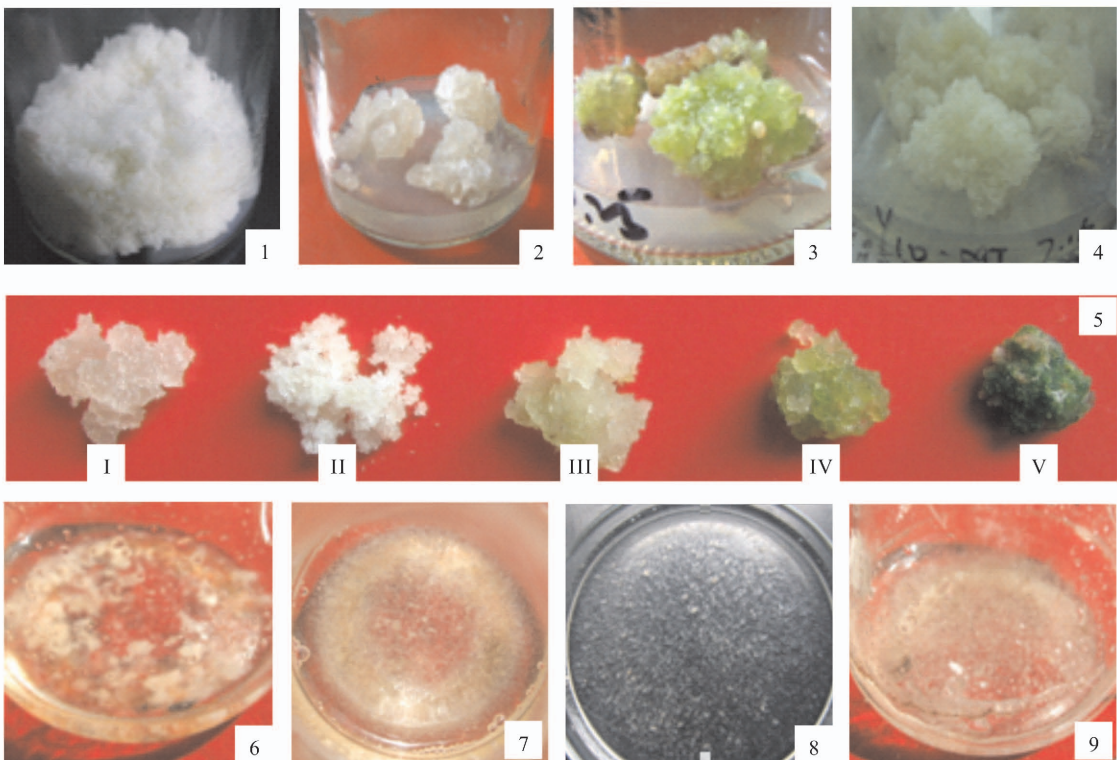


图 1 朱砂根愈伤组织诱导和悬浮细胞系的建立。1. 胚根诱导的白色冰砂状愈伤组织; 2. 胚轴诱导的白色湿软状愈伤组织; 3. 叶片诱导的黄绿色块状愈伤组织; 4. 茎段诱导的淡黄色颗粒状愈伤组织; 5. 用于悬浮培养的 5 种类型愈伤组织; 6 ~ 9. I ~ IV 类愈伤组织建立的悬浮细胞。
Fig. 1 Callus induction and establishment of suspension cell line of *Ardisia crenata*. 1. White gibraltar-like callus induced from radicle; 2. White, wet and soft callus induced from hypocotyl; 3. Kelly and nubby callus induced from leaf; 4. Yellow and granular callus induced from stem; 5. Five kinds of callus for suspensions culture; 6-9. Suspensions culture of callus I-IV, respectively.

表 1 外植体及生长素 NAA、2,4-D 对朱砂根愈伤组织诱导率(%)的影响
Table 1 Effects of explant and NAA, 2,4-D on callus induction rate (%) of *Ardisia crenata*

外植体 Explants	2,4-D (mg L ⁻¹)		NAA (mg L ⁻¹)	
	0.5	1.0	0.5	1.0
叶片 Leaf	26.7 ± 2.72aA	39.2 ± 3.19aA	1.7 ± 1.92aB	5.0 ± 1.92aB
茎段 Stem	40.8 ± 4.19bA	45.0 ± 3.33bA	2.5 ± 1.67aB	5.8 ± 1.67aB
胚轴 Hypocotyl	93.3 ± 2.72cA	95.8 ± 3.19cA	26.7 ± 3.85bB	53.3 ± 8.61bC
胚根 Radicle	100 ± 0.00dA	100 ± 0.00cA	65.8 ± 5.69cB	77.5 ± 5.69cC

不同小写和大写字母分别表示同列和同行数据的差异显著性($P < 0.05$)。
Data followed different small and capital letters indicate significant differences within column and line at 0.05 level, respectively.

2.2 愈伤组织的增殖与保持

2.2.1 培养基对愈伤组织增殖的影响

从表 2 可以看出,胚根诱导出的愈伤组织在 Y5 ~ Y9 培养基中生长旺盛,其中在添加 AgNO₃ 的

Y6 培养基中白色愈伤组织慢慢转为淡黄色,并出现颗粒状;在 Y7 ~ Y9 培养基中随着 2,4-D 浓度的升高,愈伤组织生长量也逐渐提高,但含水量也随之升高,结构变得松散。在添加肌醇的 Y10、Y11

的培养基中,愈伤组织生长缓慢,均不同程度地转变为淡黄色颗粒状;其中,Y10 中的愈伤组织全部转为淡黄色颗粒状;Y11 的转变率仅有 52.6%。

将得到的淡黄色松散型愈伤组织继续用 Y5、Y6 培养基培养,结果淡黄色松散型愈伤组织可以

达到 8 倍以上的增殖系数,虽较白色愈伤组织的增殖系数有所下降,但愈伤组织呈颗粒状。可见,低浓度的 2,4-D 与低浓度的 KT 配合、隔代添加 AgNO₃ 有利于愈伤组织的继代培养。至今这些愈伤组织继代次数已不少于 40 代,仍保持很强的增殖能力。

表 2 不同培养基对朱砂根愈伤组织增殖的影响

Table 2 Effects of different mediums on callus proliferation of *Ardisia crenata*

培养基代号 Medium No.	增殖系数 Multiplication coefficient	褐变程度 Browning	状态 Status
Y5	12.7	-	白色松散 White and loose
Y6	8.5	-	淡黄色松散与白色冰砂状相间 Straw yellow, loose alternate with white, gibraltar-like
Y7	7.2	-	白色松散 White and loose
Y8	8.7	-	白色湿软 White and wet
Y9	10.7	-	白色湿软 White and wet
Y10	2.1	+	淡黄色颗粒状 Straw yellow and granular
Y11	2.0	+	淡黄色颗粒与白色松散相间 Straw yellow, granular alternate with white, loose

- :无褐变; + :轻度褐变。
- : No browning; + : Light browning.

2.2.2 碳源对愈伤组织增殖的影响

选取生长势强、无褐变、淡黄色颗粒状松散的愈伤组织,接于 MS + 0.5 mg L⁻¹ 2,4-D + 0.01 mg L⁻¹ KT,并添加不同碳源及浓度的 C1 ~ C8 培养基中。从表 3 可以看出,不同碳源对朱砂根愈伤组织的生长影响差异较大:单独使用蔗糖,愈伤组织的增殖系数是单独使用甘露醇和山梨醇时的 4 ~ 5 倍,褐变程度也较轻,但愈伤组织呈棉絮状,无颗粒状,随着蔗糖浓度的升高,愈伤组织含水量下降,内含物

增多;使用蔗糖,配合甘露醇或山梨醇,虽然增殖系数有所下降,但愈伤组织呈颗粒状,而搭配甘露醇与山梨醇相比效果更佳,不仅增殖系数高,而且愈伤组织松散,呈颗粒状。鉴于此,本试验使用终浓度较高的蔗糖和甘露醇两种碳源搭配进行朱砂根愈伤组织的增殖和继代培养。

2.2.3 有机附加物对愈伤组织增殖的影响

许多研究表明,天然植物提取液中含有多种氨基酸、酶和内源激素等化合物,对细胞和组织的增殖

表 3 不同碳源对朱砂根愈伤组织增殖的影响

Table 3 Effects of different carbon sources on callus proliferation of *Ardisia crenata*

编号 No.	碳源 Carbon source (%)			增殖系数 Multiplication coefficient	褐变程度 Browning degree	愈伤组织状态 Status of callus
	蔗糖 Sucrose	甘露醇 Mannitol	山梨醇 Sorbitol			
C1	4	0	0	12.7	-	淡黄色松软、棉絮状 Straw yellow, soft and flocculence
C2	5	0	0	10.8	+	淡黄色松软、棉絮状 Straw yellow, soft and flocculence
C3	6	0	0	10.6	+	淡黄色松散 Straw yellow and loose
C4	7	0	0	11.3	+	黄色松散 Yellow and loose
C5	0	7	0	2.4	++	黄色紧实 Yellow and compact
C6	0	0	7	2.5	++	黄色紧实 Yellow and compact
C7	4	3	0	9.7	+	黄色松散、颗粒状 Yellow, loose and granular
C8	4	0	3	5.2	+	黄色紧实 Yellow and compact

- :无褐变; + :轻度褐变; ++ :较严重褐变。
-, +, ++ indicate no browning, light browning and severe browning, respectively.

与分化有明显促进作用,如香蕉汁能促进花生 (*Arachis hypogaea*) 上胚轴外植体愈伤组织的形成^[13],椰子汁能明显促进微甘菊 (*Mikania micrantha*)愈伤组织的生长^[14]等。因此,本文用香蕉汁、椰子汁和龙眼汁进行愈伤组织培养,选择利于愈伤组织增殖的天然提取液。

结果表明(表 4):除香蕉汁外,添加椰子汁和龙眼汁比不添加的增殖系数明显提高;且添加椰子汁

比龙眼汁的效果更好,不仅增殖系数较高,而且愈伤组织松散,呈颗粒状,同时添加 6% 椰子汁比添加 5% 的增殖系数有所提高;而添加香蕉汁不仅没有提高愈伤组织的增殖系数,而且培养的细胞颜色暗,活力下降。可见,香蕉汁不适合朱砂根愈伤组织的生长和增殖,而 6% 椰子汁较有利于朱砂根愈伤组织的增殖和继代保持。

表 4 不同有机附加物对朱砂根愈伤组织增殖的影响
Table 4 Effects of different nature additives on the proliferation of callus in *Ardisia crenata*

有机附加物 Organic appendix	增殖系数 Multiplication coefficient	愈伤组织状态 Status of callus
对照 Control	3.3	淡黄色松散 Straw yellow and loose
5% 椰子汁 Coconut milk	8.9	淡黄色松散 Straw yellow and loose
6% 椰子汁 Coconut milk	11.7	淡黄色松散 Straw yellow and loose
5% 龙眼汁 Longan juice	6.8	淡黄色紧实 Straw yellow and compact
5% 香蕉汁 Banana juice	2.8	暗黄色 Dark yellow

2.3 愈伤组织悬浮细胞系的建立与保持

在继代培养过程中,按照愈伤组织的颜色、松散度和颗粒性,可将愈伤组织分为以下 5 个类型:I-白色湿软状、II-白色冰砂状、III-淡黄色颗粒状、IV-黄绿色块状和 V-绿色块状(图 1:5)。分别挑取生长旺盛的各类型愈伤组织 1 g,用镊子轻轻夹碎后,接种于 10 mL 液体培养基中,其中 II、III 类型培养 1 周后均可建立悬浮细胞系,细胞团小(图 1:7,8);类型 IV 也可建立悬浮细胞系但所需时间较长,且细胞团大(图 1:9);I 和 V 类型愈伤组织很难建立悬浮细胞系,其中类型 I 细胞含水量大,细胞质量小,

接种后细胞漂浮在培养液表面,多为团状,很难分离(图 1:6);V 型愈伤组织结构紧实,借助接种工具也很难分散。

由图 2 可见,朱砂根悬浮细胞系的生长曲线大致呈 S 型曲线,在 1 ~ 3 d 时生长缓慢,为延滞期,该时期细胞数目基本不增加;3 ~ 5 d 为对数期,细胞数目迅速增加;5 ~ 6 d 为直线期,细胞数达到最大;之后细胞数目迅速减少。这可能是由于朱砂根的代谢产物较多,在直线期后,代谢产物严重积累,抑制了细胞生长。因此朱砂根悬浮培养的最佳继代时间是在培养的第 6 天。

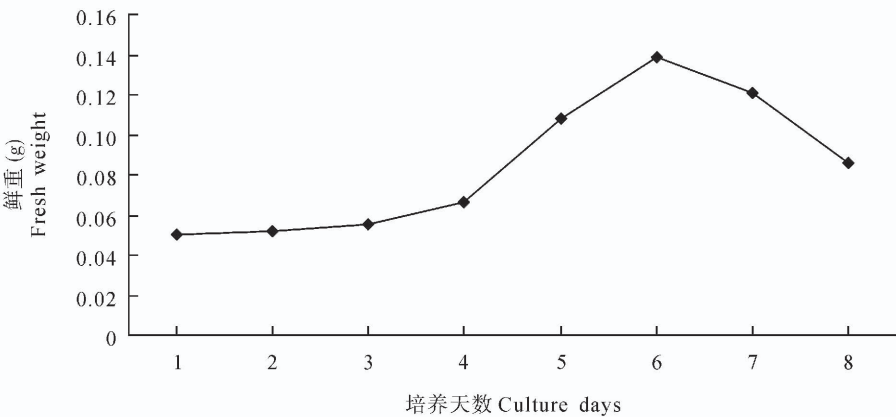


图 2 朱砂根悬浮细胞生长曲线
Fig. 2 Growth curve of *Ardisia crenata* suspension cells

悬浮细胞系的保持:即悬浮培养继代 7~8 代后转入含相同培养基成分的固体培养基上继代培养,每 25~30 d 继代 1 次,需要悬浮培养之时,再将愈伤组织转入液体培养基。结果表明:由淡黄色颗粒状(Ⅲ型)愈伤组织建立的朱砂根悬浮细胞在转入固体培养基 15~20 d 后即可形成愈伤组织并保持良好的疏松状态,生长迅速;用这种愈伤组织重新建立悬浮细胞系,只需 7~8 d。而白色冰砂状(Ⅱ型)愈伤组织建立的悬浮细胞系多次继代后转入固体培养基,很难恢复生长。

3 讨论

本试验利用朱砂根幼苗的不同部位进行愈伤组织的诱导,结果表明胚根的诱导率最高,而且诱导的愈伤组织分散性好,这虽与彭光天等^[12]的结果有差异,但都认为叶片的诱导率最低。试验中,AgNO₃ 的隔代添加有利于朱砂根愈伤组织的生长和长期培养,可能是由于 Ag⁺抑制了培养物中乙烯的合成,防止培养物的褐化,从而提高了细胞分裂的频率^[15],且隔代添加的方法能有效地避免 AgNO₃ 的毒害作用。

在朱砂根愈伤组织的继代培养过程中,获得了 5 种不同类型的愈伤组织,并建立了愈伤组织的高效增殖体系和悬浮细胞系,对朱砂根的开发利用具有重要意义。首先,建立的愈伤组织增殖体系增殖速率高,达 15 倍以上,增殖周期短,是细胞培养和遗传转化的良好体系,可用于朱砂根突变体的筛选和体细胞杂交等生物技术育种的研究;其次,以胚根为材料建立的悬浮细胞系,其中的岩白菜素含量较其他材料的高^[12],进行大规模细胞培养后可作为岩白菜素提取的原料,将解决传统的朱砂根药物利用直接使用原植株作为提取原材料造成的浪费问题,同时可以减少朱砂根大面积种植浪费的人力、物力和财力,对朱砂根药用价值的深度开发具有重要的推动作用。

参考文献

[1] Chen C(陈介). Myrsinaceae [M]// Flora Reipublicae Popularis Sinicae Tomus 58. Beijing: Science Press, 1979: 1-70. (in Chinese)

[2] Guan X T(关雄泰), Wang M T(汪茂田), Gong Y M(宫子敏), et al. Studies on diosgenin and sapogenins in *Ardisia crenata* Sims.

[J]. Chin Trad Herb Drugs (中草药), 1987, 18(8): 2-5. (in Chinese)

[3] Hang L(韩力), Ni M Y(倪幕云). Studies on the chemical constituents of *Ardisia crenata* Sims. [J]. Chin J Chin Mat Med (中国中药杂志), 1989, 14(12): 33-35, 58-59. (in Chinese)

[4] Miyamae A, Fujioka M, Koda S, et al. Structure studies of FR900359: A novel cyclic depsipeptide from *Ardisia crenata* Sims. (Myrsinaceae) [J]. J Chem Soc, Perkin Trans 1, 1989, 18(5): 873-878.

[5] Piacente S, Pizza C, De Tommasi N, et al. Constituents of *Ardisia japonica* and their *in vitro* anti-HIV activity [J]. J Nat Prod, 1996, 59(6): 565-569.

[6] Kazuo K, Zhonghua J, Saori O, et al. Minor triterpenoid saponins from *Ardisia crenata* [J]. Chem Pharm Bull, 1999, 47(3): 434-435.

[7] Deng S F(邓素芳), Huang X(黄焱), Lai Z X(赖钟雄). Progress in the medicinal and ornamental values of *Ardisia crenata* Sims. [J]. Subtrop Agri Res(亚热带农业研究), 2006, 2(3): 176-178. (in Chinese)

[8] Ma X P(麻秀萍), Jiang C H(蒋朝晖), Ding N(丁宁), et al. Determination of bergenin in *Ardisia crenata* Sims. by HPLC [J]. Chin J Ethnom Ethnopharm(中国民族民间医药杂志), 2004(6): 347-348, 369. (in Chinese)

[9] Liu N(刘姝), Li Y(李颖), Guo J X(郭济贤), et al. Studies on the taxonomy of the genus *Ardisia* (Myrsinaceae) from China and the occurrence and quantity of bergenin in the genus [J]. Acta Acad Med Shanghai(上海医科大学学报), 1993, 20(1): 49-53. (in Chinese)

[10] Qiu Y P(邱运平). Isolation and identification of bergenin in *Ardisia crenata* Sims. [J]. Plant Res Commun(植物研究通讯), 1978(3): 7-11. (in Chinese)

[11] Jia Z, Mitsunaga K, Koike K, et al. New bergenin derivatives from *Ardisia crenata* [J]. Nat Med, 1995, 49(2): 187-189.

[12] Peng G T(彭光天), Huang S Z(黄上志), Huang Z L(黄仲立), et al. Callus induction from explants of *Ardisia crenata* and the determination of bergenin content in calli [J]. J Trop Subtrop Bot(热带亚热带植物学报), 2004, 12(1): 51-56. (in Chinese)

[13] Liu B(刘宾), Jiang J Z(蒋继志), Liao X R(廖祥儒), et al. Effect of banana juice on tissue culture of peanut and activity of antioxidase [J]. J Hebei Univ (Nat Sci)(河北大学学报: 自然科学版), 2006, 26(6): 631-635. (in Chinese)

[14] Liao J S(廖劲松), Guo Y(郭勇). Induction and culture of calli from *Mikania micrantha* Kunth [J]. J Shandong Agri Univ (山东农业大学学报), 2004, 35(4): 521-525. (in Chinese)

[15] Zhang P(张鹏), Fu A G(傅爱根), Wang A G(王爱国). Role and possible mechanism of AgNO₃ in plant culture *in vitro* [J]. Plant Physiol Commun(植物生理学通讯), 1997, 33(5): 376-379. (in Chinese)