

匙羹藤组织培养条件优化研究

苏 钛^{1,2}, 黄宁珍^{1*}, 付传明¹

(1. 广西壮族自治区 广西植物研究所, 广西 桂林 541006; 2. 广西师范大学 生命科学院, 广西 桂林 541004)

摘要: 以匙羹藤无菌种子苗为外植体, 通过预备实验确定基本培养基后, 采用完全实验和正交设计相结合的方法, 研究植物生长调节剂两因素配合和多因素组合(NAA、TDZ、2-ip、IAA、6-BA 和 KT)对匙羹藤芽体诱导及继代培养的影响。结果显示, 匙羹藤组织培养最适的基本培养基为 N68; N68+NAA 0.05 mg/L+2-ip 0.4 mg/L+TDZ 0.001 mg/L 利于芽体增殖, 可用于继代培养; N68+NAA 0.05 mg/L+TDZ 0.005 mg/L 促进植株长根, 可用于生根培养。

关键词: 匙羹藤; 组织培养; 完全实验; 正交设计

中图分类号: Q943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2009)01-0087-05

Optimization *in vitro* culture conditions for *Gymnema sylvestre*

SU Tai^{1,2}, HUANG Ning-Zhen^{1*}, FU Chuan-Ming¹

(1. Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and the Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, China; 2. College of Life Sciences, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China)

Abstract: The optimum medium for tissue culture of *Gymnema sylvestre* were studied by using germfree tub-seedling as explants. The effects of plant growth regulator (NAA, TDZ, 2-ip, IAA, 6-BA and KT) on the seedlings proliferation were studied by complete experiment and orthogonal design. The results showed that the optimum basic medium for *G. sylvestre* was N68; N68+NAA 0.05 mg/L+2-ip 0.4 mg/L+TDZ 0.001 mg/L was the best for bud proliferation, and can be used in subculture; N68+NAA 0.05 mg/L+TDZ 0.005 mg/L promoted rooting, can be used as rooting medium.

Key words: *Gymnema sylvestre*; tissue culture; complete experiment; orthogonal design

匙羹藤(*Gymnema sylvestre*)别名武靴藤、金刚藤、心服黄, 为萝藦科匙羹藤属植物, 分布于印度、越南、印度尼西亚、非洲及我国的广西、云南、广东、海南、浙江、福建、台湾等地, 主要生于山坡林缘或灌木丛中(中国科学院植物研究所, 2002)。全株入药, 其性平, 味苦, 具祛风止痛、解毒消肿之功效; 主治风湿关节痛、咽喉肿痛、无名肿毒、毒蛇咬伤等(江苏新医学院, 1977)。近年来研究发现匙羹藤叶具有独特的

降血糖、降血脂、抗龋齿和抑制甜味等作用(韦宝伟等, 1996)。可见, 匙羹藤无论是作为药品还是保健品, 均有较好的开发前景。在匙羹藤组培快繁技术研究中发现, 存在继代增殖时落叶、玻璃化以及重复性差等问题。为此, 在确定基本培养基的基础上, 通过完全实验和正交实验设计相结合, 对匙羹藤离体培养体系进行系统研究, 以期筛选出合适的继代和生根的培养基配方。

收稿日期: 2007-03-19 修回日期: 2008-06-13

基金项目: 广西科技攻关项目(桂科攻 0330003-1, 0424008-1H) [Supported by Key Technologies Research and Development Program of Guangxi (0330003-1, 0424008-1H)]

作者简介: 苏钛(1982-), 男, 云南大理人, 在读硕士, 研究方向为植物组织培养和细胞培养研究。

* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: hnzhzen68@yahoo.com.cn)

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 匙羹藤无菌种子苗 选取表面无伤痕、健康、新鲜、淡黄色的成熟蒴果在流水条件下冲洗 30 min 后,在无菌台上用 70% 的酒精浸泡 0.5~1 min,再用 0.1% 的 HgCl₂ (加 2~3 滴吐温-80 作表面活性剂)消毒灭菌 5 min,然后用灭菌水冲洗 3~5 次,取出种子接种在培养基上,获得无菌种子苗。

1.1.2 试剂 植物生长调节剂 NAA(Naphthalene acetic acid)、2-ip (6-(Δ -isopenylamino) purine)、TDZ(Thidiazuron)、6-BA(6-benzylaminopurine)和 KT(Kinetin)均为分析纯,为上海 Sigma 公司生产。

1.2 方法

1.2.1 基本培养基的筛选 将匙羹藤种子苗切成带芽茎段接种于以 MS、N6、B5、White、N68 为基本培养基上,每种处理 10~15 瓶,每瓶接种 4~5 个外植体,在光照 36 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、12 h/d、温度 28 $\pm$ 3 $^{\circ}\text{C}$ 的培养室中培养(以下培养条件相同),20 d 后观察记录。

1.2.2 激素组合对继代增殖和生根的影响 (1)增殖培养基的筛选:以 N68 为基本培养基,添加 NAA (0.05,0.08,0.1mg/L)和 2-ip(0,0.1,0.4,0.8,1.2 mg/L),以确定增殖培养中合适的 NAA 和 2-ip 浓度及组合。每种处理 10~15 瓶,每瓶接种 4~5 个外植体,置于培养室中培养,30 d 后观察记录。(2)生根培养基的筛选:以 N68 为基本培养基,添加

NAA(0.02~0.1 mg/L)、TDZ(0.001~0.01 mg/L),对匙羹藤进行生根培养,30 d 后统计生根率和生根系数。生根率=生根茎段数/接种茎段 $\times$ 100%,生根系数=生根条数/生根茎段数。

1.2.3 多种激素组合对继代增殖影响 以 N68 为基本培养基,采用正交实验设计分析 NAA(0,0.02,0.05,0.1,0.2 mg/L)、TDZ(0,0.001,0.002,0.005,0.01 mg/L)、2-ip(0,0.2,0.4,0.8,1.2 mg/L)、6-BA(0,0.01,0.02,0.04,0.08 mg/L)和 KT(0,0.1,0.2,0.4,0.8 mg/L)等 5 种不同激素 5 个浓度组合对匙羹藤继代增殖的影响。根据 5 因素 5 水平的正交表 L25(5⁵)(奕军,1995),设计 25 种组合的培养基(表 4),每种组合 10~15 瓶,每瓶接种 4~5 个外植体,40 d 后记录芽体增殖及根的生长情况。

2 结果与分析

2.1 基本培养基的筛选

比较 MS、N6、B5、White、N68 等不同培养基中匙羹藤的生长效果(表 1),结果表明,在 N6、B5 和 White 培养基上,大部分材料死亡,少数存活的植株生长不正常,叶片卷曲或发黄并大量落叶,因此,这几种培养基不适合作为匙羹藤的基本培养基;在 MS 基本培养基上,虽然落叶较少,但植株长势一般,叶片卷曲,因此,MS 也不宜作匙羹藤组培的基本培养基;而在 N68 培养基上,材料生长良好,落叶少,芽较粗壮,植株长势整齐,与其它几种培养基相比,更适合作为匙羹藤组织培养的基本培养基。

表 1 基本培养基附加 NAA 对芽长势的影响
Table 1 Effect of basic culture medium with NAA on buds growing trend

培养基 Medium	NH ₄ ⁺ 相对含量 NH ₄ ⁺ on comparative content	NH ₄ ⁺ : NO ₃ ⁻	观测数 量(瓶) Number	株高(cm) Height of plant	芽体以及植株性状 Bud and plantlet traits
MS	170	1 : 2	5	5.8	粗壮,叶淡绿色且稍有卷曲,落叶 1~2 片
N68	85	1 : 2	5	7.1	粗壮,叶色绿色,落叶 1~2 片
N6	34	1 : 8	5	4.0	芽无生长且大部分死亡,叶黄且卷曲,落叶较多>4 片
B5	10	1 : 22	5	4.5	顶芽向内卷曲,叶黄色,落叶多>4 片,死亡较多
White	0		5	3.8	芽短,叶淡绿色,较小,落叶 1~3 片,多数死亡

比较 MS、N6、B5、White、N68 各个基本培养基的无机盐成分,发现几种培养基中 NH₄⁺ 浓度相差较大,从高到低依次为 MS>N68>N6>B5>White,其中 MS 中 NH₄⁺ 含量最高,分别为 N68 的 2 倍、N6 的 5 倍、B5 的 17 倍;而 White 培养基中不含 NH₄⁺;几种培养基中的 NH₄⁺ : NO₃⁻ 分别为:MS

和 N68 为 1 : 2、N6 为 1 : 8、B5 为 1 : 22。材料生长较好的 MS 和 N68 培养基中,均含有较高的 NH₄⁺ 浓度和较高的 NH₄⁺ : NO₃⁻ 比。由此推测,培养基中较高 NH₄⁺ 含量和 NH₄⁺ : NO₃⁻ 比值可能利于匙羹藤组织培养过程中植株的正常生长。

而比较 N68 和 MS 培养基上的培养材料,无论

从生长速度、外形或者落叶情况等方面,前者均优于后者。比较这两种培养基的其它无机盐成分,结果显示,N68 中 Mg、S 元素含量是 MS 的 3.3 倍、P 元素是 MS 的 4 倍,因此推断,可能较高的 Mg、S 和 P 浓度也较利于离体培养中匙羹藤植株的生长。

表 2 NAA 和 2-ip 对匙羹藤继代培养的影响
Table 2 Effect of NAA and 2-ip on Seedlings of *Gymnema sylvestre* in subculture (n=5*)

激素浓度 Hormone concentration (mg/L)		芽体增 殖倍数 Ratio of bud proli- feration	株高 of plant (cm)	植株生长表现 Plant growth performance
NAA	2-ip			
0.05	0.1	1.47	4.97	长势一般,有 1~2 片落叶,植株健壮
0.05	0.4	2.05	5.02	长势一般,有 1~2 片落叶
0.05	0.8	2.35	5.28	长势好,偶见落叶,植株健壮
0.05	1.2	2.10	4.57	玻璃化较严重,落叶多>3 片
0.08	0.1	2.15	4.23	长势一般,有 1~2 片落叶
0.08	0.4	2.32	3.99	长势差,叶卷曲,节间短
0.08	0.8	2.12	4.01	长势一般,落叶>3 片,轻微玻璃化
0.08	1.2	2.64	3.87	长势差,玻璃化较严重,叶片皱缩
0.1	0.1	1.99	4.69	长势一般,落叶较多>3 片
0.1	0.4	1.87	4.86	长势一般,节间短,叶片皱缩
0.1	0.8	2.05	5.02	长势一般,节间较长,叶片卷曲
0.1	1.2	2.55	2.98	玻璃化严重,部分植株死亡

注:表中增殖倍数、苗高的数据为 5 瓶材料的平均值。
Note: The data of bud proliferation ratio and plant height is the average of 5 bottles of plants.

2.2 NAA、TDZ、2-ip 两两组合对培养材料的影响

2.2.1 NAA、2-ip 组合对芽体增殖倍数和株高的影响 比较不同浓度的 NAA 和 2-ip 组合对继代增殖和植株生长的影响(表 2),结果发现:在所用的三个 NAA 浓度中,低浓度(0.05 mg/L)比高浓度(0.08~0.1 mg/L)更利于芽的增殖和植株长高。而对于 2-ip 而言,不论 NAA 取何种浓度,增殖倍数均随 2-ip 浓度的升高而增大,但植株的高度却随 2-ip 浓度的升高而下降,当 2-ip 浓度达到 1.2 mg/L 时,培养材料均出现严重的玻璃化现象,因此,2-ip 的浓度不能过高。

对表 2 的数据进行方差分析,比较 NAA 和 2-ip 两种激素对芽体增殖和株高的影响。结果表明,2-ip 对芽体增殖的影响显著而 NAA 不显著;对株高则相反,NAA 的影响极显著而 2-ip 不显著。综合分析两种因素对匙羹藤离体材料增殖和生长的影响,可以看出,两者浓度过高均会对培养材料产生负

面影响,如:2-ip 浓度过高,芽体的增殖倍数虽然也增大,但植株长势差、玻璃化、落叶严重等;而 NAA 浓度过高,则生长缓慢、植株矮、叶片卷曲皱缩等。因此,综合增殖倍数、株高、健壮度、落叶情况等多方面的结果,匙羹藤继代增殖培养基中,NAA 的适当浓度为 0.05 mg/L、2-ip 为 0.8 mg/L。

2.2.2 NAA、TDZ 组合对生根的影响 不同浓度和组合的 NAA 和 TDZ 对匙羹藤试管苗生根的影响见表 3。方差分析结果表明,NAA 和 TDZ 两种激素对生根率和生根系数的影响分别为极显著和显著,可见,对生根而言,因素 NAA 比因素 TDZ 更为重要。直接的观测结果表明(表 3),当 NAA 为 0.05 mg/L、TDZ 为 0.005 mg/L 时,生根率最高(为 100%),生根系数也较大(6.3),根的健壮度最好。过高或过低的 NAA 和 TDZ 的浓度均不利于匙羹藤的生根。因此,匙羹藤的生根培养基应为 N68+NAA 0.05 mg/L+TDZ 0.005 mg/L。

表 3 NAA 和 TDZ 对匙羹藤生根的影响
Table 3 Effect of NAA and TDZ on rooting of *Gymnema sylvestre* (n=5)

实验号 Experiment No.	激素浓度 Hormone concentration		生根系数 Rooting coefficient	生根率 Rooting rate (%)	根健壮度 Root health
	NAA	TDZ			
1	0.02	0.001	1.20	35	V
2	0.02	0.002	2.60	44	IV
3	0.02	0.005	3.80	35	IV
4	0.02	0.01	4.90	10	V
5	0.05	0.001	2.40	79	II
6	0.05	0.002	4.10	100	I
7	0.05	0.005	6.30	100	I
8	0.05	0.01	5.80	85	IV
9	0.08	0.001	5.30	53	II
10	0.08	0.002	4.10	65	V
11	0.08	0.005	6.90	87	I
12	0.08	0.01	6.50	63	V
13	0.1	0.001	5.60	40	II
14	0.1	0.002	6.40	46	II
15	0.1	0.005	5.00	35	III
16	0.1	0.01	7.60	15	V

注:根健壮度从好到差用 I、II、III、IV、V 级表示;生根系数、生根率的数据为 5 瓶材料的平均值。
Note: I, II, III, IV and V respectively indicate root health from strong to weak. The data of rooting coefficient and rooting rates is the average height of 5 bottles plants.

2.3 正交实验筛选最佳培养基

用正交实验研究不同浓度 NAA、TDZ、2-ip、6-BA 和 KT 组合对材料增殖、苗高和生根的影响。

表 4 NAA、TDZ、2-ip、6-BA 和 KT 对匙羹藤继代繁殖的影响
Table 4 Effect of NAA, TDZ, 2-ip, 6-BA and KT on the vitro materials of *Gymnema sylvestre* in subculture

实验号 No.	激素浓度 Hormone concentration					增殖倍数 Proliferation coefficient	株高 (cm) Height of seedling	茎形态 Shape of stem
	NAA	TDZ	2-ip	6-BA	KT			
1	0	0	0	0	0	1.32	3.86	细
2	0	0.001	0.2	0.01	0.1	1.67	4.71	中
3	0	0.002	0.4	0.02	0.2	1.79	3.37	中
4	0	0.005	0.8	0.04	0.4	1.44	3.61	中
5	0	0.01	1.2	0.08	0.8	2.89	4.74	中
6	0.02	0	0.2	0.02	0.4	1.78	5.56	中
7	0.02	0.001	0.4	0.04	0.8	2	6.42	中
8	0.02	0.002	0.8	0.08	0	1.98	4.31	中
9	0.02	0.005	1.2	0	0.1	2.69	4.89	中
10	0.02	0.01	0	0.01	0.2	1.36	5.06	中
11	0.05	0	0.4	0.08	0.1	1.78	3.97	细
12	0.05	0.001	0.8	0	0.2	2.68	5.14	健壮
13	0.05	0.002	1.2	0.01	0.4	2.89	4.09	健壮
14	0.05	0.005	0	0.02	0.8	1.33	4.33	细
15	0.05	0.01	0.2	0.04	0	1.89	3.44	细
16	0.1	0	0.8	0.01	0.8	1.23	3.83	细
17	0.1	0.001	1.2	0.02	0	2.86	4.29	健壮
18	0.1	0.002	0	0.04	0.1	1.33	3.44	中
19	0.1	0.005	0.2	0.08	0.2	1.89	4	细
20	0.1	0.01	0.4	0	0.4	1.98	3.72	细
21	0.2	0	1.2	0.04	0.2	1.56	2.3	细
22	0.2	0.001	0	0.08	0.4	1	3.06	细
23	0.2	0.002	0.2	0	0.8	1	4.16	细
24	0.2	0.005	0.4	0.01	0	1.22	0.44	细
25	0.2	0.01	0.8	0.02	0.1	0	0	死

接种 40 d 后观测统计,发现各个组合对增殖、苗高、生根的影响差异很大(表 4)。

对实验数据进行极差分析(表 5),结果表明,5 种激素对芽体增殖的影响依次为:2-ip>NAA>TDZ>6-BA>KT,对株高的影响则依次为:NAA>TDZ>6-BA>2-ip>KT。对结果进行方差分析,结果显示,对增殖有明显影响的只有 NAA、2-ip;对株

高有明显影响的只有 NAA。结合重要因子选择最适水平,不重要因子按经济原则选择最低水平,得出 NAA 的最佳浓度 0.05 mg/L,2-ip 的最佳浓度 0.4 mg/L,TDZ 为 0.001 mg/L,值得注意的是得出的各个最佳培养基并不在此实验中出现,这正体现了正交试验设计的一个优点,不会因减少试验次数而使最好的水平搭配落选。

表 5 增殖倍数及株高的极差分析结果
Table 5 The variance analysis of proliferation coefficient and height of seedlings

激素水平 Hormone level	平均增殖倍数 Proliferation coefficient					平均株高 Height of seedlings (cm)					
	NAA	TDZ	2-ip	6-BA	KT	NAA	TDZ	2-ip	6-BA	KT	NAA
1	1.962	1.534	1.268	1.934 *	1.854	3.950	3.904	4.226	4.440 *	3.420	3.950
2	1.822	2.042 *	1.646	1.674	1.494	5.248 *	4.616 *	4.376 *	3.904	3.488	5.248 *
3	2.114 *	1.798	1.754	1.552	1.856 *	4.194	3.874	3.324	3.358	4.098	4.194
4	1.858	1.714	1.466	1.644	1.818	3.858	3.454	3.446	3.648	3.926	3.858
5	0.956	1.624	2.578 *	1.908	1.690	1.992	3.394	3.870	3.892	4.310 *	1.992
极差	1.158	0.508	1.310	0.382	0.362	3.256	1.222	1.052	1.082	0.890	3.256

注:“*”表示最佳的增殖倍数或植株高度。
Note:“*”means the best proliferation coefficient or height of seedlings.

为进一步验证 5 种激素对增殖培养的影响,对最佳激素组合 NAA 0.05 mg/L+2-ip 0.4 mg/L+TDZ 0.001 mg/L 以及表 5 中表现较好的 5、9、12、13、17 五个组合进行验证实验,培养 40 d 后观测,

结果证明,NAA 0.05 mg/L+TDZ 0.001 mg/L+2-ip 0.4 mg/L 激素配比的培养基上的材料生长及增殖效果最好,增殖倍数为 2.68,植株健壮,无玻璃化苗,很少有落叶等现象。比其它两激素组合使用

的效果也较好。因此 N68 + NAA 0.05 mg/L + TDZ 0.001 mg/L + 2-IP 0.4 mg/L 可作为最佳的增殖培养基。

3 讨论

3.1 无机营养种类、浓度和配对匙羹藤组织培养的影响

不同氮形态对不同植物品种在不同试验条件下的生长影响有明显差异。这可能和不同无机氮形态对植物矿质元素的组成,植物氮代谢酶和保护酶等酶活性的影响,及其在吸收和同化上的相互影响有关(王华静等,2005)。在本试验中,材料生长较好的 MS 和 N68 培养基中,均含有相对较高的 NH_4^+ 和较高的 $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^-$ 比,而 N6、B5、White 却含有相对较低的 NH_4^+ 或不含 NH_4^+ 和较低的 $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^-$ 比。可推测,培养基中较高 NH_4^+ 含量和 $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^-$ 比值可能利于匙羹藤组织培养过程中植株的正常生长。另外,由于在单独使用硝酸盐时,培养基的 pH 值会向碱性方向漂移,加入少量铵盐则会阻止这种漂移(李俊明,2002)。N6、B5、White 也有可能在培养过程中培养基碱性增强,从而影响了匙羹藤的生长。这有待进一步的实验证明。

3.2 激素种类、浓度和配对匙羹藤组织培养的影响

激素种类和浓度的搭配是诱导植物产生芽、根、愈伤组织的关键因素。在匙羹藤组织培养中发现, NAA、2-IP 两激素配合使用时,2-IP 对增殖倍数具有显著影响,而对株高没有显著影响;而 NAA 却刚好相反。两激素的最适浓度分别为 NAA 0.05 mg/L、2-IP 0.8 mg/L。

虽然在实验中,通过不断地改变激素种类和水平配比,得到较好增殖、生根效果,但仍不能解决试管苗落叶、多次继代容易出现玻璃化等问题,因此推测,多种激素组合可能产生利于匙羹藤生长的交互作用效果。为探讨不同激素组合对植物生长的影响,获得更多的植物生长信息,采用正交实验设计分析 NAA、TDZ、2-IP、6-BA 和 KT 五因素对匙羹藤生长的影响。当五因素配合使用时,仅 NAA、2-IP 对增殖有显著影响;NAA 对株高有显著影响。最适浓度分别为 NAA 0.05 mg/L、2-IP 0.4 mg/L。陶

静等(1998)的研究也认为激素间的协同作用效果要远大于一种激素的单独使用的效果。不同的外源激素极有可能引起内源的乙烯与多胺的变化,多胺对植物的许多生理生化过程都有影响,它的变化影响可溶性蛋白、过氧化物酶,进而导致不同的形态发生(田长思等,1998)。在匙羹藤增殖过程中, NAA、TDZ、2-IP 三种激素组合使用时,其间的协同作用大于 NAA 和 2-IP 两因素组合,说明在促进匙羹藤生长时,多种激素配合的效果大于两种激素配合的效果。

参考文献:

- 中国科学院植物研究所. 2002. 中国高等植物图鉴(第3册) [M]. 北京:科学出版社,861,1040
- 韦宝伟,施蓓. 1996. 匙羹藤的研究概况. 国外医药. 植物药分册[M]. 11(3):107
- 江苏新医学院. 1977. 中药在辞典(上册)[M]. 上海人民出版社,1 246
- 李俊明. 2002. 植物组织培养教程[M]. 北京:北京农业大学出版社,24
- 张军舰,杨善朝. 2001. SPSS 统计软件应用基础[M]. 桂林:广西师范大学出版社,58
- 奕军. 1995. 现代实验设计优化方法[M]. 上海:上海交通大学出版社,54
- Wang LH(王隆华), Shen Q(沈庆). 1994. Orthogonal testing method in plant-physiology experiment application example(正交试验法在植物生理学实验中的应用实例)[J]. *Plant Physiol Common*(植物生理学通讯). 30(5): 366—367
- Tao J(陶静), Zhan YG(詹亚光), You XL(由香玲), et al. 1998. Study on tissue culture and regeneration system of *Betula platyphylla* Suks (III); change of endogenous hormones in tissue culture(白桦组培再生系统的研究Ⅲ. 组培过程中内源激素的变化)[J]. *J Northeast Fore Univ*(东北林业大学学报), 26(6):6—9
- Tian CS(田长思), Ye H(叶蕙). 1998. Changes of content of polyamines and soluble protein and activity of peroxidase during adventitious root formation in cotyledons of curcumas melon cultured *in vitro*(甜瓜子叶离体培养不定根发生过程多胺和可溶性蛋白含量以及过氧化物酶活性的变化)[J]. *Plant Physiol Common*(植物生理学通讯)43(2):105—107
- Wang HJ(王华静), Wu LH(吴良欢), Tao QN(陶勤南), et al. 2005. Effects of nitrogen forms on plant growth and quality(氮形态对植物生长和品质的影响及其机理)[J]. *Eull Sci Tech*(科技通报), 21(1):50—55
- Yoshikawa. 1989. Structure studies of new ant sweet constituents from *Gymnema sylvestre*[J]. *Tetrahedron Letter*, 37(3):1 103