

低温休眠,但抽苔后能开花的只有 50%,主要原因是此时病虫害较严重。一年两次抽苔开花对第 2 年植株生长发育的影响程度,我们调查了三年生植株花期,发现一年两次抽苔开花对第 2 年植株的再抽苔开花影响不大。

2.6 不同来源及生长年限金莲花总黄酮含量分析比较:从含量分析结果看出,北京引种的金莲花总黄酮含量比原产地野生金莲花含量高,如围场野生的含量为 6.4%,家栽的为 7.42%~7.70%。不同种源的以庞泉沟的含量高;二年生和三年生的差异不大。光照强的处理总黄酮含量高于光照弱的。结果见表 6。

表 6 不同来源及生长年限的金莲花总黄酮含量

Table 6 Total flavones of Chinese globeflower in different places and ages

栽培情况	种子来源	生长年限	采花期	总黄酮含量 %
北京家栽	雾灵山	2	盛花期	7.371 0
	庞泉沟	2	盛花期	8.101 2
	围场	2	盛花期	7.404 2
	围场,荫蔽度 54%	3	盛花期	7.720 6
	围场,荫蔽度 89%	3	盛花期	7.498 3
野生	内蒙阿尔山	多年生	盛花期	5.597 9
	围场(御道口)	多年生	盛花期	6.420 2

3 小结

通过多年的引种试验观察,金莲花在北京平原地区栽培能正常生长。开花和结果,产量较高,可产干花 450~600 kg/hm²,药效成分总黄酮含量比原产地野生的还高,引种是成功的。金莲花能够忍受夏

季 35℃~38℃高温;该栽培技术可以作为其他地区引种时参考,但引种时须注意以下几点。

3.1 在平原地区种植因气温较高,苗期需适当遮荫,荫蔽度控制在 40%~50%。

3.2 种子要处理,春播播种前地要整平整细,播后盖 1 cm 左右厚的细砂,再盖 3~5 cm 厚的稻草,再浇足水保湿,幼苗出齐后要逐渐揭去盖草进行炼苗,最后畦面还要保留少量稻草以保持畦面湿润。

3.3 采用育苗移栽,当幼苗高 6~10 cm 真叶达 5~6 片以上时即可移栽,但此期正值夏季炎热天气,移栽后如不及时浇水或蔽荫成活率低。夏季移栽一定要选阴雨天,并注意对蝼蛄和蛴螬的防治,干旱时及时浇水。适宜移栽期为第 2 年早春幼芽萌动前,成活率达 100%。

3.4 在生长季较长的平原地区种植,一年能开二次花而不影响第二年生长发育和花产量,如果精心管理,合理施肥并及时防治病虫害,产量会稳定提高。

References

- [1] Institute of Medicinal Plant, CAMS & PUMC. *The Cultivation of Medicinal Plants in China* (中国药用植物栽培学) [M]. Beijing: Agriculture Publishing House, 1991.
- [2] Ding W L, Cheng J, Ding B, *et al.* Effects of storage methods on breaking seed dormancy of *Trollius chinensis* Bge. [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2000, 25 (5): 266-269.
- [3] Bai Y M. Chinese medicinal materials globeflower (*Trollius* spp.) [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1994, 25(6): 291.
- [4] Liu L J, Wang X K, Fu Q P, *et al.* Bacteriostatic activity of long petal globeflower (*Trollius macropetalus*) and determination of its total flavones [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1992, 23(9): 461-462.

苦皮藤组织培养与植株再生

马 艳,肖娅萍,胡雅琴*

(陕西师范大学生命科学学院,陕西 西安 710062)

摘要:目的 研究药用植物苦皮藤组织培养技术,为工厂化育苗及工业化获取苦皮藤次生代谢产物提供行之有效的途径。方法 以苦皮藤子叶和胚轴为外植体,采用 MS 培养基,附加不同的植物激素进行实验。结果 MS+2,4-D 2 mg/L 培养基适合愈伤组织诱导;MS+6-BA 2 mg/L+NAA 0.2 mg/L 培养基适合芽的分化;MS+6-BA 1 mg/L+NAA 0.2 mg/L 培养基适合芽的增殖;将芽转至 MS+MET 0.7 mg/L+IBA 0.5 mg/L 培养基暗培养 10 d 后,转入 1/2MS 培养基光下培养形成根;试管苗移栽成活率为 85%。结论 通过诱导愈伤组织途径可以达到快速繁殖的目的;较高浓度的 2,4-D 对苦皮藤愈伤组织的诱导有利;6-BA 对愈伤组织的生长有明显促进作用;多效唑暗培养对根的分化是必需的。

关键词:苦皮藤;组织培养;植株再生

* 收稿日期: 2003-01-01
作者简介: 马 艳 (1970-),女,陕西咸阳人,现为陕西师范大学 2001 级硕士研究生,研究方向为植物生物技术 Tel (029) 5308451
E-mail mayanli.student@sina.com.cn

中图分类号: R282. 21

文献标识码: A

文章编号: 0253- 2670(2003) 10-附 4- 04

Tissue culture and plant regeneration in *Celastrus angulatus*

MA Yan, XIAO Ya-ping, HU Ya-qin

(College of Life Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

Key words *Celastrus angulatus* Maxim.; tissue culture; plant regeneration

苦皮藤 *Celastrus angulatus* Maxim. 是卫矛科南蛇藤属多年生落叶藤状灌木, 其根、茎、叶、果实和种子是天然的杀虫剂又是重要的中药资源, 含有丰富的皂素、树胶、红色素、纤维等物质。民间用其根皮、茎皮、树叶防治蔬菜及各种作物的虫害已有相当长的历史^[1]。苦皮藤有清热解毒、杀虫消肿、舒筋活络、调经透疹之功效^[2]。随着人们环保意识的增强和对有机合成农药产生的“三 R”问题的认识, 开发天然源杀虫剂已成为一个热点, 苦皮藤因此而倍受关注^[3]。近年来, 人们对苦皮藤所含的化学成分、杀虫机制及应用开发等方面进行了深入的研究^[4]。目前已从其根皮和种子中分离出数十种新化合物, 生物测试结果表明这些物质对菜青虫、槐尺蠖等数十种昆虫具有很好的毒杀、拒食和麻醉作用^[5]。自苦皮藤被国家审批为植源性杀虫剂以来, 其乳油、水乳剂、微乳剂已不断投放市场并且收到良好的经济效益和社会效益^[6]。随着人们对苦皮藤的大力开发利用, 自然资源已面临短缺。为了有效保护野生资源, 本实验展开了苦皮藤的组织培养研究, 为其快速繁殖和工业化生产提供有效途径。

1 材料与方法

1.1 材料: 供试材料苦皮藤 *Celastrus angulatus* Maxim. 采自秦岭山区。外植体为其种子萌发后产生的子叶及胚轴。

1.2 方法

1.2.1 外植体的制备: 将种子用铜网包住, 84消毒液处理后, 流水冲洗 2~ 3 h, 70% 乙醇浸泡 20~ 50 s, 0. 1% HgCl₂ 消毒 6~ 10 min, 无菌水漂洗 4~ 5次, 无菌条件下接入 MS培养基。培养基附加 0. 6% 琼脂、3% 蔗糖, pH 5. 8~ 6. 0 培养室温度 (25± 1) °C, 光照 14 h/d, 光强 2 500 lx。

1.2.2 愈伤组织的诱导、增殖及分化: 种子萌发后, 当胚轴 1 cm时, 将胚轴切成 5 mm切段, 子叶不切, 分别接种在含不同激素 MS培养基上 (表 1), 诱导愈伤组织。每种培养基设 8~ 10个重复, 30 d后统计结果。

将愈伤组织于继代培养基上每 25~ 35 d继代

一次。挑选生长旺盛、质地致密的愈伤组织转至愈伤组织分化培养基上 (表 2), 诱导芽分化, 筛选出合适的分化培养基。

1.2.3 芽的伸长与根的分化: 当芽高约 1 cm时, 将其从愈伤组织上切下进行继代培养。当苗长至约 2~ 3 cm时, 转至不同培养基 (表 3) 和不同培养条件下, 诱导根的分化。

1.2.4 炼苗移栽: 待苗基部生出 3~ 6条 0. 5~ 1 cm的根时, 将瓶盖打开, 置于室内锻炼 2~ 4 d, 随后从培养瓶中取出, 洗净根上的培养基, 种植于蛭石和花园土混合的基质上, 置于温室中。前 10 d加薄膜覆盖, 保持 90% 左右的相对湿度, 采用较弱的自然光照; 10 d后逐渐降低湿度增加光照, 最后放置自然条件下, 计算成活率。

2 结果与分析

2.1 影响愈伤组织诱导、增殖与分化的因素

2.1.1 激素对愈伤组织诱导的影响: 以 MS培养基为基本培养基附加不同浓度的 2, 4-D, KT和 NAA对苦皮藤子叶和胚轴进行愈伤组织诱导, 表 1显示 3种激素均可诱导愈伤组织 (图 1-1), 但其诱导作用有明显区别, 其中 2, 4-D诱导作用最强, NAA次之, KT较弱, 不加激素的培养基上未诱导出愈伤组织。

表 1 不同激素对苦皮藤愈伤组织的诱导结果

Table 1 Effect of various auxins on induction of callus of *C. angulatus*

激素种类	激素浓度 / (mg · L ⁻¹)	诱导率 / %
2, 4-D	2	87. 5
	1	70
	0. 5	37. 5
KT	1	6. 25
	0. 5	5
	0. 2	3. 15
NAA	0. 5	32. 5
	0. 3	30
	0. 1	22. 5
0	0. 0	0. 0

2.1.2 激素对愈伤组织增殖的影响: 将诱导出的愈伤组织转至含 6-BA (1. 0, 1. 5, 2. 0 mg/L)、2, 4-D (0. 5, 1. 0, 2. 0 mg/L)、GA₃ (1. 0, 3. 0, 5. 0 mg/L) 的

不同培养基上,发现其中 1 mg /L 6-BA对愈伤组织生长作用最强,一个月内增长 3. 2倍; 2, 4-D次之,增长 2. 4倍; GA₃作用不明显,仅增长 1. 2倍,且伴随有褐化现象,但随着培养时间的延长,可恢复正常。

2. 1. 3 激素对芽分化和继代的影响: 将愈伤组织接到 6-BA与 NAA和与 2, 4-D组织的培养基上,实验结果见表 2

表 2 不同激素对芽分化的培养结果

Table 2 Effect of various auxins on induction differentiation of shoot of *C. angulatus*

培养基编号	培养基 / (mg · L ⁻¹)	出芽百分率 %	单块出芽数
1	MS+ 6-BA 2+ NAA 0. 2	95	5~ 6
2	MS+ 6-BA 1+ NAA 0. 2	52. 5	3~ 4
3	MS+ 6-BA 0. 5+ NAA 0. 2	5	1~ 2
4	MS+ 6-BA 2+ 2, 4-D 2	2. 5	3~ 4
5	MS+ 6-BA 1+ 2, 4-D 2	0	0
6	MS+ 6-BA 0. 5+ 2, 4-D 2	0	0

由表 2可见, 1~ 4号培养基均可诱导芽的分化,以 1号培养基为佳(图 1-2)。说明较高浓度的细胞分裂素与低浓度的细胞分裂素配合有利于芽的分化。将芽转至 2号培养基中,芽在其上增殖很快,且生长茂盛。因此, 1号培养基适合芽的诱导, 2号培养基适合芽的伸长。

2. 1. 4 外植体部位对愈伤组织诱导和分化的影响: 实验中发现外植体部位对愈伤组织的诱导有重要影响。胚轴外植体切段在接种后第 7天开始膨大, 10 d左右开始形成愈伤组织,之后整个切段形成愈伤组织。随着 2, 4-D浓度的增加,愈伤组织生长速度有所增加,而子叶愈伤组织生长速度略大于胚轴愈伤组织。

本实验还以野外采回的苦皮藤叶片为外植体,同样可诱导愈伤组织,但很难进一步分化出芽。

2. 2 影响根的诱导因素: 苦皮藤愈伤组织诱导形成苗后,在原培养基上没有观察到根的形成。为了诱导根的发生,我们进行了多组实验,发现多效唑是根分化的关键因素,暗培养和低盐对根分化有利,结果见表 3

在含 IBA 0. 5 mg /L和多效唑 0. 7 mg /L的 MS培养基先暗培养 10 d转入 1/2 MS培养基(不加任何激素)置于光下后,第 4天即可观察到根的发生,且根的发生率较高,可达 87. 5% 以上(图 1-3); 未经过暗培养,根的发生率较低,只有 7. 5%。

2. 3 影响移栽结果的因素: 苦皮藤在生根培养基中

表 3 不同培养基及培养条件对根发生的诱导结果 (培养 30 d后结果)

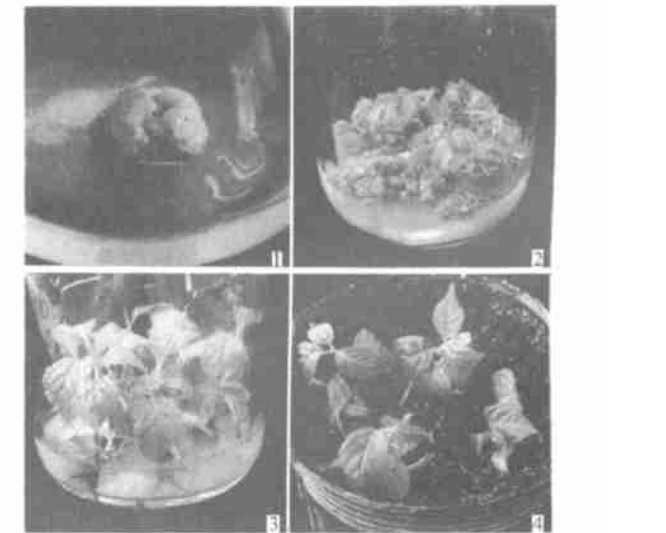
Table 3 Effect of different media with various auxins on rooting induction of *C. angulatus* after 30 days

培养基	光照/暗培养	根发生率 %
MS	光照	0
1/2MS	光照	0
B5	光照	0
MS+ IBA 0. 2	光照	0
MS+ IBA 0. 4+ KT 0. 2	光照	0
MS+ IBA 0. 6+ KT 0. 4	光照	0
* MS+ IBA 0. 5+ 多效	光照+ 光照	7. 5
唑 0. 7+ 1/2MS	暗培养+ 光照	87. 5
MS+ 活性炭	光照	0

* 先在 MS+ 多效唑 0. 7+ IBA 0. 5培养基上暗培养或光培养 10 d,后转入 1/2 MS或 MS培养基光培养

* Shoots were cultured on MS+ MET 0. 7+ IBA 0. 5 in darkness or in light, then transferred on 1/2MS or MS in light.

生长 10 d左右,生根后即可移栽。移栽初期,保持较高的相对湿度是其成活的关键。在移栽初期,植物气孔还不能完全适应外界环境,加之苦皮藤叶片较大,蒸腾作用很强,因此,一定要及时喷水,并加以塑料薄膜覆盖。本实验所采取的练苗和移栽方法可使苦皮藤的成活率达到 85% 以上(图 1-4)。



1苦皮藤外植体诱导的愈伤组织 2愈伤组织产生的不定芽
3试管苗已生根 4移栽成活的试管苗

1-callus were induced from the explants of *C. Anyulatus*
2-shoots were differentiated from callus of *C. Anyulatus*
3-roots of *C. Anyulatus* were germinated from plantlet
4-plantlets of *C. Anyulatus* were survival after transplanting under suitable condition

图 1 苦皮藤的植株再生
Fig. 1 Plant regeneration of *C. Anyulatus*

3 讨论

3.1 激素对苦皮藤组织培养的影响: 在苦皮藤愈伤组织的诱导、分化过程中, 生长素有一定作用, 以 2, 4-D 为好, 细胞分裂素效果不明显。细胞分裂素 6-BA 对苦皮藤愈伤组织的继代培养有良好作用。较高浓度的 6-BA 与一定浓度的 NAA 配合有利于苦皮藤愈伤组织的分化, 但与 2, 4-D 配合效果较差, 究其原因与激素的性质有关。巴尔茨^[7]发现在石刁柏的愈伤组织中, 当用 6-BA 与 NAA 结合使用时, 可以诱导出芽, 而 6-BA 与 2, 4-D 结合使用时则不能发生, 本实验结果与巴尔茨的结论基本一致。

3.2 外植体的部位对苦皮藤组织培养的影响: 在苦皮藤组织培养过程中发现, 正确的选择外植体的部位非常重要。本试验以其子叶和胚轴为外植体获得了成功, 而从野外采回的叶片外植体诱导效果较差, 究其原因可能是子叶和胚轴的分生细胞较多, 分化程度较低而成熟叶片细胞分化程度高, 所以在苦皮藤组织培养中应选择细胞分化程度较低的部位。

3.3 影响苦皮藤生根的因素: 一般认为生长素与细胞分裂素高比例有利于根的发生, 本试验在此比例的培养基上没有观察到根的发生, 而发现只有添加了多效唑的培养基上才有根的生成, 并且苗生长健壮、叶片翠绿, 移栽成活率高。多效唑在苦皮藤的组培苗生根方面具有明显的促进作用, 并且矮化植株使植株生长健壮, 还可增加叶片的叶绿素含量。这与文献报道的植物生长延缓剂多效唑对试管苗不定根

的形成及培育壮苗、室外移栽有良好的作用^[8]的结果一致。另外, 在实验中发现, 低盐对苦皮藤根的生长发育有利。在加入多效唑和 IBA 的 MS 培养基中, 无论是光培养还是暗培养均没有根的产生。而使用 1/2MS 培养基后, 均有根的产生。暗培养是苦皮藤生根的重要因素, 经暗培养后生根率提高了 80%, 其原因可能与某些生根基因受光调控有关。

References

- [1] Ke Z G, Nan L S. The research and advances on the plant-based insect antifeedant *Celastrus angulatus* [J]. *J Wuhan Bot Res* (武汉植物学研究), 1993, 11(3): 265-271.
- [2] Nan L S, Lu L X. Advances in plant pesticide angled bitter-sweet [J]. *Pesticides* (农药), 1995, 34(7): 29-31.
- [3] Wang J Z, Sun S L, Su H T. The research utilization present situation and forecast of plant source insecticide [J]. *J Beijing Agr Coll* (北京农学院学报), 2002, 15(2): 72-73.
- [4] Cao H Q, Yue Y D, Hua R M. Research and advances of the plant-based pesticides agents [J]. *J Anhui Agr Univ - Nat Sci* (安徽农业大学学报·自然科学版), 2000, 77(1): 40-44.
- [5] Liu H X, Wu W J, Ji Z Q, et al. Studies on the selective toxicity and selective mechanism of poisonous ingredient celanyulin V of *Celastrus angulatus* against the insect pests [J]. *Acta Agr Boreali-occidentalis Sin* (西北农业学报), 1998, 7(2): 41-44.
- [6] Wu W J, Liu H X, Ji Z Q, et al. Research and development on the botanical insecticide of 0.2% celangulines emulsifiable concentrate [J]. *Pesticides* (农药), 2001, 40(3): 17.
- [7] Barz W, Reinhard E, Zenk M H. *Plant Tissue Culture and Its Bio-technological Application* (植物组织培养技术及其在生物技术的应用) [M]. Beijing: Science Press, 1983.
- [8] Cao Z Y, Lui G M. *The Practical Technology Course of the Plant Organization Culture* (实用植物组织培养技术教程) [M]. Lanzhou: Gansu Science and Technology Press, 1995.

HPLC法测定杜仲仁中桃叶珊瑚苷的含量

杨小梅, 尚平平, 刘建斌, 孙文基*

(陕西省生物医药重点实验室 西北大学, 陕西 西安 710068)

杜仲仁为杜仲科植物杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 成熟种子的种仁, 含有脂肪油、蛋白质、糖类及桃叶珊瑚苷等多种化学成分。目前的利用价值仅限于从杜仲仁提取油脂。关于杜仲仁的研究, 未见报道, 笔者从中提取分离出桃叶珊瑚苷, 并用 HPLC 法进行含量测定, 测得杜仲仁中的桃叶珊瑚苷有较高的含量。

1 仪器与试药

Beckman Coulter 高效液相色谱仪, System Gold 125 Solvent Module, System Gold 168 Detector; 桃叶珊瑚苷对照品: 自制, TLC 检查为单一斑点。HPLC 检测为单一峰, 归一化法计算纯度为 99% 以上, 其甲醇溶液的紫外扫描图谱中 $\lambda_{\max} = 206.4 \text{ nm}$, 红外扫描图谱数据与西安交通大学药学

* 收稿日期: 2002-10-12

作者简介: 杨小梅 (1962-), 女, 陕西省武功县人, 学士学位, 副主任药师。Tel (0917) 3573739

* 通讯作者 Tel (029) 8303569