

低,导致无扩增;酶量过高,使非特异性产物增加。当酶用量为 0.5 U 时扩增产物较少,在 1.0~2.0 U 时扩增条带逐渐清晰稳定;当酶用量达 4.0 U 时产物弥散(图 6)。因此, *Taq* 聚合酶的用量为 1.5 U 最佳。

2.6 预变性时间及延伸时间 SRAP 扩增的影响: 本实验预变性和延伸时间对 SRAP 反应的影响进行了考察,结果表明预变性时间和延伸时间对扩增结果无太大影响,延伸时间在 1~10 min,变性时间在 1~5 min 扩增条带无太大差异。从缩短实验周期和节约成本考虑,最终选择预变性 2 min,延伸 5 min(图 7、8)。

### 3 讨论

本实验最终以青牛胆 DNA 为材料,建立了重复性好、分辨率高的 SRAP 反应体系,即在 25  $\mu$ L 反应体系中,模板 DNA 质量浓度为 10 ng/ $\mu$ L,2.5  $\mu$ L 的 10 倍 Buffer ( $Mg^{2+}$  free) 缓冲液,  $MgCl_2$  2.5 mmol/L, dNTPs 为 0.25 mmol/L,引物 1.0  $\mu$ mol/L, *Taq* 酶 1.5 U;扩增程序为:94  $^{\circ}$ C 预变性 2 min、94  $^{\circ}$ C 变性 1 min、35  $^{\circ}$ C 复性 1 min、72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min、5 个循环;94  $^{\circ}$ C 变性 1 min、50  $^{\circ}$ C 复性 1 min、72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min、35 个循环。

对青牛胆 SRAP 扩增最为敏感的因素是  $Mg^{2+}$ , dNTPs, *Taq* DNA 聚合酶浓度,而模板适宜浓度范围较宽,5~70 ng 均有良好扩增,引物浓度要求也不高,这与王志朴等对小麦<sup>[4]</sup>及任羽等<sup>[5]</sup>对辣椒的研究结果是一致的。扩增前 5 个循环退火温度为 50  $^{\circ}$ C,保证反应稳定可重现性。

SRAP 是对 ORFs 进行扩增,对基因相对较少的着丝粒附近及端粒的扩增较少,如结合可扩增这些区域的 SSR 标记,可获得覆盖整个基因组的连锁图。在遗传多样性研究中,SRAP 比 AFLP 更能反映表型的多样性及进化史<sup>[6]</sup>,且比 AFLP 操作简单,省去了酶切,连接等烦琐的步骤,在药用植物种质资源评价等方面具有广泛的应用前景。

SRAP 技术是基于 PCR 的一种分子标记方法,是针对生物体基因组进行分析,亲缘关系越近的生物基因相似性越大,故推断本实验优化所得的反应条件对防己科青牛胆属及亲缘关系相近的其他植物同样适用。

### References:

- [1] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica [J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 103: 455-461.
- [2] Riaz A, Li G, Quresh Z, et al. Genetic diversity of oilseed brassica napu inbred lines based on sequence-related amplified polymorphism and its relation to hybrid performance [J]. *Plant Breed*, 2001, 120(5): 411-415.
- [3] Lin Z X, Zhang X L, Nie Y C, et al. Formation SRAP genetic linkage map of cotton [J]. *Chin Sci Bull* (科学通报), 2003, 48(5): 1676-1679.
- [4] Wu Z P, Yang W X, Liu D Q, et al. Establishment of SRAP technique system in wheat genome [J]. *J Hebei Agric Univ* (河北农业大学学报), 2005, 28(3): 66-69.
- [5] Ren Y, Wang D Y, Zhang Y D, et al. Optimization of SRAP-PCR in Hot Pepper (*Capsicum annum* L.) [J]. *Mol Plant Breed* (分子植物育种), 2004, 2(5): 689-693.
- [6] Ferriol M, Pico B. Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP marker [J]. *Theor Appl Genet*, 2003, 107(2): 271-282.

## 柴胡愈伤组织生长和不定根诱导的研究

姚 智<sup>1</sup>, 高文远<sup>1\*</sup>, 李克峰<sup>1</sup>, PAEK Kee-yoep<sup>2</sup>

(1. 天津大学药物科学与技术学院, 天津 300072; 2. Research Center for the Development of Advanced Horticultural Technology, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Chungbuk, Korea)

**摘要:**目的 探讨柴胡愈伤组织生长和其不定根诱导的适宜培养条件。方法 以无菌苗为外植体诱导获得愈伤组织后,对不同种类和不同质量浓度的生长素进行实验,并对光和温度对柴胡愈伤组织生长和其不定根诱导的影响进行了研究。结果 柴胡的愈伤组织适宜于在 MS+NAA 4 mg/L+KT 0.2 mg/L 培养基或 MS+NAA 2 mg/L+KT 0.2 mg/L 培养基上继代培养。诱导其不定根时宜采用的培养基为 MS+IBA 2 mg/L+KT 0.2 mg/L。25  $^{\circ}$ C 条件下,黑暗培养既有利于柴胡愈伤组织的生长又有利于其不定根的诱导。结论 比较适宜于柴胡愈伤组织生长的生长素为 NAA,而有利于不定根诱导的生长素为 IBA。温度对愈伤组织的生长影响非常明显,光照是其发根的限制因素。

收稿日期:2006-04-10

基金项目:国家中医药管理局中医药科学技术研究专项(04-05ZP10)

\* 通讯作者 高文远 Tel:(022)87401895

关键词:柴胡;愈伤组织;不定根

中图分类号:R282.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)02-0275-04

### Callus growth and adventitious root induction in *Bupleurum chinense*

YAO Zhi<sup>1</sup>, GAO Wen-yuan<sup>1</sup>, LI Ke-feng<sup>1</sup>, PAEK Kee-yoeup<sup>2</sup>

(1. The College of Pharmaceutics and Biot echnology, Tianjin University, Tianjin 300072, China; 2. Research Center for the Development of Advanced Horticultural Technology, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Chungbuk, Korea)

Key words: *Bupleurum chinense* DC.; callus; adventitious root

柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 为常用药用植物,其根具有重要的药用价值,除了作为中医处方用药外,已经开发了多种中成药,如柴胡滴丸、柴胡舒肝丸、柴胡口服液等,用药量逐年增长。组织培养技术,特别是大规模工业化培养技术,对解决药用植物资源紧张的状况具有重要意义<sup>[1]</sup>。将组织培养技术和中药材 GAP 栽培技术结合起来,对中药材资源的可持续利用非常重要。药用植物大规模不定根培养技术的工业化,已经在韩国高丽参上取得了成功,培养的规模已经达到了 20 t<sup>[2]</sup>,这些技术对我国许多药材的培养,特别是根类药材具有重要的参考意义。为此,本实验室对柴胡不定根的培养进行了尝试。

#### 1 材料与方 法

1.1 材料:柴胡 *B. chinense* DC. 种子采自中国医学科学院药用植物研究所,经本院高文远教授鉴定。

1.2 柴胡愈伤组织的诱导和继代培养:选取饱满的柴胡种子,流水冲洗 4 h,用 1%次氯酸钠消毒 10 min,无菌水清洗后,接种于 MS 无植物生长调节剂的固体培养基上,20℃黑暗培养,20 d 后获得无菌苗。待无菌苗生长到 3~5 cm 时,接种到 MS+2,4-D 2 mg/L+KT 0.2 mg/L 的固体培养基上诱导愈伤组织,30 d 左右获得柴胡的愈伤组织。愈伤组织在相同的培养基上每 25 d 左右进行继代培养。这些愈伤组织用于本实验研究。

1.3 不同生长素对柴胡愈伤组织生长和不定根诱导的影响研究:共采用 12 种含有不同生长素的培养基。编号为 B1~B12,见表 1。培养在培养皿中进行,培养皿直径 9.5 cm,高 4.5 cm。培养室温度为 23℃,黑暗培养,培养时间为 25 d,检测柴胡愈伤组织的生长速率,并统计愈伤组织中发出的不定根的数量。每种处理重复 10 次。

1.4 培养的物理环境对柴胡愈伤组织生长和不定根诱导的影响研究:主要实验温度和光照对柴胡愈伤组织生长和不定根诱导的影响。采用的培养基为 MS+

表 1 培养基中的不同植物生长调节剂实验

Table 1 Experiments of various plant growth regulators in MS media

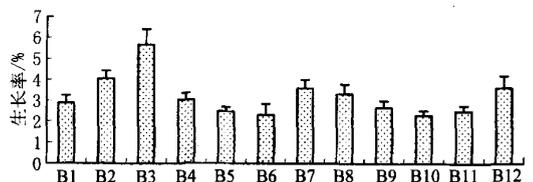
编号	培养基中的不同植物生长调节剂/(mg·L <sup>-1</sup> )
B1	MS+1 NAA+0.2 KT
B2	MS+2 NAA+0.2 KT
B3	MS+4 NAA+0.2 KT
B4	MS+8 NAA+0.2 KT
B5	MS+1 IAA+0.2 KT
B6	MS+2 IAA+0.2 KT
B7	MS+4 IAA+0.2 KT
B8	MS+8 IAA+0.2 KT
B9	MS+1 IBA+0.2 KT
B10	MS+2 IBA+0.2 KT
B11	MS+4 IBA+0.2 KT
B12	MS+8 IBA+0.2 KT

NAA 4 mg/L+KT 0.2 mg/L 固体培养基。培养在培养皿中进行,培养皿直径 9.5 cm,高 4.5 cm。设下列 5 种处理:A 黑暗 25℃;B 日光 25℃;C 紫色光 13℃;D 蓝色光 20℃;E 蓝色光 25℃。培养时间为 25 d,检测柴胡愈伤组织的生长速率,并统计愈伤组织中发出的不定根的数量。每种处理重复 10 次。

#### 2 结果与分析

2.1 不同生长素对柴胡愈伤组织生长和不定根诱导的影响:图 1 显示了不同生长素对柴胡愈伤组织生长的影响,图 2 显示了不同生长素对柴胡不定根诱导的影响。

从图 1 中可以看出,NAA 比较适合于柴胡愈伤

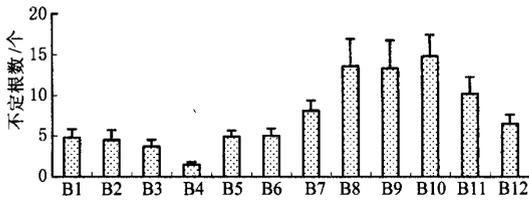


B1~B12: 对应于表 1 中的不同培养基

B1-B12: Different media according to table 1

图 1 不同生长素对柴胡愈伤组织生长的影响

Fig. 1 Effects of various plant growth regulators on callus growth in *B. chinense*



B1~B12: 对应于表 1 中的不同培养基

B1-B12: Different media according to table 1

图 2 不同生长素对柴胡不定根诱导的影响

Fig. 2 Effects of various plant growth regulators on adventitious root induction in *B. chinense*

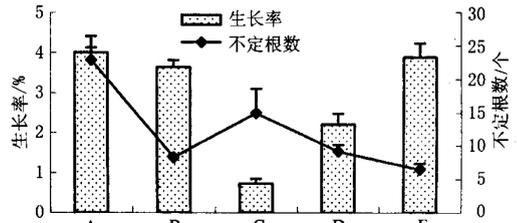
组织的生长, IAA 和 IBA 的效果相差不多。从各种培养基来看, MS+NAA 4 mg/L+KT 0.2 mg/L 培养基最适宜于愈伤组织的生长, 其次为 MS+NAA 2 mg/L+KT 0.2 mg/L 培养基, 另外 3 种培养基 MS+IAA 4 mg/L+KT 0.2 mg/L, MS+IAA 8 mg/L+KT 0.2 mg/L, MS+IBA 8 mg/L+KT 0.2 mg/L 的效果也不错。但从愈伤组织的外观来看, NAA 条件下生长的愈伤组织状况较好。

从图 2 中可以看出, IBA 比较适合于不定根的诱导, 诱导出的不定根状况较好, 颜色黄白, 生长迅速。其次为 IAA, 较高质量浓度的 IAA 对柴胡不定根的诱导效果较好。而 NAA 不适于不定根的诱导。比较适宜于柴胡诱导不定根的培养基为: MS+IBA 2 mg/L+KT 0.2 mg/L, MS+IBA 1 mg/L+KT 0.2 mg/L 和 MS+IAA 8 mg/L+KT 0.2 mg/L。

因此, 比较适宜于柴胡愈伤组织生长的生长素为 NAA, 而有利于不定根诱导的生长素为 IBA。柴胡的愈伤组织适宜于在 MS+NAA 4 mg/L+KT 0.2 mg/L 培养基或 MS+NAA 2 mg/L+KT 0.2 mg/L 培养基上继代培养。诱导其不定根时宜采用的培养基为 MS+IBA 2 mg/L+KT 0.2 mg/L, MS+IBA 1 mg/L+KT 0.2 mg/L 或 MS+IAA 8 mg/L+KT 0.2 mg/L。

2.2 培养的物理环境对柴胡愈伤组织生长和不定根诱导的影响: 图 3 显示了培养的物理环境对柴胡愈伤组织生长和不定根诱导的影响。可以看出, 温度对愈伤组织的生长影响非常明显, 而黑暗和不同光照条件对愈伤组织的生长影响不大, 如 25 °C 条件下, 无论是黑暗, 还是普通光照射或者蓝光照射, 愈伤组织的生长都很好。而在 13 °C 和 20 °C 条件下生长的愈伤组织明显生长慢, 长势不好。20~25 °C 的温度环境比较适宜于柴胡愈伤组织的生长。

对于柴胡不定根的诱导来说, 光照是其发根的限制因素, 而温度的影响相对较小。在 25 °C 条件下,



A-暗培养 25 °C B-白光下培养 25 °C C-蓝光下培养 13 °C

D-蓝光下培养 20 °C E-蓝光下培养 25 °C

A-dark 25 °C B-white light 25 °C C-blue light 13 °C

D-blue light 20 °C E-blue light 25 °C

图 3 物理环境对柴胡愈伤组织生长和不定根诱导的影响  
Fig. 3 Effects of physical environment on callus growth and adventitious roots induction in *B. chinense*

黑暗培养最有利于柴胡不定根的发生。在蓝光条件下, 13 °C 有利于发根, 其次为 20 °C, 最后是 25 °C。说明在相同的光照条件下, 低温有利于柴胡不定根的发出。

以上结果表明, 25 °C 条件下, 黑暗培养既有利于胡愈伤组织的生长, 又有利于其不定根的诱导。

### 3 讨论

本实验对柴胡的愈伤组织和不定根诱导进行了初步研究, 探索出了柴胡愈伤组织生长的最佳条件, 并发现了影响柴胡不定根诱导主要因素。不同的生长素对柴胡愈伤组织和不定根诱导的影响不同, 而温度和光照条件同样对二者具有非常重要的影响。这些结果为进一步柴胡不定根的培养打下了良好的工作基础。我国的组织培养在雪莲、石斛等药用植物上已经出现了一些工业化的实例<sup>[3]</sup>。但不定根的培养较少, 这方面做得最成功的是韩国对高丽参不定根的培养<sup>[4,5]</sup>。此外, 在其他药用植物组织培养上的研究也很深入, 并力求通过组织培养技术产生一些大田和野生药用植物无法比拟的新材料<sup>[6,7]</sup>。这些经验都值得借鉴。我国是世界上使用和出口药用植物资源最多的国家, 大力开发组织培养技术, 并与目前正在开展的 GAP 标准化栽培相结合, 对真正实现国家倡导的药用植物资源的可持续利用具有非常重要的意义。

### References:

[1] Gao W Y, Jia W. *Industrial Tissue Culture of Medicinal Plants* (药用植物大规模组织培养) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005.  
 [2] Yu K W, Gao W Y, Son S H, et al. Improvement of ginseng production by jasmonic acid and some other elicitors in hairy root culture of ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer) [J]. *In Vitro Cell Dev Biol: Plant*, 2000, 36: 424-428.  
 [3] Guo X H, Gao W Y, Chen H X, et al. Effects of mineral cations on the accumulation of tanshinone I<sub>A</sub> and protocate-

- chucic aldehyde in the adventitious root culture of *Salvia niltiorrhiza* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2005, 30(12): 885-888.
- [4] Yu K W, Gao W Y, Hahn E J, et al. Jasmonic acid improves ginsenoside accumulation in adventitious root culture of *Panax ginseng* C. A. Meyer [J]. *Biochem Eng J*, 2002, 11: 211-215.
- [5] Gao W Y, Fan L, Hahn E J, et al. Pigment and saikosaponin production through bioreactor culture of *Carthamus tinctorius* and *Bupleurum falcatum* [J]. *J Plant Biotechnol*, 2001, 3: 1-5.
- [6] Jacob J R, Korba B E, You J E, et al. Korean medicinal plant extracts exhibit antiviral potency against viral hepatitis [J]. *J Altern Complement Med*, 2004, 10(6): 1019-1026.
- [7] Kim D I, Lee T K, Jang T H, et al. The inhibitory effect of a Korean herbal medicine, *Zedoariae rhizoma*, on growth of cultured human hepatic myofibroblast cells [J]. *Life Sci*, 2005, 77(8): 890-906.

## RP-HPLC 法测定何首乌和夜交藤中二苯乙烯苷和蒽醌类成分

苏 建, 袁志芳, 张兰桐\*, 王春英, 吕春艳, 刘伟娜

(河北医科大学药学院 药物分析教研室, 河北 石家庄 050017)

何首乌 *Radix Polygoni Multiflori* 为蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的干燥块根。性微温, 味苦、甘、涩。《中国药典》2005 年版一部记载具有润肠通便之功效。何首乌中的主要有效成分之一为蒽醌类<sup>[1]</sup>(anthraquinone, AQ), 包括大黄素 (emodin, EM)、大黄酸 (rhein)、大黄酚 (chryso-phenol, CH)、大黄素甲醚 (physcion, PH) 等; 何首乌中另一种有效成分为二苯乙烯苷 (stilbene glycoside) 类<sup>[2]</sup>。夜交藤 *Caulis et Folium Polygoni Multiflori*, YJT 又名首乌藤, 为蓼科植物何首乌的干燥藤茎或带叶藤茎, 有养心、安神、通络、祛风止痛等功效<sup>[3]</sup>, 用于治疗失眠、劳伤、多汗、血虚身痛。何首乌与夜交藤虽为同一植物的不同部位, 但功效却不尽相同。二苯乙烯苷和蒽醌类衍生物均为何首乌中的有效成分。《中国药典》2005 年版中记载了何首乌中二苯乙烯苷的测定, 但并未记载关于何首乌中蒽醌类成分的测定方法。本实验采用 RP-HPLC 法分别测定了何首乌、制首乌和夜交藤中二苯乙烯苷和蒽醌类衍生物的量, 并且对 3 种药材中二苯乙烯苷和蒽醌类衍生物的量进行了比较, 为探讨其药效物质基础与作用机制, 开发新的药物制剂提供了依据。

### 1 仪器与试剂

Waters 高效液相色谱仪, Waters 色谱工作站。大黄素 (批号: 0756-9908)、大黄酸 (批号: 0757-200206)、大黄酚 (批号: 110796-200309)、大黄素甲

醚 (批号: 758-9803)、二苯乙烯苷 (批号: 0844-200003) 对照品购于中国药品生物制品检定所, 甲醇、乙腈均为迪马公司的色谱纯, 水为自制重蒸水。

何首乌、制首乌和夜交藤购于河北省安国市药材公司、河北乐仁堂药店和石家庄市饮片厂, 经河北医科大学药学院聂凤提教授鉴定。

### 2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱: Dikma (迪马) C<sub>18</sub> 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-乙腈-1% 甲酸 (15 : 10 : 75), 检测波长为 320 nm, 柱温 30 °C, 体积流量 1.0 mL/min。理论板数按二苯乙烯苷计算不低于 2 500, 分离度大于 2.0。流动相: 甲醇-乙腈-1% 磷酸 (70 : 10 : 15), 检测波长为 254 nm, 柱温 30 °C, 体积流量 1.0 mL/min。理论板数按大黄素、大黄酸、大黄酚和大黄素甲醚计算不低于 2 500, 分离度大于 2.0

2.2 对照品溶液的制备: 精密称取二苯乙烯苷、大黄素、大黄酸、大黄酚和大黄素甲醚对照品适量, 分别加甲醇溶解并稀释制成 160、90.0、100、100、100 μg/mL 的溶液, 即得。

2.3 二苯乙烯苷定量用供试品溶液的制备: 取何首乌、制首乌细粉 0.2 g, 或者夜交藤细粉 1.0 g, 精密称定, 加 50% 乙醇 25 mL, 称定质量, 超声处理 15 min, 放冷, 再次称定质量, 用 50% 乙醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 蒽醌类成分定量用供试品溶液的制备<sup>[4,5]</sup>: 将

收稿日期: 2006-04-14

作者简介: 苏 建 (1980-), 男, 河北秦皇岛人, 河北医科大学 2004 级硕士研究生。

\* 通讯作者 张兰桐 Tel: (0311)86266419 Fax: (0311)86052053 E-mail: zhanglangtong@263.net