

量。其中以 5 mL 剂量为最好,细胞中吲哚生物碱含量提高 2 倍多。

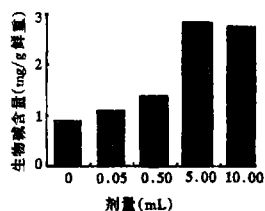


图 5 外源刺激物剂量对细胞中吲哚生物碱含量的影响。从我们这些研究结果可以看出,长春花冠瘿对大丽花轮枝孢菌匀浆物的刺激反应比较敏感,这种外源刺激物的冠瘿细胞的次级代谢活动产生了明显的调节作用。在本文描述的实验条件下,以 5 mL 外源刺激物加入的培养 15 d

的细胞培养系统处理 18 h,能显著提高细胞中吲哚生物碱含量,比对照提高 2 倍多,有关外源刺激物提高长春花冠瘿细胞药用成分的研究尚未见过报道。

#### 参考文献

- 1 常敏毅. 抗癌药物. 长沙:湖南科学技术出版社,1996: 118
- 2 王宁宁,等. 生物工程学报,1994,10(3):244
- 3 Eilert U, et al. J Plant Physiology, 1986,126:11
- 4 Morris P, et al. Plant Cell Culture—a practical approach. 1985:127

(1998-08-26 收稿)

### Studies on the Enhancing Accumulation of Indole Alkaloids in Crown Gall Cells of Madagascar Periwinkle (*Catharanthus roseus*)

Wang Shufang, Wang Ningning, Wang Yong, et al. (College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071)

**Abstract** Influences of cell age (at inoculation) and the amount inoculated on the biological mass production of cultured cells in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don suspension were investigated. Effects of treatment by *Verticillium dahliae* homogenate as elicitor on the cell growth and accumulation of indole alkaloids in the crown gall cells were studied and the optimal stimulation conditions were determined.

**Key words** *Catharanthus roseus* (L.) G. Don elicitor indole alkaloids

## 贯叶连翘组织培养及植株再生研究

陕西师范大学生命科学学院(西安 710062) 徐元红\* 李发荣 王喆之

**摘要** 在国内首次研究了贯叶连翘胚轴和子叶的培养方法,分别通过器官型和器官发生型途径获得了大量再生植株,部分可移栽成活。实验表明,在 BA 和 2,4-D 不同组合的 MS 培养基上,愈伤组织易于诱导,繁殖速度快,并且通过初步检测证明了愈伤组织中金丝桃素存在的可能性。再生植株产生极容易,繁殖系数高。

**关键词** 贯叶连翘 组织培养 愈伤组织再生植株 金丝桃素

贯叶连翘 *Hypericum perforatum* L. 是藤黄科金丝桃属植物,为多年生草本,在民间已有 2 400 余年的药用历史。80 年代后期,由于发现其植物体内含具有显著抗 DNA、RNA 病毒繁殖作用的化合物——金丝桃素(hypericin)<sup>[1]</sup>而引起人们对该植物的广泛兴

趣。目前,金丝桃素已作为药物在德国、英国等国家上市,主要用于治疗抑郁症<sup>[2,3]</sup>、甲型肝炎、乙型肝炎<sup>[4,5]</sup>及艾滋病<sup>[6,7]</sup>。国内外对贯叶连翘的研究主要集中在化学成分<sup>[8,9]</sup>、药理<sup>[4,5,10]</sup>等方面。由于金丝桃素的广泛应用前景,国内外各个公司对贯叶连翘野生资源进

\* Address: Wang Shufang, College of Life Sciences, Shanxi Normal University, Xi-an

徐元红 女,31 岁,硕士研究生,讲师。陕西师范大学植物生理教研室任教,并于植物细胞工程实验室从事植物组织、细胞培养等研究工作。先后发表《关于伊贝母微体繁殖植株再生途径的研究》、《伊贝母与平贝母胚状体诱导条件的比较》等论文。

行毁灭性采挖。为有效保护野生资源,避免资源枯竭,我们开展贯叶连翘的组织培养研究,并为利用细胞大规模提取金丝桃素等药用成分打下基础。

## 1 材料和方法

供试的贯叶连翘种子采于秦岭山区。种子用自来水冲洗干净后,用铜网包住,70%酒精浸泡30 s,0.1% HgCl<sub>2</sub>常规灭菌14 min,无菌水冲洗3~5次,接种在0.8%的琼脂培养基上。15 d以后,种子逐渐开始萌发。子叶伸出,当胚轴长达1 cm时,以子叶和胚轴为外植体(胚轴切成约2 mm长的切段,子叶不切),接种在附加不同激素的MS培养基上进行培养。培养基中附加蔗糖3%,琼脂0.7%,pH5.8,培养室温度(20±1)°C,每天光照14 h,光照强度3 000 lx。

以碱液显色反应和醋酸镁显色反应定性检测愈伤组织中萘醌类物质的存在,用紫外

扫描进一步证实金丝桃素存在的可能性。

## 2 结果与讨论

2.1 愈伤组织诱导:将胚轴切段和子叶分别接种在MS附加BA 0.2 mg/L、2,4-D 4 mg/L;BA 0.2 mg/L、2,4-D 2 mg/L和BA 0.2 mg/L、2,4-D 1 mg/L等培养基上。胚轴外植体切段在接种后的第2天即开始膨大,3~5 d后切段两端开始形成愈伤组织,之后整个切段逐渐形成愈伤组织。随着2,4-D浓度的增加,愈伤组织生长速度有所增加。子叶在接种1周后,整个外植体形成愈伤组织。子叶愈伤组织生产速度略大于胚轴愈伤组织,颜色略微发红。但在以后的继代培养中,这种差别越来越小。在继代培养过程中,培养在附加BA 0.2 mg/L、2,4-D 1 mg/L的培养基上的愈伤组织每30 d增长量为2.6倍,若在此种培养基上添加CH 500 mg/L,增长量可以达到3.7倍/30天(图1-1)。



1-贯叶连翘愈伤组织 2-由愈伤组织产生的苗 3-愈伤组织产生苗的生根 4-外植体直接成苗 5-移栽成活的试管苗

图1 贯叶连翘愈伤组织及试管苗

将胚轴切段或子叶接种在MS附加NAA 1 mg/L、BA 3 mg/L的培养基上,可以形成表面光滑、颜色鲜绿的愈伤组织。另外,我们在其它多种由生长素和细胞分裂素组成的培养基上,均可不同程度地诱导出愈伤组织,且生长速度比较快。

2.2 由愈伤组织诱导再生植株:在以上所有的培养基中,将生长素类的激素去掉,经1次继代培养后,原愈伤组织均转化为深绿色较紧密的愈伤组织,并从其上产生不定芽(图1-2)。当不定芽长大后,切下转入生根培养基生根(图1-3)。同时,部分材料不经过生根培养可一次成苗。

2.3 再生植株的直接发生:将胚轴切段接种

在不含任何激素的MS基本培养基上,1~3 d之内,切段逐渐膨大,此后在切口两端便有芽的直接发生。经过继代培养,幼芽逐渐长大,并有须根产生,形成试管苗(图1-4)。当试管苗长大后,将其移栽入土,并注意保温、保湿1周,精心管理下部分试管苗可移栽成活(图1-5)。

将试管苗的茎或叶作为外植体,接种在愈伤组织诱导培养基上,同样可以诱导出愈伤组织,并再次形成再生植株。

2.4 愈伤组织中金丝桃素的初步检测:取培养于MS附加BA 0.2 mg/L、2,4-D 1 mg/L、CH 500 mg/L培养基的愈伤组织5 g,加石英砂研磨后,20 mL乙醚脱色2次,再用

20 mL 甲醇回流提取 30 min, 取滤液进行蒽醌类化合物的定性鉴定。1) 碱液显色反应: 取甲醇提取液 1 mL, 加入 0.1 mol/L NaOH 液 1 mL, 溶液显紫红色; 2) 醋酸镁显色反应: 取甲醇提取液 1 mL, 加甲醇提取 1/2 体积的醋酸镁, 结果生成红色络合物。初步可证明, 此愈伤组织中有蒽醌类化合物存在<sup>[11]</sup>。

再取愈伤组织甲醇提取液 1 mL, 稀释至 25 mL, 依据文献<sup>[12]</sup>检测金丝桃素类物质的方法, 对稀释液进行扫描(图 2), 可见在 590 nm, 548 nm 处有明显吸收峰, 这与文献<sup>[13]</sup>记载的金丝桃素吸收峰一致。进一步显示了金丝桃素化合物在本实验系统所产生的愈伤组织中存在的可能性。

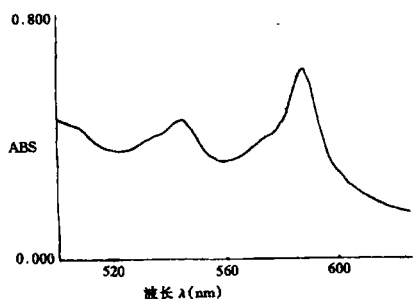


图 2 愈伤组织甲醇提取液扫描图

由此看来, 贯叶连翘愈伤组织形成容易、生长速度快。愈伤组织和外植体都可以产生

不定芽形成再生植株, 并且繁殖系数很高, 因而可以成为野生资源的有力补充。通过初步检测, 认为贯叶连翘愈伤组织中极有可能存在金丝桃素, 为进一步在愈伤组织中提取金丝桃素提供了很好的条件。

#### 参考文献

- 1 Beckmann H. Fortsch Neurol Psychiatr, 1980, 48: 415
- 2 Nahrstedt A. Desch Apoth Ztg, 1984, 124(24): 1213
- 3 Muldner Von H, et al. Arzneim Forsch/Drug Res, 1984, 34(I)(8): 918
- 4 佛山专区第一人民医院, 等. 广东中医, 1962, (4): 30
- 5 上海长征医院, 等. 中华医学, 1973, 53(4): 216
- 6 Lavie, et al. Proc Natl Acad Sci(USA), 1989, 86(15): 5963
- 7 Takahashc, et al. Biophys Res Commun, 1990, 172(1): 149
- 8 Jayasuriya H, et al. J Nat Prod, 1989, 52(2): 329
- 9 Piperopoulos G, et al. J Chromatogr B Biomed Sci, 1997, 695(2): 309
- 10 Lavie G, et al. Transfusion, 1995, 35(5): 392
- 11 张继杰主编. 中药化学(第二版). 北京: 人民卫生出版社, 1993: 206
- 12 Daniel meruel, et al. Proc Nacl Acad Sci(USA), 1988, 85(7): 5230
- 13 孙文基, 等编著. 天然药物成分提取与分离. 北京: 中国医药科技出版社, 1994: 188

(1998-06-18 收稿)

### Studies on Tissue Culture and Plantlet Regeneration of Common St. John'swort (*Hypericum perforatum*)

Xu Yuanhong, Li Farong and Wang Zhezhi (College of Life Sciences, Shanxi Normal University, Xi'an 710062)

**Abstract** Tissue culturing of *Hypericum perforatum* L. from plumular axis and cotyledon explants were studied for the first time in our country. Regenerated individual plantlet could be obtained through callus or explants directly, and some of them could be transplanted successfully. On MS medium supplemented with BA and 2,4-D, the callus was easy to induce and propagated rapidly. Hypericin was possibly present in the callus by initial tests. The regenerated individual plantlets were easy to obtained and its propagate coefficient was high.

**Key words** *Hypericum perforatum* L. tissue culture callus regenerate individual hypericin

### 欢迎订阅 1999 年《中草药》杂志

《中草药》杂志是由国家药品监督管理局主管, 中草药信息中心站、天津药物研究院主办的药学科技学术期刊。月刊, 每月 25 日出版, 从 1999 年 1 月起, 本刊改为 80 页, 内容更加丰富。定价 9.80 元/期。

邮发代号: 6-77 欢迎广大读者到当地邮局办理订阅手续。