

- gene sequence for identification of three ginseng drugs[J]. Biol Pharm Bull, 1997, 20(7): 765-769.
- [11] 曹 晖,刘玉萍,伏见裕利,等.三七及其伪品的 DNA测序鉴别[J].中药材,2001,(6): 398
- [12] 曹 晖,刘玉萍,张绍来,等.塞隆骨原动物高原鼯鼠核基因 18S rRNA序列测定与分析[J].中国中药杂志,2001,26(2): 90-94.
- [13] 陈月琴,屈良鹤,周 惠,等.杜仲原植物 25S rRNA 5' 端序列分析及其分子识别[J].中国中药杂志,1998, 23(12): 707-709.
- [14] 曹 晖,刘玉萍,毕培曦,等.中药半夏的 DNA分析与分子鉴别[A].中国药学杂志编辑部.现代药物分析论坛[C].北京: 新华出版社,2001.
- [15] 中国药典[S].2000年版.一部.
- [16] Wu Z Y, Raven P H. Flora of China[M]. Vol. 24. Beijing: Science Press and St Louis Missouri Botanical Garden Press, 2000.
- [17] 黄燮才,韦家福,陆敏仪.广西中药材标准[S].第 2册.南宁:广西壮族自治区卫生厅,1996.
- [18] 广西中医药研究所.广西药用植物名录[M].南宁:广西人民出版社,1986.
- [19] Sogin M L. Amplification of ribosomal RNA genes for molecular evolution studies[A]. In Innis M, Gelfand D, Sninsky J, et al. eds. PCR Protocols A Guide to Methods and Application [M]. San Diego Academic Press, 1990.
- [20] White T J, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [A]. In Innis M, Gelfand D, Sninsky J, et al. eds. PCR Protocols A Guide to Methods and Application [M]. San Diego Academic Press, 1990.
- [21] Cao H, But P P H, Shaw P C. Methodological studies on genomic DNA extraction and purification from plant drug materials[J]. J Chin Pharm Sci, 1998, 7: 130-136.
- [22] 叶 强.广西多来源药材及混杂品种的调查及考证[M].南宁:广西科技出版社,1989.
- [23] 广西卫生厅.广西中药志[M].南宁:广西人民出版社,1959.
- [24] Hershkovitz M, Hahn W J, Zimmer E A. Ribosomal DNA sequences and plant systematics [OB/OL] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query?bd=GenBank>, 1998-7-26.
- [25] 赵冰.山药栽培新技术[M].北京:金盾出版社,1998.
- [26] 洪德元.植物细胞分类学[M].北京:科学出版社,1990.
- [27] 李竟雄,宋同明.植物细胞遗传学[M].北京:科学出版社,1993.

药用植物粉花绣线菊的组织培养的建立与快速繁殖研究

胡益明,甘烦远*,彭丽萍,郝小江

(中国科学院昆明植物所,云南 昆明 650204)

摘要:目的 建立了粉花绣线菊 *Spiraea japonica* L. f. 愈伤培养系统和快速繁殖方法.方法 通过用 MS 6, 7-V, B₅ 等 3种不同的培养基对粉花绣线菊植株的茎尖、嫩叶、叶柄等不同部位进行愈伤组织诱导和成苗诱导.结果 通过本研究,建立了愈伤培养系统,实现了快速繁殖.结论 MS培养基诱导愈伤效果最好,在 MS+ 2, 4-D 2.0 mg/L+ KT 0.3 mg/L培养基中,幼叶、茎尖、叶柄等外植体均能诱导出愈伤组织,其中以茎尖外植体诱导的效果最好;茎尖外植体在 MS+ 2 mg/L BA+ 0.1 mg/L NAA 能长出丛生苗,将丛生苗转入培养基 1/2 MS+ 0.25 mg/L BA+ 0.5 mg/L NAA 可生根成小苗.

关键词:粉花绣线菊;组织培养;快速繁殖

中图分类号: R282.13 文献标识码: B 文章编号: 0253-2670(2001)11-1030-04

Studies on establishment of calli culture for rapid propagation of *Spiraea japonica*

HU Yi-ming, GAN Fan-yuan, PENG Li-ping, HAO Xiao-jiang

(Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming Yunnan 650204, China)

Abstract Object To establish a calli culture system for the rapid propagation of *Spiraea japonica* L. f. **Methods** Callus and shoot induction were carried out on MS, 6, 7-V or B₅ media with different parts of the plant such as stem tip, tender leaves and petiole as explants. **Results** A calli culture system was established for the rapid propagation of *S. japonica*. **Conclusion** MS cultural medium was found to be most suitable for calli induction. MS with 2.0 mg/L 2,4-D+ 0.3 mg/L KT can induce calli when the explants were used for the induction, with stem tips being the most satisfactory explant. Clusters of seedlings can be induced on MS+ 2 mg/L BA+ 0.1 mg/L NAA and when these seedlings were transferred to 1/2 MS+ 0.25 mg/L BA+ 0.5 mg/L NAA medium, root were developed to give young seedlings. -

Key words *Spiraea japonica* L. f.; callus tissue; rapid propagation

收稿日期: 2001-01-19

基金项目: 国家自然科学基金(30070087)资助;中国科学院资源与生态环境研究重点项目(KZ952-31-108)经费资助

作者简介: 胡益明(1971-),男,湖北人,现为中国科学院昆明植物研究所硕博连读生.研究方向: 中药重要成分的生物合成. E-mail Hyiming@yaho.com

* 通讯联系人 Tel: 0871-5223111

粉花绣线菊 *Spiraea japonica* L. f. 又名土黄连、火烧尖,为蔷薇科绣线菊属植物。落叶灌木,高达 1.5 m。根、叶、果实都可入药。民间常用于通经、通便、利尿、止咳、明目、镇痛,主治月经不调、痢疾、咳嗽、头痛、慢性脊髓炎等疾病^[1]。

粉花绣线菊的化学成分研究起于 1964年,前苏联学者 Frolova 等人报道了该植物中的二萜生物碱,此后至今一直有对此植物化学成分的报道。从报道的结果看,其化学成分皆为 atisine 和 hetisine 型生物碱^[2]。我们课题组自 1987年开始对该植物的化学成分进行了系统的化学研究,从中分离得到了 26 种新的 atisine 型二萜生物碱和 7 个新的 atisine 型二萜。经药理实验证明这些二萜生物碱和二萜都有一定的抗血小板凝集 (anti-PAF) 作用^[3]。我们已先后报道了生物碱 spiramine Q 的 anti-PAF 和抗炎活性^[4],生物碱 spiramine T 的神经保护作用^[5]。

为了研究二萜生物碱的生物合成途径,扩大这类二萜生物碱的来源,我们进行该植物的组织培养的研究。试图通过建立各种组织培养体系,利用生物技术、饲喂前体,来弄清二萜生物碱生物合成途径。作者用 MS 6, 7-V、B₅ 等 3 种不同的培养基粉花绣线菊植株的茎尖、嫩叶、叶柄等不同部位进行愈伤组织诱导,首次成功地诱导了该植物愈伤组织,并考察了各种培养因子的作用与影响,确定了最佳培养基;同时还实现了该植物的快速繁殖。粉花绣线菊的组织培养工作国内外未见报道,本文初次报道这一工作。

1 材料和方法

1.1 材料:取自昆明市西山,由中国科学院昆明植物所植物园的龚洵副研究员鉴定。

1.1.1 无菌外植体的来源:取茎段、茎尖、叶柄或鲜嫩叶片加洗衣粉漂洗 30 min,自来水冲洗 3 次后用蒸馏水洗 3 次。在超净工作台上用 70% 酒精消毒 1 min,0.2% HgCl₂ 消毒 5 min,无菌水冲洗多次。叶片剪成 0.5 cm×0.5 cm 大小,茎段及叶柄剪成 0.5~1 cm 长。

1.1.2 所有的培养基均经 121℃,0.1 MPa 消毒 20 min。

1.2 方法

1.2.1 丛生芽的诱导与增殖:将上述茎尖、叶柄、叶片等外植体按 5 片 (或个) 瓶,分别接种到 3×15 瓶 (50 mL 小三角瓶) MS 6, 7-V、B₅ 3 种基本培养基中,这三种培养基中,都添加 2 mg/L BA 和 0.1 mg/L NAA, 3% 蔗糖, 0.7% 琼脂粉, pH 5.8, 培养

温度为 23℃~27℃,光照 10~12 h/d,光强 2 000 lx。30 d 后,选择长势良好的小苗,转入增殖培养基 MS+ 0.25 mg/L BA+ 0.1 mg/L NAA。

1.2.2 生根培养与试管苗的移栽:将在芽增殖培养基中正常生长的新芽切下,转至培养基 1/2 MS+ 0.25 mg/L BA+ 0.5 mg/L NAA 中,光照 30 d 后。试管苗出瓶前 3 d,打开瓶塞在培养室内进行炼苗后,植入过渡栽培基质。30 d 后,移栽至温室培养。

1.2.3 愈伤组织的诱导培养:

1) 基本培养基的考察:选择 3 种常见的培养基 MS 6, 7-V、B₅ 附加 2, 4-D 2.0 mg/L+ KT 0.3 mg/L,将上述不同部位的外植体按 5 片 (或个) 瓶混合均匀地接入 3×15 瓶中 (50 mL 小三角瓶装 25 mL 相应的培养基) 进行处理。重复 3 次。与丛生芽的诱导中所使用的条件不同的是一暗培养,不需光照。培养 30 d,统计外植体的诱导情况。

2) 不同部位的外植体的诱导效果考察:上述不同部位的外植体按 5 片 (或个) 瓶,按类别接入培养基 MS 附加 2, 4-D 2.0 mg/L+ KT 0.3 mg/L,每类外植体都接 15 瓶,其它条件同上。培养 30 d,统计外植体的诱导情况。重复 3 次。

3) 不同激素对比对愈伤的诱导:用茎尖作外植体,MS 为基本培养基,改变不同激素的配比,培养 30 d,统计外植体的诱导情况。重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 基本培养基的选择:由表 1 可看出,MS 培养基最适合愈伤的诱导,诱导率达 80%; 6, 7-V 次之,诱导率为 33.3%; B₅ 培养基最差,诱导率为 24%。MS 培养基为富集元素平衡培养基,有较高含量的氮盐,适于外植体的脱分化。B₅ 培养基为 KNO₃ 含量高的培养基,而它的诱导效果比 6, 7-V 差,说明:愈伤诱导不仅需要较高含量的氮盐,而且 NH₄⁺ / NO₃⁻ 比例要高 (MS 培养基 NH₄⁺ / NO₃⁻ 比是 20.62/39.41 总氮量是 60.03 mmol/L,而 B₅ 培养基相应是 2.00/25.00, 27.03; 6, 7-V 培养基相应是 1.514/7.914, 9.4)。一般来说,还原态氮 (NH₄⁺) 对外植体的脱分化成愈伤组织有利,且不能被硝态氮 (NO₃⁻) 所代替。

表 1 不同培养基对粉花绣线菊愈伤诱导的影响 %

	培养基		
	MS	6, 7-V	B ₅
外植体的诱导率	80	33.3	24

2.2 不同部位的外植体的诱导效果不同。在 MS 附加 2, 4-D 2.0 mg/L 和 KT 0.3 mg/L 培养基中,幼

叶、茎尖、叶柄等外植体均能诱导出愈伤组织,其中以茎尖外植体诱导的效果最好。具体情况见表 2 因此,本实验选用茎尖作为外植体来诱导愈伤组织。

表 2 不同的部位的愈伤诱导率 %

	幼叶	叶柄	茎尖
诱导率	23.3	35.6	80

2.3 不同激素对比对愈伤的诱导: 用茎尖作外植体, MS为基本培养基, 附加不同配比激素组合, 培养 30 d, 诱导情况见表 3 从表中可看到: 激素对愈伤的形成有重要的影响。2,4-D对愈伤的形成有很强的诱导能力, 而 IAA, NAA 不能诱导出愈伤组织, 但较高的浓度的 2,4-D易使外植体严重褐化而死亡。KT对愈伤的诱导起重要作用, 但高浓度的 KT不利于愈伤的形成。因此, 2,4-D 2.0 mg/L和 KT 0.3 mg/L激素配比最适合愈伤的诱导(图 1)



图 1 粉花绣线菊的愈伤组织

2.4 激素对丛生芽的诱导与增殖影响: 上述 3种外植体在 MS+ NAA 0.1 mg/L+ BA 2.0 mg/L培养基以及光照条件下均能诱导出苗, 其中, 茎尖外植体诱导效果最好。外植体 7 d后小芽萌发, 15 d后并生丛生芽但产生玻璃化现象。调整激素配比将 BA由 2 mg/L降低到 0.25 mg/L, 即转入 MS附加 NAA 0.1 mg/L到 BA 0.25 mg/L培养基中, 玻璃苗消失呈正常生长。形成玻璃化苗的原因, 作者推测有以下 3点: (1) 6-BA的浓度过高, 促使嫩苗产生不正常的脱分化, 因而使幼苗叶片形成不正常的气孔和保卫细胞, 易形成玻璃化苗; (2) 据文献报道^[6], 培养基中的氨态氮过高是导致玻璃苗产生和加剧的重要因素之一。而 MS培养基属高含氮的培养基, 易产生玻璃苗; (3) 小瓶的有限容积, 使得瓶内的乙烯过饱和而诱导了玻璃化苗的形成。Kervers等^[7]的实验表明, 苹果砧木等的玻璃苗是由于过氧化物酶-吲哚乙酸氧化酶系统控制的乙烯过饱和的影响, 并认为细胞激动素或 NH₄⁺ 离子的过剩是一种最初的胁迫,

受胁迫的试管苗在乙烯过剩的空气中, 抑制了乙烯的生物合成, 结果降低苯丙氨酸解氨酶(PAL)和酸性过氧化物酶的活性, 从而妨碍了组织木质化, 导致形成玻璃苗。因此, 降低 6-BA的浓度, 转入到新的培养基中, 可抑制玻璃化苗的产生。

表 3 不同浓度配比的 2,4-D和 KT组合以及

IAA NAA和 KT组合的愈伤诱导率 %		KT (mg/L)						
(mg/L)		0.1	0.2	0.3	0.5	0.6	0.9	1
2,4-D	1.0	—	12.5	25	16.7	13.3	12.5	9.4
	1.5	14.8	30.7	67.5	37.5	37.5	49.5	23.7
	2.0	53.2	66.7	80	72.5	75.5	66.6	33.6
	3.0	23.5	39.5	61.5	56.5	54.5	24.6	9
	5.0	—	—	11	9.8	7.6	—	—
	7.0	—	0	0	0	0	0	0
	IAA	2.0	0	—	—	—	—	0
NAA	2.0	0	0	—	—	—	0	0

—表示很少, 难以统计

2.5 生根培养与试管苗的移栽: 将在丛生芽增殖培养基中正常生长的新芽切下, 转至培养基 1/2 MS+ 0.25 mg/L BA+ 0.5 mg/L NAA中, 光照 10 d左右, 芽切口出现根, 生成小苗(图 2), 30 d后植株生长粗壮, 生根率达 80%, 每株生根 3~ 8条。试管苗出瓶前 3 d, 打开瓶塞在培养室内进行炼苗后, 植入过渡栽培基质。栽培基质为珍珠岩混有少量腐殖土。30 d后, 可移栽至温室培养。由于 2,4-D很容易引起愈伤组织的形成, 所以避免用 2,4-D, 改用 IAA, NAA 而 IAA在培养基中不稳定, 所以选择用

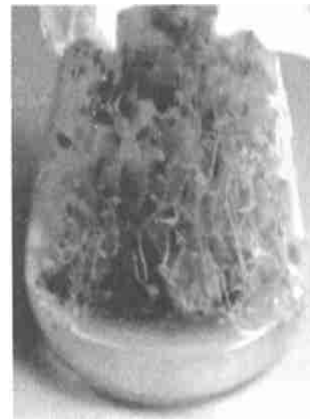


图 2 已长出的试管苗

NAA^[8]。高浓度的 6-BA有利于诱导丛生芽, 但浓度太高, 易诱发玻璃苗。诱导丛生芽以 6-BA和 NAA组合效果较好^[9]。较高浓度的 NAA, 能促进根的萌发, 但重要的是细胞生长素与细胞分裂素的合理配比^[10]。实验还表明^[8], 低盐培养基有利于生根。因此采用 1/2 MS培养基 减少蔗糖的含量有利于生根, 所以生根培养时, 蔗糖浓度为 1.0%~ 1.5%^[8]。光照有

利于生根,增加光照强度,能刺激植株产生通过光合作用而进行自养的能力^[8]。因此,需要 3 000 lx 的光强,并且日照时间为 16 h/d 有利于炼苗。移栽之前,要进行预栽培,要保持一定的温度、光照和湿度。这样能提高成活率。成活率可达 83% 以上。

3 小结

从当前的趋势来看,组织培养应用于制药主要有两个领域:(1)生产天然的植物成分;(2)外供化合物的生物转化。我们现已建立了粉花绣线菊的组织培养系统,下一步是借助它,通过饲喂前体,弄清二萜生物碱的生物合成途径。从而达到大量生产的目的。同时,粉花绣线菊的变异性强,品质不稳定,我们建立的快繁技术可帮助大量生产。另外,我们还可以利用愈伤组织诱导生成体细胞胚,进行种质保存。相关的进一步研究工作正在进行之中。

参考文献:

- [1] 江苏新医学院. 中药大词典 [M]. 上海:上海科学技术出版社, 1978-1979, 1992
- [2] 郝小江, 聂晶磊, 孙航, 等. 粉花绣线菊复合群的化学分类 [J]. 云南植物研究, 1997, 19(3): 297-303.
- [3] Wang B G, Li L, Yang X S, et al. Three new diterpene alkaloids from *Spiraea japonica* [J]. Heterocycles, 2000, 53: 1343-1350.
- [4] Shen Z Q, Chen Z H, Li L, et al. Antiplatelet and antithrombotic effects of the diterpene spiramine Q from *Spiraea japonica* [J]. Planta Medica, 2000, 66: 287-289.
- [5] Li L, Nei J L, Shen Z Q, et al. Neuroprotective effects in Gerbils of spiramine T from *Spiraea japonica* [J]. Planta Medica, 2001, 67(2): 142-145.
- [6] 卜学贤, 陈维伦. 试管苗的玻璃化现象 [J]. 植物生理学通讯, 1987(5): 13-18.
- [7] Kevers C. Th. Gasp Soluble membrane and wall peroxidases phenylalanine ammonia-lyase and lignin changes in relation to vitrification of camation tissue cultured in vitro [J]. J Plant Physiology, 1998, 118: 41-48.
- [8] 李浚明. 植物组织培养教程 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1996.
- [9] 黄健秋, 卫志明. 松属树种的组织培养和原生质体培养 [J]. 植物学通报, 1994, 11(1): 34.
- [10] 颜昌敬. 植物组织培养手册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1990.

良种银杏幼苗叶质量分析 (I)

杨义芳, 王 晖, 夏野鹰

(江西省药物研究所, 江西 南昌 330029)

摘要: 目的 进行良种银杏幼苗叶质量分析。方法 采用 HPLC 方法测定银杏叶总黄酮含量。结果 实生苗 6 月份含量明显高于 8 月份与 11 月份, 极显著地高于嫁接苗; 2 岁树龄实生苗总黄酮含量是 50 年树龄的 2.5~3.8 倍。嫁接苗 6 月份高于 8 月份, 雌性高于雄性。结论 活性成分含量与生长季节、树龄、培育方式、生长环境、基地条件等诸因素有关。

关键词: 良种银杏幼苗叶; 银杏黄酮; 高效液相色谱; 质量分析

中图分类号: R282.2 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2001)11-1033-04

Analysis on quality of leaves of improved *Ginkgo biloba* seedling sprout I

YANG Yi-fang, WANG Hui, XIA Ye-ying

(Jiangxi Institute of Materia Medica, Nanchang Jiangxi 330029, China)

Abstract Object To examine the quality of leaves from the improved *Ginkgo biloba* L. seedling sprout. **Methods** Total flavonoids in the leaves were determined by HPLC. **Results** Flavonoids in the leaves of seedling sprout were apparently higher in June than in August and November, and were much higher than grafting seedling sprout which was also higher in June than in August. 2-year-old tree contained 2.5 to 3.8 times more flavonoids than 50-year-old tree. The content of female trees were higher than that of male. **Conclusion** The content of active flavonoids were related to the season, age, breeding, environment and geographic conditions, etc.

Key words leaves from improved *Ginkgo biloba* L. seedling sprout; flavonoids; HPLC; quality analysis

银杏叶 *Ginkgo biloba* L. 产品风靡全球, 在我国就有数十种之多, 银杏叶提取物干浸膏生产企业