

生长及代谢没有显著影响。细胞增殖及其次生代谢物的合成需大量的能量及营养成分,所以在培养基成分已有部分消耗的情况下于对数期及时将细胞继代到新鲜培养基能补充细胞所需营养,为细胞的迅速增殖及紫杉醇合成提供有利条件。

References

[1] Fett-Neto A G, Zhang W Y, Dicosmo F. Kinetics of taxol production, growth and nutrient uptake in cell suspensions of *Taxus cuspidata* [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1994, 44 (2): 205-210.
[2] Schlattmann J E, Moreno P R H, Selles M, *et al.* Two-stage batch process for the production of A. jamaicensis by *Catharanthus roseus*. The link between growth and production stage [J]. *Biotech Bioeng*, 1995, 47: 53-59.
[3] Wang H Q, Zhong J J, Chen X F, *et al.* Kinetic study on

suspension cultures of *Taxus chinensis* for production of anti-cancer drug taxol [J]. *J East China Univ Sci Technol* (华东理工大学学报), 1997, 23 (6): 679-683.
[4] Zhang Z L. *Experiment Guide of Plant Physiology* (植物生理学实验指导) [M]. Beijing: High Education Publishing House, 1990.
[5] Wang D I C, Conney C L. *Fermentation and Enzyme Technology* [M]. New York: John Wiley & Sons Inc, 1979.
[6] Wang C G, Wu J Y, Mei X G. Enhanced taxol production and release in *Taxus chinensis* cell suspension cultures with selected organic solvents and sucrose feeding [J]. *Biotechnol Prog*, 2001, 17 (1): 89-94.
[7] Hu P, Yuan Y J, Miao Z Q. Effects of fed-batch carbohydrate, nitrogen, phosphorus on growth of *Taxus chinensis* var. *mairei* cell during suspension culture [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33 (1): 28-31.
[8] Mei X G, Huang W, Wang C G. Production of taxol by two-phase culture *Taxus* cell suspension [J]. *Biotechnology* (生物技术), 2000, 10 (1): 10-12.

青蒿素的组织化学定位及其含量相关性研究

朱卫平¹, 盛孝邦²

(1. 湖南农业大学理学院, 湖南 长沙 410128; 2. 湖南农业大学农学院, 湖南 长沙 410128)

摘要: 目的 确定青蒿素储存部位并为高青蒿素含量黄花蒿植株筛选提供选择指标。方法 应用组织化学方法确定青蒿素的储存结构,应用统计学方法确定储存结构腺毛状分泌腺密度与青蒿素含量的相关性。结果 青蒿素储存于腺毛状分泌腺(BGT)和T型网状分泌腺(NTFT)中,在叶中腺毛状分泌腺的密度与青蒿素含量正相关。结论 腺毛状分泌腺密度可作为高青蒿素含量黄花蒿育种筛选指标。

关键词: 黄花蒿;青蒿素;腺毛状分泌腺;组织化学
中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 0253- 2670(2003) 09- 0852- 03

Correlation between histochemical location and content of artemisinin

ZHU Wei-ping¹, SHENG Xiao-bang²

(1. College of Sciences, 2. Agronomy College, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract **Object** To determine the histochemical location deposited artemisinin and to provide selection character for screening of *Artemisia annua* L. which contains rich content of artemisinin. **Methods** Artemisinin was located by the histochemical method and then statistical method was used to ascertain the correlation between the content of artemisinin and the density of biseriate glandular trichomes (BGT). **Results** Artemisinin is located in both BGT and nonglandular T-shaped filamentous trichomes (NTFT) in *A. annua* leaves. The content of artemisinin had a positive correlation with the density of BGT in *A. annua* leaves. **Conclusion** High density of BGT in foliar tissue might be considered as one of the selection characters for the screening of *A. annua* with rich content of artemisinin.

Key words *artemisia annua* L.; artemisinin; biseriate glandular trichome (BGT); histochemistry

青蒿素 (artemisinin)是我国科技工作者从黄花蒿中分离并鉴定的有效抗疟单体成分,为世界卫生组织推荐的抗疟药品^[1,2]。目前,青蒿素类药物主要

依靠我国从天然黄花蒿中提取。野生黄花蒿已远远不能满足生产的需要,许多地方开始栽培。培育高青蒿素含量的优质黄花蒿新品种,能够成倍提高生产

(20) 收稿日期: 2002-11-26
基金项目: 湖南省科技厅资助项目 (00NKY2013, 01JZY2024)
作者简介: 朱卫平 (1962-),男,湖南双峰人,讲师,博士,研究方向为药用植物的种质资源的研究与利用和遗传育种。
Tel (0731) 4635161 E-mail wpzhu51@ Yahoo.com.cn

效益 为此我们应用组织化学方法,确定青蒿素的储存部位,并且研究储存结构密度与青蒿素含量的相关性,为高青蒿素含量的黄花蒿选育提供快速、有效的选择依据

1 材料与方法

1.1 材料:黄花蒿种子由吉首制药厂提供。2000年3月上旬播种于湖南农业大学实验基地,4月下旬移栽。密度为 $60\text{ cm} \times 70\text{ cm}$ 9月下旬选取盛蕾期果枝上已充分伸展的叶片,进行青蒿素组织化学定位,同时割取整株黄花蒿用于青蒿素含量的测定

1.2 青蒿素的组织化学定位

1.2.1 原理:青蒿素不溶于水,是一种具有过氧桥的倍半萜内酯,其过氧桥具有氧化性质,在酸性条件下释放出活性氧将碘化物氧化而产生游离碘。利用青蒿素不溶于水和氧化碘化物产生游离碘的特性,在酸性环境里让青蒿素在储存部位与碘化钾反应游离出碘,然后用淀粉作为指示剂与碘反应显蓝色来指示青蒿素的储存部位。

1.2.2 方法:任选盛蕾期黄花蒿 30株,每株取充分伸展的果枝上的叶片 5片,放入 10 mL 磨口试管中,加 2.5 mol/L 硫酸 2.5 mL,加用重蒸馏水新配的饱和 KI 溶液(分析纯,不得有游离碘) 1 mL 将试管口塞紧并轻轻摇匀,于 42°C 水浴避光恒温 4h 取出后避光冷却至室温,用蒸馏水洗 3次,每次 5 min,将多余的 KI 洗去。加入预先配制好的 2% 淀粉溶液 3~4 mL 2 h 后取出,在 Olympus BH-2 透射显微镜下观察拍照,并用网纹测微尺测定腺毛状分泌腺密度,每株测定 5片叶片,每叶片测定 5个视野,取平均值计算其密度

1.3 青蒿素测定

1.3.1 提取:在组织化学取样时,同时割取植株的地上部分,阴干,脱下叶和少量花蕾,并充分混匀。取约 10 g 叶和花蕾混合体, 50°C 烘干至恒重,充分研磨成细粉,过 60目筛。准确称取粉末 1 g,置反应器中加入石油醚 ($30^\circ\text{C} \sim 60^\circ\text{C}$) 30 mL,于 45°C 水浴锅中恒温浸提。每 24 h 更换一次溶剂,提取至溶剂无色。提取结束后,合并滤液置于分液漏斗中,加入 2% NaOH 溶液洗去碱溶性部分,弃去下层碱液后,以蒸馏水洗涤至中性。经水洗后的提取液置于圆底烧瓶中 55°C 减压蒸馏,得到含青蒿素的浸膏。再以 95% 乙醇溶解浸膏,并定容于 50 mL 容量瓶中备测^[3]。

1.3.2 测定:紫外分光光度法,参照文献进行^[4]。

2 结果

2.1 青蒿素储存位点组织化学定位:黄花蒿叶片中存在两种分泌腺,一种为腺毛状的分泌腺,由 10个细胞构成,2个柄细胞,8个腺毛状细胞,排成 2列,成熟时呈囊状^[5](图 1,2) 另一种为非腺毛状的 T-型网状分泌腺,由管状腺细胞构成(图 1) 组织化学反应后,这两种分泌腺均显蓝黑色,或有蓝黑色颗粒存在,表明均有青蒿素的存在,其他结构中未观察青蒿素的存在

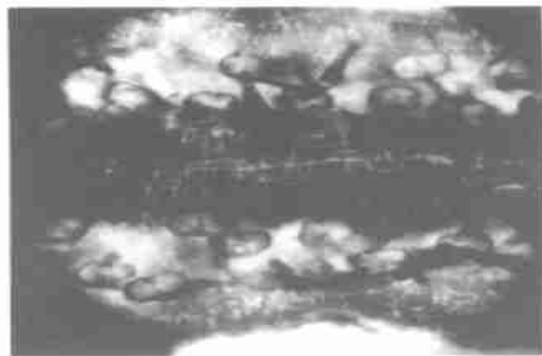


图 1 储存于 BGT 和 NTFT 中的青蒿素

Fig. 1 Artemisinin deposited in BGT and NTFT



图 2 BGT 中储存大量青蒿素

Fig. 2 Mass artemisinin deposited in BGT

2.2 腺毛状分泌腺密度与青蒿素含量的关系:腺毛状分泌腺密度及相应植株的青蒿素含量测定结果按腺毛状分泌腺密度由小到大排如表 1 从表 1 可以看出,黄花蒿叶片中腺毛状分泌腺密度与黄花蒿的青蒿素含量呈显著正相关 ($r = 0.62$),在选育高青蒿素含量黄花蒿时可作为一个选择指标

3 分析与讨论

3.1 关于青蒿素的储存部位:确定青蒿素的合成和储存部位是研究青蒿素生物合成的基础。Duke 等^[5]用扫描电镜和透射电镜观察了黄花蒿 *A. annua* L. 叶片表面由 2列共 10个细胞组成的腺毛状分泌腺,并对其发育过程进行了研究。Duke 等^[6]的研究证实腺毛状分泌腺与青蒿素的储存密切相关,因为用有机溶剂很快地浸提有腺毛状分泌腺的叶片不损伤叶

表 1 腺毛状分泌腺密度与青蒿素含量
Table 1 Results of BGT density and artemisinin content

编号	腺毛状分泌腺 /mm ²	青蒿素含量 %	编号	腺毛状分泌腺 /mm ²	青蒿素含量 %	编号	腺毛状分泌腺 /mm ²	青蒿素含量 %
1	41. 6	0. 369	11	69. 1	0. 770	21	86. 4	0. 787
2	48. 0	0. 625	12	73. 6	0. 519	22	88. 3	1. 290
3	54. 5	0. 599	13	73. 6	1. 061	23	88. 9	0. 568
4	54. 4	0. 764	14	73. 6	0. 943	24	89. 6	0. 944
5	57. 6	0. 673	15	76. 2	1. 079	25	89. 6	1. 063
6	60. 8	0. 629	16	80. 0	0. 992	26	96. 0	0. 955
7	64. 0	0. 560	17	81. 9	0. 672	27	96. 1	0. 734
8	64. 0	0. 831	18	81. 92	0. 945	28	111. 3	1. 018
9	67. 2	0. 796	19	83. 2	0. 981	29	115. 2	1. 029
10	67. 2	0. 598	20	83. 2	0. 897	30	128. 0	1. 055

表皮,能得到青蒿素及前体,浸提无腺毛状分泌腺的叶得不到青蒿素及其前体 Ferreira等^[7]在研究黄花蒿开花过程中,发现黄花蒿组织中含有两种分泌腺,一种为非腺毛状 T型网状分泌腺,另一种为腺毛状的分泌腺,并且认为青蒿素在花中的大量积累与腺毛状分泌腺在花中大量生成密切相关。然而 Weathers等^[8]和 Liu等^[9]的研究显示腺毛状分泌腺可能不是青蒿素唯一的储存位点,因为在不含腺毛状分泌腺的毛状根中检测到了高含量的青蒿素存在。综上所述,目前对于青蒿素的储存部位各研究者还不尽一致,多数学者认为存在于腺毛状的分泌腺中,而且都是间接的证据。笔者应用组织化学的方法,直接显示青蒿素的储存部位。结果显示在腺毛状分泌腺和非腺毛状的 T型网状分泌腺均有青蒿素的存在,并推测这两种结构也是青蒿素合成的主要部位。

3.2 腺毛状分泌腺密度与青蒿素含量的关系:从表 1可以看出,黄花蒿叶片中腺毛状分泌腺密度与叶片中青蒿素含量呈正相关($r=0.62$),但不成比例关系,有的甚至出现相反的情况。出现此现象可能有两个原因:一是青蒿素不仅存在腺毛状分泌腺中,还存在于非腺毛状的 T型网状分泌腺中,因此青蒿素的含量还与此结构有关(另文报道);二是不同黄花蒿植株叶片中的腺毛状分泌腺所储存的青蒿素的量存在差异,如图 2中的腺毛状分泌腺所储存的青蒿素的量明显比图 1中的要多,造成这一差异的原因可

能与取样时不同单株的腺毛状分泌腺的生理成熟程度存在差异有关。因此在选育高青蒿素含量黄花蒿时,叶中腺毛状分泌腺密度可以作为一个参考指标,淘汰一部分低青蒿素含量的单株。

References

[1] Coordinating Group for Research on the Structure of Qing-haosu. A novel kind of sesquiterpene lactone - artemisinin [J]. *Sci Bull* (科学通报), 1977, 22: 142.

[2] Klayman D L. Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China [J]. *Science*, 1985, 228: 1049-1055.

[3] Zhao B, Wang Y C, Wu J, *et al.* Studies on the extraction processes of artemisinin [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31 (6): 421-423.

[4] Shen X K, Yan K D, Luo Z Y. Determination of artemisinin content by ultraviolet meter [J]. *Chin Pharm Anal* (药物分析杂志), 1983, 3: 24-26.

[5] Duke S O, Paul R N. Development and fine structure of glandular trichomes of *Artemisia annua* L. [J]. *Int J Plant Sci*, 1993, 154 (1): 107-118.

[6] Duke M V, Paul R N, Elsohly H N, *et al.* Localization of artemisinin and artemisitene in foliar tissues of glanded and glandless biotypes of *Artemisia annua* L. [J]. *Int J Plant Sci*, 1994, 155 (3): 365-372.

[7] Ferreira J F S, Janick J. Floral morphology of *Artemisia annua* with special reference to trichomes [J]. *Int J Plant Sci*, 1995, 156 (6): 807-715.

[8] Weathers P J, Cheetham R D, Follansbee E, *et al.* Artemisinin production by transformed roots of *Artemisia annua* [J]. *Biotech Lett*, 1994, 16: 1281-1286.

[9] Liu B Y, Ye H C, Li G F, *et al.* Studies on dynamics of growth and biosynthesis of artemisinin in hairy roots of *Artemisia annua* L. [J]. *Chin J Biotech*, 1999, 14 (4): 249-254.