

表 2 当归药材指纹图谱共有峰的相对峰面积

Table 2 Relative peak areas of common peak for fingerprint of *A. sinensis*

批号	相 对 峰 面 积																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	S	17	18
1	0.439	0.324	0.113	0.556	0.064	0.416	0.096	0.115	0.052	0.058	0.057	0.090	0.436	3.558	0.286	0.077	1.000	0.063	0.089
2	0.648	0.320	0.152	0.832	0.090	0.513	0.147	0.190	0.092	0.076	0.097	0.175	0.526	4.411	0.358	0.116	1.000	0.092	0.120
3	0.591	0.212	0.128	0.713	0.075	0.482	0.100	0.132	0.050	0.053	0.065	0.115	0.443	3.874	0.377	0.076	1.000	0.075	0.100
4	0.692	0.229	0.055	0.534	0.038	0.293	0.073	0.063	0.081	0.021	0.032	0.216	0.425	5.635	0.194	0.174	1.000	0.392	0.197
5	0.453	0.330	0.125	0.631	0.059	0.412	0.099	0.132	0.053	0.060	0.043	0.075	0.412	3.123	0.271	0.084	1.000	0.071	0.068
6	0.509	0.145	0.123	0.575	0.081	0.371	0.100	0.096	0.040	0.064	0.053	0.018	0.331	1.084	1.199	0.093	1.000	0.062	0.098
7	0.572	0.241	0.097	0.502	0.067	0.528	0.129	0.124	0.059	0.077	0.078	0.271	0.365	3.083	0.292	0.173	1.000	0.393	0.205
8	0.463	0.259	0.150	0.862	0.062	0.555	0.119	0.151	0.070	0.065	0.074	0.025	0.421	4.932	0.411	0.081	1.000	0.177	0.083
9	0.300	0.266	0.205	0.438	0.118	0.720	0.154	0.147	0.136	0.115	0.110	0.737	0.518	3.497	0.448	0.128	1.000	0.075	0.106
10	0.474	0.101	0.125	0.114	0.734	0.049	0.461	0.109	0.093	0.057	0.071	0.063	0.417	5.381	0.349	0.077	1.000	0.180	0.082

表 3 不同产地当归相似度比较

Table 3 Comparison of similarity of *A. sinensis* collected from ten habitats

批号	夹角余弦	相关系数
1	0.995 4	0.994 4
2	0.998 5	0.998 5
3	0.999 0	0.998 9
4	0.992 6	0.994 1
5	0.997 7	0.997 4
6	0.986 0	0.985 1
7	0.987 5	0.987 9
8	0.997 7	0.997 9
9	0.985 0	0.984 0
10	0.994 7	0.997 0

的指纹性。虽然不同产地的当归共有指纹峰面积是有差异的,有的相差还很大。但三地当归相似性很好,说明三地当归总体上是没有差异的。有关当归质量控制与评价方面的进一步研究工作将另文报道。

References:

- [1] Liu J, Burdette J, Xu H, *et al.* Evaluation of estrogenic activity of plant extracts for the potential treatment of menopausal symptoms [J]. *J Agric Food Chem*, 2001, 49: 2472-2479.
- [2] Yin T K, Wu W K. Myocardial protection against ischemic reperfusion injury by a *Polygonum multiflorum* extract supplemented "Dang-Gui decoction for enriching blood", a compound formulation, *ex vivo* [J]. *Phytother Res*, 2000, 14: 195-199.
- [3] Wang H J, Shen X, Yang J, *et al.* Determination ferulic acid in Danggui Buxue Decoction by HPLC [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 1998, 4(5): 9-10.
- [4] Lin L Z, He X G, Lian L Z, *et al.* Liquid chromatographic electrospray mass spectrometric study of the phthalides of *Angelica sinensis* and chemical changes of Z-ligustilide [J]. *J Chromatogr (A)*, 1998, 810: 71-79.
- [5] Xie P S. On the feasibility of application of chromatographic fingerprint identification to herbal medication [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2000, 22(6): 391-394.
- [6] Xie P S. A feasible strategy for applying chromatography fingerprint to access quality of Chinese herbal medicine [J]. *Clin Drug Res Chin Pharm* (中药新药与临床药理), 2001, 12(3): 141-151.
- [7] Cheng Y Y, Chen M J, Wu Y J. Measures for determination the similarity of chemical fingerprint and a method of evaluating the measures [J]. *Acta Chem Sin* (化学学报), 2002, 60(11): 2017-2021.

黄花乌头体细胞胚胎发生及其植株再生

于荣敏^{1,3}, 徐秀泉², 赵 昱^{3*}

(1. 暨南大学药学院, 广东 广州 510632; 2. 江苏大学生物与环境工程学院, 江苏 镇江 212013;

3. 浙江大学药学院, 浙江 杭州 310031)

摘要:目的 对不同植物激素及其配比对黄花乌头体细胞胚胎诱导及植株再生进行研究,为药用植物黄花乌头的资源开发提供理论依据。方法 以黄花乌头的茎、叶、胚轴、胚根和子叶为外植体考察不同植物激素对黄花乌头愈伤组织诱导、体细胞胚胎发生及植株再生的影响。结果 外植体接种于 MS+2,4-D 1 mg/L + 6-BA 0.5 mg/L 的培养基上愈伤组织诱导率最高,愈伤组织在 MS+2,4-D 0.2 mg/L + 6-BA 0.5 mg/L

* 收稿日期:2004-02-07

作者简介:于荣敏(1955-),男,教授,博士,研究方向为中药生物技术、创新药物的研制开发。

的培养基上连续继代几次后,分化出淡绿色具有圆锥状或原球状突起的胚性愈伤组织。胚性愈伤组织能够在 MS + 6-BA 2 mg/L 的培养基上形成不定芽,该芽能够在 MS + IBA 0.5 mg/L 的培养基上生根,形成完整的再生植株。

结论 利用体细胞胚胎发生技术可以成功地得到再生植株,从而为濒危植物黄花乌头的资源开发和保护提供新途径。

关键词:黄花乌头;体细胞胚胎发生;植株再生

中图分类号:R282.13 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2004)08-0932-04

Somatic embryogenesis and plantlet regeneration of *Aconitum coreanum*

YU Rong-min^{1,3}, XU Xiu-quan², ZHAO Yu³

(1. College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 2. College of Biological and Environmental Sciences, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China; 3. College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China)

Abstract : Object To develop new resources of medicinal plant of *Aconitum coreanum* (L. é. l.) Rapaics by the method of plant cell biotechnology. **Methods** The segments of stems, leaves, embryonal axes, radicles, and cotyledon of *A. coreanum* were used as the explants. The MS medium supplied with different auxin and cytokinin was examined. **Results** The calli were induced from explants on the MS medium supplied with 2, 4-D 1 mg/L and 6-BA 0.5 mg/L in the period of 30 d. And the calli were differentiated into green conus or globe embryo after several subcultures period on medium MS supplied with 2, 4-D 0.2 mg/L and 6-BA 0.5 mg/L. The adventitious buds differentiated could be developed from the somatic embryo callus into roots on medium MS supplied with IBA 0.5 mg/L, and then the intact plantlets were obtained. **Conclusion** The plantlets of *A. coreanum* can be obtained by the techniques of somatic embryogenesis and it is indicated that this may be a new way in developing new resource and protecting of *A. coreanum*.

Key words : *Aconitum coreanum* (L. é. l.) Rapaics; somatic embryogenesis; plantlet regeneration

黄花乌头 *Aconitum coreanum* (L. é. l.) Rapaics 俗称山喇叭花,为毛茛科乌头属多年生草本药用植物。其块根关白附入药,具有祛风、燥湿、化痰止痛之功效。中医临床主治中风、口眼歪斜、头痛、癫痫、风寒失痹等^[1]。多年研究表明关白附中生物碱类成分具有较好的抗心律失常、镇痛、抗炎、抗血小板凝聚等药理作用。其中关附甲素由于具有明显的抗心律失常作用而被称为“特异性减慢心率药”(specific bradycardic agent)^[2],有望成为我国具有独立知识产权的国家一类新药。但是近年来由于人为恶性采伐,天然资源遭到严重破坏,加之其天然无性繁殖力低下,易受真菌、病毒感染,少根、腐根情况日益严重,产量急剧下降,故新药开发面临着原材料供应上的短缺局面。

本实验在前文^[3]工作的基础上,研究了以黄花乌头的茎、叶、幼苗为外植体,经组织培养筛选出胚性愈伤组织,进而获得完整的小植株,建立了一套高效的胚状体再生体系,为黄花乌头的快速繁殖和细胞工程奠定了基础。

1 材料与方法

黄花乌头块根采自沈阳药科大学药用植物园,

在培养室中用含有 GA (gibberellic acid, 100 mg/L) 和 MS (Murashige and Skoog, 1962) 培养基大量元素的溶液连续浇灌 30 d, 块根解除休眠, 获得新生成的嫩茎和叶片。

黄花乌头种子用含有 GA (100 mg/L) 的温水 (24 ℃) 浸泡 72 h, 用 2.5% NaClO₄ 溶液消毒 20 min, 接种到 MS 培养基上, 30 d 后长出约 2~3 cm 的无菌苗。

1.1 愈伤组织的诱导与筛选: 本实验用正交设计综合考察了植物激素对黄花乌头嫩茎愈伤组织诱导的影响, 在 MS 培养基中添加 4 种不同浓度的植物激素, 实验设计 [L₉(3⁴)] 见表 1。

表 1 正交设计表中的激素水平

水平	因 素			
	2, 4-D /(mg L ⁻¹)	6-BA /(mg L ⁻¹)	NAA /(mg L ⁻¹)	KT /(mg L ⁻¹)
1	0	0	0	1
2	1	0.5	2	0.2
3	2	1	4	0.5

将黄花乌头的嫩茎、叶片、侧根, 无菌苗的胚根、胚轴、子叶, 接种于附加 2, 4-D 1 mg/L, 6-BA 0.5

mg/L 的 MS 固体培养基上培养。将获得的愈伤组织转移至 MS + 2,4-D 0.2 mg/L + 6-BA 0.5 mg/L 的培养基上连续继代,获得胚性愈伤组织。除另有说明外,本实验培养条件均为 23 ~ 25 ℃,暗培养 30 d 后统计其愈伤组织诱导率。

1.2 体细胞胚的分化及其植株再生:将胚性愈伤组织转移到 MS + 6-BA 2 mg/L 培养基上诱导不定芽。不定芽在 MS + IBA 0.5 mg/L 的培养基上生根。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的诱导及培养:正交设计直观分析,以愈伤组织诱导率为指标,4 种植物激素对黄花乌头嫩茎脱分化影响力大小依次是:6-BA > 2,4-D > NAA > KT,较好的组合为 6-BA 和 2,4-D(表 2)。在细胞分裂素质量浓度一定的情况下,如培养基中生长素的质量浓度过高,愈伤组织诱导率显著下降,如 7 号实验组 2,4-D 2 mg/L, NAA 4 mg/L 时,诱导率仅为 28.6%。在一定质量浓度的生长素存在下,6-BA 具有较显著的促进愈伤组织生成的作用。本研究选择愈伤组织诱导时的激素质量浓度为 2,4-D 1 mg/L, 6-BA 0.5 mg/L,继代培养、胚性愈伤组织筛选时的激素质量浓度为 2,4-D 0.2 mg/L, 6-BA 0.5 mg/L。

表 2 正交设计中植物激素对愈伤组织诱导的影响

Table 2 Effect of phytohormones on callus induction of *A. coreanum* in orthogonal design

编号	2,4-D /(mg L ⁻¹)	6-BA /(mg L ⁻¹)	NAA /(mg L ⁻¹)	KT /(mg L ⁻¹)	诱导率 /%
1	0	0	0	0	0
2	0	0.5	2.0	0.2	44.4
3	0	1.0	4.0	0.5	73.3
4	1	0	2.0	0.5	58.7
5	1	0.5	4.0	0	77.8
6	1	1.0	0	0.2	84.6
7	2	0	4.0	0.2	28.6
8	2	0.5	0	0.5	44.6
9	2	1.0	2.0	0	54.2
j	117.7	86.9	129.0	132	
j	220.7	166.6	156.9	157.6	
j	127.2	212.1	179.7	178	
Ri	103	125.2	50.7	46	

将黄花乌头的嫩茎、叶片、侧根,无菌苗的胚根、胚轴、子叶,接种于附加 2,4-D 1 mg/L, 6-BA 0.5 mg/L 的 MS 固体培养基上,在(23.5 ± 1) ℃ 培养 28 d,获得白色、表面光滑、向四周扩散生长的愈伤组织。但不同外植体愈伤组织的诱导率有显著差异:胚轴诱导率最高(100%),侧根诱导率为 0,结果见图 1。

将获得的愈伤组织转移至 MS + 2,4-D 0.2 mg/L + 6-BA 0.5 mg/L 的培养基上连续继代两次后形

成淡黄色或淡绿色、生长紧密、分散性较差、表面有圆锥状或球状突起的愈伤组织,这些圆锥状或球状的突起较容易从愈伤组织表面脱落,在 MS 基本培养基上单独培养这些颗粒,可部分获得再生植株,因此可认定这些愈伤为胚性愈伤组织(图 2)。

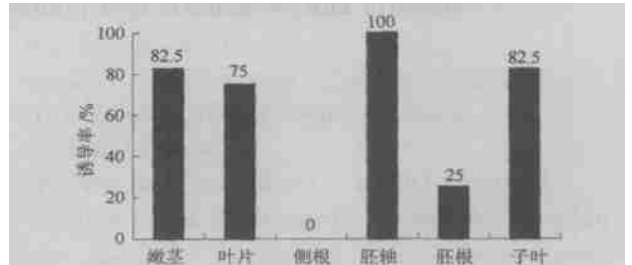


图 1 不同外植体对愈伤组织诱导的影响

Fig. 1 Effect of different explants on callus induction of *A. coreanum*



图 2 胚性愈伤组织

Fig. 2 Callus from embryoid of *A. coreanum*

2.2 体细胞胚胎分化及其植株再生:将上述胚性愈伤组织转接到附加 6-BA、NAA 的 MS 培养基中,在 1 000 ~ 1 500 lx 光照强度下培养 10 d 左右,上面的突起膨大,变为绿色,且在其基部又有突起生成,30 d 后,形成丛生的不定芽。在不同 6-BA、NAA 配比的培养基上胚性愈伤组织的分化情况有所不同:6-BA 质量浓度为 2 mg/L 时分化率较高(> 70%),附加 0.2 mg/L 的 NAA 能获得较多完整的再生植株;仅加 NAA 时,只形成短粗的圆锥根状物,结果见表 3。

表 3 不同植物激素对胚性愈伤组织分化的影响

Table 3 Effect of phytohormones on differentiation of embryonal callus

激素质量浓度/(mg L ⁻¹)	接种个数	分化个数	小植株生成数
6-BA2.0	24	18	4
6-BA2.0 + NAA0.5	22	16	6
6-BA2.0 + NAA0.2	25	18	8
6-BA1.0 + NAA0.5	20	12	2
6-BA0.5 + NAA0.5	22	10	2
NAA2.0	24	16	0

将未形成完整植株,但形成不定芽的胚性愈伤

组织切割其不定芽转移至 MS + IBA (indole-3-acetic acid) 0.5 mg/L 培养基上培养, 30 d 后能够长出数条 3~5 cm 的根, 形成再生植株 (图 3)。

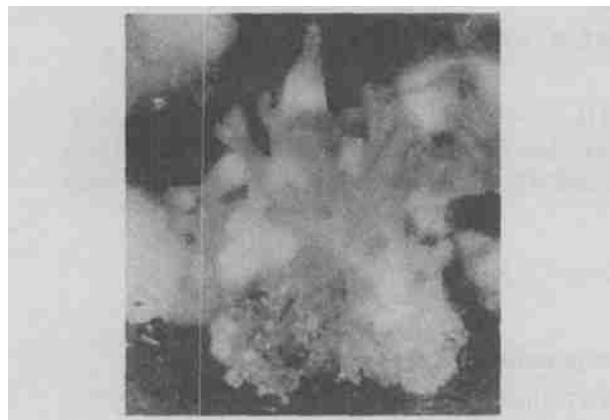


图 3 胚性愈伤组织发育的芽

Fig. 3 Adventitious shoots from embryoid callus of *A. coreanum*

3 讨论

由植物的器官、组织、外植体以及悬浮培养细胞和原生质体形成的胚, 统称为体细胞胚或胚状体, 以区别于精子和卵子通过受精作用而形成的合子胚。植物通过体细胞胚胎发生途径形成再生植株已是极其普遍的现象, 这一发育途径为研究植物细胞的分化、发育、全能性表达和作物品种改良, 突变体筛选等提供了良好的实验体系, 在理论上和应用上都具有重大意义^[4]。利用体细胞胚胎发生技术获得药用植物的再生植株, 已引起众多的中医药学家和药用植物学家们的高度关注, 近年来也取得了很多成功的实例。杨金玲^[5]等通过筛选水母雪莲的愈伤组织, 获得胚性愈伤组织, 将其转移到分化培养基上获得大量的体细胞胚, 进而得到大量的再生植株。李建民^[6]等以龙芽的幼芽为外植体, 诱导出胚性愈伤组织, 并以体细胞胚胎发生途径再生出新的植株。

植物组织、器官的脱分化是一个极其复杂的过程, 其中植物激素对脱分化过程起着重要的调节

作用。目前对于生长素与细胞分裂素对愈伤组织诱导和体细胞胚胎发育调节机制的研究已上升到分子水平。研究表明: 适量的生长素可激活某些特定基因表达产生特异蛋白, 促进组织的脱分化和体细胞胚胎的发育, 浓度过高则抑制这些基因的表达且可能刺激另一些基因的表达, 从而抑制组织的脱分化和体细胞胚胎的发育, 表现出对基因表达的时空特异性^[7,8]。

本实验对黄花岗头外植体脱分化形成胚性愈伤组织及胚性愈伤组织分化过程进行了研究, 从胚性愈伤组织可直接获得再生植株, 也可获得不定芽进而获得再生植株。从而为今后进行黄花岗头的快速繁殖、细胞工程育种、体细胞胚胎发育与调控机制的研究提供了有价值的研究资料, 也为该具有重要新药开发价值的药用植物的资源利用和保护开辟了新的途径。

References:

- [1] Mao S J, Li X D. Review of studies on Chinese traditional medicine Guanbaifu [J]. *Primary J Chin Mater Med* (基层中药杂志), 1995, 9(2): 33.
- [2] Chen W, Chen W Z. New specific bradycardic agent - Guanfu base A from Chinese traditional medicine [J]. *Chin Pharma J* (中国药理学杂志), 1998, 33(3): 132-134.
- [3] Yu R M, Xu X Q, Zhao Y, et al. Effects of physical and chemical factors on callus induction from the anthers of *Aconitum coreanum* (L. 罂.) Rpaics [J]. *J Jinan Univ* (暨南大学学报), 2003, 24(3): 109-114.
- [4] Zhao G F, Wang X L. *Introduction of Plant Tissue Cultures* (植物细胞组织培养的引进) [M]. Dalian: Press of Dalian University of Technology, 1988.
- [5] Yang J L, Zhao D X, Gui Y L, et al. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in *Saussurea medusa* Maxim [J]. *Acta Bot Boreal - Occident Sin* (西北植物学报), 2001, 21(11): 252-256.
- [6] Li J M, Li X W, Zhang D Y. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration of *Agrimonia pilosa* [J]. *Acta Biol Exp Sin* (实验生物学报), 2001, 34(2): 137-141.
- [7] Cui K R, Xing G S, Zhou G K, et al. The induced and regulatory effects of plant hormones in somatic embryogenesis [J]. *Hereditas* (遗传), 2000, 22(5): 349-354.
- [8] Kiyosue T, Satoh S, Kamade H, et al. Purification and immunohistochemical detection of an embryogenic cell protein in carrot [J]. *Plant Physiol*, 1991, 95(4): 1077-1083.

保 护 植 被 造 福 人 类