

以对两种黄芪种子进行辅助鉴别。

References:

- [1] Wang E T, Liu M Y. A comparative biology study on the two medicinal *Astragalus* [J]. *Bull Bot Res* (植物研究), 1996, 16(1): 85-91.
- [2] Chen Y. *Manual of Seeds for Medicinal Plant* (植物药种子手册) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1987.
- [3] Yang J. *Cultivating Science of Medicinal Plant* (药用植物栽培学) [M]. Beijing: Agriculture Publishing House, 1993.

不同碳源对掌叶大黄毛状根生物量和蒽醌产量的影响

杨世海¹, 刘晓峰², 果德安³, 郑俊华³

(1. 吉林农业大学中药材学院, 吉林 长春 130118; 2. 吉林亚泰(集团)股份有限公司, 吉林 长春 130031;

3. 北京大学药学院, 北京 100083)

摘要:目的 研究不同碳源对掌叶大黄毛状根生物量和蒽醌产量的影响。方法 选取3个克隆的掌叶大黄毛状根和非转化根, 采用统计分析方法, 对7种糖作为培养基碳源时大黄根生物量的积累和5种蒽醌类化合物的产量的影响进行了研究。结果 不同糖作为碳源对大黄根生物量积累和蒽醌产量有极显著影响。大黄根类型与糖类互作分析显示, DH7a与麦芽糖对于蒽醌产量来说是优势组合, 而DH5a和DH5c在蔗糖和果糖差异不显著, 非转化根在蔗糖作碳源的培养基中蒽醌产量极显著地高于其他6种糖。结论 果糖作为碳源最利于大黄根培养的生物量的积累, 蔗糖作为碳源时大黄根蒽醌产量最高。

关键词:掌叶大黄; 毛状根; 单克隆; 碳源; 蒽醌类化合物

中图分类号:R282.6

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2005)07-1075-04

Effects of different carbon sources on biomass accumulation and anthraquinone yield of hairy root cultures of *Rheum palmatum*

YANG Shi-hai¹, LIU Xiao-feng², GUO De-an³, ZHENG Jun-hua³

(1. College of Chinese Medicinal Material, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 2. Jilin YaTai Group Co. Ltd., Changchun 130031, China; 3. School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100083, China)

Key words: *Rheum palmatum* L.; hairy root; monoclonal; carbon source; anthraquinone

大黄是我国特产的世界著名的传统中药, 主要化学成分是蒽醌类化合物。蒽醌类成分具有多种生物活性, 如1,8-二羟基蒽醌衍生物有抗菌、抗病毒、抗肿瘤、免疫抑制和抗牛皮癣等作用。现代药理实验表明, 许多蒽醌衍生物如大黄素、大黄酸、大黄素-1-甲醚、大黄素-8-甲醚都具有上皮生长因子受体(EGF-R)酪氨酸蛋白激酶(tyrosine protein kinases, TPKs)抑制剂活性。因为TPKs是一些癌变的主要原因, 因而蒽醌类成分很有希望开发成为新的抗癌药物^[1]。

常振战等用野生型发根农杆菌 *Agrobacterium rhizogenes* 9402 菌株对掌叶大黄进行了毛状根诱导, 但产生的毛状根生长速度缓慢^[2]。本实验是在成功诱导掌叶大黄毛状根的基础上, 研究不同碳源对掌叶大黄毛状根生长及蒽醌类化合物合成的影响, 为进一步筛选并建立适宜的掌叶大黄毛状根培养体

系, 进而用于蒽醌类化合物工业化生产奠定基础。

1 材料与方法

1.1 单克隆掌叶大黄毛状根培养: 3种单克隆掌叶大黄毛状根, 编号分别为DH5a、DH5c和DH7a, 其中前2种由发根农杆菌LBA9402诱导产生, 后一种由发根农杆菌R1601诱导产生(另文报道)。每种毛状根以0.5g的接种量分别接种于以7种糖作为碳源的100mL液体培养基中(质量分数3%)。所用培养基为无机盐浓度均为1/2的无激素WP液体培养基。每种毛状根均设3组重复, 置于转速为100r/min的摇床上振荡培养, 培养温度为25℃。非转化根的接种量为1.0g, 其余同毛状根。

1.2 掌叶大黄毛状根和非转化根生物量的测定: 培养40d后, 收获4种掌叶大黄根培养物。先用镊子取出根, 挤净根中所含培养基, 用分析天平称鲜质量。用蒸馏水漂洗1min, 80℃烘干, 称干质量。

1.3 蒽醌类化合物的测定

1.3.1 总蒽醌类化合物的提取:将已称干质量的毛状根,用研钵研成粉末,分别装入 5 mL 试管中,每个试管中加入 2 mL 丙酮-甲醇(1:1)混合液,超声振荡 5 min,置 4 ℃ 冰箱中过夜。用注射器吸取每管中上清液,通过滤膜滤于 1.5 Eppendorf 管中,通风橱中挥干溶剂后准确加入 2 mL 甲醇,液相色谱测定。

1.3.2 对照品溶液配制:分别称取芦荟大黄素 2.5 mg、大黄酸 4.9 mg、大黄素 2.4 mg、大黄酚 4.1 mg、大黄素甲醚 2.9 mg,将它们共同溶于丙酮-甲醇(1:1)的溶液中,用容量瓶定容成 25 mL 作为对照品储备液,取 1 mL 该储备液定容于 25 mL 容量瓶作为对照品溶液。

1.3.3 HPLC 色谱条件:TSP P100 高效液相色谱仪,TSP UV100 紫外检测器,Phenomenex ODS-3

色谱柱,流动相为甲醇-1%高氯酸(85:15),体积流量为 1 mL/min,检测波长为 254 nm。

1.3.4 测定与分析:在上述色谱条件下,用 HPLC 测定各样品峰面积,根据回归方程计算芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的质量分数。

1.4 统计分析:用 SPSS 8.0 软件进行数据处理和统计分析。

2 结果

2.1 不同大黄根及不同糖对大黄根生物量积累的影响:在培养基选择实验中,发现 WP 培养基最有利于毛状根的生长,故本实验选用 WP 培养基为培养毛状根基本培养基。表 1 列出以 WP 为基本培养基,分别以 7 种糖作为培养基的碳源时大黄根生物量(鲜质量)积累的结果。

表 1 不同糖分培养基中掌叶大黄根生物量 (g·瓶⁻¹)
Table 1 Effects of different sugars on biomass accumulation of *R. palmatum* roots (g·瓶⁻¹)

根类型	麦芽糖	葡萄糖	果糖	蔗糖	半乳糖	甘露糖	乳糖
DH5a	5.660 0	2.864 4	19.414 0	13.802 8	0.499 5	0.490 2	0.879 6
DH5c	9.315 0	2.929 9	16.027 2	16.066 2	1.247 3	1.846 5	2.013 5
DH7a	13.894 1	7.694 9	28.692 6	16.325 5	1.022 2	0.928 0	3.802 7
NOR	2.113 9	0.985 7	5.019 4	9.302 6	0.482 0	0.414 8	0.670 9

对表 1 中的数据进行方差分析结果列于表 2,发现糖种类和根类型对生物量积累有极显著的差异,说明培养基中不同的糖分及不同的根生物量积累差异极大。

表 2 不同糖分培养基里掌叶大黄单克隆毛状根生物量方差分析

Table 2 Variance analysis of hairy root monoclones on biomass accumulation of *R. palmatum* roots in different sugar media

来源	自由度	均差平方和	均方	F	显著性
根类型	3	203.017	67.672	5.659	$P<0.01$
糖	6	1 054.514	175.752	14.697	$P<0.01$
误差	18	215.247	11.958		
总变异	27	1 472.778			

进一步分析结果表明大黄根的生物量积累以 DH7a 最高,显著高于 DH5a 和 NOR,与 DH5c 差异不显著,这与培养基实验结果相近。进一步证实了大黄不同克隆根的产量是有很大差异的,且经过多次继代后其各自生长速度快慢顺序依然不变。

生长在含果糖培养基里的大黄根生物量积累最高,显著高于蔗糖培养基,以半乳糖和甘露糖最低。说明果糖最有利于大黄根生物量的增加。

2.2 不同单克隆根及糖分对大黄根蒽醌产量的影响:4 种单克隆大黄根在含有不同糖分培养基里培养 40 d 后收获,提取总蒽醌类化合物,用 HPLC 测定 5 种蒽醌产量,结果列于表 3。对表 3 中的数据进行方差分析结果列于表 4。

表 4 中的各项均存在极显著的差异,说明蒽醌种类、糖分、根类型以及它们之间的互作对蒽醌产量存在极显著差异。

进一步分析结果表明,不同糖分对大黄蒽醌产量有极显著的影响。与生物量积累结果不同的是,生长在含蔗糖培养基里的大黄根蒽醌产量最高,极显著地高于其他糖分。果糖和麦芽糖居中。以半乳糖、乳糖和甘露糖为低。因此从蒽醌产量角度来看,蔗糖最有利于大黄根蒽醌类的积累。

大黄素甲醚、大黄酚和大黄素占蒽醌产量的 90% 以上,而芦荟大黄素和大黄酸所占比例要小得多,这与培养基实验结果吻合。另外,在此实验中 DH7a 大黄单克隆毛状根蒽醌产量显著高于其他 3 种。

从 5 种蒽醌化合物在 7 种糖分培养基上比较分析来看,不论在蒽醌总体水平上,还是每种蒽醌单个水平,都是以在含有蔗糖培养基积累最高,显著高于果糖,极显著高于其他 5 种成分,以半乳糖最低。再一次说明蔗糖有利于蒽醌的积累。

从 4 种大黄根对 5 种蒽醌积累量来看,各根不同蒽醌产量不尽相同。如前所述,DH7a 中 5 种蒽醌总量最高,但针对每种蒽醌产量而言,差异很大。如 DH7a 中大黄酚产量最高,显著高于大黄素甲醚和大黄素产量;而 DH5a 中大黄素甲醚最高,显著高于大黄素和大黄酚;非转化根中 5 种蒽醌产量都处于较低水平。

表 3 不同单克隆毛状根及糖分对掌叶大黄根蒽醌产量的影响

Table 3 Effects of hairy root monoclones and sugars on anthraquinome yield of *R. palmatum* roots

根类型	糖 分	蒽醌类化合物/($\mu\text{g} \cdot \text{瓶}^{-1}$)				
		芦荟大黄素	大黄酸	大黄素	大黄酚	大黄素甲醚
DH5a	果 糖	2.45	8.48	20.52	21.11	34.24
	半乳糖	0.00	0.68	1.00	0.24	0.33
	葡萄糖	1.00	1.18	2.67	1.74	3.01
	乳 糖	0.31	1.32	2.10	1.35	1.85
	麦芽糖	1.72	3.34	8.43	8.19	12.93
	甘露糖	0.27	0.34	2.81	1.66	2.51
	蔗 糖	7.99	12.59	21.57	20.16	26.18
DH5c	果 糖	2.39	6.32	16.04	13.23	19.39
	半乳糖	0.29	1.80	1.93	0.77	1.20
	葡萄糖	0.07	1.77	5.11	2.80	4.29
	乳 糖	0.26	0.66	1.92	0.62	1.04
	麦芽糖	1.23	4.24	10.26	10.56	17.12
	甘露醇	0.44	0.98	1.28	3.96	8.18
	蔗 糖	1.32	5.42	14.63	15.03	23.40
DH7a	果 糖	3.19	4.58	19.25	24.01	19.09
	半乳糖	0.68	1.91	3.26	2.70	2.87
	葡萄糖	5.48	5.82	10.24	14.40	10.88
	乳 糖	0.76	2.08	4.25	6.18	5.68
	麦芽糖	3.70	15.64	28.72	40.61	31.73
	甘露糖	0.00	0.65	0.99	3.18	3.27
	蔗 糖	4.12	9.18	23.60	36.32	27.20
NOR	果 糖	0.73	1.22	3.52	3.98	3.67
	半乳糖	0.11	0.51	2.03	0.99	1.19
	葡萄糖	0.38	1.03	1.61	1.16	1.06
	乳 糖	0.21	0.61	1.39	0.66	0.74
	麦芽糖	0.14	0.84	4.36	2.60	2.97
	甘露糖	0.00	1.04	3.27	0.83	0.86
	蔗 糖	5.00	5.99	11.98	16.85	18.49

表 4 不同类型根及糖种类对掌叶大黄根蒽醌产量方差分析

Table 4 Variance analysis of anthraquinone yield in different roots and sugars on *R. palmatum* roots

来 源	自由度	均差平方和	均 方	F	显著性
蒽醌	4	1 578.06	394.52	48.45	$P<0.01$
糖	6	3 952.82	658.80	80.90	$P<0.01$
根类型	3	1 105.82	368.61	45.27	$P<0.01$
蒽醌×糖种类	24	1 162.84	48.45	5.95	$P<0.01$
蒽醌×根类型	12	474.07	39.51	4.85	$P<0.01$
根类型×糖	18	1 365.51	75.86	9.32	$P<0.01$
误差	72	1 130.75	15.71		
总变异	139	10 769.87			

尽管前面已提到,蔗糖最有利于大黄根蒽醌量的积累,但就每种根而言,在不同培养基里的差异很大。以蒽醌产量最高的 DH7a 为例,在含麦芽糖的培养基里蒽醌产量显著高于蔗糖培养基,因此,可以说用 DH7a 生产大黄蒽醌类化合物应选择麦芽糖为毛状根培养的主要碳源。DH5a 和 DH5c 在蔗糖和果糖培养基中的蒽醌总量相近,极显著地高于其他糖分。非转化根在蔗糖培养基里的蒽醌含量极显著地高于其他 6 种糖分,说明非转化根培养最适宜的碳源是蔗糖。

3 结论

糖是毛状根离体生长必需的重要碳源。已有的研究表明,它在培养基中的代谢变化与毛状根的生长、形态及其次生物质的积累密切相关^[3]。糖的种类和浓度不同,对毛状根生长和次生代谢物积累影响不同^[4~6]。本实验结果表明,果糖作为碳源最有利于掌叶大黄毛状根生物量的积累,而蔗糖作为碳源最适合蒽醌类化合物的合成。可见,毛状根生物量积累和次生产物合成对糖类的响应与植物种类有关。

References:

[1] Chang Z Z. Studies on *in vitro* culture and active constituents of Ri plasmid-transformed roots of *Rheum wittrochii* Lundser., *Rheum palmatum* L., *Cassia obtusifolia* L. [A]. Dissertation of Doctor Degree of Beijing Medical University (北京医科大学博士学位论文) [D]. Beijing: Beijing Medical University, 1997.

[2] Chang Z Z, Guo D A, Shen X, et al. Anthraquinone production and analysis in the hairy root cultures of *Rheum palmatum* L. [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1998, 33(11): 869-872.

[3] Wang L, Yu R M, Zhang H, et al. Hairy root cultures of *Polygonum multiflorum* Thunb. and the production of its active constituents anthraquinones [J]. *Chin J Biotechnol* (生物工程学报), 2002, 18(1): 69-73.

[4] Jung K H, Kwak S S, Kim S W, et al. Improvement of catharanthine productivity in hairy root cultures of *C. roseus* by using monosaccharides as carbon source [J]. *Biotechnol*

Lett, 1992, 14(8): 695-700.

- [5] Jeong G T, Park D H, Ryu H W, et al. Optimum conditions for transformed *Panax ginseng* hairy roots in flask culture [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2002, 98-100: 1129-1139.

- [6] Zhao S J, Li C Y, Qian Y C, et al. Induction of hairy roots of *Panax ginseng* and studies on suitable culture condition of ginseng hairy roots [J]. *Chin J Biotechnol* (生物工程学报), 2004, 20(2): 215-220.

云南省悬钩子属药用植物资源研究

和加卫¹, 唐开学^{2*}, 杨静全³, 和秀云¹, 龙春林⁴, 程在全⁵

- (1. 云南省农业科学院高山经济植物研究所, 云南 丽江 674100; 2. 云南省农业科学院, 云南 昆明 650231;
3. 云南省丽江市国土资源局, 云南 丽江 674100; 4. 中国科学院昆明植物研究所, 云南 昆明 650204;
5. 云南省农业科学院生物研究所, 云南 昆明 650231)

悬钩子属(*Rubus* L.)是蔷薇科的一个大属,我国已经发现的种类有201种98变种^[1~3],产于全国各地,但以长江流域西南地区种类最丰富,分布最集中。本属植物大部分种类的果实多浆,味甜酸,可供食用,在国外早已长期栽培作为重要水果;许多种类的果实、种子、根或叶可供药用。近年来,国内许多研究者对悬钩子属植物进行了一系列药理研究,发现悬钩子属植物具有多种药理作用,对调节机体的生命活动和医疗保健作用具有重要意义。据笔者初步统计,在全国各地中医中药中应用的悬钩子属植物有51种或变种,约占总种数的17%,其中藏医用药3种^[5]。该属植物药用部位不一,药效也不尽相似。中医常用于清热解毒、祛风利湿、止血止泻、活血化瘀等,治疗跌打损伤、阳萎、遗精、月经不调、感冒、风湿关节痛、急慢性肝炎及乳腺炎等症^[4]。

云南地处青藏高原南缘向南亚、东南亚过渡的斜坡上,海拔76.4~6740 m,形成的温度跨度相当于从中国的海南岛到黑龙江的所有热量带和从华东华南沿海湿润地带到西北内陆干旱、半干旱地带的所有水湿梯度。地势由西北向东南呈阶梯状倾斜,境内高山河流相间,地形复杂,加上地质历史上的相对稳定和土地类型、地貌、景观的多样性及复合配置,构成极为丰富的生境,“是另一个分布在北纬20°~40°,最丰富、最古老的温带、亚热带北缘的植物区系”^[6],孕育了世界知名“植物王国”,是中国生物多样性最丰富的省份^[7]。陆玲娣在《我国悬钩子属植物的研究》中提到,我国西南地区,特别是滇西北和川西南到西部一带不仅是悬钩子属的一个多样性中心,同时也可能是

起源中心,强烈地聚集了古老的、中间过渡的和进化的复杂成分,特有种相当丰富^[2]。1996—1997年中国科学院江苏植物研究所对云南省悬钩子属的种类、分布状况和利用价值进行了考察,提出“云南省悬钩子植物种类资源和特有种数量之多,无不居全国各省之冠”^[8]。根据文献资料和实地调查,云南省境内的野生悬钩子有107种、45变种,其中有34种和变种可供药用,占全省该属总种数的22.4%。然而,长期以来这些宝贵的药用植物资源处于自生自灭的野生状态,绝大多数基本上没有被人们利用。研究和调查云南省悬钩子属药用植物资源,可为资源的保护和合理的开发利用提供科学依据。

1 云南省悬钩子属药用植物资源

云南省悬钩子属药用植物资源见表1。

2 云南省主要药用悬钩子属植物

根据有关记载和民间用药情况,并结合野生资源蕴藏量,云南省应用较多的主要有12种,各具不同的功效。

2.1 粗叶悬钩子 *R. alceaefolius* Poir.: 主要分布于滇南和滇西,生于林缘路旁的灌木丛中。鲜果含总糖3.77%、总酸2.03%、维生素C 106.5 μg/g、维生素B₁ 0.69 μg/g、维生素B₂ 0.95 μg/g、维生素E 74.76 μg/g,微量元素(μg/g): 锌: 27.595 2、铁49.619 0、硒0.040 8。此外还含有矿质元素(干基)钾2.166 7%、钙0.739 8%、镁0.489 5%;根及叶入药,有清热止血、活血祛瘀之功效,治疗急慢性肝炎、肝脾肿大、乳腺炎、行军性血红蛋白尿、外伤出血等症。

收稿日期: 2004-10-22

基金项目: 云南省自然科学基金资助项目(2003C0015Z)

作者简介: 和加卫(1973—),男,云南丽江人,助理研究员,主要从事经济植物引种栽培。

Tel: (0888)5121385 E-mail: hejw4522@163.com

* 通讯作者 唐开学 Tel: (0871)5120870 E-mail: kxtang@public.km.yn.cn