

(图 1-5), 海绵组织细胞排列不规则, 但也较为紧密, 胞间隙不发达, 在海绵组织中也有少量簇晶细胞存在, 但体积较小(图 1-5)。

主脉中维管组织环状, 封闭, 木质部在内方, 较为发达, 韧皮部在外方, 木质部和韧皮部之间还有微弱的形成层, 在韧皮部的外方有一圈发达的纤维细胞。较为特殊的是, 在正常维管束的侧面还具有一个副维管束, 这个副维管束也呈封闭状态, 内部是木质部, 外部是韧皮部, 在维管束的外面也具有一圈发达的纤维细胞(图 1-6、7)。中脉的髓中和皮层薄壁组织中同样具有大量簇晶存在(图 1-7)。

2.4 脉序结构: 青钱柳叶脉羽状, 中脉直或略弯曲, 二级脉 10~16 对, 互生, 和主脉夹角 $60^{\circ}\sim 85^{\circ}$ (图 1-8), 二级脉在叶缘内分支, 相互连接形成脉环(图 1-10), 三级脉以近 90° 的角度从二级脉分出, 然后和对面的三级脉相连, 四级脉形成比较均匀的矩形或多边形脉间区, 脉间区内充满分支的自由结束的小细脉(图 1-9)。

3 分析和讨论

胡桃科植物叶片宏观形态非常相似, 均为羽状复叶, 小叶羽状脉, 基部偏斜, 表面具有短柔毛、腺体和盾状鳞片, 叶缘通常具细锯齿, 这些特征使叶片的形态识别变得非常困难。如山核桃属(*Carya* Nutt.)、胡桃属(*Juglans* L.)、黄杞属(*Engelhardtia* Leschen. ex Bl.)、美黄杞属(*Oreomunnea* Oerst.)、果黄杞属(*Alfaroa* Standl.)、青钱柳属(*Cyclocarya* Iljinskaja)和枫杨属(*Pterocarya* Kunth.)等植物叶片都极为相似, 许多特征是几种或几属植物所共有的, 以致于经常造成属级水平上的鉴定错误^[5], Brown(1962)曾把青钱柳的叶化石鉴定为枫杨属的

一种植物^[6]。但胡桃科植物叶的微形态仍然有许多明显区别。在扫描电镜下, 黄杞 *Engelhardtia chrysolepis* Wall.、美黄杞属、果黄杞属都具有表皮毛和盾状鳞片, 但黄杞的角质层没有乳突、表面相对平滑, 而后两种植物叶片角质形成明显的乳突状, 两种叶片的区别在于果黄杞属的角质层乳突和盾状鳞片较小, 而 *Alfaroa costaricensis* 的角质层乳突和盾状鳞片都较大^[5]。青钱柳和美黄杞属、果黄杞属叶表面特征也极为相似, 都具有角质层乳突和较大的盾状鳞片, 但美黄杞属和黄杞属植物叶脉都是封闭的, 脉间区内没有自由结束的小脉, 而青钱柳叶片小脉间区内充满分支的自由结束的小脉。胡桃科植物叶内普遍具有晶体, 青钱柳叶肉组织中有规律地分散着体积较大的含簇晶细胞, 而黄杞属植物叶肉组织中的簇晶比青钱柳叶内的簇晶要小的多, 而在山核桃属、胡桃属、化香树属 *Platycarya*、枫杨属的一些种内, 叶肉组织中则具有单晶体细胞, 且这些晶体主要存在于靠近叶脉的细胞内^[7]。

References:

- [1] Delectis Florae Reipublicae Popularis Sinicae, Agendae Academiae Sinicae Edita. *Flora Reipublicae Popularis Sinicae* (中国植物志) [M]. Tomus 27. Beijing: Science Press, 1979.
- [2] Xie M Y, Li L. Review in studies on chemical constituents and bioactivities of *Cyclocarya paliurus* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32(4): 365-366.
- [3] Shu R G, Xu C R, Li L N. Studies on the sweet principles from the leaves of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinsk. [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1995, 30(10): 757-761.
- [4] Zhong R J, Li L N, Gao R H, et al. Pentacyclic triterpenoids from Roundwingfruit *Cyclocarya* (*Cyclocarya paliurus*) [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1996, 27(7): 387-389.
- [5] Manchester S R. The fossil history of the Juglandaceae [J]. *Monogr Syst Bot Missouri Bot Gard*, 1987, 21: 1-137.
- [6] Brown R W. Paleocene flora of the Rocky Mountains and Great Plains [J]. *US G S Profess Pap*, 1962, 375: 1-119.
- [7] Metcalfe C R, Chalk L. *Anatomy of the Dicotyledons* [J]. Oxford: The Clarendon Press, 1950.

羌活种胚后熟过程中内源激素的动态变化

史 静¹, 马小军^{1*}, 蒋舜媛², 赵 鑫¹, 陈 震¹

(1. 中国医学科学院 中国协和医科大学药用植物研究所, 北京 100094; 2. 四川省中药研究所, 四川 成都 610041)

摘要:目的 阐述羌活种胚后熟过程中内源激素与种胚发育和休眠解除的关系。方法 激素测定用 HPLC 法, 外标法定量, 质量分数以 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 表示。结果 羌活种胚后熟过程中, 玉米素(Z)有 2 个高峰和 2 个低谷, 第 1 个峰值出现在层积 20 d 时, 第 2 个峰值出现在层积 100 d 时; 第 1 个低谷出现在层积 70 d 时, 第 2 个低谷出现在层积 150 d 时。吲哚乙酸(IAA)层积 20 d 时出现高峰, 层积 100 d 和层积 150 d 时没能检测到。脱落酸(ABA)的变

收稿日期: 2005-04-20

基金项目: 国家中医药管理局中医药科学技术研究专项中药研究课题(02-03ZP10); 国家科技部国家科技攻关计划创新药物和中药现代化课题(2001BA701A60-03)

* 通讯作者 马小军 Tel: (010) 62890692 E-mail: xjma@public.bta.net.cn

化和 IAA 相似,不同在于层积 220 d 未完成生理后熟和层积 220 d 发芽的种子中都不能检测到 ABA 的量。赤霉素 (GA₃) 的量比其他激素高很多,出现 2 个峰值,第 1 个出现在层积 20 d,第 2 个出现在层积 150 d 时;完成生理后熟种子中的 GA₃量比未完成生理后熟种子中的高。结论 层积 20 d 后 Z、IAA、ABA 和 GA₃量的增加启动了羌活种胚的发育。Z 能促进羌活种胚的发育和萌发。GA₃可能对打破羌活种子休眠没有直接的作用,但是能促进种胚的生长。层积中后期没有检测到 ABA 的量,ABA 可能不是羌活种子萌发的主要抑制物质。

关键词:羌活药材;休眠;种胚后熟;内源激素

中图分类号:R282.7

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2006)02-0273-04

Dynamic changes of endogenous hormone in seed of *Rhizoma et Radix Notopterygii* during post-ripening period

SHI Jing¹, MA Xiao-jun¹, JIANG Shun-yuan², ZHAO Xin¹, CHEN Zhen¹

(1. Institute of Medicinal Plant, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100094, China; 2. Sichuan Institute of Chinese Materia Medica, Chengdu 610041, China)

Key words: *Rhizoma et Radix Notopterygii*; dormancy; embryo post-ripening period; endogenous hormone

羌活是生长于高寒生境的多年生野生药材,因产于羌地而得名,是我国传统中藏羌药中最常用的药材之一,始载于《神农本草经》,列为上品,其后历代本草均有收载,《中国药典》历版本都有收载。《中国药典》收载的羌活是植物羌活 *Notopterygium incisum* Ting ex H. T. Chang 和宽叶羌活 *N. forbesii* Boiss. 的干燥根茎及根,是伞形科,芹亚科,美味芹族,羌活属 (*Notopterygium* Boiss.) 植物,为我国特有种。羌活产地相对集中,开发历史较长,随着用量的不断增加,采挖过量和滥伐林木,使羌活的生长环境遭到破坏,其分布海拔不断上移,最适分布区面临灭绝,已成为典型的渐危物种,面临资源枯竭和丧失该物种的可能性。人工栽培羌活前景广阔,而人工栽培存在相当的困难,就羌活种子而言其存在胚形态后熟和生理后熟,有很长的休眠期。为了研究打破羌活种子休眠的方法,有必要探讨羌活种子休眠的生理生化基础,为此,笔者首次研究了有关内源激素与羌活种胚发育以及解除休眠的关系。

1 材料与与方法

1.1 材料:为 2002—2003 年采自四川省甘孜州甘孜县的野生羌活种子,2002 年采自四川省阿坝州壤塘县野生羌活种子,由蒋舜媛博士鉴定为羌活 *N. incisum* 种子。采摘后于室内晾干进行层积处理。层积用的砂子清洗之后于 130 ℃ 条件下烘干 2 h,层积时种子、砂子比为 1 : 3,层积过程经历 3 个温度等条件变化。层积于 2003 年 11 月 29 日(四川甘孜县 2003 年的种子)开始。在层积过程中间隔一定时间取样一次,样品存放于液氮中,同时测定胚率(种胚长/胚乳长×100%)的变化。2003 年 11 月 29 日重复进行了于 2003 年 5 月 4 日(四川甘孜县 2002

年的种子)、2003 年 6 月 5 日(四川甘孜县 2002 年的种子)、2003 年 8 月 19 日(四川壤塘县 2002 年种子)和 2003 年 9 月 28 日(四川甘孜县 2003 年的种子)分别开展的试验。

1.2 激素的测定

1.2.1 激素的提取:精密称取羌活种子鲜样 1.0 g 于研钵中捣烂,转至 50 mL 锥形瓶中,加 30 mL 甲醇于 4 ℃ 冰箱过夜,滤过,残渣再加 20 mL 冷甲醇 4 ℃ 左右电磁搅拌 30 min 后滤过,合并两次滤液,用 2% 氢氧化钠调 pH 值等于 8。用 50 mL 石油醚分两次萃取,去掉石油醚相。将甲醇液减压蒸发至 10 mL 定容,经 0.5 μm 滤膜滤过,清液待测定。

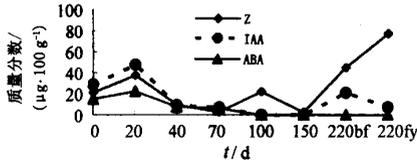
1.2.2 激素的测定:用 HPLC 法测定,外标法定量,激素质量分数以 μg/100 g 表示。

羌活种子生长素:Novapak C₁₈柱(150 mm×4.0 mm);流动相为 40% CH₃OH-15%CH₃CN-45% H₂O(用 H₃PO₄ 调 pH 4.0);体积流量 0.7 mL/min,检测器为 UV254 nm。羌活种子细胞分裂素:Novapak C₁₈柱(150 mm×4.0 mm);流动相为 15% CH₃CN-25%CH₃OH-60%H₂O(用 H₃PO₄ 调 pH 3.5);体积流量 0.7 mL/min,检测器为 UV 254 nm。

2 结果与分析

羌活种胚后熟过程中,种子内源激素玉米素(Z)、吲哚乙酸(IAA)和脱落酸(ABA)的变化见图 1,赤霉素(GA₃)的变化见图 2,胚率变化见表 1。

2.1 Z 的变化:从表 1 中看出,20 d 时 Z 升高达到第 1 个高峰,到 100 d 时升高达到第 2 个高峰。细胞分裂素的量可能与胚的生长速度有一定的关系,因为 20 d 的时候羌活种胚的发育开始启动,到 30 d 时在放大 20 倍的条件能测到羌活种子的胚,此时



bf-未完成生理后熟种子 fy-完成生理后熟种子
bf-post-ripened seed fy-dormant seed

图 1 羌活种胚后熟期种子 Z、IAA 和 ABA 的变化动态
Fig. 1 Dynamic changes of endogenous Z, IAA, and ABA during post-ripening period of *Rhizoma et Radix Notopterygii* embryo

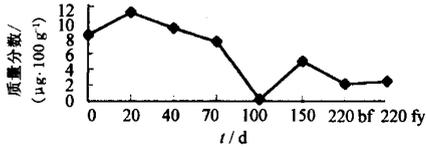


图 2 羌活种胚后熟期种子 GA₃ 的变化动态

Fig. 2 Dynamic changes of endogenous GA₃ during postripening period of *Rhizoma et Radix Notopterygii* embryo

表 1 羌活种胚后熟过程中的胚率变化

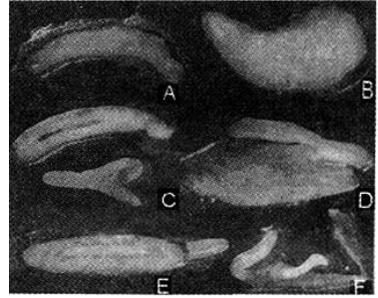
Table 1 Embryo rate during post-ripening period of *Rhizoma et Radix Notopterygii* embryo

时期	层积后时间/d	胚率/%	备注
层积的第 1 时期	0	0	取样; 见图 3-A
	20	0	取样
	30	5.60	
	40	11.82	取样
	70	17.80	取样; 见图 3-B; 调节层积条件
层积的第 2 时期	80	25.19	
	90	40.45	
	100	55.91	取样
	110	66.29	
	130	72.28	
	150	78.92	取样; 种胚完成形态后熟(胚率 80%左右); 见图 3-C; 调节层积条件
层积的第 3 时期	160	77.75	
	180	81.00	
	220 未发芽	91.65	取样; 种胚未完成生理后熟; 见图 3-D
	220 发芽	-	取样; 种胚完成生理后熟胚根突出种子; 见图 3-E、F

* 每次取 10 粒种子, 3 次重复, 取其平均值

* ten seeds every time, three repeats, then taking mean value

是心形胚初期, 100 d 时是羌活种胚快速生长的时期(表 1), 此时羌活种子中 Z 的量较高; 而到 150 d 种胚完成形态后熟的时候降到最低, 和 70 d 时的比较接近, 这两个时期的羌活种胚发育缓慢, 改变层积温度才能有效促进羌活种胚的发育, 故这两个时期



A-0 d, 胚率 0 B-70 d, 胚率 20% C-150 d, 胚率 80%
D-220 d, 胚率 100% 未完成生理后熟 E、F-220 d, 完成生理后熟胚根突出

A-0 d, embryo rate 0 B-70 d, embryo rate 20% C-150 d, embryo rate 80% D-220 d, embryo rate 100% dormant seeds E, F-220 d, post-ripened seeds, radical outgrowth

图 3 羌活种胚的发育和萌发

Fig. 3 Embryo development and germination of *Rhizoma et Radix Notopterygii*

都是转变羌活层积温度的有利时期。到层积后期 Z 随着羌活种胚休眠的减轻而升高, 完成生理后熟种子(fy)中 Z 的量高于未完成生理后熟种子(bf)中的 Z 量。

2.2 IAA 的变化动态: 20 d 出现第 1 个高峰, 之后到 220 d 时未发芽种子中出现第 2 个高峰, 但没有未层积和层积 20 d 时种子中的量高。在层积 100 和 150 d 的种子中未能检测到 IAA 的量。随着羌活种子层积的继续, 休眠的减轻, IAA 量有所下降, 220 d 发芽种子中 IAA 量比 220 d 未发芽种子中的低。

2.3 ABA 的变化动态: 从图 1 可以看到, 种子内源 ABA 的动态变化和种子内源 IAA 的动态变化相似, 20 d 有一个高峰, 之后下降, 不同在于 220 d 未完成生理后熟和发芽的种子都没有检测到 ABA 的量。层积到 100 d 后再也没有检测到 ABA 的量, ABA 可能不是羌活种子萌发的主要抑制物质。

2.4 GA₃ 的动态变化: 从图 2 可以看到, GA₃ 羌活种子中的量比其他激素高很多。在 20 d 时达到最高峰, 之后下降, 100 d 时量最低, 到 150 d 时达到第 2 个高峰, 之后下降, 220 d 完成生理后熟种子中 GA₃ 的量比 220 d 尚未完成生理后熟种子中的量略高, 而且羌活种子中内源 GA₃ 的量一直远高于 ABA 的量。

3 讨论

有研究证明激素与种子休眠有着密切的关系, Khan 提出“三因子”假说(Khan 等, 1978), 认为种子休眠与发芽受赤霉素、细胞分裂素和发芽抑制物(如 ABA) 3 个因素共同决定, 其中细胞分裂素促进 ABA 等的分解, 起解抑制作用。当种子中含有抑制

物时,必须加入细胞分裂素解除抑制,才能打破休眠,促进萌发^[1]。

羌活种子中内源 Z、GA₃、IAA 和 ABA 的量在 20 d 时都增加,可能有利于启动羌活种胚的生长分化。从羌活种子内源 Z 的变化来看,Z 与种胚的生长速度有关,羌活种胚生长缓慢的时期是层积 70 和 150 d 时,这两个时期羌活种子中内源 Z 量相对较低。羌活种子内源 IAA 量在 20 d 时增加,之后下降,在 100 和 150 d 时检测不到,且未完成生理后熟的羌活种子 IAA 量比出芽种子中的高,可能羌活种子内源 IAA 与羌活种子休眠的解除有关。

羌活种子内源 GA₃量在 100 d 时较低,别的时期都比较高,尤其是在 20 d 时达到最高值,可能此时 GA₃量的增加提高了羌活种胚的生长潜力,有研究指出内源赤霉素可能通过这两条途径控制种子萌发:降低胚周围组织的机械阻碍作用和提高胚的生长潜力,种皮和胚乳的破裂导致烟草种子休眠解除与赤霉素相关^[2]。羌活种子内源 ABA 量在 20 d 时增加,之后下降,到 100 d 时就检测不到了,ABA 量在层积前期增加,可能促进胚的分化和发育,有研究指出 ABA 在植物种胚发育中的作用主要有两点:一是刺激胚胎的发生,一是防止成熟的胚过早萌发而影响物种的延续^[3]。而赤霉素可能对打破种子休眠没有直接的作用,如通过后熟和层积能提高 *Arabidopsis thaliana* 赤霉素缺陷突变体对赤霉素的敏感性来减轻种子的休眠;外源 GA₃处理 *A. thaliana* 的休眠种子不能很有效地打破休眠,GA₃只是当 ABA 的合成被抑制的时候才促进种子的萌发^[4]。羌活种子中内源 GA₃的量一直远高于 ABA 的量,而

且不同质量浓度的外源 GA₃浸泡完成形态后熟的羌活种子(胚率 80%) 24 h 对打破羌活种子的生理后熟效果也不明显(未发表),可能 GA₃对打破羌活种子的休眠也没有直接的作用。根据近些年来的研究,从生理学方面分析指出 ABA 和赤霉素在种子中的作用有“拔河”般的激素平衡关系,决定着种子所有的休眠和萌发能力。ABA 高敏感水平和赤霉素低敏感水平导致种子休眠程度增加,反之,ABA 低敏感水平赤霉素高敏感水平导致种子休眠程度降低^[5]。层积后期不能检测到 ABA,此时羌活种子并没有解除休眠,可能除了 ABA 之外还有其他内源抑制物质,有待进一步的研究证明。

致谢:实验得到中国林业科学院分析中心王文芝老师帮助。

References:

- [1] Han B W. *Plant Growth and Differentiation* (植物生长与分化) [M]. Beijing: China Agricultural University Press, 2003.
- [2] Philippe G, Denise B, Bruno S, et al. Control of seed dormancy in *Nicotiana plumbaginifolia*: post-imbibition abscisic acid synthesis imposes dormancy maintenance [J]. *Planta*, 2000, 210(2): 279-285.
- [3] Zhao Y H, Yang S L, Liu H Q, et al. Dynamics of endogenous hormone in American ginseng seed during morphological after-ripening period and their regulation to embryo development [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32(2): 159-162.
- [4] Sonia A R, Denise B, Marie-Hélène W, et al. Changes in endogenous abscisic acid levels during dormancy release and maintenance of mature seeds: studies with the Cape Verde Islands ecotype, the dormant model of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Planta*, 2004, 219(6): 479-488.
- [5] Brady S M, McCourt P. Hormone cross-talk in seed dormancy [J]. *J Plant Growth Regulat*, 2003, 22(1): 25-31.

筛选草珊瑚黄酮高产细胞克隆系的研究

涂艺声,吴笑臣

(江西师范大学生命科学学院,江西 南昌 330022)

植物单细胞克隆的研究,国际上自 20 世纪 70 年代以后迅速发展。其原因是,一方面理论研究的需要,另一方面细胞工程的研究,特别是植物次级代谢工业化生产的兴起,推动了单细胞克隆研究的发展^[1,2]。笔者在江西省自然科学基金资助下,已研究

报道了草珊瑚 *Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai 愈伤组织启动诱导、悬浮细胞培养系统^[3~5]和建立了一套适合草珊瑚细胞克隆的平板培养技术^[6]。

光是植物生长发育的重要环境因素,它作为一种调节植物信号以调节植物的各生理过程因子,在

收稿日期:2005-04-01

基金项目:江西省自然科学基金项目(99460)

作者简介:涂艺声(1957—),女,教授,2002 年调入江西师范大学,研究方向植物生物技术。