

表 4 色谱图相似性分析结果 (参照模板:S2)

Table 4 Results of comparability of chromatogram (control template: S2)

样品编号	相关系数法(峰面积)	夹角余弦法(峰面积)	相关系数法(峰高)	夹角余弦法(峰高)	相关系数法(全图谱)	夹角余弦法(全图谱)
S1	0.991 770	0.988 780	0.990 398	0.986 732	0.988 994	0.989 552
S3	0.923 206	0.931 884	0.935 960	0.940 249	0.941 697	0.945 210
S4	0.987 101	0.981 120	0.985 604	0.975 153	0.979 832	0.971 399
S5	0.982 929	0.982 344	0.984 954	0.974 569	0.979 292	0.979 428
S6	0.990 774	0.979 062	0.991 496	0.966 609	0.970 412	0.968 227
S7	0.992 610	0.992 931	0.994 086	0.994 436	0.991 162	0.991 637
S8	0.989 780	0.989 514	0.990 533	0.989 128	0.990 945	0.990 504
S9	0.953 277	0.947 137	0.952 801	0.934 746	0.939 417	0.938 310
S10	0.967 358	0.961 661	0.970 920	0.961 429	0.964 196	0.952 053
S11	0.972 295	0.973 160	0.972 042	0.962 920	0.967 514	0.966 494

从色谱图上比较,虽各批样品成分的量有差异,但色谱图概貌一致,说明该药材群体成分的一致性(包括成分种类和相对质量分数的一致性),且稳定,制定的指纹图谱可对白术药材组分群体特征的一致性作出判断。白术指纹图谱有自身化学条码的特征,是其内在化学成分种类与数量的反映。在白术药材指纹图谱的共有特征峰中,整体分离度比较好;不同批次药材指纹图谱概貌也有较好的一致性,能充分反映白术药材化学成分的特征。

采用 996 PDA 二级管阵列检测器,在分析时进行全波长紫外扫描,同时得到不同波长下全数据。结果显示,检测效果受波长影响较大,经比较后表明在 254 nm 色谱峰形最好,出峰数目适中,各色谱峰相互之间分离度较好,故检测波长定在 254 nm。

在供试品溶液制备方法考察中,对提取条件(溶媒、提取方法)及色谱条件(流动相、流速、进样量)进行了单因素平行研究。不同溶媒(石油醚、氯仿、甲醇、50% 甲醇)中以石油醚提取物共有峰相对稳定,绝对峰面积和总峰数均最高。故确定提取溶剂为石油醚;超声提取较索氏提取、回流等方法操作方便,提取时间短且效率高,但为了防止溶剂挥发和

有效成分损失,提取时应注意水浴温度不宜过高。

本研究首次将 HPLC 色谱法运用到白术药材的鉴定与质量评价中,能更加有效地评价药材化学成分多样性的复杂性;通过使用国家药典委员会 2004 年出版的中药色谱指纹图谱相似性分析软件进行相似度评价,为指纹图谱研究成果运用于中药材生产和市场流通中具体环节的质量检验,提供一个新的方法。对科研与生产实践的结合,具有重要的指导意义。

References:

- [1] Yang C P, Lao Y X, Wu F W. Progress in study of *Atractylodes macrocephala* Koidz. [J]. *J Chin Med Mater* (中草药), 2002, 25(3): 206-208.
- [2] Yan L, Gao J, Hou L L. Summarize on study of methodology in fingerprints of Chinese herbs [J]. *J Luzhou Med Coll* (泸州医学院学报), 2004, 27(1): 87-89.
- [3] Liu H H, Guo S H. Modern equipment and fingerprint of Chinese herbs [J]. *J Chin Med Pharmacol* (中医药学报), 2002, 30(2): 35.
- [4] Miao A D, Sun D J. Application of microsoft excel 2002 to calculate the similarity in fingerprints of Chinese herbs [J]. *Prog Pharm Sci* (药学进展), 2003, 27(1): 51.
- [5] Wang L X, Xiao H B. Vectorial angle method for evaluating the similarity between two chromatographic fingerprints of Chinese herb [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2002, 37(9): 713.

刺五加的体细胞胚胎发生研究

邢朝斌¹, 沈海龙², 赵丽娜¹, 王明艳¹, 陈正恒¹

(1. 华北煤炭医学院 生物科学系, 河北 唐山 063000; 2. 东北林业大学林学院, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要:目的 用不同质量浓度 2,4-D 和外植体类型对刺五加体细胞胚胎诱导进行研究,为刺五加的资源保护和遗传工程提供理论依据。方法 以刺五加的萌发 3 周幼苗和层积处理种子合子胚的胚根、下胚轴和子叶为外植体,

收稿日期:2005-07-01

基金项目:国家“十五”科技攻关子课题(2001BA510B0801)

作者简介:邢朝斌(1975—),男,河北省定州市人,讲师,硕士,主要从事药用植物细胞工程的研究。

Tel: (0315) 3725859 E-mail: xingzhb@mail.edu.cn

考察不同激素对刺五加体细胞胚胎发生的影响。结果 来自层积处理种子合子胚的外植体接种于附加 0.5 mg/L 2,4-D 的 MS 或 1/2MS 培养基中体细胞胚胎诱导率 (57.1%) 和数量 (3.3) 最高。体胚在原培养基中即可发育成熟,转入降低 2,4-D 质量浓度的培养基后更有利于新体胚的产生和原有体胚的成熟。刺五加体胚的发育历程与合子胚相似。结论 刺五加可以通过来自合子胚的外植体实现体细胞胚胎发生,体胚诱导率取决于 2,4-D 质量浓度和外植体的发育程度。

关键词:刺五加;体细胞胚胎发生;2,4-D

中图分类号:R282.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2006)05-0769-04

Somatic cell embryogenesis of *Acanthopanax senticosus*

XING Zhao-bin¹, SHEN Hai-long², ZHAO Li-na¹, WANG Ming-yan¹, CHEN Zheng-heng¹

(1. Department of Biological Science, North China Coal Medical College, Tangshan 063000, China;

2. College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Abstract: Objective To study somatic cell embryogenesis of *Acanthopanax senticosus* induced by different concentration of 2,4-D and type of explants, which provides theoretic evidence in protection of *A. senticosus* resources and genetic engineering. **Methods** Using 3-week seedlings and zygotic embryos (cotyledon, hypocotyls, and roots) of stratificated seeds as explants researches the effect of different hormones on somatic cell embryogenesis of *A. senticosus*. **Results** Explants of zygotic embryos of stratificated seeds cultured on MS and 1/2MS media containing 0.5 mg/L 2,4-D generated the highest frequency (57.1%) and the most number (3.3) of somatic cell embryos, which can develop into maturation in the initial medium. But it is more beneficial to generate new somatic cell embryos and to develop primary somatic cell embryos into maturation when transferred into 2,4-D of decreased concentration. And the development process of somatic cell embryos of *A. senticosus* is similar to that of zygotic embryos. **Conclusion** Somatic embryogenesis of *A. senticosus* is realized by culturing explants of zygotic embryos and the inductive rate of somatic cell embryos is related to the concentration of 2,4-D and developmental stage of explants.

Key words: *Acanthopanax senticosus* Harms; somatic cell embryogenesis; 2,4-D

刺五加 *Acanthopanax senticosus* Harms 是我国医药珍品,根、茎、叶均可入药^[1]。历代本草医药记载,有益气健脾、补肾安神之功效。自 20 世纪 70 年代末,以刺五加为原料生产的各种制剂和饮料等产品远销国外,因而使刺五加资源消耗与日俱增^[1,2]。在自然状态下刺五加有性生殖能力弱^[2]、无性繁殖困难^[3,4],1992 年出版的《中国植物红皮书》已把刺五加列为了渐危物种。

近年来利用植物组织、细胞培养快速繁殖刺五加和生产其药用成分的研究成为热点。张喜春等^[4]和张健夫等^[5]以刺五加茎尖为外植体,尝试过离体培养,但繁殖系数低,不能满足生产需要。李学宝等^[6]用农杆菌感染刺五加,获得了能在无生长调节剂的培养基上生长的愈伤组织,但因不能再生而未能获得转基因植株。体细胞胚胎发生作为植物快速繁殖的方法之一,与茎尖培养相比具有繁殖速度快、繁殖系数高等优点。笔者以刺五加的胚轴为外植体,获得了体细胞胚胎,为刺五加快速繁殖和基因工程等提供了可靠技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料与培养条件

1.1.1 材料处理:刺五加种子采自东北林业大学帽儿山实验林场。将种子混拌 2 倍湿沙,放入花盆内,在 20 ℃ 左右温度下催芽 3 个月后,转入 3 ℃ 以下低温处层积 3 个月,期间保持种沙含水量在 60%~70% 进行层积处理。处理结束后选取胚根即将伸出、具有完全成熟胚的种子,在无菌操作台中,用 75% 酒精消毒 30 s,无菌水冲洗 3 次,然后用 10% H₂O₂ 消毒 15 min,无菌水冲洗 5 次,用无菌纱布吸干水分。将种子剖开取出胚,用解剖刀将胚切分成胚根、胚轴、子叶 3 部分,分别水平放置在培养基中。所用基本培养基为 MS 和 1/2MS 培养基,附加 10 g/L 蔗糖、6 g/L 琼脂,pH 5.8,121 ℃ 灭菌 15 min。

1.1.2 培养条件:光照强度为 2 000 lx,每日光照 16 h,培养温度 (25±1) ℃。

1.2 方法

1.2.1 外植体材料的获得:取灭菌后经层积处理的种子,接种于三角瓶中,经 3 周种子萌发后,分别切取胚根、胚轴、子叶 3 部分作为外植体转入体细胞胚胎诱导培养基中培养。

1.2.2 体细胞胚胎的发生:根据实验要求设置 MS 和 1/2MS 基本培养基(对照);MS 和 1/2MS+6-BA 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 mg/L;MS 和 1/2MS+2,4-D 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 mg/L 等不同组合,各组合均重复 6 次,采用 50 mL 三角瓶,每瓶 20 mL 培养基,来自同一胚的外植体接种于同一三角瓶。每 4 周继代 1 次,共继代 3 次。外植体分为层积种子与萌发幼苗的胚根、胚轴、子叶和未经层积处理种子。待胚状体产生后转移至 0.1 mg/L MS 培养基中光培养,诱导胚状体发育成熟。

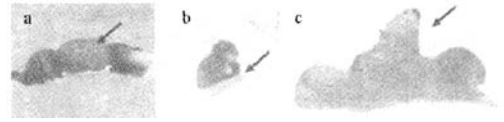
2 结果与分析

2.1 外植体材料的获得:未经层积处理的种子,经 8 周培养后,全部未萌发,即使长期培养,仍没有任何变化,解剖后发现这些种子中的绝大多数均具有胚,但胚体的大小在培养前后并无显著差异。在未附加任何激素的 MS 培养基中培养 3 周后,70% 经层积处理的种子不同程度地萌发。将获得的幼苗分成胚根、下胚轴和子叶 3 种外植体,接种于体细胞胚胎诱导培养基。

2.2 体细胞胚胎的诱导:在未添加任何植物激素的 MS 基本培养基上,外植体很少生长,基本保持原样。在含 6-BA 的培养基上,胚只稍有增大但无体胚或不定芽的形成。在使用生长素 2,4-D 的情况下,外植体在培养基上培养 1~2 个月,普遍肿大伸展,并从肿胀的子叶及胚轴上直接分化出黄白色不同发育时期的体细胞胚胎。

2.2.1 体细胞胚胎的形态发生:刺五加外植体在试管中培养 2 周后,自胚轴和胚根外植体的木质部与韧皮部结合部,即形成层处和子叶外植体的形成层迹线处开始产生突起,子叶、下胚轴和胚根外植体上所产生的胚状体,最初为一些圆形突起,表面十分光滑,产生数量较多,此为处于球形胚阶段的体细胞胚胎(图 1-a)。原胚纵向伸长后,先端两侧生长速度加快,此为心形胚(图 1-b)。进而子叶原基快速伸长生长成为鱼雷形胚,并最终发育形成成熟的体胚(图 1-c)。从培养的第 4 周开始,在突起的周围产生淡黄色愈伤组织。此愈伤组织经过两周的培养,颜色渐渐变浅,从愈伤组织表层略下层次开始形成原胚突起,继续培养后,原胚发育成为成熟胚。

2.2.2 2,4-D 对体细胞胚胎诱导的影响:2,4-D 对体胚和愈伤组织的影响如表 1 所示。在未添加生长素 2,4-D 的培养基中,经 10 周培养后,所有外植体均未见有体胚的产生。6 周培养后 0.5 mg/L 的 2,4-D 使 66.7% 的外植体产生了体胚,显著高于



a-原胚 b-心形胚 c-成熟胚

a-primary embryo b-heart-shape embryo c-mature embryo

图 1 刺五加体细胞胚胎的发生

Fig. 1 Somatic embryogenesis of *A. senticosus*

表 1 激素对体细胞胚胎和愈伤组织的影响(培养 6 周)

Table 1 Effect of hormone on somatic cell embryos and callus (cultured for 6-week)

2,4-D/ (mg · L ⁻¹)	体细胞胚胎		愈伤组织	
	诱导率/%	数量/个	诱导率/%	数量
0	0	0	0	0
0.1	0	0	0	0
0.2	29.6*	1.0	9.2	很少
0.5	66.7**	5.5**	28.5*	很少
1.0	27.3*	2.3*	45.4**	较少
2.0	20.0*	1.0	47.0**	较少

与 0 mg/L 2,4-D 比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs 0 mg/L 2,4-D group

0.2、1.0 和 2.0 mg/L 的体胚诱导率,后 3 者之间的诱导率没有显著性差异,但显著高于 0.1 mg/L 处理的诱导率。在体胚的数量上,附加 0.2 或 2.0 mg/L 2,4-D 的外植体上平均产生了 1.0 个体胚,0.5 mg/L 2,4-D 诱导产生的体细胞胚胎数量最多(5.5 个)。

愈伤组织的诱导率在试验设计的质量浓度梯度内与 2,4-D 的质量浓度呈正相关,1.0 与 2.0 mg/L 处理的诱导率均 $> 90\%$,显著高于其他水平。但无论何种质量浓度水平,产生的愈伤组织数量均很少,经由愈伤组织产生的体胚也仅有 1 例。

2.2.3 外植体对体细胞胚胎诱导的影响:经过 3 周培养,首先从下胚轴外植体直接产生了体胚,随着培养时间的推移,子叶和胚根外植体也先后产生了体胚。6 周培养后 57.1% 的下胚轴外植体产生了体胚,体胚诱导率显著高于子叶和胚根外植体,后两者间无显著差异,并且胚轴外植体产生的体胚数量最多,是子叶的 1.4 倍,胚根的 3.3 倍(图 2)。

2.2.4 培养基和外植体发育程度:MS 与 1/2 MS 培养基在体胚诱导率上没有显著差异。来自层积处理种子直接剖取的合子胚外植体,有 35.9% 产生了体胚,而来自萌发幼苗的所有外植体即便是长时间培养也未见有体胚的产生,外植体始终维持原有状态。

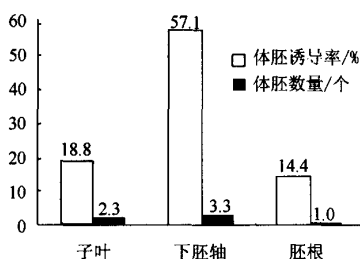


图 2 不同外植体对体细胞胚胎诱导的影响

Fig. 2 Effect of various explants on somatic cell embryos induction

2.3 体细胞胚胎的诱导成熟:已经诱导产生体胚的外植体在附加有相同质量浓度 2,4-D 的培养基中,经 2 周左右发育成为成熟的体胚。若将上述外植体整体继代入附加了 0.1 mg/L 2,4-D 的 MS 培养基中,培养 1 周后,外植体在诱导培养基中未产生体胚的区域逐渐产生数量不等的体胚,先前产生的体胚随着培养时间的推移依次经心形、鱼雷形等阶段后,渐次发育成熟。

3 讨论

五加科药用植物的体细胞胚胎发生,在人参^[7]、西洋参^[8]上已有成功报道。它们均为从外植体上先产生愈伤组织,由愈伤组织再分化出体细胞胚胎。桂耀林等^[7,9,10]认为刺五加与这些植物不同,在植物激素作用下,不经过胚性愈伤组织阶段,而由外植体直接产生体胚。在本实验中,虽然多数体胚直接产自外植体,但也发现有来自胚性愈伤组织的体胚。在多数植物中,2,4-D 只对胚性细胞或细胞团的形成起到诱导作用,而对体细胞胚胎的进一步发育与生长却是抑制的因素^[11]。但对于刺五加而言,不管其体胚发生途径如何,2,4-D 对胚性细胞的诱导及体胚的分化均起到了促进作用,像刺五加这样只需在培养基中加入 2,4-D 一种植物激素,就足以保证大量体细胞胚胎的产生,这一特点与在禾本科植物组织培养中要求有较高质量浓度的 2,4-D 以诱导胚状体产生的情况十分类似^[7]。笔者的研究表明,在来自刺五加合子胚外植体的培养过程中,0.5 mg/L 2,4-D 对于体胚的诱导率和产生的体胚数量是最优的,来自萌发 3 周幼苗的任何外植体,均不能产生体胚。

Choi 等^[9,10]认为来自萌发 1 周幼苗的外植体(子叶、下胚轴和胚根)在含 1.0 mg/L 2,4-D 的培养基中培养,体胚诱导率和数量为最高。这说明来自合子胚时期的外植体诱导产生体胚所需要的 2,4-D 质量浓度比来自幼苗外植体的低,且萌发时间越久,成胚能力越低。因此可以推论:若去除其他萌发抑制因素后,种子成熟后具有未成熟胚的刺五加的未经层积处理种子应该具有更高的成胚能力。

References:

- [1] Zhang J Y, Yan Z K, Wang B X, et al. *Flora of Changbai shan* (长白山植物志) [M]. Changchun: Jilin People's Publishing Company, 1982.
- [2] Zhu N, Zhuo L H, Zang R G. *Eleutherococcus senticosus* become an endangered species [J]. *Chin Biodiver* (生物多样性), 1998, 6(4): 253-259.
- [3] Zhao S L, Shen Y J. A research on the reproduction of *Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms by green branch cuttage [J]. *Spec Wild Eco Ani Plant Res* (特产研究), 2003, 3:1-2.
- [4] Zhang X C, Liu H W, Zhang H, et al. Effective elements on shoot-tip culture of *mangprickle Acanthopanax* [J]. *J North Forest Univ* (东北林业大学学报), 1996, 24(6): 107-110.
- [5] Zhang J F. A study of tissue culture and rapid breeding of *Acanthopanax senticosus* Harms [J]. *J Changchun Univ* (长春大学学报), 2004, 14(4): 73-75.
- [6] Li X B, Jing B, Chen G R. Study on genetic transformation of *Acanthopanax senticosus* [J]. *J Centr China Norm Univ: Nat Sci* (华中师范大学学报:自然科学版), 1995, 29(4): 494-497.
- [7] Guo Z C, Gui Y L. *Plant Somatic Embryogenesis and Artificial Seed* (植物体细胞胚胎发生和人工种子) [M]. Beijing: Science Press, 1990.
- [8] Tang F Y, Zhai Z X, Guo Y H. Callus induction and plant regeneration through somatic embryogenesis in American ginseng [J]. *Review China Agric Sci Technol* (中国农业科技导报), 2004, 6(5): 23-26.
- [9] Choi Y E, Yang D C, Yoon E S. Rapid propagation of *Eleutherococcus senticosus* via direct somatic embryogenesis from explants of seedlings [J]. *Plant Cell Tis Org Cult*, 1999, 58: 93-97.
- [10] Choi Y E, Kim J W, Yoon E S. High frequency of plant production via somatic embryogenesis from callus or cell suspension cultures in *Eleutherococcus senticosus* [J]. *Annals Bot*, 1999, 83: 309-314.
- [11] Cui K R, Xing G S. The induced and regulatory effects of plant hormones in somatic embryogenesis [J]. *Hereditas* (遗传), 2000, 22(5): 349-354.