

AFLP 更能反映表型的多样性及进化史^[5]。由于省去了酶切,连接等的步骤,整个方法比 AFLP 操作简单,相比之下,具有更广泛的应用前景。

References:

- [1] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction; its application to mapping and gene tagging in Brassica [J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 103: 455-461.
- [2] Li G, Gao M, Yang B, et al. Gene for gene alignment between the Brassica and Arabidopsis genomes by direct transcriptome mapping [J]. *Theor Appl Genet*, 2003, 107 (1): 168-180.
- [3] Riaz A, Li G, Quresh Z, et al. Genetic diversity of oilseed brassica napu inbred lines based on sequence-related amplified polymorphism and its relation to hybrid performance [J]. *Plant Breeding*, 2001, 120(5): 411-415.
- [4] Lin Z X, Zhang X L, Nie Y C, et al. Construction of a genetic linkage map for cotton based on SRAP [J]. *Chin Sci Bull (科学通报)*, 2003, 48(19): 2063-2067.
- [5] Ferriol M, Pico B, Nuez F, et al. Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP marker [J]. *Theor Appl Genet*, 2003, 107(2): 271-282.
- [6] Lin Z X, Zhang X L, Nie Y C, et al. Construction of a genetic linkage map for cotton based on SRAP [J]. *Chin Sci Bull (科学通报)*, 2003, 48(19): 2063-2067.
- [7] Ren Y, Wang D Y, Zhang Y D, et al. Optimization of SRAP-PCR in Hot Pepper (*Capsicum annum* L.) [J]. *Mol Plant Breeding (分子植物育种)*, 2004, 2(5): 689-693.
- [8] Wu W H, Wang L, Cheng G Z, et al. Studies on molecular genetics of rice blast fungus population-comparison of genetic and pathotypic structures of two rice blast fungus populations derived from Guangdong and Yunnan provinces of China [J]. *Sci Agric Sin (中国农业科学)*, 2004, 37(5): 675-680.
- [9] Zhang L, Ye H C, Li G F. Related factors of artemisinin biosynthesis in clone strain of *Artemisia annua* L. [J]. *Chin J Appl Environ Biol (应用与环境生物学报)*, 2004, 10(3): 277-280.
- [10] Wu Z P, Yang W X, Liu D Q, et al. Establishment of SRAP technique system in wheat genome [J]. *J Agric Hebei (河北农业大学学报)*, 2005, 28(3): 66-69.

前体和诱导子饲喂黄芩愈伤组织强化黄芩苷生产研究

王梦亮,任振兴,刘滇生

(山西大学现代化学研究所,山西 太原 030006)

黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 为唇形科植物的干燥根,性寒、味苦,具有清热燥湿、泻火解毒等功效^[1],含数种黄酮苷。黄芩苷(baicalin)是其主要有效成分,药理作用最强,具有抑菌抗炎^[2]、抗 HIV-1 活性^[3,4]、抗氧化^[5]、抗变态反应^[6]和清除自由基^[7]等药理作用。因此近年来,临床上对黄芩药材的需求量大增,黄芩野生资源破坏严重,产量日趋下降,有的产区种群已濒临灭绝^[8],因此利用植物组织培养技术对黄芩进行组织培养来生产其有效成分是目前供需矛盾的有效途径之一。

在植物细胞培养中,向培养基中加入目的化合物生物合成的前体及应用诱导子是提高有用次生代谢产物产量的有效途径。目前在黄芩愈伤组织培养研究中,尚未见相关的报道。本实验研究了 3 种前体和 3 种诱导子对黄芩愈伤组织合成黄芩苷的影响,旨在为黄芩苷的工业化生产提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料:黄芩愈伤组织由本实验室从黄芩试管苗

幼茎诱导而来。培养基为 MS 培养基(附加 0.2 mg/L IAA 和 2 mg/L 6-BA),蔗糖 4%,琼脂 0.8%,pH 5.8,暗培养,(25±1)℃培养周期为 40 d。

1.2 添加前体和诱导子实验设计:前体物为乙酸钠、L-苯丙氨酸和酪氨酸;浓度梯度为 0.1、0.5、1.0、2.0 mmol/L。诱导子为硝酸钾、水杨酸和硝酸银;浓度梯度分别为 0.01、0.1、0.5 mmol/L;0.1、1.0、10 mmol/L;0.01、0.05、0.1 mmol/L。

将新鲜黄芩愈伤组织接种于添加各种前体和诱导子的固体培养基中并立即置于培养箱中暗培养,处理时间为 40 d。对照为不添加任何前体或者诱导子。

1.3 干、鲜质量测定方法:将培养完成的愈伤组织用滤纸将表面的水吸去,放在天平上,称其鲜质量,随后放入烘箱(60℃)烘烤至恒重,再称其干质量,并可得到细胞的干质量比。

1.4 HPLC 法测定黄芩苷

1.4.1 色谱条件^[1]:ODS 色谱柱(150 mm×4.6

mm,大连依利特科学仪器有限公司),流动相:水-甲醇-磷酸(47:53:0.2),检测波长:280 nm,柱温:35℃,进样量:10 μL,体积流量:1 mL/min,按外标法以峰面积计算供试品溶液中黄芩苷。

1.4.2 黄芩愈伤组织提取液的制备:称取0.3 g黄芩愈伤组织干粉,加50%乙醇80 mL超声提取20 min,定容至100 mL,精密移取上清液1 mL于10 mL量瓶中,用甲醇定容,用0.45 μm微孔滤膜滤过后进样。

1.4.3 对照品溶液的制备:精密称取黄芩苷对照品适量,用甲醇配成0.172 mg/mL溶液,作为对照品溶液。

1.4.4 标准曲线制备:取0.172 mg/mL的对照品溶液,按一定的比例用甲醇稀释成172、68.8、55.0、44.0、35.2、28.2、5.64 μg/mL的溶液,各取10 μL,注入色谱仪,记录色谱图。以对照品溶液的质量浓度(C)为横坐标,相应的峰面积(S)为纵坐标得回归方程: $S=30\ 324\ C+24\ 715$, $r=0.999\ 6$,线性范围:5.64~172 μg/mL。

2 结果与分析

2.1 前体饲喂对黄芩苷积累的影响

2.1.1 乙酸钠浓度的影响:乙酸钠对黄芩苷的合成具有促进作用,加入0.5 mmol/L乙酸钠,黄芩苷的产量最高,是对照的1.76倍,而2 mmol/L乙酸钠出现了明显的抑制作用。通过黄芩苷量的比较,可以看出黄芩苷随乙酸钠浓度的变化是起伏波动的,乙酸钠的最佳浓度应为0.5 mmol/L。

2.1.2 L-苯丙氨酸浓度的影响:只有0.1 mmol/L的L-苯丙氨酸对黄芩苷的合成有促进作用,随着浓度的增加,对黄芩苷的抑制作用在增强。

2.1.3 酪氨酸浓度的影响:加入一定浓度的酪氨酸可明显提高黄芩苷的量,加入0.1、0.5 mmol/L的酪氨酸,黄芩苷的量分别是对照的1.67和1.29倍,但其浓度大于0.5 mmol/L后出现抑制,并且随着浓度的增加抑制作用在增强。

2.2 诱导子饲喂对黄芩苷积累的影响

2.2.1 硝酸铈铵浓度的影响:0.01 mmol/L的硝酸铈铵可以显著提高黄芩苷的量,比对照提高了112%,但随着浓度的增加反而出现了抑制。

2.2.2 水杨酸和硝酸银浓度的影响:不同浓度的两种诱导子对黄芩苷的合成均有抑制作用,这可能与它们均不同程度地抑制了黄芩愈伤组织的生长有关,因此它们都不是有效的诱导子。

2.3 前体与诱导子协同作用对黄芩苷积累的影响:通过上面的实验可以得知,0.5 mmol/L的乙酸钠

和0.01 mmol/L的硝酸铈铵对黄芩苷积累而言效果最好,因此将二者同时加入培养基中来观察它们协同作用对黄芩苷量的影响。暗培养40 d后黄芩苷的量达到了1.33 g/L,比对照提高了161%,说明二者的协同作用可以有效促进黄芩苷的积累。

3 讨论

黄芩的主要有效成分为黄酮类化合物,根据苯丙烷类代谢途径示意图^[9],一般认为黄芩苷是经醋酸-丙二酸途径生成的间苯三酚与经莽草酸途径生成的肉桂酸结合而生成,所以选择乙酸钠、苯丙氨酸、酪氨酸为其生物合成的前体物。本实验结果表明3种前体均能提高黄芩愈伤组织的生物量和黄芩苷的产量,以0.5 mmol/L的乙酸钠的效果最好,可使黄芩苷的产量比对照提高76%。

诱导子活化植物次生代谢途径的一个明显的特点是具有种属专一性,即对特定次生代谢产物进行选择诱导,因此对诱导子的筛选成了目前的一个研究热点^[10]。本实验结果也说明了这一点,3种诱导子中只有硝酸铈铵对黄芩苷的积累而言是一种有效的诱导子,且还受到浓度的制约,而其他两种诱导子反而产生抑制作用。

诱导子和前体物的联合应用可大大促进目的产物的合成,这是因为诱导子和前体分别作用于代谢合成的不同层面上,相当于在催化反应中加入底物的同时加入适量的催化剂,使得整个反应顺利进行^[11]。本实验结果也证明了这一点,0.5 mmol/L的乙酸钠和0.01 mmol/L的硝酸铈铵的协同作用可以使黄芩苷的量比对照提高161%,达到1.33 g/L,这可为工业化生产黄芩苷提供理论依据。

References:

- [1] Ch P (中国药典) [S]. Vol 1. 2000.
- [2] Hou Y N, Zhu X Y, Cheng G F. Study on the anti-inflammatory mechanism of baicalin [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2000, 35(3): 161-164.
- [3] Kitamura K, Honda M, Yoshizaki H, et al. Baicalin, an inhibitor of HIV-1 production *in vitro* [J]. *Antiviral Res*, 1998, 37: 131-140.
- [4] Li B Q, Fu T, Yao D Y, et al. Flavonoid baicalin inhibits HIV-1 infection at the level of viral entry [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 276(2): 534-538.
- [5] Masataka Y, Keiko M. Interaction of iron with polyphenolic compounds application to antioxidant characterization [J]. *Analyt Biochem*, 1998, 257: 40-44.
- [6] Shen Y C, Chiou W F, Chou Y C, et al. Mechanisms in mediating anti-inflammatory effects of baicalin and baicalein in human leukocytes [J]. *Europ J Pharm*, 2003, 465: 171-181.
- [7] Gao Z H, Huang K X, Yang X L, et al. Free radical

scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of *Scutellaria baicalensis* Geogi [J]. *Biochem Biophys Acta*, 1999, 1472: 643-650.

[8] Li X, Huang L Q, Shao A J, et al. Study on *Scutellaria baicalensis* Geogi source [J]. *World Sci Technol: Mod Tradit Chin Mater Med* (世界科学技术—中药现代化), 2003, 5 (6): 54-58.

[9] Chen S Y, Chen K S, Liu W H, et al. Regulation and

expression of the PAL in plant and its outlook [J]. *J Fruit Sci*, 2003, 20(5): 351-357.

[10] Xiao C Q, Gao H, Chi R A. Progress in application of elicitors to promote the production of plant secondary metabolites [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2004, 16(5): 473-476.

[11] Yuan Y J, Ge Z Q. *Plant Cell Culture Engineering* (植物细胞培养工程) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2004.

杭白菊花瓣组织培养的初探

牛颜冰¹, 姚敏¹, 孟庆章¹, 王玉庆¹, 郭吉刚², 陈占峰³

(1. 山西农业大学, 山西 太原 030801; 2. 山西生物应用职业技术学院, 山西 太原 030031; 3. 山西丰源药业有限公司, 山西 芮城 040801)

杭白菊 *Chrysanthemum morifolium* Ramat. 属于菊科中的菊花, 是一种常用的中药, 也是一种提神饮品^[1]。花中含有挥发油 0.13%、菊苷、腺嘌呤、黄酮、胆碱、水苏碱及微量维生素 A 样物质、维生素 B₁、氨基酸及刺槐素等, 对中枢神经具镇静作用, 而且有解热、增强毛细血管抵抗力、扩张冠状动脉作用^[2], 另有抗菌、抗病毒、抗炎、抗衰老、抗肿瘤的作用^[3]。可用于目赤疼痛、头痛眩晕、眼花缭乱、风热感冒、胃痛食少、水肿尿少等症^[2]。是浙江省八大名药材“浙八味”之一。随着国内外医药、食品和饮料加工业的迅猛发展, 作为药食两用的菊花用量急剧增加^[2]。长期以来杭白菊采用分株、扦插等无性繁殖方法, 以及茎尖组织培养方法进行繁殖。前两种方法易受环境影响, 繁殖周期长, 而且极易导致病毒感染。后一种方法虽然取材方便, 脱毒率高, 脱毒速度快, 能在较短的时间内得到较多的原种繁殖材料, 但这种方法存在的缺点是外植体不易消毒, 存活率低^[4], 要求操作熟练且快, 因为茎尖长时间暴露在空气中易失水而死亡, 还会存在弱苗试管苗生长缓慢、不生根等问题。因此脱毒技术相对简单, 势在必行。在植物体内病毒分布不均匀, 在分生组织和无维管束的组织器官中一般无病毒或量少^[5-7]。花瓣不仅病毒量少, 而且其组织培养具有取材容易、繁殖系数高的特点。因此采取花瓣组织培养可获得优良杭白菊种苗以供生产应用。本试验以杭白菊为试验材料, 利用其花瓣离体培养, 通过优化培养技术以便筛选出最佳的培养基组合, 从而提高繁殖系数, 获得优良的

试管苗, 为以后向生产上示范推广提供优良的种源。

1 试验材料和方法

1.1 试验材料: 试验于 2005 年 10 月—2006 年 1 月进行。试验材料源于山西农业大学园艺学院实验苗圃的杭白菊植株, 2005 年采自浙江省桐乡市。

1.2 试验方法

1.2.1 试验条件: 以 MS 培养基为基本培养基, 通过改变激素种类、浓度及添加不同的附加物形成不同培养基组合。每天的光照时间为 12 h, 光照强度为 2 500 lx, 培养温度为 (25±2) °C。

1.2.2 试验材料的获取及消毒: 从健康无病虫害的杭白菊上取饱满且苞片未开裂的花蕾^[8], 于自来水中荡洗 1 次, 再用洗衣粉上清液荡洗 1 次, 自来水荡洗 3 次, 再用蒸馏水荡洗 2~3 次, 拿入无菌室; 在超净工作台上, 按表 1 的灭菌时间进行灭菌, 每次灭菌剂处理后都用无菌水荡洗 4~5 次。

表 1 不同消毒方法对抗白菊花瓣消毒效果的比较(接种后 4 d)

Table 1 Comparison of different sterilization methods on petals of *C. morifolium* (after 4 d)

| 序号 | 70%酒精/s | 0.1%HgCl ₂ /min | 10%NaClO/min | 接种数 | 污染率/% |
|----|---------|----------------------------|--------------|-----|-------|
| a | — | 5 | 8 | 100 | 0 |
| b | — | 5 | 10 | 220 | 2 |
| c | 45 | 10 | — | 80 | 0 |

1.2.3 愈伤组织或胚状体的诱导: 在无菌条件下, 将无菌材料放在无菌的滤纸上, 将其无菌水吸干, 再放入

收稿日期: 2006-03-17
 基金项目: 山西省自然科学基金项目(20051071); 山西农业大学科技创新基金项目(2004085)
 作者简介: 牛颜冰(1968—), 女, 副教授, 博士。 Tel: (0354)6185019 E-mail: niuniugood@yahoo.com.cn