

- droxyecdysone in *Ajuga hairy roots*; fate of 6- α and 6 β -hydrogens of lathosterol [J]. *Bioorg Med Chem*, 1999, 7: 2925-2930.
- [8] Ryo H, Yoshinori F. Biosynthesis of 20-hydroxyecdysone in *Ajuga hairy roots*; the possibility of 7-ene introduction at a late stage [J]. *Phytochemistry*, 2000, 53: 733-737.
- [9] Zakirova R P, Malikova M K. Accumulation dynamics of ecdysterone and carbohydrates in callus tissue of *Ajuga turkestanica* [J]. *Chem Nat Comp*, 2001, 37(3): 266-268.
- [10] Tamara S, Pensri W, Vladimir S, et al. Distribution and identities of phytoecdysteroids in the genus *Briza* (Gramineae) [J]. *Biochem Syst Ecol*, 1998, 26: 781-791.
- [11] Chadin I, Volodin V, Whiting P, et al. Ecdysteroid content and distribution in plants of genus *Otamogeton* [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2003, 31: 407-415.
- [12] Zhang C Y, Liang S W, Zhang G Q. Determination of ecdys-
terone in *Achranthes bidentata* from different locations [J]. *Chin Pharm J* (中国药杂志), 2001, 36(10): 699-700.
- [13] Tamara S, Michaela B, Satyajit D S, et al. Phytoecdysteroids from *Lamium* spp.: identification and distribution within plants [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2001, 29: 891-900.
- [14] Li J T, Hu Z H, Peng L, et al. Structural development of root and their relationship to accumulation of triterpenoid saponins in *Achranthes bidentata* Bl. [J]. *J Mol Cell Biol* (分子细胞生物学报), 2007, 40(2): 121-129.
- [15] Li H Y. Determination of ecdysterone in stems and leaves of *Achranthes bidentata* [J]. *Technol Chin Med Mater* (中药材科技), 1982 (3): 30.
- [16] Zhang H, Zhang Z Z, Wei Y. Study on contents of ecdysterone in *Achranthes bidentata* of different sources and variation [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2000, 23(12): 734-735.

香鳞毛蕨配子体发育及快速繁殖的研究

黄庆阳¹, 樊锐锋², 袁 强¹, 常 缨^{1,3*}

(1. 东北农业大学生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江中医药大学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150040;
3. 黑龙江省农业科学院博士后工作站, 黑龙江 哈尔滨 150086)

香鳞毛蕨 *Dryopteris fragrans* (L.) Schott 是鳞毛蕨科鳞毛蕨属植物。香鳞毛蕨对皮肤病的治疗效果显著, 是具有极大的开发潜力和应用前景的纯天然中药^[1~3]。香鳞毛蕨在中国以黑龙江省为分布中心, 主要生长在高寒地区的滑石坡、火山岩裂隙中。近年来, 香鳞毛蕨的药用价值受到了广泛的关注, 但是人为干扰使其野生资源正遭到严重的破坏, 因此对香鳞毛蕨资源的保护性研究更具有必要性和紧迫性。应用蕨类植物孢子进行组织培养, 是快速繁育种苗的有效途径^[4]。王全喜^[5]、Momose^[6]等对鳞毛蕨科植物的配子体发育进行了大量的研究, 但是关于香鳞毛蕨配子体形态发育的研究尚未见报道。本实验通过对香鳞毛蕨配子体发育和培养模式的研究, 建立了香鳞毛蕨的快速体系, 为提出香鳞毛蕨引种栽培策略、实现香鳞毛蕨植物资源的可持续利用奠定了基础。

1 材料和方法

香鳞毛蕨采自黑龙江省五大连池市二池的火山熔岩的岩缝间。取成熟的孢子置于 1.5 mL 离心管内, 滴入无菌水, 充分振荡使成悬浮液, 4 000 r/min

离心 1 min, 使孢子全部沉淀, 弃去上清液。离心管内再滴入约 1.0 mL 的 0.1% HgCl₂ 溶液, 灭菌 2 min, 无菌水冲洗 4~5 次, 用上述离心方法获得无菌的孢子悬浮液。

采用不同的培养方法, 包括固体培养基培养、液体培养基培养和土壤培养 3 种。

固体培养基采用 MS、1/2MS、1/4MS 和改良的 Knop's 配方 (NaH₂PO₄ 0.2 g、KNO₃ 0.2 g、MgSO₄ 0.2 g、Ca(NO₃)₂ 0.8 g、蒸馏水 1 000 mL), 琼脂浓度为 1%。培养基分装三角瓶中, 高压灭菌 (121 ℃、15 min) 后备用。待原叶体长出性器官后每 3 天用无菌水冲洗, 以促进受精。

液体培养基培养是将 MS、1/2MS、1/4MS 和改良 Knop's 液体培养基直接分装在三角瓶中, 高压灭菌 (121 ℃、15 min) 后备用。

土壤培养是将过细筛草炭土和细沙以体积为 1:1 比例均匀混合后放入底部钻有孔的塑料盘 (大小为 25 cm×20 cm×5 cm) 内, 基质厚度约 3 cm, 将基质表面整平、压实后, 将塑料盘放入装有水的平盘中泡水, 待基质表面湿润后取出备用。待原叶体长出

收稿日期: 2007-01-12

基金项目: 黑龙江省博士后科研启动基金资助项目 (LHK-04051); 东北农业大学科学研究启动基金和黑龙江省农业科学院博士后科研启动基金资助

作者简介: 黄庆阳 (1981-), 女, 黑龙江人, 硕士研究生, 主要从事资源植物学和植物分子生物学研究工作。

Tel: (0451) 55190410 E-mail: huangqingyang@163.com

* 通讯作者 常 缨 E-mail: chang_ying72@163.com

性器官后每天用喷雾器浇水,以促进受精。

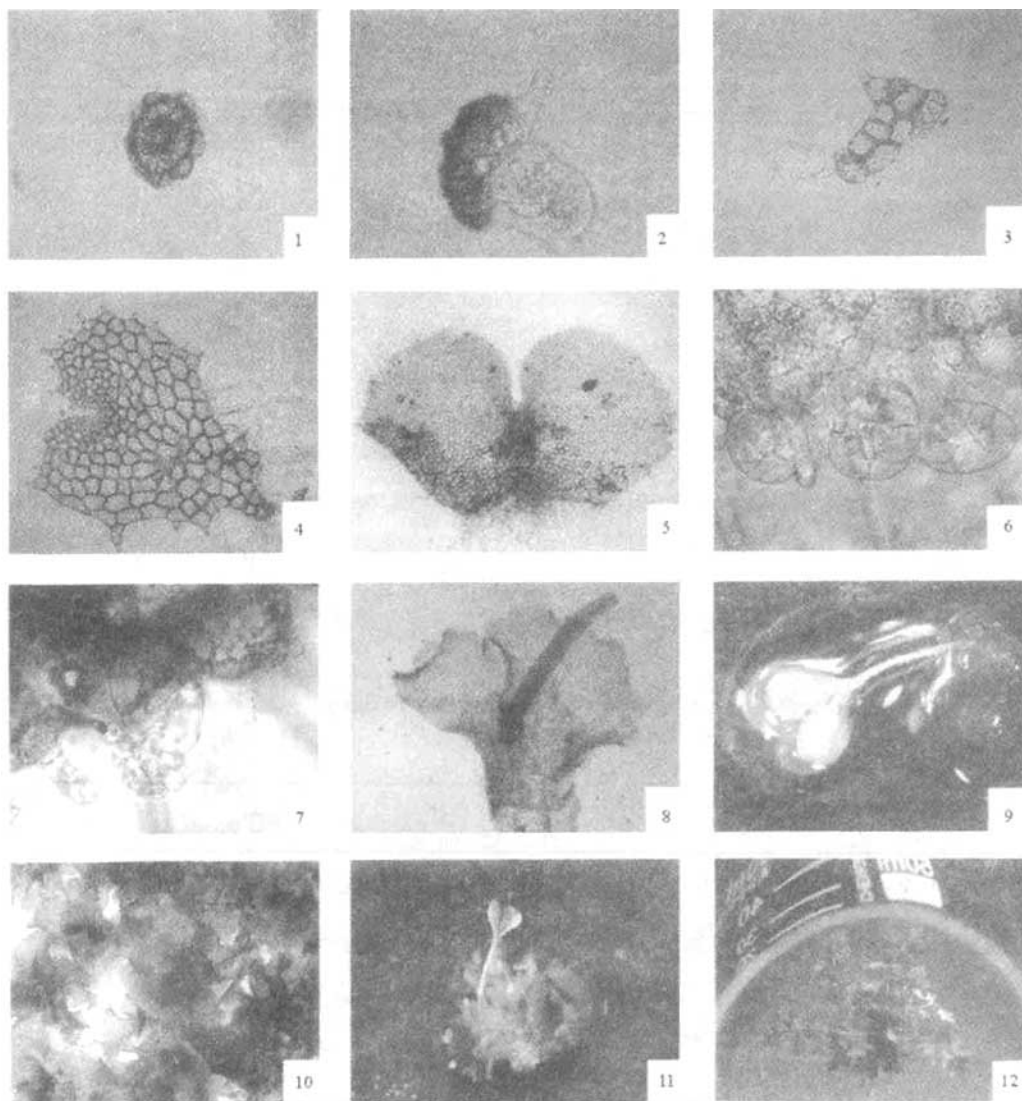
将获得的孢子悬浮液接种在上述培养基上。接种后先黑暗处理 36 h,以促其同步萌发。然后在下列条件下培养:光照 12 h、黑暗 12 h,光强约为 2 000 lx,温度 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ 。重复培养 3 次,每次 3 份,培养过程中始终保持一定湿度。依各发育阶段进行显微镜下活体观察照相并记录(显微镜为 Olympus BH-2)。

2 结果与分析

2.1 香鳞毛蕨配子体发育及幼胚的形成:香鳞毛蕨

孢子棕褐色,单裂缝,表面带脊状或瘤状突起(图 1-1)。孢子接种 5~7 d 开始萌发,孢子萌发产生的第一个细胞为假根,表现为书带蕨型(Vittaria type)^[7](图 1-2)。以后逐渐形成丝状体、片状体和原叶体(图 1-3、4)。丝状体可达 3~9 个细胞,30 d 左右时形成前端稍向前突的多细胞广阔板状片状体,最后形成左右对称的心脏形的原叶体(图 1-5)。配子体发育为三叉蕨型^[8]。

接种后 50~60 d 开始产生精子器(图 1-7)和颈



1-孢子 2-书带蕨型 3-片状体 4-幼原叶体 5-成熟原叶体 6-颈卵器 7-精子器

8-幼胚 9-第一真叶 10-原叶体群 11、12-组培植株

1-spore 2-showing Vittaria-type 3-prothallial plate 4-young prothallus 5-adult prothallus 6-archegoniums

7-antheridium 8-young embryo 9-first leaf 10-prothallus community 11,12-tissue culture seedling

图1 香鳞毛蕨生活史

Fig. 1 Life history of *D. fragrans*

卵器(图 1-6),当精子成熟,盖细胞一侧开裂或盖细胞被穿破,精子逸出。20~30 min 后,若具鞭毛的精子不能与卵细胞结合,立即死亡且随即解体。颈卵器成熟后顶端开裂,精子进入,完成受精作用。受精后的颈卵器明显膨大,呈深褐色。

精卵受精 10 d 以后,可以观察到原叶体上生成的幼胚(图 1-8)。胚的不断生长冲破颈卵器一部分配子体组织,幼孢子体形成(图 1-9)。幼孢子体长出后,原叶体仍继续发育,直至长出 2~3 枚幼小的真叶后,原叶体逐渐枯死。

2.2 香鳞毛蕨孢子繁殖技术

2.2.1 培养基中无机盐浓度对孢子萌发和配子体发育及成苗的影响:香鳞毛蕨孢子在 Knop's 培养基上 5~7 d 时最早萌发,且萌发率可达 82.6%,MS 和 1/2MS 培养基 1 个月时也不萌发。固体培养基上的孢子萌发、原叶体形态正常,原叶体呈对称的倒卵状心脏形。而液体培养基孢子萌发、原叶体的发育形态不正常。土壤培养 10 d 左右孢子开始萌发,形成原叶体时间比 Knop's 培养基晚 15 d 左右。

从表 1 中可以看出,在 Knop's 培养基中培养的孢子萌发时间最早,萌发率最高,配子体及幼孢子体出现的都最早。但是在土壤培养中的受精率较高,可能是受精期间喷水均匀的原因。然而在土壤培养中由于高湿且富集营养,容易滋生菌类和苔藓类,严重破坏了香鳞毛蕨的生长环境,所以确定改良的 Knop's 培养基为最佳培养基。

表 1 香鳞毛蕨孢子在不同培养基中的萌发与发育状况
Table 1 Germination and development of spores of *D. fragrans* in various culture media

培养基	萌发时间/d	萌发率/%	配子体大量出现的时间/d	第 1 株幼孢子体出现时配子体的百分率/%	配子体发育成孢子体的百分率/%
MS	30 以上	—	—	—	—
1/2MS	30 以上	10.0	—	—	—
1/4MS	20	24.2	70	115	16.5
Knop's	6	82.6	45	76	37.1
土壤	10	42.1	66	100	40.2

2.2.2 培养基中蔗糖浓度对孢子萌发的影响:孢子接种在蔗糖分别为 0.1%、2%、3% 的 Knop's 培养基上,结果显示在添加蔗糖的培养基上,孢子不萌发或延迟萌发,孢子的萌发时间长于不添加蔗糖的培养基,且萌发率较低。所以香鳞毛蕨孢子在不添加蔗糖的培养基上萌发率最高。

2.2.3 试管苗的移栽:孢子体长出 3~4 片叶子(叶长约为 1~2 cm)时(图 1-12),将三角瓶放在自然光

照下炼苗 7 d,再打开瓶盖炼苗 7 d,用镊子轻轻夹出试管苗,洗净根部的培养基,移栽至土壤(草炭土和细沙体积为 1:1),湿度保持在 80% 以上,薄膜覆盖 1 周后揭膜,移栽成活率可达 80% 以上。移栽时,最适温度控制在 25 ℃ 左右。

3 讨论

3.1 王全喜^[1]对鳞毛蕨科的粗茎鳞毛蕨、华北鳞毛蕨、远东鳞毛蕨的配子体形态有过报道。香鳞毛蕨具有:孢子单裂缝,孢子萌发为书带蕨型,原叶体发育为三叉蕨型。原叶体心脏形,具单细胞毛状体。香鳞毛蕨在形态发育上与鳞毛蕨科的粗茎鳞毛蕨、华北鳞毛蕨、远东鳞毛蕨的配子体形态发育具有相似的特征。

3.2 本实验结果显示香鳞毛蕨孢子在 Knop's 培养基上 5~7 d 时最早萌发,MS、1/2MS、1/4MS 培养基不萌发或萌发较晚,这表明香鳞毛蕨孢子只能在低盐培养基上萌发。Miller^[8]等研究也表明孢子萌发培养基一般用 MS 为基本培养基,但有些种类在全量 MS 中不能萌发,只有在稀释的 MS、Knudson、Knop's 等低盐培养基上才可萌发。本实验确定改良的 Knop's 培养基为最佳培养基。

3.3 本实验研究了蔗糖对香鳞毛蕨孢子萌发的影响,实验表明培养基中不添加或添加低浓度(低于 2%)的蔗糖利于孢子萌发,高浓度的蔗糖抑制孢子萌发。袁艺^[9]等也发现,紫萁孢子萌发对糖的浓度要求较严格,在 2%~3% 时较适宜,当低于 2% 或高于 4% 时,孢子萌发率明显降低。糖类的促进作用只是在光合作用受到限制后才表现出来,从某种意义上看,配子体的正常生长不需要外源糖。

3.4 通过本实验的研究,已完成香鳞毛蕨配子体和成苗的详细观察,建立了香鳞毛蕨孢子的人工繁殖方法。实验表明,香鳞毛蕨的配子体形态发育正常,从孢子播种到第一株幼孢子体仅需要 76 d,幼孢子体移栽成活率可达 80% 以上。因此,可以建立香鳞毛蕨的人工繁殖体系,为提出香鳞毛蕨引种栽培策略、实现香鳞毛蕨植物资源的可持续利用奠定了基础。

致谢:香鳞毛蕨植物由哈尔滨师范大学刘保东副教授鉴定,特此致谢。

References:

- [1] Shen Z B, Jin Z X, Zhang D L, et al. Pharmacological study on psoriasis of *Dryopteris fragrans* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(5): 448-449.
- [2] Shen Z B, Jin Z X, Zhang D L, et al. Pharmacognostical studies on *Dryopteris fragrans* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(7): 661-663.

- [3] Ito H, Muranaka T, Mori K, et al. Dryofragin and aspidin PB. piscicidal components from *Dryopteris fragrans* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1997, 10(45): 1720-1722.
- [4] Wei D S, Zeng L L, Wang Y P, et al. Propagation and growth of *Neolepisorus truncatus* Ching P. S. Wang [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1998, 23(9): 524-526.
- [5] Wang Q X, Shao C W, Cao J G, et al. Study on the development of gametophytes of ferns from north-eastern China. M. *Dryopteridaceae* [J]. *J Harbin Norm Univ* (哈尔滨师范大学学报), 1995, 4(11): 83-88.
- [6] Momose S. *Prothallia of the Japanese Ferns* [M]. Tokyo, University of Tokyo Press, 1967.
- [7] Kayar B K, Kaur S. Gametophytes of homosporous fern [J]. *Bot Res*, 1971, 37(3): 295-396.
- [8] Miller J H. Fern gametophytes as experimental material [J]. *Bot Res*, 1968, 34: 361-370.
- [9] Yuan Y, Tian S N, Ye A H, et al. Studies on the rapid propagation of *Osmunda japonica* Thunb. [J]. *Acta Horticult Sin* (园艺学报), 2002, 29(3): 247-250.

HPLC 法测定不同生长期两面针药材中氯化两面针碱

刘华钢¹, 黄秋洁², 赖茂祥³

(1. 广西医科大学, 广西 南宁 530012; 2. 广西中医学院, 广西 南宁 530001;

3. 广西中医药研究院, 广西 南宁 530035)

两面针是《中国药典》2005 年版收载的常用中药,也是广西大宗主产优势中药材之一,其植物来源为芸香科植物两面针 *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC. 的干燥根。由于两面针具有良好的行气止痛、活血化瘀、祛风通络作用,故为常用药物,广泛应用于中医处方、中成药及精细化工产品中,两面针药材及其相关产品所属产业已经成为振兴广西经济的特色产业之一。为了更好地合理利用两面针药用资源,本实验对不同月份生长期两面针药材中有效成分氯化两面针碱的量进行考察,探讨两面针中氯化两面针碱成分的变化规律,以便对两面针药材的质量进行综合的评价。

1 仪器与试剂

液相色谱仪系统包括:Agilent 1100 系列高效液相色谱仪(包括 G1131 四元泵, G1313 自动进样器, G1131 脱气机, G1314A 紫外可见检测器, G1316 柱温箱,并配备 HP1100 工作站)。

氯化两面针碱(中国药品生物制品检定所,批号 848-9901);两面针样品 1~12 月采收,所有样品均采自广西南宁市高峰林场,经广西中医药研究院中药室赖茂祥副研究员鉴定为芸香科植物两面针 *Z. nitidum* (Roxb.) DC. 的干燥根。乙腈为色谱纯;水为高纯水;其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱: Lichro Sphere C₁₈

(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-缓冲液(0.2%三乙胺+0.2%磷酸)(30:70);柱温:35℃;体积流量:1.0 mL/min;检测波长:272 nm;进样量 10 μL。理论塔板数按氯化两面针碱计算应不低于 3 000。按上述色谱条件,氯化两面针碱对照品,样品的色谱图见图 1。在样品色谱图中,与对照品色谱相应的位置上有一相同保留时间的色谱峰。

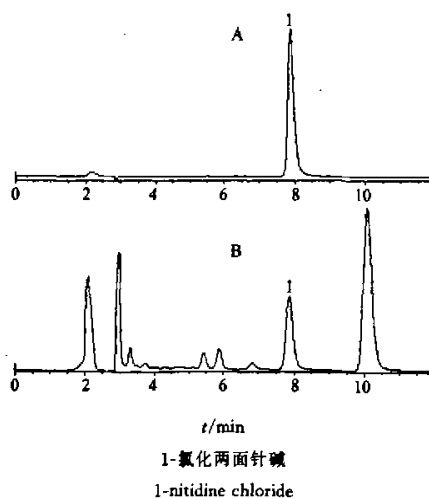


图 1 对照品(A)和药材样品溶液(B)的 HPLC 图谱
Fig. 1 HPLC Chromatograms of reference substance (A) and sample solution (B)

2.2 对照品溶液的制备:精密称取氯化两面针碱对照品 9.75 mg 置 25 mL 量瓶中,加适量甲醇使之溶

收稿日期:2007-01-10

作者简介:刘华钢(1956—),女,教授,博士生导师,广西医科大学副校长,研究方向为中药新剂型、新制剂及中药药理作用机制的研究。
Tel:(0771)5350964 E-mail:hglu@263.net