

表 1 野生、退化、复壮蜜环菌对同一天麻生物产量、天麻素量的影响

Table 1 Effect of wild, degradative, and rejuvenative *A. melaleuca* on yield of *G. elata* and content of gasterodrin

菌号	鲜质量/g	干质量/g	天麻素/%	
野生菌种	A1-1	444.85	290.53	0.443 8 *
	A1-2	452.37	301.12 (297.51 ± 6.05) **1	0.432 4 (0.437 6 ± 0.005 7) **1
	A1-3	450.52	300.89	0.437 6
退化菌种	A2-1	212.04	110.64	0.155 8
	A2-2	224.38	103.27 (107.41 ± 3.77)	0.167 2 (0.162 0 ± 0.005 8)
	A2-3	219.56	108.33	0.163 0
复壮菌种	A3-1	438.42	287.26	0.431 2
	A3-2	445.55	292.32 (290.14 ± 2.60) **2	0.438 2 (0.436 7 ± 0.004 9) **2
	A3-3	440.31	291.85	0.440 7

\* 3 次测定结果的均值; \*\*1 野生菌种组与退化菌种组之间比较差异极显著 ( $P < 0.01$ ); \*\*2 复壮菌种组与退化菌种组之间比较差异极显著 ( $P < 0.01$ )

\* mean of three analyses; \*\*1 significant difference between wild and degradative strains ( $P < 0.01$ ); \*\*2 significant differences between rejuvenative and degradative strains ( $P < 0.01$ )

( $P < 0.01$ ); 复壮菌种与退化菌种处理组间差异极显著 ( $P < 0.01$ ); 野生菌种与复壮菌种处理组间无显著性差异, 在栽培试验中复壮的蜜环菌与野生的第一代蜜环菌菌材上的菌索 (rhizomorph) 颜色红亮、粗壮, 生长态势旺盛; 而无性繁殖第二代蜜环菌菌索色泽、生长态势均次于第一代菌索; 第三代菌索则更差, 这一现象符合微生物生长代谢的一般规律, 表明栽培天麻的产量与质量不仅取决于麻种的质

量, 而且与菌种的无性繁殖代数密切相关, 蜜环菌连续无性繁殖代数越高其质量越差, 药农所谓“菌棒只能用一年的说法”是有科学依据的。

目前实验室条件下采用诱导子实体方法能够使由于连续无性繁殖退化的蜜环菌菌种复壮, 其促进天麻生长及天麻素积累的生物学效能相应得到恢复。但在天麻实际生产过程中药农需在每个栽培季节开始前, 采集优良的野生蜜环菌菌种扩大培养作为当年的天麻栽培用菌种, 而对于前一年收获天麻后剩余的蜜环菌菌材由于缺乏大生产条件下诱发子实体的适宜方法大多废弃造成浪费, 今后应加强大生产条件下栽培天麻后剩余蜜环菌菌材诱导产生子实体的研究。一旦突破即可形成栽培天麻后剩余蜜环菌菌材成为美味食用菌榛蘑 (即蜜环菌子实体) 的栽培料, 实现植物、微生物资源最大限度的利用。

#### 参考文献:

- [1] 王秋颖, 郭顺星, 关凤斌. 不同来源蜜环菌对天麻产量影响的研究 [J]. 中草药, 2001, 32(9): 839-841.
- [2] 孙士青, 史建国, 李雪梅, 等. 连续无性繁殖蜜环菌对天麻生物产量及天麻素含量的影响 [J]. 山东科学, 2008, 21(4): 10-12.
- [3] 程显好, 郭顺星. 蜜环菌子实体的诱导和发生条件 [J]. 菌物学报, 2006, 25(2): 302-307.
- [4] 王淑芬, 杨金玲, 朱平, 等. 蜜环菌菌种的复壮研究 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(2): 121-123.
- [5] 谢笑天, 郑萍, 李海燕, 等. 反相 HPLC 法测定天麻中药材中天麻素含量 [J]. 云南化工, 2004, 31(4): 23-25.

## 刺五加叶柄的体细胞胚胎发生研究

邢朝斌<sup>1</sup>, 劳风云<sup>2</sup>, 田春迎<sup>1</sup>, 王建石<sup>1\*</sup>

(1. 华北煤炭医学院 生物科学系, 河北 唐山 063000; 2. 华北煤炭医学院 药理学系, 河北 唐山 063000)

**摘要:**目的 以来源广泛、原植物药用成分可测定的刺五加叶柄为外植体, 研究刺五加体细胞胚胎发生情况, 为实现药用成分高产刺五加的快速繁殖奠定基础。方法 以 3 年生植株萌发 15 d 以内的刺五加复叶叶柄为外植体, 考察 2,4-D 和 BA 对刺五加体细胞胚胎发生的影响。结果 28 d 培养后, 2,4-D 1.5 mg/L + BA 1.0 mg/L 处理的叶柄外植体中 71.4% 直接产生或经由愈伤组织间接产生了 8.5 个体胚。两种产生方式均可在诱导培养基中进行, 但间接发生比例较少。转入相同或降低 2,4-D 质量浓度的培养基后, 体胚渐次发育成熟。同时新的体胚也在逐渐产生, 经由间接途径产生的体胚所占比例也随之上升。结论 刺五加可以通过萌发 15 d 以内的复叶叶柄外植体实现体细胞胚胎发生, 体胚诱导率取决于 2,4-D 和 BA 的质量浓度。

**关键词:**刺五加; 叶柄; 体细胞胚胎; 2,4-D; BA

**中图分类号:**R282.1 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2009)08-1302-04

\* 收稿日期: 2008-10-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30701086)

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方面的研究。

Tel: (0315) 3726238 E-mail: xingzhaobin@yahoo.com.cn

**Somatic embryogenesis from petiole in *Eleutherococcus senticosus***XING Zhao-bin<sup>1</sup>, LAO Feng-yun<sup>2</sup>, TIAN Chun-ying<sup>1</sup>, WANG Jian-shi<sup>1</sup>

(1. Department of Biology, North China Coal Medical College, Tangshan 063000, China; 2. Department of Pharmacy, North China Coal Medical College, Tangshan 063000, China)

**Abstract : Objective** The petiole of *Eleutherococcus senticosus* was used as somatic embryo, which is widely original plants with the pharmacological active components whose contents could be determined, the somatic embryo in *E. senticosus* was studied, the aim of this study is to provide the proof of *E. senticosus* species which have the higher yield of pharmacological active components. **Methods** Using the petiole of *E. senticosus* of three years old plants germinated somatic embryos within 15 d to observe the somatic embryogenesis of *E. senticosus* with the 2,4-D + BA medium. **Results** After cultured for 28 d with 2,4-D 1.5 mg/L + BA 1.0 mg/L, 71.4 % of the petiole somatic embryos were directly produced or 8.5 embryos in total were produced via callus. Both of the two methods could be used in the elicitation medium, but the percentage of indirect production was smaller. After transforming into the same or the lower concentration of 2,4-D medium, the somatic embryos gradually matured. At the same time, those of the new somatic embryos were also produced, the percentage of the somatic embryos which were produced by indirect way was increased with it. **Conclusion** Using the petiole of *E. senticosus* germination within 15 d could make somatic embryogenesis. It confirms that the somatic embryogenesis and the bodybmerys inductivity depend on the 2,4-D and BA concentration.

**Key words:** *Eleutherococcus senticosus* Harms; petiole; somatic embryos; 2,4-D; BA

刺五加 *Eleutherococcus senticosus* Harms 是我国医药珍品,根、茎、叶均可入药<sup>[1]</sup>。历代本草医药记载,其有益气健脾、补肾安神之功效,已载入《中国药典》(1977 年版)。自 70 年代末以来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<sup>[1,2]</sup>。在自然状态下刺五加有性生殖能力弱<sup>[2]</sup>、无性繁殖困难<sup>[3,4]</sup>,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<sup>[5]</sup>。但刺五加的茎尖外植体繁殖系数低<sup>[4]</sup>,不能满足生产需要。经由愈伤组织也难以形成不定器官<sup>[6]</sup>。邢朝斌等<sup>[5]</sup>、宋永贤等<sup>[7]</sup>以经过层积处理的刺五加种子的合子胚为起始材料获得了体细胞胚胎。但由于刺五加自身产生种子的能力有限,且种子萌发形成的植株药用成分的合成能力也不能早期鉴定,因此通过合子胚的体细胞胚胎发生难以实现药用成分高产刺五加的快速繁殖。本实验以来源广泛、原植物药用成分的量可测定的刺五加叶柄为外植体,研究了其体细胞胚胎的发生。

## 1 材料与方法

1.1 材料:2007 年 3 月采集吉林省伊通满族自治县西苇镇天然分布的 3 年生刺五加,假植于华北煤炭医学院校园内,经药理学系韩刚教授鉴定为五加科植物刺五加 *Eleutherococcus senticosus* Harms。取新萌发 15 d 以内的掌状复叶,去除小叶及小叶柄,

以复叶叶柄为试验材料。

### 1.2 方法

1.2.1 外植体:将复叶叶柄流水冲洗 30 min,70 % 酒精 2 min,无菌水洗 3 次,0.1 % HgCl<sub>2</sub> 5 min,无菌水洗 4 次,在超净工作台中吸干表面水分。用解剖刀分成 0.5 mm 小段,接种于诱导培养基。

1.2.2 体细胞胚胎诱导:诱导培养基为 MS (含蔗糖 30 g/L、琼脂 6 g/L、pH 5.8),根据实验要求设置 0.5、1.0、1.5、2.0 mg/L BA 与 2,4-D 的不同组合。采用 50 mL 三角瓶,每瓶 20 mL 培养基,每处理 30 瓶。(25 ± 1) 暗培养,待体胚产生后转移至 0.1 mg/L 2,4-D MS 培养基中光培养,诱导体胚发育成熟。光照强度为 2 000 lx,每日光照 16 h。

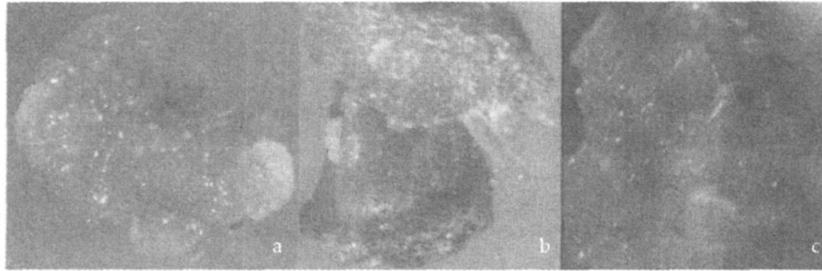
## 2 结果

2.1 愈伤组织的诱导:叶柄外植体在诱导培养基中培养 5 d 左右,自切口处开始膨大,7 d 后即可观察到白色、明亮的愈伤组织。之后逐渐转变为淡黄色,结构紧密的愈伤组织,且表面产生颗粒状突起(图 1-a)。当单独添加 2,4-D,或同时添加的 BA 质量浓度较低(1.0 mg/L)时,愈伤组织的发生率与 2,4-D 的质量浓度呈正相关;当同时添加高质量浓度 BA 时(1.5、2.0 mg/L),全部外植体均产生了愈伤组织,但后者产生的数量更多。BA 对愈伤组织产生的影响与 2,4-D 相同(表 1)。

2.2 体细胞胚胎发生的方式:培养 20 d 后,自叶柄外植体切口中未被愈伤组织覆盖的韧皮部与木质部

交界处开始产生体细胞胚胎(图 1-b),即体胚经由叶柄的形成层切口处直接产生。除此以外,体胚尚可通过先期产生的愈伤组织间接产生(图 1-c)。两

种产生方式均可在诱导培养基中进行,但间接发生比例较少,转入降低 2,4-D 质量浓度的继代培养基后,比例随之上升。



a-愈伤组织 b-直接产生的体胚 c-间接产生的体胚  
a-callus b-directly from embryos c-indirectly from embryos

图 1 刺五加叶柄的体细胞胚胎发生

Fig. 1 Somatic embryogenesis from petiole in *E. senticosus*

2.3 激素对体细胞胚胎发生的影响:在未添加任何激素和仅添加 BA 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。28 d 培养后 2,4-D 1.5 mg/L + BA 1.0 mg/L 使 71.4% 的外植体产生了体胚,显著高于其他处理的体胚发生率,除 BA 为 2.0 mg/L 外,1.5、2.0 mg/L 2,4-D 与各质量浓度 BA 组合的体胚发生率均高于与 1.0 mg/L BA 组合的发生率,且前者之间的诱导率没有差异显著性。在体胚的数量上,附加 2,4-D 1.5 mg/L + BA 1.5 mg/L 处理的最高,平均每个外植体上产生了 8.5 个体胚(表 1)。

表 1 激素对体细胞胚胎和愈伤组织的影响(培养 28 d)

Table 1 Effect of hormone on somatic embryos and callus (cultured for 28 d)

激素/(mg·L <sup>-1</sup> )		体细胞胚胎		愈伤组织	
2,4-D	BA	发生率/%	数量/个	发生率/%	数量
0	0	0	0	0	无
	1.0	0	0	5.3	少
	1.5	0	0	16.2	较少
	2.0	0	0	18.7	较少
1.0	0	0	0	8.6	少
	1.0	26.7	1.0	80.0*	较多
	1.5	38.9	1.8	94.4**	多
	2.0	33.3	1.9	100.0**	多
1.5	0	6.7	2.0	28.5	少
	1.0	71.4**	8.5**	100.0**	较少
	1.5	53.3*	3.9*	100.0**	多
	2.0	11.8	1.7	100.0**	中等
2.0	0	11.8	1.8	32.3	少
	1.0	66.7*	2.3	100.0**	中等
	1.5	64.7*	2.5	100.0**	较多
	2.0	57.1*	2.1	100.0**	多

\*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$

2.4 体细胞胚胎的诱导成熟:培养早期产生的体胚在原培养基中随着培养时间的推移,依次经心形胚、

鱼雷形胚等阶段后,渐次发育成熟。与此同时,新的体胚也在逐渐产生。培养 28 d 时,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,先前产生的体胚逐渐发育成熟。

### 3 讨论

诱导体细胞胚胎发生时,对于绝大多数植物而言,2,4-D 都是诱导胚性愈伤组织必不可少的。在胚性愈伤组织形成后,应降低 2,4-D 的量或去除 2,4-D;否则,胚状体便不能正常生长<sup>[8]</sup>。而刺五加与这些植物不同,在植物激素作用下,来自刺五加成熟胚的外植体,不经过胚性愈伤组织阶段,而由外植体直接产生体胚<sup>[5,7,9]</sup>,经由胚性愈伤组织产生的体胚仅 1 例<sup>[5]</sup>。在本实验中,刺五加的复叶叶柄,在 2,4-D 的作用下多数以类似于来自成熟胚外植体的发育方式直接产生体胚,但同时也产生了较前者更多的胚性愈伤组织,且在先期诱导阶段和继代后均可由此愈伤组织产生体胚。产生的体胚在原培养基中,或者降低 2,4-D 质量浓度的培养基中均能促进体胚成熟和新体胚产生的特性也与成熟胚外植体<sup>[5,9]</sup>的特点相同。

目前关于刺五加体细胞胚胎发生的报道中,起始外植体均来自胚及胚相关组织<sup>[5,7,9]</sup>,并表现出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<sup>[5]</sup>。即细胞的分化程度越高,体胚发生能力越低。与合子胚的胚性组织具有相同分化程度的顶端分生组织可分化产生幼叶原基,进而形成幼叶、成熟叶。本实验所用材料虽取自萌发后 3 年(3 年生)的刺五加,但新萌发的复叶叶柄同样为分化程度较低的组织类型。因而萌发 15 d 以内的

复叶叶柄可以产生体胚,而萌发 30 d 以后的叶柄在整个实验周期内均未见胚胎发生,产生的愈伤组织量也极少。

#### 参考文献:

- [1] 吉林省中医中药研究所等编著. 长白山植物药志 [M]. 长春:吉林人民出版社,1982.
- [2] 祝宁,卓丽环,臧润国. 刺五加 (*Eleutherococcus senticosus*) 会成为濒危种吗? [J]. 生物多样性,1998,6(4):253-259.
- [3] 赵淑兰,沈育杰. 刺五加绿枝扦插繁殖研究 [J]. 特产研究,2003,25(3):1-2.
- [4] 张喜春,刘宏伟,张弘,等. 影响刺五加茎尖培养的因素 [J]. 东北林业大学学报,1996,24(6):107-110.
- [5] 邢朝斌,沈海龙,赵丽娜,等. 刺五加的体细胞胚胎发生研究 [J]. 中草药,2006,37(5):769-772.
- [6] 李学宝,金波. 刺五加愈伤组织的遗传转化 [J]. 华中师范大学学报(自然科学版),1995,29(4):494-497.
- [7] 宋永贤,孙利,孙金元. 刺五加离体培养中胚状体的诱导 [J]. 时珍国医国药,2005,16(5):440-442.
- [8] 崔凯荣,邢更生,周攻克,等. 植物激素对体细胞胚胎发生的诱导与调节 [J]. 遗传,2000,22(5):349-354.
- [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, Tissue Org Cult*, 1999, 58: 93-97.

## 不同款冬花药材中槲皮素和山柰素的定量分析及 HPLC 指纹图谱研究

马致洁<sup>1,2</sup>,董红红<sup>2</sup>,李振宇<sup>2</sup>,周玉枝<sup>2</sup>,秦雪梅<sup>1,2\*</sup>,郭小青<sup>2</sup>,孙海峰<sup>2</sup>,张丽增<sup>2\*</sup>

(1. 山西大学化学化工学院,山西太原 030006; 2. 山西大学 化学生物学与分子工程国家教育部重点实验室中药现代研究中心,山西太原 030006)

**摘要:**目的 建立款冬花药材中槲皮素和山柰素的定量测定方法,测定不同来源的药材中槲皮素和山柰素的量,评价产地、生长方式及炮制对款冬花中槲皮素和山柰素量的影响;并建立款冬花中黄酮醇苷类成分指纹图谱,为款冬花质量控制的制定提供依据。方法 采用 HPLC 建立款冬花药材中槲皮素和山柰素的定量测定方法,色谱条件:Diamondsil C<sub>18</sub> (200 mm ×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-水 (77:23),检测波长:365 nm。采用 HPLC 法建立款冬花药材中黄酮醇苷类成分指纹图谱,色谱条件:ODS-BP C<sub>18</sub> (200 mm ×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>水溶液梯度洗脱;检测波长为 365 nm。结果 不同产地,炮制品与生品之间,其槲皮素和山柰素的量差异较大,不同生长方式的药材之间无明显差异;不同产地及批次的款冬花药材的指纹图谱相似度较高。结论 本研究建立的槲皮素和山柰素的定量测定方法简便、准确、重现性好,可用于款冬花药材中黄酮醇苷类成分的质量控制;不同来源的款冬花药材中的槲皮素和山柰素的量有明显差异;所建立的黄酮醇苷类成分的指纹图谱方法操作性强、重现性好,可作为款冬花黄酮醇苷类成分指纹图谱研究的基础。

**关键词:**款冬花;槲皮素;山柰素;HPLC;指纹图谱

中图分类号:R282.7 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2009)08-1305-04

### Quantitative analysis and HPLC fingerprint of quercetin and kaempferide from different *Flos Farfarae*

MA Zhi-jie<sup>1,2</sup>, DONG Hong-hong<sup>2</sup>, LI Zhen-yu<sup>2</sup>, ZHOU Yu-zhi<sup>2</sup>, QIN Xue-mei<sup>1,2</sup>, GUO Xiao-qing<sup>2</sup>, ZHANG Li-zeng<sup>2</sup>

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 2. Modern Research Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering Centre for Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

**Abstract : Objective** To establish the method for quantitative analysis of quercetin and kaempferide in *Flos Farfarae*, to determine the contents of quercetin and kaempferide in *Flos Farfarae* from various habitats, to evaluate the effects of habitats, growth way, and processing on the contents of quercetin and kaempferide in *Flos Farfarae*, and to establish the fingerprint of flavone glycosides in *Flos Farfarae*, so as to provide the information for quality control of *Flos Farfarae*. **Methods** Quantification of quercetin and kaempferide in *Flos Farfarae* was performed by HPLC on Diamondsil C<sub>18</sub> column (200 mm ×4.6 mm, 5 μm) using acetonitrile-H<sub>2</sub>O (77:23) as mobile phase and detected at 365 nm. And fingerprint analysis of flavone glycosides in *Flos Farfarae* was performed by HPLC on ODS-BP C<sub>18</sub> column (200 mm ×4.6

\* 收稿日期:2008-10-17

作者简介:马致洁(1983—),天津人,在读硕士,主要从事中药质量控制及中药代谢组学研究。E-mail:zhijiesy@yahoo.com.cn

\*通讯作者:秦雪梅,教授,研究生导师。Tel:(0351)7011202 E-mail:qinxm@sxu.edu.cn