

Species of *Ligularia* in the northwestern China and their medicinal usesLIU Shou-jin^{1,2}, QI Huan-yang¹, QI Hui¹, ZHANG Mian¹, WANG Zheng-tao¹

(1. China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China;

2. School of Pharmacy, Anhui College of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230038, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the species of *Ligularia* distributed in the northwestern China and their medicinal uses in the local area. **Method:** Field investigation, specimen collection, taxonomic study and datum check were adopted. **Result:** There are 29 species and 1 varieties of *Ligularia* distributed in the northwestern China, and 18 species of them had been used as folk medicines with the function of resolving phlegm, relieving cough, clearing heat and toxins. **Conclusion:** The northwestern China is abundant in medicinal resource of *Ligularia*.

[Key words] *Ligularia*; species and distribution; medicinal resource; the northwest China

[责任编辑 张宁宁]

麻花秦艽组织培养及植株再生的研究

刘丽莎*, 张西玲, 王 岚, 张延红

(甘肃中医学院, 甘肃 兰州 730000)

[摘要] **目的:**研究药用植物麻花秦艽组织培养技术,为工厂化育苗提供科学依据。**方法:**以麻花秦艽根、茎育出的无菌苗为外植体,采用MS培养基,附加不同的植物激素进行实验。**结果:**以MS培养基为基本培养基,附加BA 0.5~1.0 mg·L⁻¹+NAA 0.5 mg·L⁻¹,适于丛生芽的诱导与增殖;附加IAA 1.0 mg·L⁻¹+BA 3 mg·L⁻¹,适于愈伤组织的诱导;附加IAA 1.0 mg·L⁻¹+BA 2.0~3.0 mg·L⁻¹适于愈伤组织继代培养,附加BA 2.0 mg·L⁻¹+NAA 0.5 mg·L⁻¹适于愈伤组织的分化。**结论:**通过诱导愈伤组织途径可以达到快速繁殖的目的。

[关键词] 麻花秦艽;组织培养;植株再生

[中图分类号] S 567 [文献标识码] A [文章编号] 1001-5302(2006)10-0797-04

麻花秦艽 *Gentiana stramines* Maxim 是龙胆科植物,国家重点保护的野生药材之一^[1,2]。麻花秦艽主产于甘肃、青海、四川、陕西等地。甘肃为道地产区,目前都为野生^[2]。近年来,由于用药需求量猛增,过度采挖,致使麻花秦艽野生资源严重枯竭,产量锐减,市场价格逐年上升,因此,应用组织培养方法繁殖和保存野生药用植物种质已成为必需。作者采用生物技术手段复壮麻花秦艽优良品种,具有诱导周期短,再生苗频率高,苗具健壮的根等优点。为麻花秦艽的工厂化快速繁殖提供了科学依据。

1 材料和方法

[收稿日期] 2004-02-01

[基金项目] 甘肃省环保局项目(GH2001-10)

[通讯作者] *刘丽莎, Tel: (0931)8765414

1.1 材料

供试植物材料采自甘肃榆中野生麻花秦艽 *G. straminea*, 由本院中药鉴定教研室张西玲副教授鉴定。外植体为其根基上的芽长成的无菌苗。

1.2 方法

1.2.1 无菌外植体的获得 野生麻花秦艽采下后,用洗衣粉溶液仔细刷洗,并用自来水冲洗干净,从根基上切下大约0.5 cm的芽,置于75%乙醇中浸泡35 s,再于0.1%升汞中消毒8 min,无菌水冲洗5~6次,然后接种于MS培养基中培养获得无菌苗,培养条件为MS培养基附加0.8%琼脂, pH 5.8; 培养温度(25±2)℃;光照10~12 h·d⁻¹, 光强800~1 000 lx, 蔗糖为30 g·L⁻¹。

1.2.2 丛生芽的诱导与增殖 剪取麻花秦艽试管

苗基部约 1 cm 长接种于附加不同激素配比的 MS 培养基中,筛选出适于丛生芽诱导的培养基。

1.2.3 愈伤组织的诱导、继代与分化 选取较幼嫩的麻花秦艽试管苗的不同部位接入附加不同激素配比的愈伤组织诱导培养基中进行愈伤组织的诱导,将诱导出的愈伤组织于愈伤组织继代培养基上每 30~35 d 继代 1 次。选取继代了 2~3 次生长旺盛,质地致密,表面有细颗粒状结构,颜色鲜黄的愈伤组织转入愈伤组织分化培养基中进行愈伤组织分化培养。

1.2.4 芽的伸长与生根培养 将在愈伤组织分化培养基中生长健壮的再生芽及在芽增殖培养基中生长了约 1 个月的丛生芽分成 3~4 个为一小簇转入芽伸长培养基中进行芽的伸长培养。将在芽伸长培养基中生长了约 1 个月的芽再转入到芽生根培养基中进行生根培养。

1.2.5 试管苗的移栽 将在生根培养基中生长了约 1 个月的生长健壮的试管苗在移栽前 3~5 d 将瓶口打开,注入少量清水淹没培养基表面,于室内自然光下散射。移栽时将试管苗从瓶中取出,用清水将根表面的培养基冲净,然后移入蛭石和花园土混合的基质中,于温室内培养。

2 结果与分析

2.1 激素对丛生芽诱导与增殖的影响

细胞分裂素和生长素是芽诱导与增殖过程中最关键的因子。本实验研究了多种细胞分裂素和生长素的不同含量的配比组合,其中以 BA 和 NAA 的组合最佳。BA 与 NAA 对芽的诱导与增殖的影响见表 1。由表 1 可见 BA 0.5~1.0 mg·L⁻¹ + NAA 0.5 mg·L⁻¹ 最适于芽的诱导,见图 1,BA 含量超过 2.0 mg·L⁻¹ 时对芽的分化产生了抑制作用。

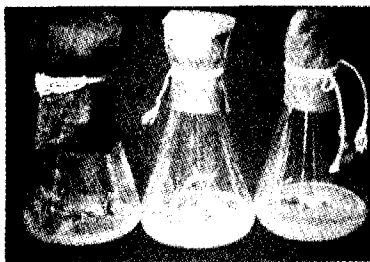


图 1 茎尖诱导出的丛生芽

2.2 激素对愈伤组织诱导,继代和分化的影响

2.2.1 生长素对愈伤组织诱导,继代和分化的影响 以 MS 培养基为基本培养基,分别附加不同含

表 1 BA 与 NAA 对麻花秦艽试管苗丛生芽诱导的影响

BA/mg·L ⁻¹	NAA/mg·L ⁻¹	产生芽的时间/d	芽生长状况
0.5	0.5	14~16	芽健壮,饱满
1.0	0.5	12~14	生长迅速
1.0	1.0	13~15	
2.0	0.5	16~17	芽弱小
2.0	1.0	17~18	缓慢
3.0	1.0	17~18	

量的 IAA, 2,4-D, NAA 对麻花秦艽的根、茎、叶进行愈伤组织诱导,培养 1 个月后观察,见表 2。

表 2 生长素对愈伤组织诱导的影响

IAA /mg·L ⁻¹	NAA /mg·L ⁻¹	2,4-D /mg·L ⁻¹	产生愈伤组织 时间/d	出愈率 /%
0.5	0.0	0.0	20~21	82~84
1.0	0.0	0.0	18~19	95~96
0.0	0.5	0.0	25~26	10~12
0.0	1.0	0.0	-	-
0.0	0.0	0.5	17~18	84~85
0.0	0.0	1.0	20~21	67~68

注:“-”表示无愈伤组织产生

由表 2 可见,IAA, 2,4-D 和 NAA 对麻花秦艽均可诱导愈伤组织,但其诱导作用有明显区别,其中 IAA 诱导作用最强,2,4-D 次之,NAA 较弱。不加激素的培养基上未诱导出愈伤组织。

2.2.2 BA 对愈伤组织诱导,继代和分化的影响 实验中发现单独使用 IAA, 2,4-D 即可诱导出愈伤组织,但诱导出的愈伤组织生长缓慢且不能分化。因此本实验在诱导愈伤组织过程中除了使用 IAA, 2,4-D 外,还附加了不同含量的 BA。结果发现 BA 有利于状态良好的愈伤组织的产生。在 MS + BA 3 mg·L⁻¹ + IAA 1 mg·L⁻¹ 的培养基中诱导产生的愈伤组织(图 2)在继代培养中生长旺盛。以 MS + BA 2.0~3.0 mg·L⁻¹ + IAA 1.0 mg·L⁻¹ 进行愈伤组织的继代培养较为适宜,见图 3。BA 对愈伤组织的分化也有很大的影响,见表 3。

由表 3 可见,BA 1.0~3.0 mg·L⁻¹ 愈伤组织都能分化出芽,见图 4。但 BA 2 mg·L⁻¹ 即有利于愈伤组织的分化,又有利于再生芽的成苗(成苗率 70% 左右)。当采用 MS + BA 2.0 mg·L⁻¹ + NAA 0.5 mg·L⁻¹ 培养基进行愈伤组织分化培养时,再生芽成苗率可较 MS + BA 2.0 mg·L⁻¹ 培养基提高 10% 以上(成苗率 83%~87%)。

2.2.3 外植体部位对愈伤组织诱导,继代和分化的影响 实验中发现外植体部位对愈伤组织诱导具

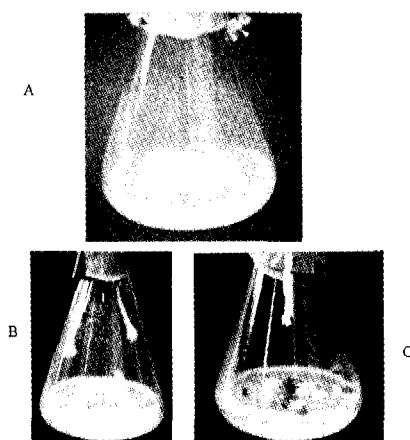


图 2 从外植体诱导出愈伤组织
A. 根; B. 茎; C. 叶



图 3 愈伤组织继代培养

表 3 BA 对愈伤组织分化的影响

BA /mg·L ⁻¹	产生率 时间/d	诱导率 /%	再生芽数目 /个/块	再生芽生长状态
0.5	-	-	-	-
1.0	21~33	80	2~3	芽生长状态良好
2.0	18~20	95	8~9	芽生长状态良好, 易成苗
3.0	18~20	95	10~13	芽生长状态一般, 不易成苗
4.0	18~20	94	10~11	芽生长较弱, 不易成苗



图 4 愈伤组织开始分化出芽

有极其重要的影响, 在含 MS + BA 3.0 mg·L⁻¹ + IAA 1 mg·L⁻¹ 的培养基上, 茎经大约 15 d 培养后在其切口处形成黄色松软愈伤组织, 继代培养生长旺盛, 而且易于分化。相比较, 根、叶切块形成愈伤组织较迟缓, 根形成的愈伤组织为白色小颗粒状, 生长缓慢, 叶形成的愈伤组织为淡绿色, 继代培养生长缓慢。

2.3 影响麻花秦艽试管苗成活率的主要因素

2.3.1 GA 对再生芽伸长的影响 在麻花秦艽再生芽的伸长培养中, 附加一定含量的 GA 对再生芽的伸长有明显的促进作用。在 MS + BA 3 mg·L⁻¹ + IAA 1 mg·L⁻¹ 的培养基中附加 GA 3 mg·L⁻¹ 时, 30 d 后即可较未加 GA 的对照组芽高 1 倍左右, 既能保证再生芽的快速生长, 又能保证其健壮而不弱小。

2.3.2 IAA 对试管苗生根的影响 实验中发现 IAA 既能使试管苗正常生长, 又能诱导出良好的根系。本实验采用 MS + BA 0.5 mg·L⁻¹ + IAA 1.0 mg·L⁻¹ + 蔗糖 30 g·L⁻¹ 的培养基作为麻花秦艽试管苗的生根培养基, 取得良好的效果。生根率可达 80%, 并获得了生长健壮的试管苗。

2.3.3 温度、光照和水分对试管苗移栽的影响 麻花秦艽试管苗在生根培养基中生长 1 个月后可以移栽, 试管苗移栽时温度不能低于 16 ℃, 也不宜过高, 否则易引起试管苗徒长。移栽初期试管苗不能接受阳光的直射, 最好是散射光或遮阴。试管苗移栽后, 每 2~3 d 应浇水 1 次, 相对湿度应保持在 80% 左右。试管苗移栽 2 周后, 便长出新叶, 当户外温度稳定在 20 ℃ 时便可移栽入大田。

3 讨论

3.1 细胞分裂素和生长素之间的比例关系对麻花秦艽组织培养的影响 在麻花秦艽芽的诱导, 增殖和愈伤组织的分化过程中, 高含量的细胞分裂素是必需的, 而且同时应配合一定低浓度的生长素。细胞分裂素类物质腺嘌呤与生长素 IAA 之间的比例关系非常主要, 可以有效地控制植物组织培养中芽和根的发生, 这一比例高时有利于芽的分化, 这时细胞分裂素起主导作用。比例低时有利于根的分化, 这时生长素起主导作用, 本实验结果与上述观点相符。

在麻花秦艽的愈伤组织的诱导过程中也使用了高含量的细胞分裂素 BA 3 mg·L⁻¹ 并配合 IAA 1.0 mg·L⁻¹ 进行愈伤组织的诱导。虽然细胞分裂素对麻花秦艽的愈伤组织的诱导不是必需的, 但是配合高浓度的细胞分裂素都有利于麻花秦艽产生高质量的易于继代和分化的愈伤组织。

3.2 细胞分化程度与麻花秦艽脱分化的关系 在麻花秦艽组织培养的快速繁殖和愈伤组织诱导过程中, 正确的选择外植体的部位极其重要, 麻花秦艽芽的诱导, 增殖和愈伤组织的诱导都是在茎尖生长点处比较成功。这是因为该处分生细胞较多, 分化程

度低的原因。麻花秦艽叶片、根也可诱导产生愈伤组织,但诱导出的愈伤组织分化较慢。在愈伤组织诱导过程中,将根、茎段外植体竖放、横放和倒放的方式接入愈伤组织诱导培养基中培养,结果根竖放的外植体周围距培养基 1.3 cm 范围内都能产生大量的愈伤组织,而横放的外植体只是在靠近基部约 0.4 cm 的范围内产生一些愈伤组织,倒放的外植体只是在上端(原形态学下端,苗基部)产生少量的愈伤组织,而接触培养基的部位却未能产生出愈伤组

织,这证明了细胞的分化程度对麻花秦艽脱分化有极其重要的影响。应该选择细胞分化程度低的部位进行麻花秦艽的脱分化研究。

[参考文献]

- [1] 张恩迪,郑汉臣.中国濒危野生药用动植物资源的保护.上海:第二军医大学出版社,2000.28.
- [2] 中国药典.一部.2000.222.
- [3] 朱俊儒,宋平顺,马潇,等.甘肃产秦艽植物资源及商品研究.中药材,2000,23(9):521.

Studies on plantlet regeneration and propagation of *Gentiana stramines*

LIU Li-sha, ZHANG Xi-ling, WANG Lan, ZHANG Yan-hong
(Gansu College of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

[Abstract] Objective: To provide scientific basis for large scale production by studying the technique of tissue culture of *Gentiana stramines*. **Method:** Callus was induced from germ-free stem segment of *G. stramines* on a MS medium supplemented with different hormones. **Result:** The MS medium with 0.5-1.0 mg·L⁻¹ BA and 0.5 mg·L⁻¹ NAA was suitable for the induction and proliferation of cluster buds. MS medium with 1.0 mg·L⁻¹ IAA and 3 mg·L⁻¹ BA was suitable for the induction of calli. MS medium with 1.0 mg·L⁻¹ IAA and 2.0-3.0 mg·L⁻¹ BA was suitable for the subculture of calli. MS medium with 2.0 mg·L⁻¹ BA and 0.5 mg·L⁻¹ NAA was suitable for the differentiation of calli. **Conclusion:** Aseptic seeding of *G. stramines* can be quickly propagated by shoot culture.

[Key words] *Gentiana stramines*; tissue culture; plant regeneration

[责任编辑 张宁宁]

指纹图谱技术对贯叶连翘提取物制备工艺过程的评价

王冬梅,刘朝葵,杨得坡*

(中山大学药学院生药学与天然药物化学实验室,广东广州 510080)

[摘要] 目的:建立贯叶连翘提取物(含金丝桃素类和黄酮类化合物)的指纹图谱分析方法,并对提取物制备工艺的有效性、稳定性以及抗氧化剂、药材采收部位对提取物质量的影响进行综合评价。**方法:**采用 HPLC-UV-MS 法测定了药材与提取物的指纹图谱,并对主要色谱峰进行定性定量分析。**结果:**在提取物指纹图谱中标示了 10 个特征峰,鉴定了其中 8 个色谱峰所代表的化学成分。采用的提取物制备工艺稳定性良好,可有效地富集金丝桃素类和黄酮类化合物;抗氧化剂的使用对提取物的质量影响不大,但药材采收部位则对其有显著影响。**结论:**该指纹图谱分析方法可为提取物的质量控制以及制备工艺的评价提供依据。

[关键词] 贯叶连翘提取物;提取制备工艺;HPLC 指纹图谱

[中图分类号] R 284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-5302(2006)10-0800-05

贯叶连翘 *Hypericum perforatum* L. 是藤黄科金丝桃属植物,其抗抑郁、镇静、抗 HIV 病毒、抗甲型、乙型

[收稿日期] 2004-09-07

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30470188);国家教育部高等学校骨干教师资助计划项目(2000)

[通讯作者] *杨得坡, Tel: (020)87333159, E-mail: lsswdm@mail.sysu.edu.cn