

Determination of rubrofusarin gentiobioside in *Cassia obtusifolia* by HPLCTANG Li-ying¹, WANG Zhu-ju¹, WU Qiu-ping², HE Yan³, HUANG Lu-qi¹

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

2. Jiang Xi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;

3. Institute of Basic Clinical Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for determining the content of rubrofusarin gentiobioside in *Cassia obtusifolia*.**Method:** The HPLC with Diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column was used, acetonitrile-THF-1% acetic acid (18:3:79) was used as a mobile phase, with flow rate of 1 mL · min⁻¹, column temperature at 40 °C and detection wavelength at 278 nm. **Result:** A good linearity was obtained from 0.1-0.5 μg with $r = 0.9999$ for rubrofusarin gentiobioside. The average recovery was 101.1%, and RSD was 2.23% ($n = 5$). **Conclusion:** The method was proved to be simple, rapid, sensitive, precise, reliable and repeatable. It can be applied to the quality control of Semen Cassia.[Key words] *Cassia obtusifolia*; rubrofusarin gentiobioside; HPLC

[责任编辑 张宁宁]

抱茎苦苣菜的组织培养及植株再生

陶 静¹, 杨世海^{1*}, 张梦萍², 田义新¹

(1. 吉林农业大学 中药材学院, 吉林 长春 130118;

2. 江都中医院, 江苏 江都 225200)

[摘要] **目的:**探讨苦苣菜组织培养和植株再生条件。**方法:**以苦苣菜叶片为外植体,应用正交设计方法,对愈伤组织的诱导和分化培养基进行优化筛选。**结果:**最佳的愈伤组织诱导培养基为 MS + 2, 4-D 1.5 mg · L⁻¹ + 6-BA 1.5 mg · L⁻¹ + NAA 1.0 mg · L⁻¹ + IBA 1.5 mg · L⁻¹ + KT 1.5 mg · L⁻¹,最佳的芽诱导培养基为 MS + 2, 4-D 0.2 mg · L⁻¹ + 6-BA 0.5 mg · L⁻¹ + NAA 0.5 mg · L⁻¹ + IBA 0.5 mg · L⁻¹ + KT 0.5 mg · L⁻¹,不定芽经附加 IBA 0.1 mg · L⁻¹的 1/4 MS 培养基生根后移栽成活,获得再生植株。**结论:**建立了一套有效的苦苣菜组织培养再生体系。

[关键词] 苦苣菜;组织培养;植株再生;正交试验

[中图分类号] S 567 [文献标识码] A [文章编号] 1001-5302(2008)04-0368-04

抱茎苦苣菜 *Ixeridium sonchifolium* Hance 为菊科苦苣菜属植物,又名苦碟子、盘尔草、秋苦苣菜、鸭子食等^[1]。苦苣菜味苦、性微寒。具有清热祛火、消炎解毒、凉血消肿、祛瘀止痛、补虚止咳的作用。现代科学研究表明^[2],苦苣菜含有三萜、甾

醇、倍半萜、黄酮、香豆素等,对循环系统,具有增加冠脉流量、增加心肌营养性血流量,改善心脏微循环等方面的作用,可开发成为治疗心脑血管系统疾病的药物。

目前国内外有关苦苣菜的研究主要集中在生药学及其所含的化学成分、生物活性物质、临床应用等方面^[3-5],但在组织培养、遗传改良方面却鲜有报道,仅有唐万侠报道了以苦苣菜地上部分的培养细胞为原料,生物制备具有特殊药用价值的

[收稿日期] 2006-12-09

[基金项目] 吉林省科技厅项目(20050903-1)

[通讯作者] * 杨世海, Tel: (0431) 4533304, E-mail: jlyangs@

yahoo.com.cn

齐墩果酸^[6]。抱茎苦蕒菜目前均为野生。近年来,由于市场需求量大,过度采挖,造成野生资源锐减和生态破坏。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。笔者首次采用苦蕒菜的叶片建立了组织培养及再生体系,以期苦蕒菜的快繁、开发利用、种质改良及利用细胞工程生产有效成分方面的研究提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 外植体的消毒 新鲜苦蕒菜叶片采自野生,用流水冲洗2 h,用70%乙醇漂洗30 s,无菌水洗2~3次,再用0.1%升汞消毒后,用无菌水洗6~8次,然后将叶片切成0.5 cm²大小,备用。

1.2 愈伤组织和不定芽的诱导 上述外植体接种于含不同浓度2,4-D,BA,NAA,IBA和KT的MS培养基中。试验采用5因素4水平正交设计法,正交表选用L₁₆(4⁵)。各种培养基均加入蔗糖3%,琼脂0.8%,pH 5.8。培养条件:温度(25±1)℃,光照每天12 h,光强为2 000 lx。

1.3 根的诱导 将诱导出的不定芽接种于生根培养基中。各种培养基均加入蔗糖3%,琼脂0.8%,pH 5.8。培养条件:温度(25±1)℃,光照每天12 h,光强为2 000 lx。试验采用3因素3水平正交设计法,正交表选用L₉(3⁴)。

1.4 移栽 当组培苗长出3条以上不定根时,打开瓶盖,在室内炼苗2 d后移栽至细颗粒、松软的土壤中,适当遮光,温度保持在20℃左右,相对湿度在75%~85%。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的诱导 外植体接种20 d后,叶表面切口处产生淡黄色愈伤组织,质地致密。50 d后统计,实验结果表明(表1,2):在叶片诱导愈伤组织的16种组合中,以8,14号的植物生长物质配方的愈伤组织诱导率最高,达到100%,1号培养基不能诱导出愈伤组织。即诱导叶片愈伤组织的最佳激素组合为MS+2,4-D 0.5 mg·L⁻¹+6-BA 1.5 mg·L⁻¹+NAA 1.0 mg·L⁻¹+IBA 0.5 mg·L⁻¹+KT 0.2 mg·L⁻¹,MS+2,4-D 1.5 mg·L⁻¹+6-BA 0.5 mg·L⁻¹+NAA 1.0 mg·L⁻¹+IBA 0.2 mg·L⁻¹+KT 1.5 mg·L⁻¹。5种植物生长物质对愈伤组织的诱导均有一定的作用,直观分析表明,2,4-D对愈伤组织的诱导率影响最大;其次是NAA,IBA;6-BA,

KT对愈伤组织的诱导率影响最小。方差分析结果表明,不同质量浓度的2,4-D对愈伤组织诱导率的作用有显著性差异,其他4种植物生长物质各水平间的差异未达到显著水平。统计分析的结果可得最优水平组为MS+2,4-D 1.5 mg·L⁻¹+6-BA 1.5 mg·L⁻¹+NAA 1.0 mg·L⁻¹+IBA 1.5 mg·L⁻¹+KT 1.5 mg·L⁻¹。

2.2 不定芽的诱导 培养出的愈伤组织,随后分化出丛生芽(2~5,7号)(表1,3,图1),少数培养基处理不经愈伤直接出芽(1号)或只长愈伤不分化出芽(6,8~16号)。50 d后统计直接产生的不定芽数,实验结果表明:①在叶片诱导愈伤组织的16种组合中,以3号的植物生长物质配方的不定芽诱导率最高,达到30.2%,以8~16号的不定芽诱导率为最低,为0。②5种植物生长物质对不定芽的诱导均有一定的作用,直观分析表明,2,4-D对不定芽的诱导率影响最大;其次是NAA,KT,IBA;6-BA对不定芽的诱导率影响最小。方差分析结果表明,不同浓度的2,4-D对不定芽诱导率的作用有显著性差异,其他4种植物生长物质各水平间的差异未达到显著水平。统计分析的结果可得最优水平组为MS+2,4-D 0.2 mg·L⁻¹+6-BA 0.5 mg·L⁻¹+NAA 0.5 mg·L⁻¹+IBA 0.5 mg·L⁻¹+KT 0.5 mg·L⁻¹。

2.3 生根 不定芽转接入生根培养基后,分别于第21天统计生根(表4,5,图2)。结果表明:各种培养基所诱导的根在形态上无差别,均为白色、细长的大量侧根。在9种组合中,生根率均较高,以6,8号的分生根率最高,达到100%,诱导不定芽生根的最佳激素组合为1/2 MS+IBA 0.4 mg·L⁻¹,1/4 MS+IBA 0.2 mg·L⁻¹。培养基,IBA和ZT 3种因素对不定芽的分生根均有一定的作用,直观分析表明,ZT对生根率影响最大;其次是IBA,基本培养基质量浓度的高低对生根率影响最小。方差分析结果表明,3种因素的不同水平对生根率的作用无显著性差异。统计分析的结果可得最优水平组为1/4 MS+IBA 0.1 mg·L⁻¹。

2.4 试管苗移栽 移栽成活是试管苗的难关之一,成功与否取决于根系是否发达,粗壮根多的幼苗成活率高,而根少细弱的苗则难成活。待根较繁茂,试管苗长至5~6 cm高时,打开瓶口,炼苗2 d,取出,洗去根部残余的培养基,移栽到花钵中,浇足水,每周用稀释10倍的MS浇1次,待其正常生长。

表1 苦苣菜愈伤组织及芽诱导正交试验结果

No.	2,4-D/mg · L ⁻¹	6-BA/mg · L ⁻¹	NAA/mg · L ⁻¹	IBA/mg · L ⁻¹	KT/mg · L ⁻¹	愈伤组织诱导率/%	不定芽诱导率/%
1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.0	7.3
2	0.2	0.5	0.5	0.5	0.5	7.5	50.0
3	0.2	1.0	1.0	1.0	1.0	48.9	30.2
4	0.2	1.5	1.5	1.5	1.5	67.5	22.5
5	0.5	0.2	0.5	1.0	1.5	45.0	10.0
6	0.5	0.5	0.2	1.5	1.0	76.9	0.0
7	0.5	1.0	1.5	0.2	0.5	27.9	2.3
8	0.5	1.5	1.0	0.5	0.2	100.0	0.0
9	1.0	0.2	1.0	1.5	0.5	72.1	0.0
10	1.0	0.5	1.5	1.0	0.2	36.8	0.0
11	1.0	1.0	0.2	0.5	1.5	75.8	0.0
12	1.0	1.5	0.5	0.2	1.0	35.3	0.0
13	1.5	0.2	1.5	0.5	1.0	90.5	0.0
14	1.5	0.5	1.0	0.2	1.5	100.0	0.0
15	1.5	1.0	0.5	1.5	0.2	72.7	0.0
16	1.5	1.5	0.2	1.0	0.5	95.7	0.0

表2 苦苣菜愈伤组织诱导率方差分析

因素	偏差平方和	自由度	F	P
2,4-D	0.702	3	5.949	<0.05
6-BA	0.126	3	1.068	
NAA	0.331	3	2.805	
IBA	0.241	3	2.042	
KT	0.118	3	1.000	
误差	0.120	3		

表3 苦苣菜不定芽诱导率方差分析

因素	偏差平方和	自由度	F	P
2,4-D	0.213	3	13.313	<0.05
6-BA	0.016	3	1.000	
NAA	0.036	3	2.250	
IBA	0.024	3	1.500	
KT	0.025	3	1.563	
误差	0.020	3		



图1 愈伤组织再生出芽

3 结论与讨论

利用苦苣菜叶片诱导不定芽进行苦苣菜的快速繁殖是一条快捷的途径。

表4 苦苣菜生根率直观分析

因素	培养基	IBA	ZT	生根率/%
1	MS	0.1	0.00	87.5
2	MS	0.2	0.05	62.5
3	MS	0.4	0.10	85.7
4	1/2 MS	0.1	0.05	87.5
5	1/2 MS	0.2	0.10	66.7
6	1/2 MS	0.4	0.00	100.0
7	1/4 MS	0.1	0.10	88.9
8	1/4 MS	0.2	0.00	100.0
9	1/4 MS	0.4	0.05	75.0

表5 苦苣菜生根率方差分析

因素	偏差平方和	自由度	F
培养基	0.014	2	0.438
IBA	0.025	2	0.781
ZT	0.070	2	2.188
误差	0.030	2	

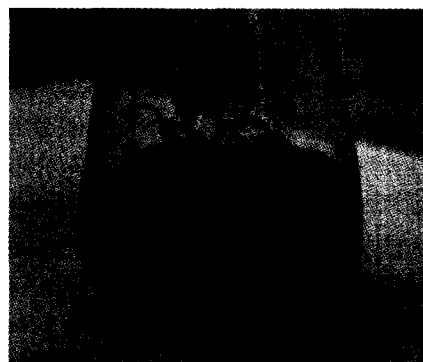


图2 不定芽诱导生根

激素对植物组织和细胞的增殖、分化;芽和根的诱导以及形成等起着关键的作用^[7]。苦苣菜的愈伤组

组织和不定芽较易于诱导,2,4-D在诱导中起着最重要的作用,另外,组培苗的生根较容易。本试验采用正交实验分别选取不同的影响因子进行试验,筛选出苦蕒菜愈伤组织、不定芽和生根的最佳培养基。本研究表明,正交实验设计与数据分析方法对于反映植物生长物质与丛生芽诱导和生根研究的关系,选择最佳培养基,都是十分有效的方法,其优越性在于能大量减少实验次数,从而节省了大量的人力、物力和财力。可以预计,若能广泛应用正交实验设计和分析,其工作效率及实验结果的正确性和可靠性均能得到较大幅度的提高。实验中还发现,在MS+2,4-D 0.2 mg·L⁻¹+6-BA 0.2 mg·L⁻¹+NAA 0.2 mg·L⁻¹+IBA 0.2 mg·L⁻¹+KT 0.2 mg·L⁻¹试验条件下,少数外植体直接分化不定芽,分化率很低,若能进一步优化试验条件,提高直接分化不定芽的

分化率,将为苦蕒菜快繁和遗传转化体系的建立开辟一条快捷有效的植株再生途径。

[参考文献]

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上册. 上海:上海人民出版社,1977:1300.
- [2] 叶冠,范明松,黄成钢,等. 抱茎苦蕒菜化学成分研究[J]. 中国药理学杂志,2005,40(21):1613.
- [3] 张艳萍. 苦蕒菜的开发利用及其栽培技术[J]. 科技园地,2005,(3):7.
- [4] 许梅,王西奎,刘长欣,等. 苦蕒菜生物活性成分的提取与鉴定研究[J]. 山东建材学院学报,1998,12(4):304.
- [5] 张晓梅. 苦蕒菜的利用价值[J]. 宁夏农林科技,2002,(6):51.
- [6] 唐万侠,安东政羲,苏立强,等. 齐墩果酸的苦蕒菜细胞培养制备与分离纯化研究[J]. 齐齐哈尔大学学报,2005,21(4):1.
- [7] 闫晓慧,谈锋,胡凯. 狭叶松果菊的组织培养和植株再生[J]. 西南师范大学学报,2006,31(3):148.

Tissue culture and plant regeneration of *Ixeridium sonchifolium*

TAO Jing¹, YANG Shi-hai¹, ZHANG Meng-ping², TIAN Yi-xin¹

(1. College of Chinese Medicinal Material, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

2. Jiangdu Hospital of Traditional Chinese Medicine, Jiangdu 225200, China)

[Abstract] **Objective:** To study the callus induction and plant regeneration of *Ixeridium sonchifolium*. **Method:** By using the orthogonal experiment design, the medium for callus induction and plant regeneration was optimized. **Result:** The optimal medium for callus induction was MS+2, 4-D 1.5 mg·L⁻¹+6-BA 1.5 mg·L⁻¹+NAA 1.0 mg·L⁻¹+IBA 1.5 mg·L⁻¹+KT 1.5 mg·L⁻¹, the optimal medium for inducing adventitious bud was MS+2, 4-D 0.2 mg·L⁻¹+6-BA 0.5 mg·L⁻¹+NAA 0.5 mg·L⁻¹+IBA 0.5 mg·L⁻¹+KT 0.5 mg·L⁻¹. Plantlets were rooted on 1/4MS medium supplemented with different concentrations of IBA, and high rooting and survival was achieved when the IBA concentration was 0.1 mg·L⁻¹. **Conclusion:** An efficient system for plant regeneration of *I. sonchifolium* was established.

[Key words] *Ixeridium sonchifolium*; tissue culture; plant regeneration; orthogonal test

[责任编辑 张宁宁]

《中国中药杂志》近况简介

《中国中药杂志》为中国中文核心期刊,中国科技核心期刊;为“中国科学引文数据库”、“中国学术期刊综合评价数据库”和“中国科技论文统计源”核心期刊,并且被《中国学术期刊文摘》中、英文版收录。在国际上,被美国医学索引 Medline 及《化学文摘》(CA)、《生物学文摘》(BA)、《国际药文摘》(IPA)、《分析文摘》(AA),俄罗斯《文摘杂志》(AJ),荷兰《医学文摘》(EM),波兰《哥白尼索引》(IC)等权威性专业文摘收录。

据2005年中国科技论文统计与分析年度研究报告结果:《中国中药杂志》在Medline收录中国论文的期刊中名列第4位,为524篇。据中国科学技术信息研究所信息分析研究中心发布2006年版中国科技期刊引证报告:《中国中药杂志》总被引频次为3260;影响因子为0.634;基金论文比例0.48。另据中国学术期刊综合引证年度报告(2006):《中国中药杂志》总被引频次为4676,影响因子为0.938,5年影响因子1.224,基金论文比0.47。

《中国中药杂志》荣获第三届国家期刊奖百种重点期刊,国家中医药管理局“以岭杯”第三届全国中医药优秀期刊评选一等奖,第五届中国百种杰出学术期刊,中国科协精品科技期刊工程项目资助。