

半夏小块茎悬浮培养及其生物碱类化合物的测定

刘永红, 梁宗锁, 杨东风, 刘文婷

(西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘要】【目的】筛选半夏小块茎悬浮培养过程中诱导和继代的最佳培养基,并对小块茎中生物碱类化合物的含量进行测定,为半夏生物碱的生产及其次生代谢物的调控提供参考。【方法】在添加不同激素的 MS 培养基上诱导、增殖半夏小块茎,并建立未分化小块茎的液体悬浮培养体系,采用酸性染料比色法测定小块茎的总生物碱含量,高效液相色谱法测定小块茎中鸟苷、肌苷和葫芦巴碱的含量。【结果】以块茎、叶片叶柄为外植体诱导半夏小块茎的最佳培养基分别为 MS + 0.5 mg/L NAA + 1.0 mg/L 6-BA 和 MS + 0.2 mg/L NAA + 1.0 mg/L 6-BA;小块茎最适继代培养基为固体 1/2 MS + 0.6 mg/L ABA;小块茎的液体悬浮培养基为液体 1/2 MS + 0.6 mg/L ABA。与栽培块茎相比,以块茎及叶片叶柄为外植体诱导的半夏小块茎总生物碱含量分别提高了 4.46 倍和 2.07 倍。以块茎为外植体诱导的半夏小块茎中,鸟苷和葫芦巴碱的含量分别是栽培块茎的 10.6 和 2.5 倍;而肌苷含量降低,约是栽培块茎的 1/3。以叶片叶柄为外植体诱导的半夏小块茎中,鸟苷和葫芦巴碱的含量分别比栽培块茎增加了 1.1 和 1.9 倍,肌苷含量约为栽培块茎的 1/4。【结论】半夏组培小块茎可作为一种模式材料,用于半夏生物碱的生产以及鸟苷、肌苷和葫芦巴碱的代谢调控。

【关键词】 半夏;组培小块茎;鸟苷;肌苷;葫芦巴碱

【中图分类号】 S567.23⁺⁹

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2009)11-0168-07

Suspension culture establishment and alkaloids analysis of tubercles of *Pinellia ternata*

LIU Yong-hong, LIANG Zong-suo, YANG Dong-feng, LIU Wen-ting

(College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 The induction and subculture media to establish suspension cultures of *Pinellia* tubercles were selected. Alkaloids in tubercles were examined. The objective was to provide evidence for *Pinellia* tubercles on alkaloids production or metabolism regulation. 【Method】 The induction, propagation and suspension culture establishment of tubercles were investigated on MS medium supplemented with various hormones. Total alkaloids were determined using the method of uv-vis spectrophotometry. The contents of guanosine, inosine and trigonelline in tubercles and field-grown tuber were determined by HPLC. 【Result】 The suitable media to induce tubercles from tuber as well as leaf and petiole explants were MS medium containing 0.5 mg/L NAA and 1.0 mg/L 6-BA and MS medium containing 0.2 mg/L NAA and 1.0 mg/L 6-BA, respectively. The suitable medium to subculture tubercles was solid one-half strength MS medium containing 0.6 mg/L ABA. Suspension culture of tubercles was established in liquid one-half strength MS medium containing 0.6 mg/L ABA. Total alkaloids contents in tubercles induced from tuber explant, tubercles induced from leaf and petiole explant were 4.46 and 2.07 times higher than that in field-

* [收稿日期] 2009-03-10

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划项目(2008BAD98B08);中国科学院知识创新项目(KZ CX2-XB1-05)

[作者简介] 刘永红(1974—),女,陕西宝鸡人,在读博士,主要从事药用植物学研究。

[通信作者] 梁宗锁(1965—),男,陕西扶风人,教授,博士生导师,主要从事植物生理生态学和药用植物学研究。

E-mail:liangzs@ms.iswc.ac.cn

grown tubers respectively. The contents of guanosine and trigonelline in tuber derived tubercles were 10.6 and 2.5 times higher respectively than that in field-grown tubers, while inosine content was about one third of that in field-grown tubers. The contents of guanosine and trigonelline in leaf and petiole derived tubercles were 1.1 and 1.9 times higher respectively than that in field-grown tubers, while inosine content was about one fourth of that in field-grown tubers. 【Conclusion】 *Pinellia* tubercles not only can serve as a novel material for alkaloids production, but also for guanosine, inosine and trigonelline metabolism regulation.

Key words: *Pinellia ternata*; cultured derived tubercle; guanosine; inosine; trigonelline

半夏(*Pinellia ternata* (Thunb.) Breit.)为天南星科多年生草本植物,以块茎入药,是一种重要的传统中药材,其次生代谢物生物碱具有镇吐痛、抗心律失常、抗坏血栓、抗肿瘤和提高记忆之功效,是药理作用的主要有效成分之一。在单一生物碱中,鸟苷是半夏的水溶性指标成分^[1],次黄嘌呤是半夏的鉴别成分^[2],而葫芦巴碱则用于半夏的质量控制^[3]。

随着对半夏生物碱药理作用的深入研究,一些研究者尝试用离体细胞培养的方法来生产半夏碱^[4]。由于细胞培养的分化程度较低,其目标次生代谢物含量往往不高。半夏的组培小块茎是一种高度分化的组织培养物,其与栽培块茎不仅形态上相似,而且有基本相同的组织结构^[5]。由于半夏生物碱主要集中在块茎的表皮中^[6],故能分化出表皮的组织培养物——小块茎,在半夏生物碱的生化研究中必定具有很大的优势。目前,关于半夏小块茎的研究主要集中在组培成苗过程中的诱导及形态发生方面^[7-8]。除了郭余龙等^[9]比较了组培小块茎和野生块茎极性提取物的色谱图外,关于半夏小块茎的化学成分研究还未见报道。本试验探讨了未分化小块茎的诱导和增殖条件,建立了小块茎的液体悬浮培养体系,并用酸性染料比色法和 HPLC 法测定了组培小块茎中生物碱的积累情况,以探讨小块茎做为一种模式材料用于半夏总生物碱生产,以及用于鸟苷、肌苷和葫芦巴碱代谢调控的可行性。

1 材料与方 法

1.1 材 料

半夏采自陕西杨凌西北农林科技大学试验田,经生命科学院植物分类研究室鉴定为天南星科植物三叶半夏(*Pinellia ternata* Briet.)。

1.2 培养基及培养条件

选用 MS 基本培养基,其中蔗糖含量 30 g/L,用 7 g/L 琼脂固化,加入不同组合及质量浓度的植物生长调节物质(2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)、6-苄基氨基嘌呤(6-BA)、 α -萘乙酸(NAA)),调 pH 为 5.8,

分装于 100 mL 三角烧瓶,121 ℃ 湿热灭菌 20 min。材料接种后置于光照培养箱中培养,培养温度(25±1) ℃,光照强度 2 000~3 000 lx,光照时间 12 h/d。

1.3 无菌外植体的获得及培养

从田间采挖直径 0.5~1.0 cm 的半夏块茎,在流水中冲洗干净,剥去表皮,置于超净工作台上用体积分数 70% 酒精表面消毒 30 s,再用体积分数 0.1% HgCl₂ 溶液消毒 15 min,无菌水冲洗 6~7 次,切成 0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm 的小块,然后将其接入含 0.2 mg/L 2,4-D 和 3.0 mg/L 6-BA 的 MS 培养基中,于光照培养箱中,培养 1~2 个月后诱导形成半夏植株。

1.4 小块茎的诱导

将半夏块茎及无菌苗的叶片叶柄分别切成 0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm、0.5 cm×0.5 cm、0.5 cm 大小,接入下列 6 种培养基中,观察小块茎的形态发生情况。(1) MS + 0.2 mg/L NAA + 0.5 mg/L 6-BA;(2) MS + 0.2 mg/L NAA + 1.0 mg/L 6-BA;(3) MS + 0.2 mg/L NAA + 2.0 mg/L 6-BA;(4) MS + 0.5 mg/L NAA + 0.5 mg/L 6-BA;(5) MS + 0.5 mg/L NAA + 1.0 mg/L 6-BA;(6) MS + 0.5 mg/L NAA + 2.0 mg/L 6-BA。每种激素组合分别接种块茎和叶片叶柄外植体各 10 瓶,每处理重复 3 次。从块茎外植体上诱导的小块茎培养 50 d 后观察结果,从叶片叶柄外植体上诱导的小块茎培养 40 d 后观察结果。

1.5 小块茎的继代培养

将诱导出的小块茎,转接入下列 6 种培养基中,30 d 后察小块茎的增殖与分化情况。(A) MS + 0.2 mg/L NAA + 1.0 mg/L 6-BA;(B) 1/2 MS;(C) 1/2 MS + 1.0 mg/L 2,4-D;(D) 1/2 MS + 2.0 mg/L 2,4-D;(E) 1/2 MS + 0.6 mg/L ABA;(F) 1/2 MS + 1.2 mg/L ABA。每瓶接种(0.2±0.1) g 小块茎,每处理重复 3 次。小块茎的生长速率(GR)按下列公式计算:

$$GR = (W - W_0) / W_0 \times D。$$

式中: W 为收获的小块茎鲜质量, W_0 为接种的小块茎鲜质量, D 为培养时间。小块茎的分化情况以成苗比率(DR)表示, 指培养 30 d 后平均成苗数量除以平均小块茎数量。

1.6 小块茎的液体悬浮培养

小块茎的液体培养选用 1/2MS 液体培养基, 其中添加 0.6 mg/L ABA。每 250 mL 三角瓶中加入 100 mL 培养液, 接种 3.00 g 小块茎, 在 25 ℃、100 r/min 旋转式摇床上振荡培养。小块茎的生长曲线用生长量表示。每隔 1 周收获 3 瓶小块茎, 用滤纸擦干水分, 称质量, 计算平均生长量。

1.7 总生物碱含量的测定

将组培小块茎及栽培块茎收获后, 冲洗干净, 置 60 ℃ 下烘干至恒质量, 分别研磨成细粉, 采用酸性染料比色法测定总生物碱的含量^[10]。

1.8 鸟苷、肌苷和葫芦巴碱含量的测定

将组培小块茎及栽培块茎收获后, 冲洗干净, 置 60 ℃ 下干燥至恒质量, 分别研磨成细粉, 用高效液相色谱法测定样品中鸟苷、肌苷和葫芦巴碱的含量。鸟苷、肌苷和葫芦巴碱的提取条件如下: 精密称取样品粉末 0.200 0 g 置于 10 mL 容量瓶中, 加蒸馏水 10 mL 静置过夜。超声提取 30 min, 5 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 在残渣中加蒸馏水 10 mL, 超声 30 min, 5 000 r/min 离心 10 min, 合并上清液, 水

浴浓缩至干, 全部转移至 10 mL 容量瓶中, 定容, 摇匀, 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清液过微孔滤膜, 取滤液进样, 以回归方程计算含量, 每个样品平行 3 份, 每份进样 2 次。Waters 高效液相色谱仪检测的色谱条件: 色谱柱: Sunfire C₁₈ 柱; 流动相: 甲醇-蒸馏水混合液 ($V(\text{甲醇}) : V(\text{蒸馏水}) = 95 : 5$); 检测波长: 肌苷 248 nm, 鸟苷 254 nm, 葫芦巴碱 264 nm; 流速 1.0 mL/min; 进样体积 20 μ L; 柱温 30 ℃。

2 结果与分析

2.1 不同激素组合对半夏块茎及叶片叶柄外植体诱导形成小块茎的影响

当 NAA 与 6-BA 组合诱导小块茎时, 0.5 mg/L 的 6-BA 使外植体愈伤化或从外植体表面诱导出芽点, 但随着培养时间的延长这些芽点并不发育为小块茎; 2.0 mg/L 的 6-BA 虽然使外植体产生了较多小块茎, 但这些小块茎容易分化成苗。可见只有在 NAA 和 6-BA 合适的质量浓度配合下, 才能诱导出未分化的小块茎。对于块茎外植体, 在 NAA 0.5 mg/L 和 6-BA 1.0 mg/L 激素组合上(培养基 5), 形成了较多未分化的小块茎; 对于叶片叶柄外植体, 在 NAA 0.2 mg/L 和 6-BA 1.0 mg/L 激素组合上(培养基 2), 小块茎的诱导效果最好, 生成小块茎的数目多, 且不易分化成苗(表 1)。

表 1 不同激素组合对半夏块茎及叶片叶柄外植体诱导形成小块茎的影响

Table 1 Effect of different hormones on *Pinellia* tubercle induction from tuber, leaf and petiole explants

培养基 Medium	块茎外植体 Tuber explant	叶片叶柄外植体 Leaf and petiole explant
1	出现愈伤组织 Callus with roots	出现小块茎 Tubercles induced from explants
2	出现小块茎样的芽点 Buds induced from explants	小块茎多, 不易分化 Undifferentiated tubercles
3	小块茎多, 易分化成苗 Tubercles to differentiate	出现小块茎, 分化成苗 Tubercles growing into seedlings
4	外植体膨大, 愈伤化 Explants bulged to callus	生根愈伤组织 Callus with roots
5	小块茎多, 不易分化 Undifferentiated tubercles	外植体膨大, 生根 Explants bulged, with roots
6	出现小块茎, 易分化成苗 Tubercles to differentiate	出现生根小块茎, 易分化成苗 Tubercles with roots, to differentiate

2.2 半夏小块茎的继代培养

诱导出的未分化小块茎若不转接, 其会随着培养时间的延长而抽芽分化成苗。为了探索适宜小块

茎增殖的培养基, 将诱导出的小块茎转接入含不同激素组合的培养基中, 观察小块茎的增殖情况, 结果见表 2。

表 2 不同培养基上半夏小块茎的增殖与分化情况

Table 2 Proliferation and differentiation of *Pinellia* tubercles on mediums supplemented with various hormones

培养基 Medium	生长速率/($g \cdot d^{-1}$) Growth rate	成苗比率/% seedling rate	小块茎形态特征 Tubercle characteristics
A	0.008 ± 0.00 3	100	分化成苗 Growing into seedlings
B	0.019 ± 0.00 2	23	未分化及成苗 Undifferentiated and seedlings
C	0.027 ± 0.00 4	14	表面愈伤化 Callus from tubercles
D	0.032 ± 0.00 3	0	转化为愈伤组织 Callus
E	0.160 ± 0.00 3	0	未分化 Undifferentiated
F	0.086 ± 0.00 3	0	未分化 Undifferentiated

表 2 表明, 在培养基 A 中, 小块茎易分化成苗,

增殖缓慢; 在无激素的 1/2 MS 培养基中(培养基

B),增殖和分化同时进行,有少量小块茎分化成苗,大部分小块茎不断生长变大,并产生新的小块茎;在培养基 C 和 D 中,2,4-D 虽可抑制小块茎的分化,但 2,4-D 易使小块茎愈伤化;在培养基 E 和 F 中,ABA 不仅抑制了小块茎的分化,而且还促进了小块茎的增殖,但较高质量浓度 ABA 处理时的小块茎增殖速度低于较低质量浓度的 ABA 处理。可知半夏小块茎的最适继代培养基为 1/2 MS+0.6 mg/L ABA。

2.3 半夏小块茎的液体悬浮培养

根据小块茎在固体培养基上的增殖情况,选用添加 0.6 mg/L ABA 的 1/2 MS 液体培养基进行小块茎的液体悬浮培养。在此培养基中,未分化的小块茎不断生长出许多二级、三级小块茎。在一个培养周期内,小块茎的生长进程如图 1 所示。图 1 显示,转入液体培养基的第 1 周,小块茎的生长量几乎没有变化,此时为培养的延滞期;到培养的第 2 周,小块茎生长量有少量增加,从刚开始接种的 30.00 g/L 增加到了 30.38 g/L;第 2 周以后,小块茎进入了快速生长期,到第 5 周末,生长量已达到 120.56 g/L,是初始接种的 4.02 倍;培养至第 6 周,小块茎增长变缓,而此时其颜色已开始变褐,培养基浑浊,表明小块茎已进入生长衰退期。

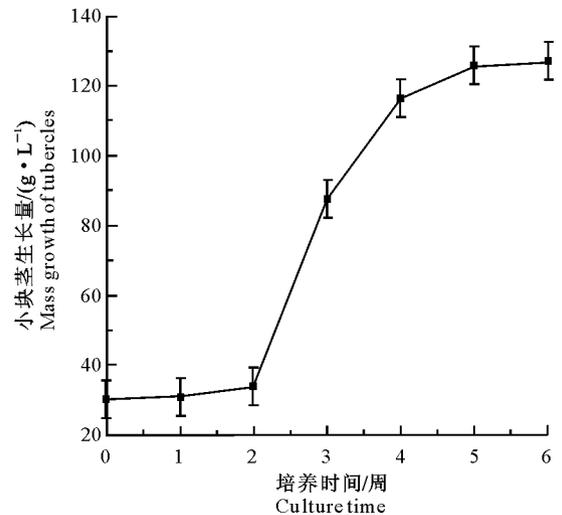


图 1 半夏小块茎在 1/2 MS + 0.6 mg/L ABA 液体培养基中的生长曲线

Fig. 1 Growth dynamics of tubercles cultured on one-half strength MS medium supplemented with 0.6 mg/L ABA

2.4 半夏组培小块茎和栽培块茎总生物碱含量的比较

研究发现,2 种组培小块茎的总生物碱含量均较栽培块茎高,其中以块茎和叶片叶柄为外植体诱导的小块茎总生物碱含量分别比栽培块茎提高了 4.46 和 2.07 倍(表 3)。

表 3 半夏 2 种组培小块茎和栽培块茎总生物碱含量的比较($\bar{X} \pm SD, n=3$)

Table 3 Alkaloid contents of tissue culture-derived tubercles and field-grown tubers

样品 Sample	样品质量/g Dry weight	生物碱含量/(g · g ⁻¹) Alkaloid content	相对标准偏差/% RSD
块茎诱导的小块茎 Tuber-derived tubercles	0.100 0	0.032 1 ± 0.000 3	0.93
叶片叶柄诱导的小块茎 Leaf and petiole-derived tubercles	0.100 0	0.014 9 ± 0.000 4	1.76
栽培块茎 Field-grown tubers	0.100 0	0.007 2 ± 0.000 3	4.16

2.5 半夏组培小块茎和栽培块茎中鸟苷、肌苷和葫芦巴碱含量的比较

利用 HPLC 法检测组培小块茎及栽培块茎中的鸟苷、肌苷和葫芦巴碱含量,结果见表 4 和图 2。表 4 显示,以块茎为外植体诱导的小块茎中,鸟苷和

葫芦巴碱的含量均较高,分别是栽培块茎的 10.6 和 2.5 倍,但其肌苷含量较低,约是栽培块茎的 1/3。以叶片叶柄为外植体诱导的小块茎中,鸟苷和葫芦巴碱的含量分别是栽培块茎的 1.1 和 1.9 倍,肌苷含量约为栽培块茎的 1/4。

表 4 半夏组培小块茎及栽培块茎中鸟苷、肌苷和葫芦巴碱含量的比较($\bar{X} \pm SD, n=3$)

Table 4 Guanosine, inosine, and trigonelline contents of tissue culture-derived tubercles and field-grown tubers $\mu\text{g/g}$

样品 Sample	鸟苷含量 Guanosine content	肌苷含量 Inosine content	葫芦巴碱含量 Trigonelline content
块茎诱导的小块茎 Tubercles from tubers	857.475 0 ± 0.000 3	26.507 5 ± 0.000 2	155.375 0 ± 0.000 2
叶片叶柄诱导的小块茎 Tubercles from leaf-petiole	83.255 0 ± 0.000 2	20.689 8 ± 0.000 2	116.490 0 ± 0.000 3
栽培块茎 Field-grown tubers	80.825 0 ± 0.000 3	74.545 0 ± 0.000 4	60.960 0 ± 0.000 1

图 2 显示,组培小块茎含有栽培块茎色谱图中代表鸟苷、肌苷和葫芦巴碱的色谱峰,但峰面积发生

了变化,表示这 3 种单一生物碱的含量发生了变化。此外,比较栽培块茎和组培小块茎的色谱图还

可发现,组培块茎中多了某些栽培块茎所没有的色谱峰,但同时缺少了某些栽培块茎原有的色谱峰,

这说明组培小块茎和栽培块茎的化学成分有一定的差异(图 2)。

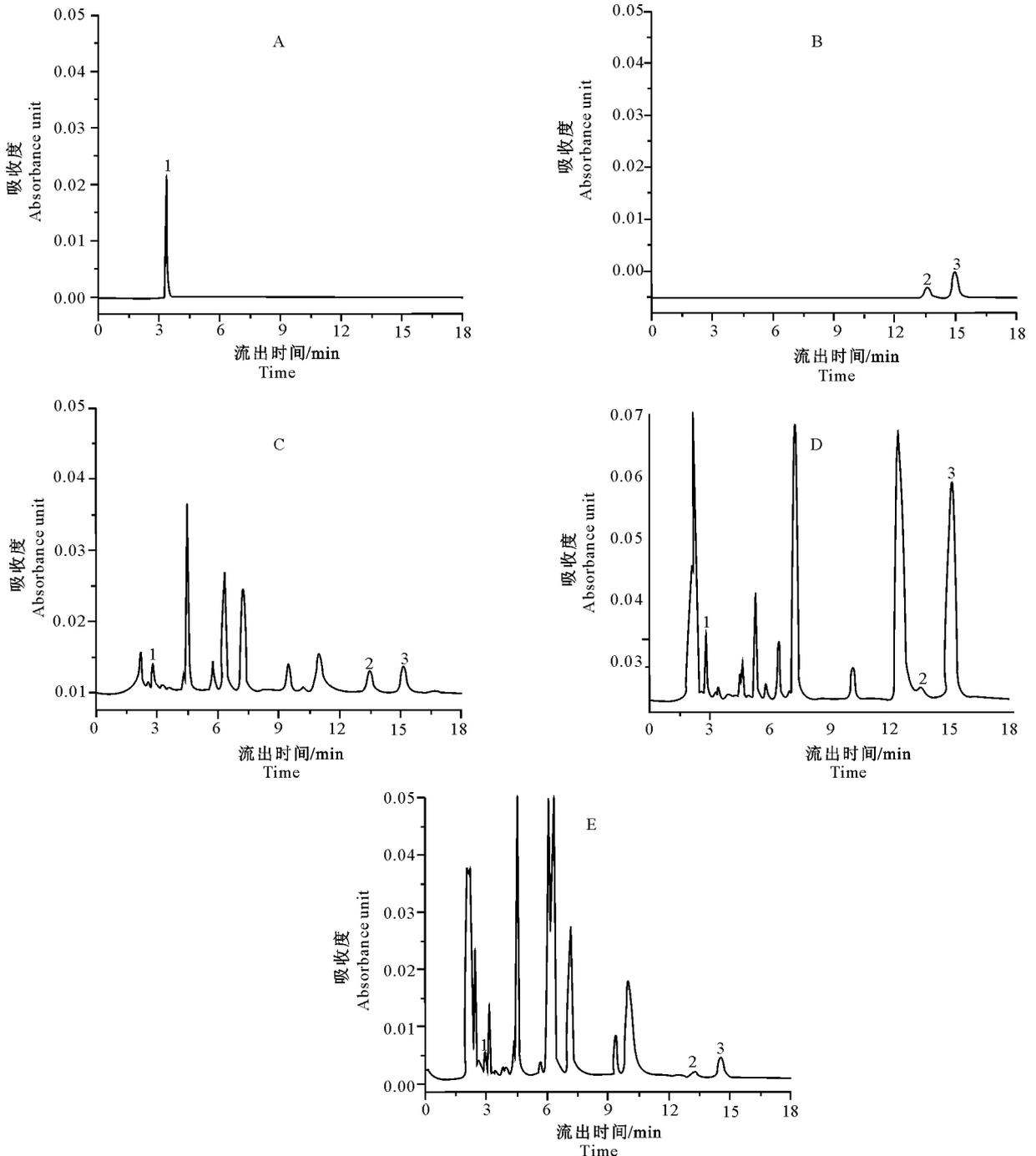


图 2 半夏栽培块茎和组培小块茎的 HPLC 色谱图

A. 葫芦巴碱对照品; B. 肌苷和鸟苷对照品; C. 栽培块茎; D. 块茎外植体诱导的小块茎; E. 叶片叶柄外植体诱导的小块茎;

1. 葫芦巴碱; 2. 肌苷; 3. 鸟苷

Fig. 2 HPLC chromatogram of field-grown tubers and tissue culture-derived tubercles

A. Trigonelline standard; B. Inosine and guanosine standards; C. Field-grown tubers; D. Tubercles derived from field-grown tuber explants;

E. Tubercles derived from leaf and petiole explants; 1. Trigonelline; 2. Inosine; 3. Guanosine

3 讨论

NAA 和 6-BA 组合常用于诱导植物的器官发

生和胚胎发生^[11-12]。对于半夏小块茎的形成, NAA 和 6-BA 的质量浓度不同, 诱导出的小块茎的生理状态也不同。本研究中, NAA 质量浓度一定时, 较

低质量浓度的 6-BA 不利于半夏小块茎的形成,而较高质量浓度的 6-BA 又易使半夏小块茎分化成苗,只有在合适的 NAA 和 6-BA 质量浓度(0.2~0.5 mg/L NAA + 1.0 mg/L 6-BA)下,才能诱导出未分化的小块茎。

Suk 等^[13]报道,2,4-D 可以抑制大半夏胚性愈伤组织的分化。本研究发现,当用 2,4-D 抑制半夏小块茎的分化时,虽然 2,4-D 表现出一定的抑制作用,但同时也使小块茎生成了愈伤组织。ABA 有抑制植物生长和种子萌发的作用。本试验发现,ABA 不仅能抑制半夏小块茎的萌发,还促进了半夏小块茎的增殖,小块茎不仅生长变大,还有许多次级小块茎从初级小块茎上长出。关于 ABA 促进小块茎增殖的作用机理还有待于进一步研究。

Zha 等^[14]报道,霍山石斛原球茎的液体悬浮培养可在 1/2 MS 无激素的培养基中进行。本试验发现,在与此相同的培养基中,少量半夏小块茎易分化成苗;当在 1/2 MS 液体培养基中添加 ABA 后,实现了未分化小块茎的悬浮培养,小块茎的悬浮培养不仅可以以类似于细胞悬浮培养一样的方式增殖,而且高度分化,更有利于次生代谢物的生产。

本研究中,与栽培块茎相比,半夏 2 种组培小块茎的鸟苷和葫芦巴碱含量均明显增加,肌苷的含量均降低,这可能与激素的应用有关^[15],可能是激素的应用激活或抑制了嘌呤生物碱(鸟苷、肌苷)和吡啶生物碱(葫芦巴碱)代谢过程中某些酶的活性,从而影响了这 3 种生物碱的生物合成。作者进一步比较了不同培养基上培养的小块茎水提物的色谱图发现,3 种单一生物碱的色谱峰基本相似,这说明不同培养基上诱导的小块茎中都含有鸟苷、肌苷和葫芦巴碱。

4 结 论

本研究结果表明,以半夏块茎及叶片叶柄为外植体,诱导未分化小块茎的适宜培养基分别为 MS+0.5 mg/L NAA+1.0 mg/L 6-BA 和 MS+0.2 mg/L NAA+1.0 mg/L 6-BA;可在添加 0.6 mg/L ABA 的 1/2 MS 液体培养基中进行小块茎的悬浮培养;与栽培块茎相比,组培小块茎的总生物碱含量增加;3 种单一生物碱中,组培小块茎的鸟苷和葫芦巴碱含量均增加,肌苷含量均降低。表明小块茎不仅可用于半夏生物碱的生产,还可作为一种模式材料用于鸟苷、肌苷和葫芦巴碱的代谢调控。

[参考文献]

- [1] 细田子,井本芳则,常风润一,他. 半夏厚朴汤の指标物质の分析 [J]. 生学,1990,110(10):755.
- [2] 吴 浩,李 伟,张科卫,等. 半夏药材鉴别成分的研究 [J]. 中国中药杂志,2003,28(9):836-839.
Wu H, Li W, Zhang K W, et al. Studies on a distinguish principle of *Pinellia ternata* [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2003, 28: 836-839. (in Chinese)
- [3] 王艳华. 半夏质量评价方法研究 [D]. 沈阳:沈阳药科大学,2001.
Wang Y H. Study on the method of quality assessment of rhizoma *Pinellia* [D]. Shenyang: Shenyang Medicine Inspection University, 2001. (in Chinese)
- [4] 范美化,周吉源. 不同培养条件对半夏悬浮细胞生长及总生物碱形成的影响 [J]. 云南植物研究,2004,26(6):656-660.
Fan M H, Zhou J Y. Effects of culture conditions on cell growth and total alkaloid formation in suspension cultures of *Pinellia ternata* [J]. Acta Botanica Yunnanica, 2004, 26(6): 656-660. (in Chinese)
- [5] Tsay H S, Gau T G, Chen C C. Rapid clonal propagation of *Pinellia ternata* by tissue culture [J]. Plant Cell Reports, 1989, 8: 450-454.
- [6] 孟祥海. 光照强度、6-BA、GA₃ 对半夏生长发育与有效成分含量的影响研究 [D]. 陕西杨凌:西北农林科技大学,2007.
Meng X H. Studies on effects of shading, 6-BA, GA₃ on growth and effective constituents of *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit [D]. Yangling, Shaanxi: Northwest A&F University, 2007. (in Chinese)
- [7] 何奕昆,刘 刚,刘铁刚,等. 半夏茎尖培养及块茎的品质改良 [J]. 植物学报,1994,36(1):39-44.
He Y K, Liu G, Lu T G, et al. Stem apex culture and quality improvement of tubercles of *Pinellia ternata* [J]. Acta Botanica Sinica, 1994, 36(1): 39-44. (in Chinese)
- [8] 薛建平,朱艳芳,张爱民,等. 半夏试管块茎直接再生技术的研究 [J]. 作物学报,2004,30(10):1060-1064.
Xue J P, Zhu Y F, Zhang A M, et al. Research on direct formation of microtubers from *Pinellia ternata* [J]. Acta Agronomica Sinica, 2004, 30(10): 1060-1064. (in Chinese)
- [9] 郭余龙,贾永芳,杨星勇,等. 半夏的组织培养及其成分比较 [J]. 农业生物技术学报,2003,11(3):259-262.
Guo Y L, Jia Y F, Yang X Y, et al. Tissue culture and component analysis of *Pinellia ternata* [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2003, 11(3): 259-262. (in Chinese)
- [10] 于 超,张 明,王 宇,等. 栽培、野生及不同产地半夏总生物碱测定 [J]. 中国中药杂志,2004,29(6):583-584.
Yu C, Zhang M, Wang Y, et al. Determination of alkaloids content of cultivated and wild *Pinellia ternata* from various areas [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2004, 29(6): 583-584. (in Chinese)
- [11] Sheelavanthmath S S, Murthy H N, Hema B P, et al. High frequency of protocorm like bodies (PLBs) induction and plant regeneration from protocorm and leaf sections of

- Aerides crispum* [J]. *Scientia Horticulturae*, 2005, 106: 395-401.
- [12] Jonojit R, Soumi N, Madhumita M. Direct and callus-mediated protocorm-like body induction from shoot-tips of *Dendrobium chrysotoxum* Lindl. (Orchidaceae) [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 2007, 90: 31-39.
- [13] Suk W K, Dong S I, Kyoung H T, et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration in leaf and petiole explant cultures and cell suspension cultures of *Pinellia tripartite* [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 2005, 80: 267-270.
- [14] Zha X Q, Luo J P, Jiang S T, et al. Enhancement of polysaccharide production in suspension cultures of protocorm-like bodies from *Dendrobium huoshanense* by optimization of medium compositions and feeding of sucrose [J]. *Process Biochem*, 2007, 42: 344-351.
- [15] Dias A, Seabra R M, Andrade P B. Xanthone biosynthesis and accumulation in calli and suspended cells of *Hypericum androsaemum* [J]. *Plant Sci*, 2000, 150: 93-101.

(上接第 167 页)

- [16] 朱浩, 侯世祥, 孙毅毅, 等. 大孔吸附树脂吸附纯化不同中药有效部位特性研究 [J]. *中国中药杂志*, 1998, 23(10): 607-609.
- Zhu H, Hou S X, Sun Y Y, et al. Application and characteristics of macroporous resin in purification study of different effective ingredients in Chinese medicines [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 1998, 23(10): 607-609. (in Chinese)
- [17] 李剑君, 李稳宏, 高新, 等. AB-8 大孔吸附树脂吸附葛根素过程的研究 [J]. *西安交通大学学报*, 2000, 34(4): 78-81.
- Li J J, Li W H, Gao X, et al. Adsorption process of puerarin with macropore resin AB-8 [J]. *Journal of Xi'an Jiao Tong University*, 2000, 34(4): 78-81
- [18] 李岂凡, 白兰莉, 胥永, 等. 葛根总黄酮的分离与纯化 [J]. *南昌大学学报: 自然科学版*, 2007, 31(5): 463-472.
- Li Q F, Bai L L, Yu Y, et al. Separation and purification of *Pueraria* total isoflavones [J]. *Journal of Nanchang University: Natural Science Edition*, 2007, 31(5): 463-472. (in Chinese)
- [19] 何宇新, 于杰, 李玲, 等. 大孔树脂分离纯化葛根总黄酮工艺研究 [J]. *西南农业大学学报*, 2006, 28(6): 957-960.
- He Y X, Yu J, Li L, et al. Study on the technology of isolation and purification of gross anthoxanthin in *Radix Puerarise* with macroporous adsorbing resin [J]. *Journal of Southwest Agricultural University*, 2006, 28(6): 957-960. (in Chinese)
- [20] 陈斌. 葛根有效成分快速检测方法的建立及葛根素分离提纯新工艺研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2001.
- Chen B. Studies on rapid method for the analysis of effective components of *P. Lobata* and new purification technology for puerarin [D]. Beijing: China Agricultural University, 2001. (in Chinese)