



附子资源

与遗传多样性研究

侯大斌 / 著

Fuzi Ziyuan Yu
Yichuan Duoyangxing
Yanjiu



四川大学出版社

Fuzi Ziyuan Yu
Yichuan Duoyangxing
Yanjiu

附子资源 与遗传多样性研究

侯大斌 / 著



四川大学出版社

责任编辑:朱兰双 黄文龙

责任校对:周 颖

封面设计:翼虎书装

责任印制:李 平

图书在版编目(CIP)数据

附子资源与遗传多样性研究 / 侯大斌著. —成都: 四川大学出版社, 2008.11

ISBN 978-7-5614-4176-3

I. 附… II. 侯… III. ①附子-种质资源-研究②附子-遗传-生物多样性-研究 IV. S567

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2008) 第 172797 号

书名 附子资源与遗传多样性研究

著 者	侯大斌
出 版	四川大学出版社
地 址	成都市一环路南一段 24 号 (610065)
发 行	四川大学出版社
书 号	ISBN 978-7-5614-4176-3
印 刷	四川锦祝印务有限公司
成品尺寸	185 mm×260 mm
印 张	14
字 数	319 千字
版 次	2008 年 11 月第 1 版
印 次	2008 年 11 月第 1 次印刷
定 价	35.00 元

版权所有◆侵权必究

◆读者邮购本书,请与本社发行科联系。电 话:85408408/85401670/85408023 邮政编码:610065

◆本社图书如有印装质量问题,请寄回出版社调换。

◆网址:www.scupress.com.cn

前言

中药资源是祖国传统中医药的物质基础和中医药数千年持续发展的物质保障,也是中医药临床应用的物质载体,因此,加强中药资源的保护和研究,确保中药资源的可持续利用,对保障中医药持续健康发展具有极其重要的意义。但从目前的状况来看,中药资源可持续利用面临十分严峻的局面。一方面,我国是世界生物多样性最丰富的国家之一,也是中药资源生物多样性最丰富的国家,我国中药资源达 12807 种,其中药用植物 11146 种,药用动物 1581 种,药用矿物 80 种。全国民间药(草药)约 5000 种,民族药约 4000 种,藏药约 300 种,蒙药约 2230 种,维药约 600 种,傣药约 1200 种。另一方面,由于中药资源保护与利用缺乏科学管理,中药资源的保护研究和保护手段相对落后,常用中药 70% 来源于野生植物,随着对主要中药资源的利用和需求的扩大,部分中药资源的遗传性衰竭,加之生态环境和农药使用等因素,导致中药资源的可持续利用面临困难境地。目前我国处于濒危状态的近 3000 种植物中,用于中药或具有药用价值的占 60%~70%,部分已经灭绝。被列入中国珍稀濒危保护植物名录的药用植物有 168 种,列入国家重点保护野生动物名录的药用动物有 162 种。世界自然基金会(World Wide Fund for Nature) 2004 年 1 月公布的一份报告声明:人们对药用植物的采集和消费已经使世界上已认知的药用植物的 1/5 面临灭绝的危险。为此,中国《中药现代化发展纲要》(2002—2010)明确提出了在充分利用资源的同时,保护资源和环境,保护生物多样性和生态平衡,特别是濒危和紧缺中药材资源的修复和再生;保护中药种质和遗传资源,加强优选优育和中药种源研究,防止品种退化,解决品种源头混乱的问题,以保障中药资源的可持续利用和中药产业的可持续发展。在国际自然和自然保护联盟发起的《濒危野生动植物物种国际贸易公约》(CITES) 第十届缔约国大会上,专门通过了有关传统医药的决议,要求普遍使用传统医药的国家,必须密切关注受威胁的物种,并对过度利用的物种采取有力的保护措施。因此,中药资源研究成了当前的热点,开展中药资源研究将对保持传统中医药的持续健康发展具有重要的理论和现实意义。

附子(川乌)是我国著名的传统中药和川产道地药材,具有显著的抗炎、镇痛、强心、抗心律失常、降血糖、抗癌、毒性以及对心血管系统和对神经系统作用等药理作用,有回阳救逆、补火助阳、散寒除湿的功效,至今已有两千多年的药用历史和一千三百多年的栽培历史,药用始载于《神农本草经》,以后历代本草书中多有记载,《中国药典》1953 年版至 2005 年版的八个版本均有收录。2006 年被列入中国地理标志产品保护。因此,附子资源研究既具有自身的重要研究意义,又具有明显的中药资源研究的代表性。

开展附子资源研究的主要目的是建立附子资源有效保护和可持续利用的长效的技术体系,持续提供高产、高效、质量稳定、临床药效可靠的附子药材产品。为此,我们确定了资源调查与资源保存相结合和建立较系统的附子种质资源库、道地资源研究与一般资源研究相结合来综合评价优良种质资源,以植物(农作物)资源研究的思路为指导开展附子种质资源研究的研究思路,用中药资源学、药用植物学、中药化学、分子生物学、农艺学、栽培学、遗传育种学等多学科结合开展附子资源研究的方法,通过资源调查、种质资源库、遗传多样性、基本生物学特性、优良种质资源评价,以建立系统的附子种质资源库,了解附子种质资源的遗传多样性,评价和筛选出附子优良种质(品种),为生产提供优良品种。目前,我们研究中评价出的附子优良种质已经运用于新品种的培育研究,并应用于江油附子生产中,初步显现了明显的社会和经济效益。完成的研究工作将对附子资源系统研究起到重要的推动作用,同时提出的研究思路和建立的研究方法将对其他中药资源研究是一个有益的借鉴。

本研究工作的完成,要特别感谢我的博士生导师四川农业大学任正隆教授,在选题、确定研究思路和研究方案的过程中都得到了他的全面指导。我们的研究工作自始至终都得到了西南科技大学相关领导和学校生命科学与工程学院的全面关心和支持,同时得到了四川省应用基础项目、四川省教育厅重点科技项目、绵阳市重点科技项目的资助,得到了四川省中药研究院主持的科技部“十五”科技攻关项目的资助,使得我们的附子资源研究工作不断深入。在研究工作完成过程中得到了四川农业大学、四川省中医药研究院、成都中医药大学、四川大学、中科院成都生物所、中科院昆明植物所、西南交通大学药学院等单位和相关人员的大力帮助;在资源采集过程中得到了西昌学院、重庆药物种植研究所,以及四川的绵阳、广元、乐山、凉山、雅安、阿坝等地相关单位,重庆的云阳、酉阳、城口等地相关单位,陕西汉中、湖北竹山和竹溪等地区的相关单位和人员的热情帮助,从而保证了野外资源采集工作的顺利完成;研究过程中有近10名研究生参加了部分研究工作。此外,还有许多人员给予了众多帮助,在此,一并表示感谢!

编辑出版本研究专著的目的主要有两个:一是对我们在附子资源研究方面的工作进行整理和总结,为进一步深入的研究工作提供基础;二是把我们在附子资源研究中所采取的研究思路、研究方法、研究结果和体会等提供给从事中药资源研究的同行和有关人员,进行学术交流,听取意见和建议,期望能对今后的研究工作有所帮助。由于水平所限,书中难免存在不足和缺陷,敬请读者给予批评、指正和帮助。

侯大斌

2008年10月于绵阳

目 录

第一章 附子资源研究概况	(1)
第一节 乌头的分布与资源	(2)
一、乌头的分类与分布	(2)
二、中国乌头植物的药用资源	(4)
第二节 乌头细胞学与系统发育学	(5)
一、乌头细胞学	(5)
二、乌头系统发育学	(6)
第三节 乌头生物学	(7)
一、乌头发育特性	(7)
二、乌头的形态解剖	(8)
三、乌头的组织培养	(10)
第四节 乌头的生物化学	(11)
一、乌头类生物碱与生物合成	(11)
二、乌头类生物碱含量测定方法	(11)
三、附子(乌头)的化学成分与指纹图谱	(12)
第五节 附子(乌头)的药理学与炮制学	(14)
一、乌头的药理	(14)
二、附子的药理	(14)
三、附子的加工炮制	(15)
四、附子(乌头)的毒性	(16)
五、附子(乌头)的功效	(17)
第六节 附子(乌头)的遗传分化和遗传多样性	(18)
第七节 附子(乌头)的品种资源和栽培研究	(19)
第八节 中药现代化与中药资源研究	(21)
第二章 附子资源的现代研究思路	(33)
第一节 附子资源研究中拟重点解决的关键问题	(33)
第二节 附子资源现代研究思路	(33)
一、资源调查与资源保存相结合建立较系统的附子(乌头)种质资源圃(库)	(33)
二、道地资源研究与普通资源研究相结合,综合评价优良种质资源	(35)

三、以植物(农作物)资源的研究思路为指导,开展附子(乌头)种质资源研究	(35)
第三节 主要研究内容	(36)
一、附子种质资源圃的建立	(36)
二、附子(乌头)的发育生物学研究	(36)
三、附子(乌头)的生物化学研究	(36)
四、附子(乌头)的遗传多样性研究	(37)
五、附子(乌头)的育种学研究	(37)
第三章 附子种质资源圃(库)的建立	(40)
第一节 附子种质资源的调查与收集	(40)
一、附子种质资源的调查	(40)
二、附子种质资源的收集	(40)
第二节 附子种质资源圃(库)的建立与保存	(42)
一、附子种质资源圃(库)的建立	(42)
二、附子种质资源的保存	(43)
第四章 附子(乌头)的发育生物学研究	(44)
第一节 附子(乌头)的生长发育动态研究	(44)
一、附子(乌头)根系的生长发育动态分析	(45)
二、附子(乌头)茎的生长发育动态分析	(52)
三、附子(乌头)叶的生长发育动态分析	(54)
四、附子(乌头)花、果的发育动态分析	(57)
五、附子(乌头)植株生物总量的生长发育动态分析	(58)
六、附子(乌头)生育期划分	(63)
第二节 附子(乌头)的栽培研究	(67)
一、母根大小对附子(乌头)植株主要性状的影响	(68)
二、附子(乌头)母根大小(打尖修根)对块根产量的影响	(74)
三、附子(乌头)打顶留叶数量(修根)对子根产量的影响	(75)
四、附子(乌头)子根(附子)产量的影响及构成因素分析	(76)
第三节 附子的贮藏研究	(76)
一、贮藏期间附子含水量与呼吸速率的变化	(77)
二、贮藏期间附子可溶性蛋白的变化	(78)
三、贮藏期间附子还原糖、淀粉含量及淀粉酶活性的变化	(78)
四、附子贮藏生理指标间的关系分析	(79)
第四节 讨论	(80)
一、关于附子(乌头)植株生长发育动态特性	(80)
二、关于附子(乌头)的产量、品质与收获期	(82)
三、关于附子(乌头)的生长发育期	(83)
四、关于母根大小对附子(乌头)植株发育的影响	(84)

五、关于附子(乌头)的栽培管理措施	(84)
六、关于附子贮藏期间的生理指标变化	(86)
第五章 附子(乌头)的生物化学研究	(89)
第一节 附子(乌头)生物碱含量发育动态分析	(89)
一、附子(乌头)子根生物碱的发育变化动态	(89)
二、附子(乌头)母根生物碱的发育动态	(90)
三、附子(乌头)不同组织生物碱含量比较	(91)
第二节 附子(乌头)氨基酸含量发育动态分析	(92)
一、附子(乌头)子根氨基酸含量的发育动态	(92)
二、附子(乌头)叶片氨基酸含量的发育动态	(94)
三、附子(乌头)不同组织氨基酸含量比较	(96)
第三节 附子(乌头)谷草转氨酶和谷丙转氨酶活力动态分析	(98)
一、谷草转氨酶(ALT/GOT)活性的动态分析	(99)
二、谷丙转氨酶(AST/GPT)的动态分析	(100)
第四节 N、P、K施用对附子生物碱、氨基酸含量和酶活性的影响	(100)
一、N、P、K施用对附子生物碱含量的影响	(102)
二、N、P、K不同施用量对附子氨基酸含量的影响	(104)
三、N、P、K不同施用量对附子(乌头)几种酶活性的影响	(107)
第五节 附子(乌头)生物碱、粗多糖的提取工艺	(112)
一、附子(乌头)生物碱的提取工艺	(112)
二、附子(乌头)粗多糖的提取工艺	(118)
第六节 讨论	(122)
一、关于附子(乌头)生物碱含量与变化	(122)
二、关于附子(乌头)氨基酸含量及转氨酶的变化	(123)
三、关于附子(乌头)谷草转氨酶和谷丙转氨酶活性的动态变化	(124)
四、关于N、P、K对附子(乌头)生物碱和氨基酸含量的影响	(125)
五、关于N、P、K对附子(乌头)氮代谢酶活性的影响	(126)
六、关于附子(乌头)二萜生物碱的纯化工艺	(127)
第六章 附子(乌头)的遗传学研究	(132)
第一节 附子(乌头)资源的细胞遗传学研究	(132)
第二节 附子(乌头)资源的分子遗传学研究	(134)
一、附子(乌头)RAPD扩增条件的优化	(134)
二、附子(乌头)DNA的改良CTAB法提取与ISSR扩增条件的优化	(139)
三、附子(乌头)种质资源的ISSR分析	(145)
四、附子(乌头)资源遗传多样性的RAPD分析	(148)
五、附子(乌头)种质资源及近缘种属遗传关系的RAPD分析	(158)
第三节 道地性附子种质资源的分子指纹图谱研究	(160)
第四节 讨论	(165)

一、关于附子(乌头)资源的染色体遗传变异·····	(165)
二、关于附子(乌头)DNA的改良CTAB法提取与ISSR扩增条件优化···	(166)
三、关于附子(乌头)资源的遗传多样性·····	(167)
四、关于附子(乌头)近缘属种的系统关系·····	(170)
五、关于附子种质资源的分子指纹图谱·····	(170)
第七章 附子(乌头)的育种学研究·····	(175)
第一节 附子(乌头)种质资源遗传分化类型的分子鉴定·····	(175)
一、附子(乌头)种质资源遗传分化类型的RAPD分析·····	(176)
二、附子(乌头)种质资源遗传分化程度分析·····	(178)
第二节 附子(乌头)种质资源遗传分化类型的性状鉴定·····	(180)
一、附子(乌头)种质资源遗传分化类型子根产量性状分析·····	(182)
二、附子(乌头)种质资源遗传分化类型生物碱含量比较分析·····	(186)
三、附子(乌头)种质资源遗传分化类型氨基酸含量及生化比较分析·····	(189)
第三节 附子(乌头)优良品种的综合评价·····	(197)
第四节 讨论·····	(204)
一、关于附子(乌头)种质资源遗传分化类型的DNA标记分类·····	(204)
二、关于附子(乌头)种质资源遗传分化类型评价的产量与品质性状选择 ·····	(205)
三、关于附子(乌头)种质资源遗传分化类型的经济产量性状和品质性状比较 ·····	(207)
四、关于附子(乌头)优良品种的综合评价·····	(208)
五、关于中药材的资源研究与品种选育·····	(209)

第一章 附子资源研究概况

附子是一种传统中药,是四川道地药材之一,又名乌头、乌喙、奚毒、即子、鸡毒、毒公、耿子、川乌头等^[1],附子之名最早出现于东汉医书《金匱要略》^[2]。其原植物为毛茛科乌头属植物乌头 (*Aconitum carmichaeli* Debx.)^[1,3,4],又名藟、茛、独白草、鸳鸯菊、鹅儿花、铁花、五毒等,为多年生草本,高 60cm~150cm。块根通常 2 个,栽培时可达 4~15 个,呈倒卵圆形至倒卵形。茎直立,圆柱形。叶互生,叶片卵圆状五角形,坚纸质或略革质,掌状三裂几达基部。总状圆锥花序;花蓝紫色,花瓣盗形;雄蕊数多;心皮 3~5 离生。蓇葖果长圆形。花期 9~10 月,果期 10~11 月。据《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)2005 年版^[5],我国入药的有川乌、制川乌、附子、草乌、制草乌、草乌叶 6 个乌头品种,川乌为毛茛科植物乌头 (*A. carmichaeli* Debx.) 的干燥母根,附子则为其子根的加工品;制川乌为川乌的炮制加工品;而草乌、制草乌、草乌叶分别是乌头属北乌头 (*A. kusnezoffii* Reichb.) 的干燥块根、草乌的炮制加工品和干燥叶,与附子(乌头)类似但有区别。

附子(乌头)含乌头碱(aconitine)、次乌头碱(hypaconitine)和中乌头碱(mesaconitine)等主要成分,具有抗炎、镇痛、强心、抗心律失常、降血糖、抗癌、毒性等对心血管系统和对神经系统作用的主要药理作用,有回阳救逆、补火助阳、散寒除湿的功效^[1,3,4]。其药用始载于《神农本草经》^[6]。《金匱要略》、《伤寒论》中的很多方剂含附子,以后历代本草书中大多有附子的记载。《伤寒论》已收载方 113 种,有附子者 20 个,约占总载方量的 18%;《本草纲目》记载的附子为主的药方有 113 种^[7],《中国药典》1990,1995,2000,2005 年版及卫生部标准第 1 册~第 19 册中含有乌头类的中成药制剂(扣除重复品种)共计 338 种,所占比重很大。由于附子具有众多的药效,一直以来受到关注,国内外市场需求量很大。

附子(乌头)适应性强,对气候条件要求不严,具有耐寒与耐阴湿的特点,在年降雨量 861.4mm~1419mm、年平均气温 13.7℃~16.3℃及年日照时间 903.1h~1499.7h 的平坝与盆地边缘的浅丘地带栽培^[2],主产于四川(江油、平武、绵阳、安县、布拖)和陕西(城固、勉县、南郑、汉中),年产量占全国总产量的 90%以上,是国家确定的附子商品生产基地,产品销往全国并有一定量出口;湖北、湖南、贵州、重庆、云南也有栽培^[1,3,8]。附子的全国道地性药材最佳产地是四川江油,已有上千年的栽培历史^[1,3,9],在国内外享有很高的盛誉。

乌头属植物,除药用外还具有其他用途。乌头含乌头碱等生物碱,多数种类的块根有剧毒,早在《神农本草经》中就有“其汁煎之,名射闕,杀禽兽”的记载^[6],民间常

用来制造箭毒以猎射野兽。在南亚地区和太平洋北部地区也有用来制造箭毒^[10]的。乌头碱还可作农药,防治病虫害,消灭蚊蝇幼虫等^[11,12]。此外,由于本属植物的花多美丽,可供园林观赏^[13~15]。

第一节 乌头的分布与资源

一、乌头的分类与分布

乌头属 (*Aconitum* L.) 植物约有 350 种, 包含乌头亚属 (Subgen. *Aconitum*)、牛扁亚属 (Subgen. *Paraconitum*) 和露蕊乌头亚属 (Subgen. *Gymnaconitum*) 三个亚属^[9,16]。

牛扁亚属 (Subgen. *Paraconitum*) (多年生根状茎)^[9,17] 包括约 43 个种, 划分为几个组。独花乌头组 (Sect. *Galeatum*, Sect. *Fletcherum*), 展喙乌头组 (Sect. *Alatospermum*) 和牛扁组 (Sect. *Lycocotnum*) 等, 其中前三个组为单种组。牛扁组 4 个组下分 11 个系。中国—喜马拉雅植物亚区 11 种, 中国—日本植物亚区 12 种, 欧洲—西伯利亚植物区 19 种, 北美植物区仅 1 种。中国—喜马拉雅植物亚区具有全部 4 个组中的 3 个组、11 个系中的 5 个系, 而其他地区仅有 1 个组。

乌头亚属 (Subgen. *Aconitum*) 是乌头属最复杂的一群 (多年生块根)^[9,17], 包括约 310 个种, 下有多果乌头组 (Sect. *Sinaconitum*) 和乌头组 (Sect. *Aconitum*) 2 个组。其中乌头组下有 11 个系, 甘青乌头系 (Ser. *Tangutica*)、圆叶乌头系 (Ser. *Rotundifolia*)、保山乌头系 (Ser. *Bullatifolia*)、褐紫乌头系 (Ser. *Brunnea*)、显柱乌头系 (Ser. *Stylosa*)、岩乌头系 (Ser. *Racemulosa*)、蔓乌头系 (Ser. *Volubilia*)、乌头系 (Ser. *Inflata*)、兴安乌头系 (Ser. *Ambigua*)、准噶尔乌头系 (Ser. *Grandituberosa*)、短柄乌头系 (Ser. *Brachypoda*)。在分布上, 中国—喜马拉雅植物亚区有 2 个组 9 个系约 170 种, 中国—日本植物亚区有 1 组 3 个系约 50 余种, 欧洲—西伯利亚植物区有 1 组 6 个系约 55 种, 北美植物区仅有 1 个组约 1~2 个系 25 种。

露蕊乌头亚属 (Subgen. *Gymnaconitum*) 是单种亚属 (一年生直根), 仅分布于中国—喜马拉雅植物亚区及近邻^[9]。

中国乌头属属下等级的数量分类研究基本上支持了经典分类方法^[18], 认为乌头属是各方面演化较为稳定、分化趋于缓和的类群, 但存在分化多样、演进复杂激烈的类群 (例如兴安乌头系)。

乌头属 (*Aconitum* L.) 为典型的温带属, 分布于北半球温带, 主要分布于东亚植物区 (由中国—喜马拉雅植物亚区和中国—日本植物亚区组成) (亚洲), 其次是欧洲—西伯利亚植物区 (欧洲) 和北美植物区 (北美洲)。我国有 170 余种, 加上变种约有 250 个分类群, 除海南岛外, 台湾和祖国大陆各省区都有分布, 大多数分布于云南北部、四川西部和西藏东部的高山地带, 其次在东北诸省也有不少种类^[9]。

关于乌头属植物的起源问题,研究认为^[19]东亚地区是该属植物的起源中心,后来研究进一步认为^[17,20],由于喜马拉雅山脉的隆升以及由此而产生的复杂的历史自然环境条件,中国—喜马拉雅植物亚区成了乌头属植物地理分布的频度中心,多样性中心,原始类群的保存中心,分化中心以及特有类群的分布中心。该区具有乌头属植物的全部3个亚属,6个组中的5个组,22个系中的13个系和180种,集中了乌头属植物中最原始的绝大多数组、系和种类,例如牛扁亚属中的很原始的单种组独花乌头组(Sect. *Fletcherum*)和展喙乌头组(Sect. *Alatospermum*),以及有许多主要原始特征的多果乌头(*A. polycarpum*)、甘青乌头(*A. tanguticum*)、褐紫乌头(*A. brunneum*)等都特产或集中分布于中国—喜马拉雅植物亚区。同时,中国—喜马拉雅植物亚区除部分组、系和种类是原始或比较原始外,很大部分是进化和较进化的类群,有分化水平较高的露蕊乌头亚属,种与种之间存在许多过渡类型,乌头属植物在该区域存在激烈的变异和分化。此外,该区域还具有特有类群多(50%的组、13.6%的系和42.8%的种),种类复杂,起源古老,分布区狭小等特点。在分布上还存在地带性规律,四川峨眉山以西的地区本属植物种类极为丰富而且密度大,峨眉山以东的地区种类骤降,而且均处于零散分布。本属植物对高原的生态环境有很强的适应能力,纬度愈北其生长海拔高度愈低,在青藏高原及其邻近地区分布海拔为2000m~5000m,在华中和华北分布海拔800m~2000m,在沿海及东北地区分布于海拔100m~1000m,一般是类群特征愈原始,其分布海拔愈高。乌头属植物替代分布现象亦较明显,如乌头(*A. carmichaeli* Debx.)与北乌头(*A. kusnezoffii* Reichb.)呈南北替代分布,黄花乌头(*A. coreanum*)与拟黄花乌头(*A. anthoroideum*)呈垂直替代分布,前者分布于海拔1000m以下,后者分布于海拔1400m~2000m。

中国乌头属植物可进一步划为4个分布区^[20],青藏区、东南区、北方区和台湾区。青藏区,包括四川、云南、西藏、青海、甘肃、宁夏,即青藏高原及其邻近地区,隶属于中国—喜马拉雅植物亚区和青藏高原植物亚区,乌头属类群最丰富亦最复杂,具有该属中的全部3亚属、6组中的5群、22系中的13系和约170个种及种下等级,且其中不少为特有类型。东南区,包括广东、广西、贵州、湖南、湖北、江西、浙江、安徽、河南和陕西,即青藏高原以东、黄河以南和北回归线以北的广大地区,是中国—日本植物亚区的核心,乌头属自其现代分化中心向东南方向迁移和扩散,于是形成了本区的分布格局,种类较少,约31种,北回归线以南未见乌头属植物分布。北方区,包括河北、山西、内蒙古、辽宁、吉林、黑龙江和新疆,属于中国—日本森林植物亚区、欧—亚森林植物亚区和欧—亚草原植物亚区的交汇地带,该区与东南区相对应,为乌头属向东北方向迁移扩散而形成的最重要的次生分布区,并延伸至朝鲜半岛和苏联远东地区,是国产乌头属的第二大分布中心,有62种,其中准噶尔乌头系(Ser. *Grandituberosa*)为该区特有。台湾区,包括台湾岛及其附近岛屿,乌头属有4种,属乌头系(Ser. *Inflata*),且全为该区特有。

乌头属中的乌头(*A. carmichaeli* Debx.)是我国分布最广的,自川藏高原东缘起向东至长江中、下游以及珠江流域上游各省区的丘陵地区,从江苏向北经过山东到达辽宁南部,包括辽宁南部、陕西、甘肃、河南、山东、安徽、江苏、浙江、江西、湖北、湖南、

广东北部、广西、四川、贵州、云南等^[9,21]都有分布。由于乌头分布广、变异大,从西向东形成了毛叶乌头 (*A. carmichaeli* var. *pubescens*), 黄山乌头 (*A. carmichaeli* var. *huangshanicum*), 深裂乌头 (*A. carmichaeli* var. *tripartitum*), 展毛乌头 (*A. carmichaeli* var. *truppclianum*) 4个变种, 对于4个变种的分合一直存在争议, 有研究认为^[22]乌头4个地理变种是乌头种内的4个主要的分布居群, 支持一个种而不设变种的观点。

二、中国乌头植物的药用资源

肖培根教授等^[23] (1965) 在对我国乌头属 160 余种植物的调查研究中, 先鉴定出了 35 种具有药用价值的种类^[2], 附子和川乌只来源于乌头 (*A. carmichaeli* Debx.), 草乌除主要来源为乌头 (*A. carmichaeli* Debx.) 及北乌头 (*A. kusnezoffii* Reichb.) 外, 还有 20~30 种野生乌头属 (*Aconitum* L.) 植物的块根, 多呈乌鸦头状圆锥形或胡萝卜状长圆锥形, 并具有不同程度的毒性。

1995 年, 楼之岑教授完成了国家“九五”重点科技攻关项目“常用中药材品种整理和质量研究”的科研成果, 对国产乌头属 16 种草乌的主流商品药材进行了基源调查, 通过对全国 26 个省、市自治区使用的草乌原植物和商品药材进行调查、采集试验样品、鉴定原植物及 60 份草乌商品, 搞清了全国草乌主要来源于毛茛科乌头属多种植物的块根, 多为野生品, 少数为栽培品。加上据《新华本草纲要》《中药志》《中国植物志》等记载, 乌头属植物中供药用的品种达 50 余种^[2,18]。

此外, 对贵州、河北、云南、山西、四川、陕西、甘肃、宁夏等省(区)的乌头属植物的药用资源调研究上, 许多学者开展了大量调查、鉴定和研究工作^[24~29]。主要包括对乌头属牛扁亚属中供中医使用的 5 种 3 变种, 贵州的 12 种有药用价值的乌头属植物, 河北地区(包括北京、天津)乌头属 6 种 4 变种药用植物, 云南昭通地区 14 种乌头属植物, 山西省 5 种 5 变种乌头属的资源分布及药用概况, 陕西、甘肃、宁夏、四川等省(区)产雪上一枝蒿(展毛短柄乌头)药材的原植物来源鉴定和研究, 川产商品草乌的原植物有 6 种 2 变种, 主流品种是瓜叶乌头 (*A. hemsleyanum* Pritz.) 及白花瓜叶乌头 (*A. hemsleyanum* var. *leucantum*)。

通过上述文献可见, 在乌头属植物的分类和资源研究上, 亚属、组的划分体系已形成, 并得到了普遍公认, 但个别种的划分上仍需要探讨。中国—喜马拉雅植物亚区作为乌头属植物地理分布的频度中心、多样性中心和分化中心, 许多种均存在大量变异类型, 乌头被认为是我国分布最广、具有变异类型最多的一个种。但是, 对于这些种内变异的资源类型还缺乏全面的调查及深入、系统的研究; 这些种内变异的分类学地位与关系, 有待于进一步的物种生物学研究。

第二节 乌头细胞学与系统发育学

一、乌头细胞学

对乌头属的染色体研究开始于 1933 年^[30,31], 研究证明乌头属的染色体基数为 8, 乌头属的染色体属于 R 型, 大小一般为 $3\mu\text{m}\sim 12\mu\text{m}$, 乌头 (*A. carmichaeli* Debx.) 为八倍体 ($2n=64$), 认为乌头属中的染色体多倍化是产生新种的主要途径。国产乌头研究发现^[32,33] 乌头有六倍体和八倍体 ($2n=48, 64$)。进一步研究发现^[34] 了我国的栽培乌头有四倍体 ($2n=32$), 与日本的栽培乌头 (*A. chinense* Pax.) 的染色体数目 ($2n=32$) 一致, 认为日本栽培的乌头可能与我国山西栽培的乌头属于同一种。

对乌头属植物的染色体研究众多^[30,31,35~56], 染色体基数均为 8, 没有例外, 但在欧洲和印度的种中发现了非整倍性的现象^[30,31]; 乌头亚属 (Subgen. *Aconitum*) 染色体倍性从二倍体、四倍体、六倍体到八倍体, 牛扁亚属 (Subgen. *Paraconitum*) 为二倍体和四倍体, 露蕊乌头亚属 (Subgen. *Gymnaconitum*) 的染色体均为二倍体, 表明乌头属中亚属的产生与染色体数目变异无关, 而乌头亚属的多倍性变异可能与亚属内大量种的形成有关; 对国产乌头属乌头亚属 (Subgen. *Aconitum*)、牛扁亚属 (Subgen. *Paraconitum*) 和露蕊乌头亚属 (Subgen. *Gymnaconitum*) 三个亚属的染色体数目和形态进行研究后发现^[32,37,43], 染色体演化造成乌头属中根状茎多年生和块茎二年生种的染色体间在大小和结构上存在差异, 具根状茎而多年生的种多为二倍体, 染色体形态较大; 具二年生的种多为多倍体, 染色体形态较小; 露蕊乌头亚属为二倍体, 染色体与乌头亚属差不多, 其研究结果支持经典分类学上的牛扁亚属、乌头亚属、露蕊乌头亚属的划分。

此外, 许多学者对乌头属植物一些种的细胞学进行了深入研究, 并根据染色体组型、核型和结构讨论了该属中亚属、组和一些种的系统关系^[37,57,58,59]。

对国产乌头属植物的染色体数目资料的统计分析发现^[60], 国产 61 种乌头属植物已有染色体报道, 其中包括牛扁亚属 8 种, 乌头亚属 52 种, 露蕊乌头亚属 1 种, 占国产乌头属植物的 41%。国产乌头属中有 79% 的种类为二倍体, 四倍体或多倍体占 13%。在具多年生根状茎的牛扁亚属和具二年生块根的乌头亚属中都可观察到四倍体, 在一年生的露蕊乌头亚属中仅发现二倍体。乌头亚属中二倍体、四倍体、六倍体和八倍体都有发现, 乌头 (*A. carmichaeli*) ($4x, 6x, 8x$)、高乌头 (*A. sinomontanum*) ($2x, 4x$)、冯氏乌头 (*A. fengii*) ($2x, 4x$) 等 5 种乌头属植物表现为种内多倍性。横断山区分布的乌头亚属植物多为二倍体, 多倍体主要分布于华北和东北地区的乌头亚属的乌头系中。横断山区的牛扁亚属植物多数为四倍体。国产乌头属植物中没有发现非整倍性的现象, 据此认为曾在欧洲和印度的种中发现的非整倍性的现象可能存在一些误差, 尚需进一步确认。

国外对乌头属植物中 B 染色体的研究时有报道^[32,46,53], 在国产乌头属植物中首次报道采自北京的牛扁 (*A. barbatum* var. *puberulum* Ledeb.) 中出现 1 个 B 染色体, 后来对土官村乌头 (*A. tuguncunense*) 和中甸乌头 (*A. piepunense*) 研究中也发现了 B 染色体。

二、乌头系统发育学

关于乌头属植物的系统发育, 许多学者从形态及解剖学、细胞学、化学分类学等方面进行了大量研究, 主要观点包括以下几方面。

(1) 系统学以植物外部形态为依据, 认为乌头属演化方向由直根多年生牛扁亚属到块根二年生乌头亚属, 到直根一年生露蕊乌头亚属^[9,39,61]; 叶的分裂由浅到深, 从掌状深裂到掌状全裂, 裂片从浅裂到细裂; 花筒由小到大, 花萼由大到小, 上萼片由矮到高; 花瓣的瓣片从小发展到较大, 距离从无到有, 从短到长; 种子表面平滑到出现膜质横翅。

(2) 比较解剖学认为, 结构由繁到简, 由分裂中柱类群 (牛扁亚属) 到不分裂的多体中柱类群, 到真中柱类群 (乌头亚属); 导管由梭形到圆柱形, 纹孔由对列式到互列式排列; 导管端壁倾斜由大到小, 尾部由长而尖到钝圆略具尾突到平截; 内皮层数由多到少, 由维管束的内外缘均出现到仅在其外方出现^[61]。

(3) 细胞学的研究表明^[46,49], 染色体的变异趋势是形体由大→小; 核型由近端着丝点 (st 型)→近中着丝点 (sm 型)→中部着丝点 (m 型) (商效民和李正理, 1984; 商效民, 1985), 核型由不明显的二型性→二型性。

(4) 花粉学研究表明^[63], 乌头属植物的花粉形态演化的趋势是近矩形、方形 (圆形)→宽椭圆形→长椭圆形; 外壁纹饰的演化为具中等大小的小刺 (排列由密到疏, 由均匀到不均匀, 由规则到不规则)→小刺或颗粒纹饰→近光滑→点状凹陷、偶见穿孔网状。

(5) 化学分类学根据生物碱在植物体内的生源途径, 认为含有合成后期二次代谢产物 C_{19} 生物碱的类群较含合成前体物质 C_{20} 生物碱的类群进化; C_{19} 生物碱中具双酯基的类群较含单酯基或胺醇类的类群进化; 含氧取代多的类群较含氧取代少的类群进化。牛扁亚属主要含牛扁型生物碱 (Lycotoline type), 而乌头亚属中以乌头型生物碱 (Aconitine type) 为主, 较进化的露蕊乌头亚属中则以乌头碱型胺醇 (Amino alcohol) 和阿替生 (Atisine) 为主^[61,64]。

综合形态学、解剖学、细胞学、花粉学、化学分类学等观点^[60], 乌头属三个亚属中, 露蕊乌头亚属 (Subgen. *Gymnaconitum*) 被认为已达到本属演化水平的最高阶段 (形态学和细胞学都支持这种观点, 植物化学资料不赞同), 牛扁亚属 (Subgen. *Paraconitum*) 又比乌头亚属 (Subgen. *Aconitum*) 处于更原始的状态^[32,34,43,49,51]。

可见, 乌头属植物的染色体组型、不同亚属的染色体核型特点、染色体倍性 (数目) 特点和染色体结构特点等已基本清楚, 细胞学研究在乌头属植物种属系统关系、起源和进化关系上取得了十分宝贵的结果。但乌头细胞学研究上主要是染色体核型分析, 已在其他植物上得到广泛使用^[66], 而染色体鉴别更为准确的显带技术^[67] 在乌头细胞学

上研究极少^[68]；乌头属中仍有许多种缺乏染色体研究资料；已发现包括乌头（*A. carmichaeli* Debx.）在内的 5 个种存在种内多倍性，对其种内多倍性状况、形成机制、生物学和植物化学差异、分类学地位和关系等还缺乏研究。

第三节 乌头生物学

一、乌头发育特性

在发育来源上^[69,70]，附子实质上是一个具有膨大主根的“更新芽”。乌头附子和北乌头附子的研究进一步证实了这一点^[71~73]。乌头的种子在秋季脱落时，胚尚在心形胚或鱼雷形胚早期。在低温湿润条件下，胚继续生长，大约经过 3 个月，完全长成。种子出土萌发，但仅子叶顶着种皮出土，幼苗茎端一直位于地表之下、形成短缩的地下茎，与增粗肥大的根一下胚轴一起休眠越冬。第二年幼苗抽出地上茎，同时，上一年已形成的基生叶的腋芽产生不定根，并膨大成为附子。附子将于第二年形成地上茎，成为乌头植株，而其上的腋芽又形成新的附子，如此不断循环。附子是一种特殊的结构，附生在植株的根旁，由一个顶芽、腋芽以及块根状的不定根组成。附子上的腋芽出现后的第二年 3 月，在腋芽第一节下方远轴一侧的部分近似形成层细胞分化，形成了直接与芽端原形成层连接的不定根原基。同时，腋芽第一节间横向伸出成为连接母株的“桥”。随着不定根上部韧皮部薄壁组织细胞的增生，此根不断增粗，变成了新的附子，6 月、7 月达到最大。这种附子的顶芽则是在 7 月、8 月后才迅速发育，直到秋冬休眠，第三年春再发展成为新的植株。因此，附子实际上是一个具有膨大不定根的更新芽，连接母株的“桥”则是腋芽第一节间所形成的一种特殊的地下茎。

在北乌头附子的发育过程中，7 月~8 月间，附子主根次生结构中的薄壁细胞积累的淀粉达到最高峰^[74]。9 月时附子的茎端开始活动，在叶原基远轴面细胞内首先出现淀粉粒，此时附子主根中的淀粉含量则急剧下降，到次年春季，当附子抽出地面时，根中的淀粉完全消失。

双兰菊（*Aconitum napellus*）是一个产于欧洲的乌头属种，具有紫色或蓝色的鲜艳色彩，在欧洲作为一种切花广泛种植已近 30 年^[13]。为了提高产量以满足切花或盆栽花需要，人们对其进行了大量研究^[75~77]。研究发现花和块根的产量受环境条件和种子本身质量的影响^[76,78~82]，母树的花朵质量对后代第二年的花朵和子根生长势和质量是一致的，相应地种用块根（母根）的大小将对第二年的开花质量和子根产量产生主要影响。同时母根大小与第二年的植株高度、主花序长度、茎秆直径和每株的花朵数量密切相关。用于繁殖的块根大小是影响花生长的主要因素，在块根种子大小与出芽、生长、开花和子根产量之间存在显著正相关^[79,83,84]。因此，建议块根繁殖时使用小块根（小于 10g），但切花生产时则应使用大块根。增加种子块根的大小也会增加乌头的繁殖系数，乌头的生长和开花还会受到日照长度的显著影响，长日照条件下，茎和主花序长度将会

加倍,而每株花序的花朵数量也会增加,但开花时间会推迟。栽种前 $200\mu\text{m GA}_3$ 处理块根可以打破低温对植株诱导的休眠而促进发芽,抽薹后在叶面上施用 GA_3 可显著地增加茎秆长度,也会影响花朵数量和子根的产量。研究还发现开花后 4~6 周时子根重量达到最大,这时子根主芽开始伸长;块根种达到 30g~40g 时的花的质量最好,而低于 5g 时植株很少开花;小块根、少根系量和少光照均不利于植株开花;大的块根种会增加子根数,小的块根种则有利于提高生长比例;气温高于 27°C 或更高时,植株停止生长,在 22°C 或略低时,植株生长良好^[13]。双兰菊 (*Aconitum napellus*) 的块根栽种深度对出芽、植株生长和茎秆高度对子根形成均有影响^[85,86]。

此外, GA_3 处理双兰菊 (*Aconitum napellus*) 的芽尖后栽植在含有 BA (benzyl adenine) 的固体介质中的方法能较好地提高其繁殖率和花的产量。在固体营养体栽植方法的基础上,发明了效率更高的液体培养技术进行双兰菊 (*Aconitum napellus*) 的微性繁殖^[77,87],在含有 BA 的营养液上放置一种漂浮的膜筏(被称为生命筏),用 GA_3 处理后的芽尖栽植,固体营养法中最佳分芽繁殖要求的 BA 浓度为 $4\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,而液体营养法中外殖体最佳分芽繁殖要求的 BA 浓度为 $0.25\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,其最大的分芽繁殖率为每月 4.2,比固体营养法高 45%。培养体鲜重和芽长对最佳 BA 浓度具有相似的要求。

乌头是兼块根无性繁殖和种子有性繁殖两种方式的植物,对乌头的有性繁殖影响因素的研究认为,环境因素和群体密度对乌头植物的繁殖能力影响较大,增加群体密度有利于提高其繁殖能力^[88~91]。乌头具有鲜艳的紫色花并含有大量花蜜,开花期会吸引大量昆虫。有学者对乌头开花授粉与昆虫活动相互关系进行了研究^[90~94],认为昆虫(主要是蜂)的采蜜对乌头的异花授粉和远距离传粉是有益的,但同时对花有一定的损伤。

二、乌头的形态解剖

乌头的形态解剖研究主要集中于根部,较早的研究是对印度乌头属植物中块根二年生的一个亚属^[69,95,96],将根的构造分为三种主要类型(形成层环波状连续的 Napellus 型,形成层分成数个独立束的 Anthora 型,Atrox 型)。Tamura (1964) 认为这种分型不稳定。盟波恒雄(1960)报道了日本乌头类生药的形态组织学研究,但缺乏多学科的综合研究。

童玉懿等^[97](1984)将国产乌头类的根部分为草乌类、雪上一枝蒿类、榜嘎类、牛扁类及其他类 5 类。根的横切面构造可分为:具单一管状中柱,维管束外韧型,中心有髓;具多体中柱,排成一轮;具裂生中柱,排成轮状等三大类型。

李鸣等^[62,98](1990, 1991)进一步将中国乌头属植物根部组织构造划分为 6 大类型 and 18 种亚型。I 型构造(2 个亚型)的外韧维管束排成一轮,髓部和束间区域(射线)极宽广,木质部束小且不达中心;II 型构造(10 个亚型)的形成层排成多轮,独立或套合;III 型构造(3 个亚型)的木质部达根的中心;IV 型构造的根的直径较小,3 个裂生的维管柱被木栓组织隔开,维管束排成 Y 字形,韧皮部筛管群的行间具多轮内皮层;V 型构造的根的直径较大,多个裂生的维管柱被木栓组织包围断续排成一轮,根的中心具大型空腔,维管束的本质部多排成两层,筛管群行间到两层本质部之间可见自立内皮层;VI 型构造的本质部多排成两轮,内皮层在其外方排成多轮,在其内方排成一