

References:

- [1] Ch P (中国药典) [S]. Vol 1. 2005.
- [2] Bai Y, Huang L M, Mu F H, et al. Determination of anthraquinone in *Polygonum multiflorum* from Deqing [J]. *Acad J Guangdong Coll Pharm* (广东药学院学报), 2001, 17(1): 40-41.
- [3] Chen W S, Chai Y F, Zhang W D, et al. Diversity of chemical composition and quality in *Polygonum multiflorum* from different regions [J]. *J Pharm Pract* (药学实践杂志), 2000, 18(5): 344-345.
- [4] Cai J N, Zhou K Y, Xu L S, et al. Ribosomal DNA ITS sequence analyses of *Cnidium monnieri* from different geographical origin in China [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 2000, 35(1): 56-59.
- [5] Zhou L, Wang P X, Huang F, et al. ITS Sequence analysis of *Amomum villosum* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(1): 72-75.
- [6] Zeng M, Ma Y J, Zheng S Q, et al. Studies on ribosomal DNA sequence analyses of *Radix Puerariae* and its sibling species [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2003, 38(3): 173-175.
- [7] Rodrigues K F. The foliarfungal endophytes of the Amazonian palm *Euterpe oleracea* [J]. *Mycologia*, 1994, 86: 376-385.
- [8] Gao X X, Zhou H, Xu D Y, et al. High diversity of endophytic fungi from the pharmaceutical plant, *Heterosmilax japonica* Kunth revealed by cultivation-independent approach [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2005, 249: 255-266.

AgNO₃ 在铁皮石斛组织培养中抗衰老作用李进进¹, 廖俊杰^{1*}, 许继勇², 麦瑜玲²

(1. 广东轻工职业技术学院 食品与生物工程系, 广东 广州 510300; 2. 汕头市中蔬花卉有限公司, 广东 汕头, 515041)

摘要:目的 解决铁皮石斛在组织培养过程中的衰老问题。方法 在原球茎增殖培养基、丛芽增殖培养基和生根培养基中分别加入 AgNO₃ 0.1、2 mg/L, 测定乙烯的产生量, 观察试管苗生长情况。结果 AgNO₃ 抑制乙烯的产生, 提高了原球茎的增殖速度和丛芽的分化效率, 明显促进种苗的生长, 提高移栽成活率 2 倍, 表现出抗衰老功能。结论 1 mg/L AgNO₃ 可以作为铁皮石斛组织培养的抗衰老剂。

关键词: 铁皮石斛; 组织培养; AgNO₃; 抗衰老

中图分类号: R282.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2007)06-0914-04

Effects of AgNO₃ on caducity-resistant from tissue culture of *Dendrobium officinale*LI Jin-jin¹, LIAO Jun-jie¹, XU Ji-yong², MAI Yu-ling²

(1. Department of Food and Bio-technology, Guangdong Industry Technical College, Guangzhou 510300, China;

2. Shantou Zhongshu Flower Co., Ltd., Shantou 515041, China)

Abstract: Objective To solve the caducity question of *Dendrobium officinale* during the tissue-culture process. **Methods** Added the different concentration of 0.1 and 2 mg/L AgNO₃ into the PLB proliferation medium, buds proliferation medium, and rooting medium separately. The quantity of the ethylene production was to be determined and the situation of the tube seedling growth was to be observed. **Results** AgNO₃ can suppress the production of the ethylene, enhance the multiplication speed of PLB and split-up efficiency the clump of bud, and obviously promote the seedling's growth. It showed that the survival ratio of transplant could enhance as many as two times and display the merit of caducity-resistant. **Conclusion** AgNO₃ (1 mg/L) can be taken as the caducity-resistant reagent of *D. officinale* during the tissue-culture processing.

Key words: *Dendrobium officinale* Kimura et Migo; tissue-culture; AgNO₃; caducity-resistant

铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo 是一种名贵的中药材, 由于野生资源的缺乏, 只能通过人工培养满足药材市场的需要。近年来对

铁皮石斛种苗组织培养技术的研究较多, 然而能够理想地运用于生产的实例却不多, 关键是不能规模生产出符合要求的试管种苗, 下地移栽成活率低, 种

收稿日期: 2006-08-14

基金项目: 广东省 2005 年科技资助项目[粤科计字(2005)193 号]; 汕头市 2005 年科技资助项目[汕市财文(2005)219 号]

作者简介: 李进进(1964-), 女, 湖南湘潭人, 高级农艺师, 主要从事组织培养技术研究。

* 通讯作者 廖俊杰 E-mail: junjie33@gdqy.edu.cn

植后的种苗生长缓慢,不能进入正常的生长状态,有的甚至出现假成活现象。已有采用兰科植物共生菌可以提高移栽成活率,不同程度取得了一定的效果^[1,2],但仍不能从根本解决问题。经过多年的研究与实践,笔者认为根本的原因还是试管种苗本身的问题,铁皮石斛特殊的基因型及固有的生理特性导致试管苗在培养过程中衰老退化。在实验中发现铁皮石斛原球茎增殖 4 代以后或者茎段丛芽增殖 6 代以后会逐渐衰老并影响生根率和移栽成活率。因此试想通过在培养基中加入 AgNO_3 达到延缓试管苗衰老、提高移栽成活率的目的,以解决铁皮石斛组织培养苗产业化生产的“瓶颈”问题。

1 材料与方 法

1.1 材料:铁皮石斛母本由浙江省天台县引进。原球茎由种胚产生,已经增殖 5 代以上,形态上已经进入衰退期;丛芽由茎段产生,已经增殖 7 代以上且形态上已经进入衰退期。植物激素 6-BA、NAA 为进口分装; AgNO_3 为分析纯试剂,加入培养基的 AgNO_3 先配成 1 mg/L 的母液,装入无菌试剂瓶中待用。

1.2 方 法

1.2.1 AgNO_3 与试管苗培养试验:在原球茎增殖培养基(A; N_6 +6-BA 0.2+NAA 0.5+椰子汁(CM)10%)、丛芽增殖培养基(B;MS+6-BA₂+NAA 0.2+CM 10%)、生根培养基(C;MS+NAA 0.2+香蕉泥 10%)中分别加入 AgNO_3 ,终质量浓度分别为 0、1、2 mg/L。苗的生长高度测量为茎基部到最长的叶片的高度;原球茎的质量采用千分之一电子天平称质量。

1.2.2 生根苗移栽试验:将 AgNO_3 处理的生根苗按照常规方法移栽入 1.5 寸营养钵内,移栽基质为水苔,以未经 AgNO_3 处理的生根苗为对照。以产生新根且茎叶出现明显生长作为移栽成活标准,60 d 后统计移栽成活率。

1.2.3 乙烯释放量的测定:自接种试管苗的当天开始,隔天从培养瓶中用注射器取 1 mL 气体注入气相色谱仪(Hitachi 163)进行乙烯的检测。以氮气为载气,柱温 60 °C,进样口温度 80 °C,标准曲线法定量。每培养瓶为一个处理,设 5 个重复。

2 结 果

2.1 AgNO_3 对原球茎增殖的影响:铁皮石斛原球茎经过不断地增殖,增殖 5 代以后形态上进入衰退期。主要表现在原球茎质量下降,原球茎颗粒中的幼叶原基由紧包的状态呈刺状张开,并由正常的绿色变为黄色或者白色。这种衰退的原球茎增殖能力很

低,因此增殖速度也下降。在培养基中加入 AgNO_3 ,30 d 后观察其增殖的情况,见表 1。

表 1 AgNO_3 对铁皮石斛原球茎增殖的影响

Table 1 Effect of AgNO_3 on regeneration of *D. officinale* PLB

AgNO_3 / (mg·L ⁻¹)	原球茎初 质量/g	原球茎终 质量/g	增长率 /%	生长状况
0	1.02	2.88	182.4	原球茎出现黄化、白化现象
1	1.10	4.08	270.9	原球茎绿色、富有生机
2	1.06	3.99	276.4	原球茎绿色、富有生机

2.2 AgNO_3 对原球茎成苗的影响:增殖 5 代以后的原球茎成苗质量开始下降,出现叶片淡化甚至黄化、呈莲座状,茎段短缩,生长缓慢,不能正常生长成苗,通常在继代过程中要淘汰掉。加入 AgNO_3 后,非正常苗的比例明显减少,并且出芽后新芽生长速度加快,叶片变大,生长恢复正常,表现出 AgNO_3 可抵抗原球茎的衰老,促进原球茎正常成苗。45 d 后统计原球茎成苗情况,见表 2。可以看出加入 1 mg/L AgNO_3 的培养基配方较好。2 mg/L AgNO_3 发生轻微的毒害现象,个别小芽出现坏死现象。图 1-C 箭头所示分别为小芽与顶芽坏死情况。

表 2 AgNO_3 对铁皮石斛原球茎成苗的影响

Table 2 Effect of AgNO_3 on plantlet-inducing from *D. officinale* PLB

AgNO_3 / (mg·L ⁻¹)	正常苗比 例/%	非正常苗 比例/%	苗平均高 度/cm	原球茎成 苗状况	苗生长情况
0	65	35	0.8	+	叶莲座状及黄化现象
1	92	8	1.2	+++	生长正常
2	88	12	1.3	+++	个别芽黑色坏死



A-对照 B-1 mg/L AgNO_3 C-2 mg/L AgNO_3
A-controll B-1 mg/L AgNO_3 C-2 mg/L AgNO_3

图 1 AgNO_3 对铁皮石斛原球茎成苗的影响

Fig. 1 Effect of AgNO_3 on plantlet-inducing from *D. officinale* PLB

2.3 AgNO_3 对丛芽增殖的影响:当铁皮石斛丛芽增殖超过 6 代以后,丛芽增殖的苗将出现矮化、短缩、丛生状,叶片变小、呈鱼鳞状张开、茎段节间短缩、生长速度减慢。从表 3 中可以看出,加入 AgNO_3 后,非正常苗的比例下降,苗生长的速度加快。以加入 1 mg/L AgNO_3 的培养基配方的效果最好。2 mg/L AgNO_3 导致叶片褐色水浸状坏死,说明质量浓度过高发生了毒害现象。

表 3 AgNO₃ 对丛芽增殖的影响Table 3 Effect of AgNO₃ on regeneration of buds

AgNO ₃ / (mg · L ⁻¹)	矮化苗 /%	鱼鳞壮 苗/%	月增殖 系数	种苗生长情况
0	42.5	23.3	4.3	叶色黄化
1	8.2	0	4.5	生长正常
2	10.3	0	4.3	叶片有褐色水浸状坏死

2.4 AgNO₃ 对生根率及成苗生长的影响:随铁皮石斛增殖代数的提高,生根率会明显下降,且生根苗的生长速度也下降。在生根培养基中加入AgNO₃,30 d 后生根率由 72.5% 提高到 100%,苗生长的速度也会明显提高(表 4)。在不含 AgNO₃ 的培养基上,生根率降低的主要原因是接入培养基中的茎段苗在 15 d 后出现叶片黄化、不能正常伸展和茎段短缩等现象,生长明显受阻(图 2-A)。而 AgNO₃ 加入明显改变了这种状况。1 mg/L AgNO₃ 使种苗恢复了正常的生长(图 2-B);而 2 mg/L AgNO₃ 虽然使生长得到恢复,但会导致叶片出现坏死斑(图 2-C 箭头所示)。

表 4 AgNO₃ 对生根率及苗生长的影响Table 4 Effect of AgNO₃ on rooting percentage and plantlet growth

AgNO ₃ / (mg · L ⁻¹)	生根率/ %	增高 度/cm	苗生长质量
0	72.5	0.12	茎叶出现玻璃化现象
1	100	1.25	生长正常
2	100	1.20	生长正常,叶片有坏死斑现象



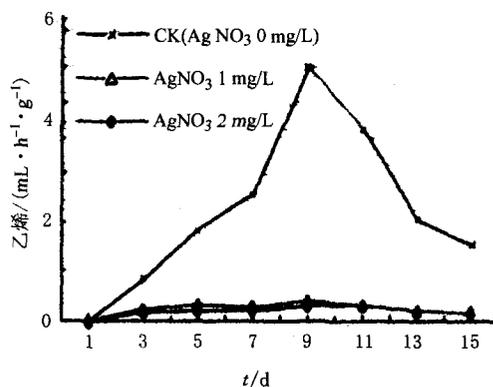
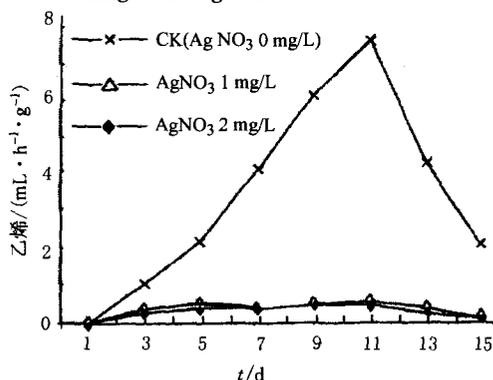
A-对照 B-1 mg/L AgNO₃ C-2 mg/L AgNO₃
A-controll B-1 mg/L AgNO₃ C-2 mg/L AgNO₃

图 2 AgNO₃ 对试管苗生长的影响Fig. 2 Effect of AgNO₃ on growth of tube-plantlets

2.5 AgNO₃ 处理的生根苗与移栽成活率:AgNO₃ 处理对苗的生长与生根具有明显的促进作用,将 AgNO₃ 处理的生根苗与未经过处理的生根苗(对照)进行移栽对比试验,结果表明,经过 1 mg/L AgNO₃ 处理的生根苗的移栽成活率为 89%,而对照的移栽成活率仅为 43%。AgNO₃ 处理对提高移栽成活率发挥了明显的作用。

2.6 AgNO₃ 处理对乙烯抑制的作用:在丛芽增殖培养基 B 及生根培养基 C 中分别加入不同质量浓度的 AgNO₃,然后对丛芽增殖过程及茎段苗生根过程中乙烯释放量进行测定。从图 3 可以看出,经过转接的丛芽于第 3 天乙烯质量浓度开始升高,至第 9

天乙烯达到最高,然后逐渐降低,而加入 1、2 mg/L AgNO₃ 则完全抑制了乙烯的产生。从图 4 中看出,在生根培养基中的茎段苗,乙烯释放的高峰期为茎段苗转接后的第 11 天,培养基中加入 1、2 mg/L AgNO₃ 抑制了生根过程中乙烯的产生。乙烯出现高峰的时间与丛芽及茎段苗在培养基中表现出黄化及衰老退化症状的时间基本吻合。

图 3 AgNO₃ 抑制丛芽增殖过程中乙烯的产生Fig. 1 Inhibition of AgNO₃ on producing of ethylene during buds regeneration图 4 AgNO₃ 抑制生根过程中乙烯的产生Fig. 4 Inhibition of AgNO₃ on producing of ethylene during rooting

3 讨论

铁皮石斛组织培养不能进入工业化生产的最大问题是试管种苗的质量问题,因为在试管苗培养过程中,苗的衰退致使移栽成活率降低,所以有些观点认为在铁皮石斛组织培养过程中要不断淘汰低质衰老苗以保证后序生产的进行,这样种苗生产质量虽然有所提高但生产的成本也相应提高,生产流程打了折扣。这是铁皮石斛组织培养快速繁殖不能进入产业化生产的主要原因。通过对铁皮石斛组织培养生产过程的观察推测导致铁皮石斛试管繁殖衰老过快的主要原因是乙烯引起的“三重反应”。顶端生长受阻、侧向生长增粗、叶柄短缩、偏上生长而导致叶片鱼鳞状张开,症状与乙烯引起的生理形态十分类似。

众所周知,乙烯是引起植物衰老的激素。植物体内乙烯的合成是在一系列严密的代谢控制下进行的,其合成的途径是:蛋氨酸→S-腺苷蛋氨酸→1-氨基环丙烷羧酸(ACC)→乙烯。后两步是在 ACC 合成酶和 ACC 氧化酶的作用下进行的。采用乙烯抑制剂可以控制乙烯的产生,阻止乙烯行使功能,从而防止植物衰老的发生。乙烯抑制剂可以分为乙烯合成抑制剂和乙烯作用抑制剂两种。乙烯合成抑制剂主要是控制 ACC 合成酶和 ACC 氧化酶的活性;而乙烯作用抑制剂是控制乙烯发挥正常的生理功能。 Ag^+ 是乙烯作用抑制剂的一种。Beyer 于 1976 年首次发现 Ag^+ 具有抗乙烯效应。 Ag^+ 竞争植物体内的乙烯受体,阻止乙烯与受体结合,进而抑制乙烯所诱发的生理反应^[3]。试验中试图采用乙烯的作用抑制剂 $AgNO_3$ 作为抗衰老剂减缓乙烯对种苗生长的影响。通过气相色谱分析证实, $AgNO_3$ 的加入有效抑制丛芽增殖和生根培养过程中乙烯的产生(图 3、4),提高了原球茎的产量和品质(表 1),改善了原球茎出芽成苗的质量(表 2),也提高了丛芽增殖生长效率(表 3),生根率与试管成品苗质量也大为改善(表 4),更重要的是提高了试管苗的移栽成活率,根本上解决了铁皮石斛组织培养快速繁殖走向产业化生产的“瓶颈”问题。这一系列问题的解决

有力地说明,导致铁皮石斛试管苗衰老的根本原因是乙烯引起的。周敏^[4]研究发现加入 $AgNO_3$ 后对花生幼芽的再生具有促进作用,抑制外植体褐化现象,芽诱导率提高;李洪清等^[5]发现 $AgNO_3$ 有促进木薯组织培养过程中再生芽的作用。本试验也同样证明 $AgNO_3$ 作为乙烯的作用抑制剂对铁皮石斛试管种苗抗衰老发挥了重要作用。至于乙烯在铁皮石斛试管苗培养过程中是因何原因而产生,是正常的生理过程还是种苗因转接过程而产生仍有待进一步研究。不管是何原因, $AgNO_3$ 作为乙烯的作用抑制剂在铁皮石斛试管苗培养过程中发挥的抗衰老效能是值得肯定的。

References:

- [1] Gao W W, Guo S X. Effect of three endophytic fungi on growth of *Dendrobium officinale* and *Anoectochilus roxburghii* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(6): 543-545.
- [2] Chen R R, Shi Y Q, Lin X G, et al. Effect of inoculation of orchid mycorrhizal fungi on growth of tissue-cultured *Dendrobium* seedlings [J]. *Soils* (土壤), 2004, 36(6): 658-661.
- [3] Jiang Y M, Fu J R. Ethylene regulation of fruit ripening: molecular aspects [J]. *Plant Grow Regul*, 2000, 30: 193-200.
- [4] Zhou M, Zhang D H. Effect of glutamine and $AgNO_3$ on shoot regeneration from leaflets of peanut [J]. *Plant Physiol Comm* (植物生理学通讯), 2002, 38(3): 240-241.
- [5] Li H Q, Li M R, Liang C Y. Some influential factors for shoot organogenesis and plant regeneration in cassava [J]. *Plant Physiol Comm* (植物生理学通讯), 2000, 36(4): 297-299.

氮磷钾配施对紫锥菊产量和质量的影响

陈 荣¹, 年 海², 吴 鸿^{1*}

(1. 华南农业大学生命科学学院 药用植物研究中心, 广东 广州 510642; 2. 华南农业大学农学院, 广东 广州 510642)

摘 要:目的 探讨氮(N)、磷(P)、钾(K)不同配比施肥处理对紫锥菊生物产量和菊苣酸量的影响。方法 对 N、P、K 不同配比施肥栽培处理的紫锥菊生物产量和菊苣酸的量进行测定和统计。结果 第一次收获各处理全株干质量由高到低依次为 N+K、CK、P、N+P、N、N+P+K、P+K、K; 方差分析结果表明, N+K、CK、P、N+P、N 5 个处理间无显著差异, 但 5 个处理均与 P+K、K 两个处理差异显著。各处理对菊苣酸的量影响不显著; 第二次取样 N、N+K、P、N+P 各处理分别比 CK 组高 47.7%、35.4%、33.8%、12.3%, N+P+K、P+K、K 各处理分别比 CK 低 7.7%、10.8%、28.5%; 方差分析结果显示 N 处理与 CK 差异显著, K 处理显著低于 CK。结论 研究表明不同配施肥对紫锥菊主要有效成分菊苣酸的量影响不大; 对产量的影响, N 起主导效应, P 效应不明显, 而氯化钾导致减产。

关键词:紫锥菊; 氮; 磷; 钾; 产量; 菊苣酸

中图分类号: R282.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)06-0917-05

Effect of nitrogen, phosphorus, and potassium on yield and quality of *Echinacea purpurea*

CHEN Rong¹, NIAN Hai², WU Hong¹

(1. Center for Medicinal Plant Research, College of Life Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642,

收稿日期: 2006-08-18

基金项目: 广州市科技计划项目(2004Z3-E5021)

作者简介: 陈 荣, 男, 硕士研究生, 研究方向为药用植物资源与利用。 E-mail: yeehoofuture@tom.com

* 通讯作者 吴 鸿 E-mail: wh@scau.edu.cn