

怀地黄的研究概况

周春娥, 路淑霞, 周延清, 谷凤平 (河南师范大学生命科学学院, 河南新乡 453007)

摘要 从品种间性状差异、组织培养、遗传多样性研究、病毒研究以及化学成分的研究等几方面回顾近年来对怀地黄的研究概况。

关键词 怀地黄; 品种间性状差异; 组织培养; 遗传多样性; 病毒; 化学成分

中图分类号 S567.23^① **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)32-14140-02

怀地黄(*Rehmannia glutinosa* Libosch)为玄参科(Scrophulariaceae)地黄属(*Rehmannia*)多年生草本植物,是驰名中外的四大怀药之一,因产于河南怀庆府而得名,具有多种药效,是常用的治病养生、滋补保健的中药材。河南焦作是地黄的地道产区,每年都有大量地黄产品销往国内外市场,出口东南亚和日本等国,它已经成为当地重要的经济来源之一。为了满足国内国际市场对怀地黄的需求,对怀地黄的研究引起了国内外学者的关注,近年来对怀地黄的研究有了很大进展。

1 品种间性状差异的研究

李建军等以85.5等6个怀地黄主流品种为材料,分析了单株鲜重产量与单位面积鲜重产量的相关性及其相关性,结果表明,单株鲜重产量与叶绿素a含量、花序高度呈显著正相关,而与蒴果长度呈显著负相关,与花冠长度/宽度的比值呈极显著正相关。鲜重产量与块根长度/直径的比值呈显著负相关,而与块根直径、块根长度呈显著正相关。鲜重产量与蒴果长度之间有较强的负相关性^[1]。李建军等采用石蜡切片和分光光度计对6个不同品种怀地黄块根的显微结构和糖分含量进行了研究,结果表明,不同品种块根的显微结构差异明显,且还原糖含量的差异达显著水平。块根中还还原糖含量、总糖含量均与块根各解剖结构特征呈正相关关系^[2]。李建军等探讨了6个怀地黄品种的根部性状和品质性状,测量了各品种块根的外观性状和解剖结构,测定了各品种的微量元素和梓醇含量,结果表明怀地黄不同品种梓醇含量、单株块根鲜重和块根中木质部的面积都有明显差异,梓醇含量与块根中木质部的比例呈显著正相关^[3]。张留记等以地黄苷A、梓醇和地黄多糖3种成分为指标,采用高效液相色谱法和紫外分光光度法对怀庆4等10个怀地黄农家品种进行了含量测定,结果表明,不同品种的地黄中3种成分含量差异较大,地黄苷A含量较高的怀地黄品种有怀庆5、9302和北京-1等,梓醇含量较高的怀地黄品种有怀庆5、北京-1、红薯王等,多糖含量较高的怀地黄品种有金状元、白状元、怀庆-7等。同时,怀地黄各农家品种中,地黄苷A、梓醇和多糖的含量高低没有一致性的规律,在进行怀地黄的品种比较和质量研究时,应增加检测指标和测定方法,以更加全面地评价药材质量^[4]。

2 组织培养的研究

李明军等对怀地黄离体再生植株及生长调控作了研究,结果表明,①6-BA 1 mg/L(单位下同)+NAA 0.1的组合有

利于叶片愈伤组织的形成,2,4-D 2 + NAA 2 的组合有利于根愈伤组织的形成;②诱导愈伤组织产生再生植株的最佳组合为6-BA 1 + NAA 0.01;③PP₃₃₃对再生植株的生长调控具有良好的效应,PP₃₃₃ 1 处理后,再生植株生长健壮,根系发达,叶色浓绿^[5]。薛建平对怀地黄茎尖培养和植株再生作了研究,结果表明,怀地黄茎尖在MS + 6-BA 0.3 mg/L + NAA 0.02 mg/L + GA 0.1 mg/L培养基上能生长成健壮苗;在MS + PP₃₃₃ 1 培养基上能生成健壮根系,长成完整小植株^[6]。薛建平等选用地黄“85.5”为试验材料,研究了植物激素、蔗糖浓度、活性炭和日照时间等对地黄试管苗不定根的形成及膨大的影响,结果表明,将试管苗先在1/2 MS + IBA 1 mg/L的培养基中诱导生根后,转入诱导培养基中,根可膨大形成试管地黄,其最适诱导培养基为MS + 6-BA 2 mg/L + NAA 0.1 mg/L + 蔗糖5%,最适培养条件为25℃、光照2000~3000 lx,12 h/d,培养基中不宜添加活性炭和GA₃^[7]。武宗信等从地黄种茎育出的无菌幼苗上切取下的茎尖,用组织培养方法诱导成去病毒幼苗,且研究出适宜地黄茎段苗消毒的消毒剂为0.05% HgCl₂;适宜于茎段苗生长的MS培养基的琼脂浓度为0.7%,pH为7;诱导茎尖成苗的培养基为MS + 6-BA 0.5 mg/L;繁殖脱毒苗所用的MS培养基为1/4大量元素+1/2微量元素,并用1/2食用白砂糖代替蔗糖,可使快繁成本降低48.7%^[8]。陈永勤等研究了以怀地黄不定芽诱导生根的适宜培养基以及微型块茎繁殖,结果表明,以IBA 2.0 mg/L + BA 0.5 mg/L,糖浓度40 g/L培养基生根效果好,根多、粗壮,移栽后成活率可达98.2%;以IBA 2.0 mg/L + BA 2.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L,糖浓度为40 g/L为诱导微型块茎的最佳培养基^[9]。李明军等研究了培养基成分对怀地黄试管苗生长发育的影响,比较1/2 MS与MS、自来水与蒸馏水、白砂糖与蔗糖对怀地黄试管苗生长发育的影响,结果表明,1/2 MS培养基和MS培养基对怀地黄试管苗根数、鲜质量、干质量和叶绿素量有极显著影响,对叶片数有显著影响,1/2 MS培养基明显优于MS培养基;自来水和蒸馏水对试管苗根部、冠部、鲜质量增量、干质量和叶绿素量均有显著性影响,添加蒸馏水明显优于添加自来水;白砂糖和蔗糖对试管苗根部、冠部、鲜质量增量和干质量的影响不大,但对叶绿素量有极显著影响,选用蔗糖作为碳源时,其叶片的叶绿素量更高^[10]。李明军等研究了PP₃₃₃和BA组合对怀地黄试管苗生长发育的影响,结果表明:①与对照相比,不同浓度的PP₃₃₃与0.5 mg/L BA组合均严重地抑制试管苗根、茎和叶的生长;②与单独使用0.5 mg/L BA相比,低浓度PP₃₃₃(0.01和0.1 mg/L)与0.5 mg/L BA组合促进茎的伸长和加粗;③2 mg/L

基金项目 国家高技术研究发展计划(863)项目子课题(2006AA100109)。

作者简介 周春娥(1977-),女,山西寿阳人,讲师,从事植物生物技术方面的研究。

收稿日期 2008-09-03

PP₃₃₃与0.5 mg/L BA组合能显著提高愈伤组织的芽分化率和腋芽萌发率,有利于试管苗的快速繁殖^[11]。李明军等研究了怀地黄叶片愈伤组织诱导形成及其可溶性糖含量的变化研究,结果表明,1/2 MS+6-BA 0.5 mg/L培养基有利于怀地黄块茎诱导形成无菌苗。单独使用2,4-D有利于叶片愈伤组织的诱导,但不利于愈伤组织的继代培养;2,4-D和6-BA配合使用时,对愈伤组织的增殖具有良好的促进作用,当2,4-D浓度为1.0 mg/L时,随6-BA浓度的增加,愈伤组织的生成量也增加,其中,以MS+2,4-D 1.0 mg/L+6-BA 0.4 mg/L培养基诱导的愈伤组织的量为最大,且呈黄色、疏松、颗粒状。愈伤组织诱导形成期间可溶性糖含量在不同培养基中均呈现先下降后上升,达到峰值后再下降的趋势^[12]。刘梦林等研究了地黄不同外植体、激素浓度及其组合、培养基种类等条件下暗培养对地黄愈伤组织诱导的影响,结果表明,以地黄叶片、叶柄、茎段作为外植体在MS+1.0~1.5 mg/L NAA条件下诱导率均能达到100%。其中叶片诱导的愈伤生长势较好;单独使用NAA和2,4-D均能高频率诱导出愈伤,加入0.5 mg/L 6-BA后明显提高生长速度;MS、IS培养基诱导率高,但B5培养基中愈伤生长势较好^[13]。路淑霞等以怀地黄85-5无菌苗的叶片为外植体,接种到含有不同浓度植物生长物质的MS培养基上,可诱导愈伤组织,进而可分化出芽和根,从而实现了由叶片到完整植株的快速繁殖^[14]。

3 遗传多样性研究

陈京荔等对不同品种的地黄进行了RAPD分析,结果表明,“北京”系列的8个品系首先聚在一起,“85-5”系列中5个品种能较早地聚在一起,表明类内具有较近的亲缘关系,为地黄育种材料的选择提供了参考^[15]。周延清等对怀地黄ISSR扩增条件优化作了研究,通过单因子试验分别研究了退火温度、Taq酶单位、Mg²⁺浓度、dNTP浓度、引物浓度和模板DNA浓度对ISSR-PCR反应的影响,找出各自合适的条件,而且每个合适条件确定以后都被作为后续研究的一个条件,为用ISSR技术分析鉴定怀地黄种质资源奠定了良好的基础^[16]。周延清等对怀地黄85-5品种内遗传多样性的RAPD和ISSR进行分析,结果表明,怀地黄85-5品种内存在遗传差异,但遗传多样性比地黄品种间的低^[17]。

4 病毒的研究

余方平等从田间取症状明显植株进行室内分离鉴定:用鉴别寄主单斑分离3次,纯化病毒;用PTA和UA分别对长条病毒和球形病毒作负染进行电镜检测;用PEG沉降结合超离心法提纯病毒;耳静脉结合皮下注射免疫制备抗血清和用微量沉淀反应测定效价;用双扩散法检测血清学相关性和用间接酶联法检测田间标样带毒百分率。共分离到4种病毒^[18]。温学森等对地黄病毒病在不同品种中的症状表现作了研究,经观察发现,地黄不同品种的病毒病症状差异明显,褪绿和畸形症状分布较广,不同品种间感病程度相差明显。不同症状在不同品种中的分布具有一定的品种特异性,如泡状背突主要存在于“小黑英”中,其他品种中较少或不存在;“千层叶”在幼苗期黄斑症状严重,但夏初以后基本上看不到黄斑,生长旺盛;“土城”的黄化症状严重,部分植株矮缩,甚至死亡,经济产量很低,许多植株无膨大的块根。因此,仅依

病毒病的症状即可初步区分部分品种^[19]。张振臣等利用血清学、RT-PCR并结合核苷酸序列测定等方法,对河南省地黄病毒病进行了初步鉴定,结果表明,烟草花叶病毒(TMV)为侵染地黄的主要病毒;对TMV地黄分离物(TMV-RH)CP基因的序列分析结果表明,TMV-RH与TMV-U1株系CP基因的核苷酸同源性为86.5%,氨基酸同源性为94.3%;与已发表的TMV其他株系CP基因的核苷酸同源性为76.3%~88.5%,氨基酸同源性79.3%~95.0%,同源性较低。根据不同株系CP的氨基酸序列进化分析,推测该分离物可能为TMV的一个新株系^[20]。王敏等自河南省焦作地区10个地点采集带不同病毒症状的地黄叶片近200份以及少量块茎,结果发现:河南省与山东省产区的地黄中存在TMV与CMV,均为系统侵染,表现症状为花叶、黄斑以及坏死等,部分呈现复合侵染。地黄的病毒感染非常普遍,田间有100%带毒的可能性。病毒对地黄的侵染遍布整个植株,种栽带毒的情况普遍而且严重存在^[21]。侯红琴等对ReMV的生物学特性进行了初步研究,结果表明,ReMV粒子形态为杆状,可以侵染茄科、番杏科、十字花科和藜科等4科10种植物;ReMV的钝化温度为90~95℃,稀释限点为10⁻⁵-10⁻⁶,20~22℃条件下的体外存活期在60 d以上^[22]。张爱民等采用电镜检查和病毒血清试验,结果发现怀地黄茎尖培养苗已脱去地黄黄斑病毒,说明利用茎尖培养脱毒技术,可获得怀地黄无病毒种苗^[23]。

5 化学成分的研究

罗燕燕等采用高效液相色谱法测定河南产的16批鲜地黄和生地黄中梓醇的含量,结果表明,鲜地黄中梓醇含量为2.7~10.6,平均6.3;生地黄中梓醇含量0.7~2.0,平均1.6,两种样品间差异显著,为中医将鲜地黄、生地黄区别使用提供了科学依据^[24]。周燕生等从鲜地黄叶中分离鉴定了7种成分:8-表番木鳖酸、苯甲酸、丁二酸、C17-C30系列脂肪酸、β-谷甾醇、胡萝卜甙和D-甘露,均为鲜地黄叶首次报道^[25]。倪慕云等从干地黄中分离鉴定了系列脂肪酸、p-谷甾醇、棕榈酸、丁二酸、胡萝卜甙及S环状化合物,后4种成分在干地黄中属首次报道^[26]。孟洋等用硅胶柱色谱及重结晶等方法并根据理化性质和光谱数据从生地黄中分离鉴定了7种化合物,其中2[4'-hydroxyphenyl]-ethyl hexacosanoate、rehmapi-crogenin、阿魏酸、8-表番木鳖酸为首次从生地黄中分得^[27]。王宏洁等用化学分离手段,从鲜地黄新鲜的根茎中分离得到6种化合物,经波普鉴定谱分别为:毛蕊花糖苷、梓醇、桃叶珊瑚苷、水苏糖、胡萝卜苷、β-谷甾醇^[28]。

6 发展趋势和前景展望

地黄是我国著名的传统大宗中药材,为玄参科植物地黄的新鲜或干燥块根。在地黄的生产中,由于长期使用根茎进行无性繁殖,因此品种退化问题一直是困扰产区多年的老问题。地黄的品种退化,主要表现在块根逐步缩小,笼头增长,等级和产量逐年降低等。研究结果表明,导致地黄品种退化的主要原因是病毒的感染。通过基因工程手段来解决地黄病毒问题是一个比较好的方法,但在这方面的研究还很少,用生物技术手段来解决地黄生产中的问题是将来的发展方向。

(下转第14165页)

因此,在生产上要注意保持烟叶中适当的含氮化合物和氯离子含量以提高烟叶的评吸质量。

表 5 评吸总分与化学成分的逐步回归参数
Table 5 Stepwise regression parameter of total smoking scores and chemical components

	回归系数 B Regression coefficient	标准偏回归系数 Standard partial regression coefficient	T 值 T value	显著性 Significance
常数 Constant	97.843		21.358	0.000
X_1	-0.190	-0.162	-1.939	0.053
X_2	0.205	0.153	2.188	0.029
X_3	2.344	0.160	1.703	0.090
X_4	-3.021	-0.687	-4.835	0.000
X_5	0.213	0.034	0.430	0.668
X_6	-16.172	-0.482	-6.958	0.000
X_7	-0.402	-0.225	-4.159	0.000
X_8	-0.338	-0.737	-7.513	0.000
X_9	-0.210	-0.444	-5.718	0.000

注:决定系数 $R^2=0.342$ 。
Note:Coefficient of determination was $R^2=0.342$.

3 结论与讨论

四川省烤烟中部叶主要化学成分含量总体适宜,总糖、还原糖、烟碱、氯离子含量适中,总氮、钾离子含量偏低,淀粉含量、糖碱比、钾氯比数值偏高。总糖、还原糖和总氮的变异系数较低,说明其稳定性较好。从评级结果看,四川烤烟中部叶总体评吸质量较好,且变异系数均较低,说明其评吸质

量稳定,在工业生产中的可用性较高。
从评吸指标与主要化学成分的相关及回归分析看,四川省烤烟中部叶各评吸指标与主要化学成分的相关性差异较大,主要评吸指标受化学成分含量影响较大。对烟叶香气质影响最显著的化学指标依次为氯离子、烟碱、总氮和钾离子,对烟叶香气量影响最显著的化学指标依次为氯离子、钾离子、烟碱和总氮,对烟叶总体评吸质量影响最显著的化学指标为氯离子、烟碱和总氮。氯离子对各评吸指标的副作用最为明显。因此,含氮化合物和钾离子、氯离子含量可作为衡量四川烤烟中部叶评吸质量的品质指标^[5]。

经分析得出,烟叶中含氮化合物和钾氯比值是衡量四川烤烟中部叶评吸质量的品质指标,但四川省烤烟中部叶主要化学成分中,总氮、钾离子含量偏低,烟碱、氯离子含量适宜,因此在实际生产中应适当提高氮肥与钾肥使用量,提高烟叶中含氮化合物及钾离子含量,维持烟叶中各化学成分的协调,以进一步改善烟叶评吸质量。

参考文献

[1] 尹启生,陈江华,王信民,等. 2002 年度全国烟叶质量评价分析[J]. 中国烟草学报,2003,9(B11):59-70.
[2] 赵献章,刘国顺,杨永锋,等. 不同叶位烤烟叶片主要物理性状和化学品质的差异分析[J]. 河南农业大学学报,2006,40(3):230-233.
[3] 阎克玉. 烟草化学[M]. 郑州:郑州大学出版社,2002:106-108.
[4] 高家合,秦西云,谭仲夏,等. 烟叶主要化学成分对评吸质量的影响[J]. 山地农业生物学报,2004,23(6):497-501.
[5] 杜咏梅,郭承芳,张怀宝,等. 水溶性糖烟碱、总氮含量与烤烟口味品质的关系研究[J]. 中国烟草科学,2000(1):7-10.

(上接第 14141 页)

参考文献

[1] 李建军,范善梅,孙平,等. 怀地黄 6 个主流品种产量相关性状及其相关分析[J]. 河南农业科学,2007(9):86-89.
[2] 李建军,孙华,王太霞,等. 怀地黄不同品种块根显微结构与糖分含量的比较研究[J]. 河南大学学报:自然科学版,2007,37(5):505-508.
[3] 李建军,孙华,王太霞,等. 怀地黄不同品种根部特征和有效成分含量比较[J]. 河南师范大学学报:自然科学版,2007,35(3):140-142.
[4] 张留记,屠万倩. 怀地黄品种比较和质量研究[J]. 河南农业科学,2007(3):101-102.
[5] 李明军,张嘉宝,刘萍. 怀地黄离体培养及其生长调控[J]. 河南师范大学学报:自然科学版,1996,24(4):60-63.
[6] 薛建平,张爱民,李明军,等. 怀地黄茎尖培养和植株再生技术的研究[J]. 新乡医学院学报,2000(1):18-20.
[7] 薛建平,石乐义,张爱民. 试管地黄诱导技术的研究[J]. 中国中药杂志,2002,27(1):824-827.
[8] 武宗信,解红娥. 地黄脱毒技术研究[J]. 中药材,2002,25(6):383-385.
[9] 陈永勤,胡传银. 怀地黄不定芽诱导生根和微型块茎繁殖的研究[J]. 湖北大学学报:自然科学版,2004,26(1):61-64.
[10] 李明军,杜琳,赵喜亭,等. 培养基成分对怀地黄试管苗生长发育的影响[J]. 中草药,2007,38(9):1389-1392.
[11] 李明军,徐鑫,夏民,等. PP₃₃₃ 与 BA 组合对怀地黄试管苗生长发育影响[J]. 植物学通报,2006,23(1):56-59.
[12] 李明军,张晓丽,陈明霞,等. 怀地黄叶片愈伤组织的诱导形成及其可溶性糖含量变化的研究[J]. 河南农业科学,2005(8):72-75.
[13] 刘梦林,晁鑫,崔红,等. 地黄愈伤组织的诱导条件的研究[J]. 安徽农业科学,2006,34(21):5542-5543.
[14] 路淑霞,涂荣涛,周春娥,等. 怀地黄 85-5 叶片愈伤组织快速诱导和植株再生的研究[J]. 河南师范大学:自然科学版,2007,35(4):147-

149.
[15] 陈京荔,黄璐琦,邵爱娟,等. 地黄不同品种的 RAPD 分析[J]. 中国中药杂志,2002(7):505-508.
[16] 周延清,景建洲,李振勇,等. 怀地黄 ISSR 扩增条件优化的研究[J]. 西北植物学报,2004,24(1):6-11.
[17] 周延清,牛敬媛,田苗苗,等. 怀地黄 85-5 品种内遗传多样性的 RAPD 和 ISSR 分析[J]. 河南师范大学学报:自然科学版,2006,34(3):136-139.
[18] 余方平,杨立. 地黄花叶病的初步研究[J]. 植物病理学报,1994,24(4):310-310.
[19] 温学森,赵华英,李先恩,等. 地黄病毒病在不同品种中的症状表现[J]. 中国中药杂志,2002,27(3):225-227.
[20] 张振臣,张丽芳,乔奇,等. 河南省地黄病毒病初步鉴定[J]. 植物病理学报,2004,34(5):395-399.
[21] 王敏,李明福,黄璐琦,等. 栽培地黄(*Rehmannia glutinosa* Libosch.) 普遍感染 TMV 和 CMV[J]. 植物病理学报,2006,36(2):189-192.
[22] 侯红琴,张振臣,雷彩艳,等. 地黄花叶病毒(ReWV)的生物学特性研究初报[J]. 中国农学通报,2007,23(90):406-408.
[23] 张爱民,翟光礼. 怀地黄茎尖培养苗黄斑病毒病的鉴定[J]. 新乡医学学报,2007,17(1):21-23.
[24] 罗燕燕,张绍青. 高效液相色谱法测定地黄中梓醇含量[J]. 中国药学杂志,1994,29(1):38-39.
[25] 周燕生,倪慕云. 鲜地黄叶化学成分的研究[J]. 中国中药杂志,1994,19(3):162-163.
[26] 倪慕云,边宝林,王宏生. 干地黄化学成分的研究[J]. 中国中药杂志,1992,17(5):297-298.
[27] 孟洋,彭柏源,毕志明,等. 生地黄化学成分研究[J]. 中药材,2005,28(4):293-294.
[28] 王宏洁,刘婷,梁爱华,等. 鲜地黄化学成分的分鉴定及活性作用初探[J]. 中国实验方剂学杂志,2007,13(1):15-16.