

参考文献:

- [1] 中国药典[S].一部,1977.
- [2] 邓麟瑞,朱景玉,徐惠堂,等.空心莲子草抑制流感病毒的实验研究[J].中华微生物和免疫杂志,1984,4(3):172-176.
- [3] 曲春枫,杨占秋,向近敏.空心莲子草有效部位对流行性出血热病毒感染乳鼠的保护作用[J].中国中药杂志,1983,18(5):304-305.
- [4] 熊舜华,程化奇,黄天蓉,等.螃蟹菊对乙型肝炎患者染色体及GPT、HBsAg聚细胞改变的观察[J].湖北医学院学报,1986,7(2):140-142.

甘肃道地黄芪种苗的离体快繁研究

张延红¹,何春雨^{2*},刘晓博¹,杜 骏¹,陈红刚¹

(1. 甘肃中医学院 药理学系,甘肃 兰州 730000; 2. 甘肃省冬小麦研究所,甘肃 兰州 730020)

摘要:目的 筛选出适于无菌短枝快繁的培养基及研究试管苗移栽驯化技术。方法 以MS为基本培养基添加不同质量浓度的BA和NAA,对黄芪的不同外植体进行组织快繁研究。结果 一年生植株的带芽茎段在MS+BA 0.1 mg/L培养基上短枝长势最好;一年生植株的新生芽和两年生植株的带芽茎段,在MS+BA 0.8 mg/L+NAA 0.1 mg/L培养基上均能产生丛生芽。将短枝接种于1/2MS+0.1%活性炭或1/2MS+NAA 1.5 mg/L+0.1%活性炭的培养基上,经诱导产生有效根。小苗经沙培驯化后,移栽成活。结论 利用蒙古黄芪的无菌短枝快繁优良种苗是一种经济、快速、可行的育苗方式。

关键词:黄芪,离体快繁;无菌短枝;炼苗;移栽

中图分类号:R282.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2008)11-1729-04

黄芪 *Astragalus membranaceus* Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 为豆科黄芪属多年生草本植物,以根入药,是常用大宗中药材^[1],也是甘肃道地药材之一。甘肃陇西就素有“中国黄芪之乡”的美称。近年来,由于市场需求量逐年增加,野生资源日渐匮乏,采用育苗移栽进行人工栽植成为黄芪的主要来源^[2]。但是黄芪生长周期长、种子硬实现象严重^[3],且易受黄芪小蜂危害,所以播种时用种量大、繁殖系数低,造成药农经济成本增加。同时,黄芪种植历史悠久,传统栽培中往往不重视优良性状的选育,存在性状变异多、品系混杂严重等现象,对药材产量和品质产生不良影响^[4]。目前,陇西地区育苗也出现了一定困难,一年生小苗易遭受病虫侵染,导致根部出现黑斑甚至断根。因此,寻找一种新的育苗方式迫在眉睫。

利用植物组织培养的方法,采用黄芪带腋芽及顶芽的茎段作外植体,进行植物离体快繁,可于短期内获得大量遗传性状一致的幼苗,比用种子繁殖节省育苗空间和成本,成苗迅速且便于集中精细管理^[5]。虽然国内外对黄芪的组织培养有一些报道,但主要研究愈伤诱导和植株再生,利用短枝进行快繁种苗未见报道。本试验旨在建立黄芪无菌短枝快繁

的育苗体系。

1 材料与方法

1.1 材料采自甘肃陇西县马河镇产一年和二年生黄芪,经林丽高级实验师鉴定,剪取实生苗的新生芽及地上茎段。

1.2 短枝诱导:用软毛刷及洗衣粉水轻轻刷洗黄芪枝条,然后用流水冲洗12 h。在超净工作台上先用75%乙醇漂洗30 s,然后用2%次氯酸钠溶液灭菌10 min,再用0.1%升汞溶液灭菌10 min,最后用无菌水冲洗5次,接种于添加不同质量浓度6-BA及NAA的培养基上。将材料置于室温25℃、光照时间13 h/d左右、光照强度2 000 lx的条件下培养。

1.3 根的诱导:当短枝长到6~8 cm高时,切除基部较老化部分,然后将形态学下端近节处插入生根培养基中,在与1.2项相同的培养条件下诱导生根^[6]。生根培养基为1/2MS培养基添加不同质量浓度NAA和0.1%活性炭。

1.4 炼苗和移栽:当短枝基部形成较发达的根系后,打开瓶塞,炼苗2 d,然后轻轻取出小苗,小心洗去根部的培养基^[6],然后将试管苗栽植于蛭石-河沙-腐殖土(5:4:1)的基质中,用打孔的透明塑料杯罩住保湿。用半透明塑料膜遮荫,每日喷水2次,

收稿日期:2008-01-11

基金项目:本科生毕业专题专项基金资助

作者简介:张延红(1977—),女,讲师,硕士,主要从事药用植物育种和组织培养方面的研究和教学工作。

* 通讯作者 何春雨 Tel:13919459087 E-mail:hchy@lzc.edu.cn

逐渐增加光照并降低湿度。

2 结果与分析

2.1 不同外植体在相同培养基上生长状况比较:培养两周后进行观察统计,发现相同激素处理的培养基中,不同材料表现出的生长状况不同(表1)。相同的培养基中,一年生植株及两年生植株的腋芽诱导的枝条矮且粗壮,一年生的新生芽则普遍较高。其中以一年生植株的茎段诱导的枝条长势最好,接种材

料全部成枝(图1)。其原因可能是一年生苗的茎段内源激素量较高,营养物质充足^[7],因此,抽枝分化容易,生长良好。一年生植株的茎段及一年生苗的新生芽较两年生植株的茎段易抽生二级侧枝,且生长旺盛、株型丰满。在 MS+BA 0.8 mg/L+NAA 0.1 mg/L 培养基上,两年生植株的茎段及一年生植株的新生芽经诱导后在原叶腋处产生了丛生芽,一年生植株的茎段则无丛生芽发生。

表1 不同外植体在不同培养基上的短枝生长

Table 1 Growth of short branches of different explants on different media

材料来源	激素/(mg·L ⁻¹)	短枝		短枝上侧枝 ⁽³⁾	切口愈合	褐化	叶腋处
		高矮 ⁽¹⁾	粗细 ⁽²⁾	生长状况	组织状态	情况	丛芽数
两年生苗	BA 0.0+NAA 0.1	矮	细	无侧枝	无愈合	深褐	0
	BA 0.1+NAA 0.0	矮	粗	无侧枝	小块深绿愈合	深褐	0
	BA 0.1+NAA 0.1	矮	粗	无侧枝	较大块深绿愈合	中褐	0
	BA 0.5+NAA 0.1	矮	较粗	无侧枝	大块深绿愈合	浅褐	0
	BA 0.8+NAA 0.1	矮	细	无侧枝	大块深绿愈合	浅褐	4×3个
一年生苗	BA 0.0+NAA 0.1	矮	细	无侧枝	无愈合	深褐	0
	BA 0.1+NAA 0.0	矮	较粗	3个	较大块深绿愈合	中褐	0
	BA 0.1+NAA 0.1	矮	较粗	无侧枝	小块深绿愈合	中褐	0
	BA 0.5+NAA 0.1	矮	较粗	3个	大块深绿愈合	浅褐	0
	BA 0.8+NAA 0.1	矮	细	无侧枝	大块深绿愈合	浅褐	0
一年生新生芽	BA 0.0+NAA 0.1	较高	细	无侧枝	无愈合	深褐	0
	BA 0.1+NAA 0.0	较高	细	3个	小块深绿愈合	中褐	0
	BA 0.1+NAA 0.1	较高	细	无侧枝	大块深绿愈合	浅褐	0
	BA 0.5+NAA 0.1	高	粗	3个	大块深绿愈合	浅褐	0
	BA 0.8+NAA 0.1	高	较粗	3个	大块深绿愈合	浅褐	3×3个

(1)平均茎长≤6.0 cm 为较矮;6.0 cm<茎长<8.0 cm 为较高;茎长≥8.0 cm 为高

(2)平均茎粗≤3.0 mm 为细弱;3.0 mm<茎粗<3.3 mm 为较粗;茎粗≥3.3 mm 为粗壮

(3)短枝上侧枝是指经诱导后抽生的短枝上产生的二级分枝

(1) average stem height≤6.0 cm is short; height>6.0 cm and<8.0 cm is higher; height≥8.0 cm is highest

(2) average stem diameter≤3.0 mm is slim; stem diameter>3.0 mm and<3.3 mm is stronger; diameter≥3.3 mm is strongest

(3) side branch is secondary branch of short branch which was induced



图1 生长旺盛的短枝

Fig. 1 Bloom plantlets of short branches

2.2 激素质量浓度不同配比的培养基上,同种外植体生长状况比较:外植体来源相同,但培养基激素质量浓度配比不同,外植体经诱导后生长状况亦有差异。

2.2.1 两年生植株的茎段:当 NAA 为 0.1 mg/L 时,随着 BA 质量浓度的升高,短枝由粗变细,但植

株普遍表现低矮,愈伤组织块变大、褐化减轻。由此可见,BA 对短枝粗细、愈伤组织大小及褐化程度的影响较显著。在 MS+BA 0.8 mg/L+NAA 0.1 mg/L 培养基上,经诱导后大部分材料产生丛生芽。其中以 MS+BA 0.1 mg/L 培养基上的短枝长势最好。

2.2.2 一年生植株的茎段:随着 BA 质量浓度的升高,短枝和愈伤组织状况与两年生植株茎段相似,在 MS+BA 0.1 mg/L 培养基上的短枝长势也最好。在 MS+BA 0.1 mg/L 及 MS+BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L 培养基上,材料经诱导后,短枝上抽生的二级侧枝生长旺盛、株型丰满。

2.2.3 一年生植株的新生芽:随着 BA 质量浓度的升高,短枝则由细变粗,植株较高变为高,愈伤组织

块由小变大、褐化减轻。在与上述一年生植株茎段相同的培养基上,也诱导产生了二级侧枝。在与两年生植株茎段相同的培养基上诱导产生了丛生芽。

因此,综合3种外植体的共同表现分析,BA质量浓度适当升高,利于减轻褐化程度^[8]。MS+BA 0.1 mg/L 和MS+BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L 培养基适于诱导短枝。MS+BA 0.8 mg/L+NAA 0.1 mg/L 培养基适于诱导丛生芽。这种培养基中BA量较高,经验证易于诱导腋芽产生丛生芽。在MS+NAA 0.1 mg/L 培养基上,材料基部均未产生愈伤组织块。

2.3 不同培养基对诱导生根的影响:将5~6 cm 长的短枝接种于MS培养基或添加激素的MS培养基上,均未诱导生根。但接种于添加活性炭的1/2MS培养基或添加活性炭和1.5 mg/L NAA 的1/2MS培养基上的短枝,经诱导后均产生有效根(表2)。其中以1/2MS+活性炭培养基诱导效果最佳,培养12 d 时发根,20 d 时形成发达根系(图2)。NAA 质量浓度低时,易诱导生根,但随着NAA 质量浓度升高,根诱导受到阻碍且在根基部产生少量白色愈伤组织,所以低质量浓度的NAA 利于生根。同时笔者也做了相同激素质量浓度处理,但未加活性炭的对比试验,经过相同天数的培养,未能诱导生根,可见活性炭对黄芪短枝生根有良好的促进作用。

表2 不同激素处理对诱导生根的影响

Table 2 Effect of different hormones on inducing of roots

培养基类型	接种材料 总数	有效生根 材料数	平均根长 /mm	平均根粗 /mm	愈伤组织 状况
活性炭+1/2MS	5	4	33	1.0	无
活性炭+1/2MS+ NAA 1.5 mg/L	5	2	8	2.0	无
活性炭+1/2MS+ NAA 3.0 mg/L	5	0	0	0	少量白色
活性炭+1/2MS+ NAA 5.0 mg/L	5	0	0	0	少量白色

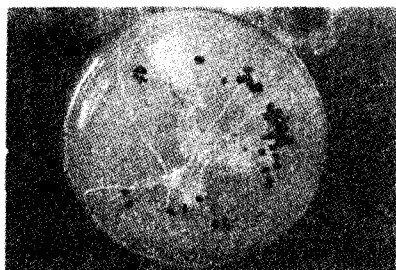


图2 试管苗生根

Fig. 2 Producing roots in test tube

2.4 试管苗移栽驯化:本试验获得了生根的组培小苗,经沙培驯化后移栽成活(图3)。移栽应在苗基部形成较发达的根系后进行,过早会导致小苗枯死^[9]。在移栽前需先打开瓶塞炼苗2 d,使小苗逐渐适应较干燥的外界环境。然后轻轻取出小苗,小心洗去根部的培养基,注意尽量减少根的损伤,罩上塑料杯。在小苗驯化阶段,应逐渐增加光照并降低湿度,使气孔逐渐恢复至正常状态^[10]。待枝叶上挺、新叶抽出、叶色转绿后,去除塑料杯,逐渐控制水分,继续锻炼数日,小苗即可在正常条件下生长。



图3 试管苗移栽成活

Fig. 3 Viability of transplant in test tube

3 讨论

3.1 培养时外植体愈伤化和褐化控制:短枝诱导时凡在添加有BA 的培养基中,茎段切口处均产生了深绿色的致密愈伤组织,该愈伤组织极易褐化且阻碍根的诱导。随着BA 质量浓度的升高,愈伤组织的量也相应增多,但褐化程度减轻。因此,要减少深绿色愈伤组织产生,可适当降低BA 的用量^[11]。

另外,诱导生根时在添加有活性炭、3.0 mg/L NAA 或5.0 mg/L NAA 的1/2MS培养基上,经诱导在短枝基部均产生了小块白色较疏松愈伤组织,但无褐化发生。而在添加活性炭的1/2MS培养基或添加活性炭和1.5 mg/L NAA 的1/2MS培养基上的短枝,既无褐化发生,又无愈伤组织产生,所以培养中添加活性炭并降低无机盐浓度,可有效地控制褐化。同时随着NAA 质量浓度降低可避免产生白色愈伤。

3.2 材料的污染及其控制:外植体初代培养时极易污染,污染率最高可达90%。为了提高实验效率在材料污染控制方面应注意:采材时应选取生长健壮的无病植株,以地上部分作外植体材料;于春末采材,材料带菌少,不易污染;在材料预处理时应用毛刷在洗衣粉稀溶液中轻轻刷洗,再用流动水冲洗12 h;外植体以两种灭菌剂配合灭菌并加入数滴浓度0.2%的聚山梨酯80,可取得良好的灭菌效果。

3.3 前景展望:本实验采用带腋芽或顶芽的茎段进

行组织培养,建立甘肃道地黄芪的离体快繁体系。该试验最重要的一个突破就是将试管苗成功地移栽于盆土中且生长良好,这对于实现黄芪种苗工厂化生产具有非常重要的实践意义。

参考文献:

- [1] 康廷国. 中药鉴定学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2004.
- [2] 高学敏. 中药学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2004.
- [3] 张树森, 胡秋芳. 蒙古黄芪种子特性与发芽试验[J]. 内蒙古草原, 1995, 1: 59-62.
- [4] 杨继祥, 田义新. 药用植物栽培学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004.

- [5] 王 蒂. 植物组织培养[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004.
- [6] 陈 刚, 贾敬芬. 草本犀状黄芪高频离体再生体系的建立[J]. 西北植物学报, 2001, 21(1): 136-141.
- [7] 蔡晓剑, 李松龄. 青海省野生大黄组织培养研究初报[J]. 青海科技, 2004(6): 25-27.
- [8] 包英华, 苏格尔. 蒙古黄芪的组织培养研究[J]. 韶关学院学报, 2002, 23(9): 70-76.
- [9] 冉懋雄. 中药组织培养实用技术[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 2004.
- [10] 王 忠. 植物生理学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [11] 包英华, 苏格尔. 蒙古黄芪不同外植体愈伤组织中黄芪甲苷含量比较[M]. 内蒙古大学学报, 2003, 21(1): 136-141.

产地和采收时间对美花石斛药材中多糖的影响

武孔媛¹, 王文全^{1*}, 金家兴², 孙志蓉¹, 龙友邻², 白 音³

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102; 2. 贵州兴义吉仁堂药业公司, 贵州 兴义 562400;

3. 韶关学院, 广东 韶关 512005)

摘 要:目的 研究不同产地和不同采收季节对美花石斛药材多糖的影响, 为确定美花石斛药材的最佳产地和采收时间提供依据。方法 采用苯酚-浓硫酸比色法比较不同产地和不同采收时间美花石斛药材的多糖量, 并对结果进行方差分析。结果 不同产地和生长年限美花石斛多糖量差异较大, 贵州则戎产的美花石斛药材多糖量最高, 为14.9%; 不同采收时期美花石斛药材的多糖量2年生均高于3年生, 4月时多糖量最低, 从4月开始量逐渐增高, 其中9月量达到最高。结论 以多糖量为指标来判断药材质量的好坏, 贵州则戎所产的美花石斛药材质量较好, 2年生药材的多糖量较高, 采收期安排在9月至次年1月份期间比较合适, 这一结果与传统石斛药材秋冬季节采收相符, 并为美花石斛药材的采收和质量评价提供了科学依据。

关键词: 美花石斛; 产地; 采收时间; 多糖量

中图分类号: R282.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)11-1732-04

石斛具有滋阴清热、益胃生津、润肺止咳之功效, 为传统名贵中药, 其来源植物有40多种, 美花石斛 *Dendrobium loddigesii* Rolfe 是《中国药典》2000年版收载的环草石斛药材的原植物, 化学成分含有多糖、生物碱和芪类化合物(stilbenoids)等^[1~3]。药理实验证明石斛的多糖类成分是石斛中具有免疫促进和抗肿瘤作用的活性成分^[4], 常以多糖的量高低来判断某一类石斛药材的质量好坏^[3]。因此, 多糖量可以作为评价环草石斛药材质量的指标。

《中国药典》2005年版中石斛的采收时间是全年均可采收, 对于石斛药材的采收时间没有明确的规定, 但是不同生长年限和生长月份的石斛中有效成分的量 and 积累是存在差别的, 药材的产地也影响药材有效成分。白音等^[5]研究了不同生长年限美花石斛茎的多糖量, 发现2年生药材的多糖量较高, 采

收期安排在第2年生长结束时比较合适, 但对具体的采收时间, 未进行动态分析。确定药材的适宜产地有利于发展药材的生产, 而药材适宜采收时间的确定有利于药农进行采收和确保药材中的有效成分的量, 从而确保临床药效。本实验采用苯酚-硫酸法对不同产地、不同生长年限和不同月份采收的美花石斛的多糖量进行测定, 并对测定结果进行比较分析, 初步确定美花石斛药材的适宜产地和采收时间, 为其质量评价及探索最佳采收期提供科学依据。

1 仪器、试剂与材料

1.1 仪器与试剂: U-2000 紫外-可见分光光度计(日本, HITACHI); UV-2100 紫外-可见分光光度计(上海优尼柯仪器有限公司); 无水葡萄糖对照品(北京拜尔迪生物公司, 批号 G-8270, 供定量测定用)。浓硫酸、苯酚、乙醇均为分析纯(北京化工厂)。

收稿日期: 2008-04-05

作者简介: 武孔媛(1982—), 女, 贵州省六盘水人, 北京中医药大学中药学院在读硕士研究生, 主要从事中药质量方面的研究。

Tel: (010)84738623 E-mail: kongyuan112@163.com

* 通讯作者 王文全 Tel: (010)84738623 E-mail: wwq57@126.com