

源枯竭的严重境地,野生黄连仅十分稀少地见于陕西南部、湖北西部和四川东部的一些地区。如果不进行有效的保护,随着野生黄连分布区域的继续缩小和资源的大量流失,将导致黄连遗传多样性的进一步降低,甚至有可能难以找到野生资源。此外,生产上长期的人为选择加上药材市场的调控,丢失了许多农家品种资源,造成黄连栽培群体遗传基础狭窄,基因组差异缩小,降低了居群间的遗传多样性水平。因此,在黄连遗传多样性保护上,一方面需人为增加个体间的基因流动,促进基因重组,对物种进行复壮;另一方面要在广泛调查的基础上大量收集和保护好野生、农家品种的优质种内变异,在适宜地建立田间种质资源圃,最大限度地对遗传多样性进行保护,并进行植物形态学、生长发育规律和繁殖生物学的研究,使种质资源的收集和保护更具有目的性和有效性。本室利用分子标记技术对黄连栽培种质资源进行遗传多样性分析,不仅可以对黄连的育种工作中亲本的配置提供理论依据和指导作用,而且在遗传多样性恢复和保护中具有重要价值。

致谢:分子生物学实验在西南大学蚕桑学重点

实验室完成。

#### 参考文献:

- [1] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brossica* [J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 103(2-3): 455-461.
- [2] 林忠旭, 张献龙, 聂以春. 新型标记SRAP在棉花F<sub>2</sub>分离群体及遗传多样性评价中的适用性分析 [J]. *遗传学报*, 2004, 31(6): 622-626.
- [3] 李丽, 郑晓鹰, 柳李旺. 用SRAP标记分析黄瓜品种遗传多样性及鉴定品种 [J]. *分子植物育种*, 2006, 4(5): 702-708.
- [4] 文雁成, 王汉中, 沈金雄, 等. 用SRAP标记分析中国甘蓝型油菜品种的遗传多样性和遗传基础 [J]. *中国农业科学*, 2006, 39(2): 246-256.
- [5] 程远辉, 周昌华, 马爱芬, 等. 重庆何首乌遗传多样性的SRAP研究 [J]. *中国中药杂志*, 2007, 32(8): 661-663.
- [6] 李敏, 王琦, 付福友. 不同品种郁金的SRAP研究 [J]. *中草药*, 2006, 37(8): 1255-1258.
- [7] 陈大厦, 李隆云, 彭锐, 等. 黄连种质资源遗传多样性的ISSR研究 [J]. *中国中药杂志*, 2006, 31(23): 1937-1940.
- [8] 钱韦, 葛颂, 洪德元. 采用RAPD和ISSR标记探讨中国疣粒野生稻的遗传多样性 [J]. *植物学报*, 2000, 42(7): 741-750.
- [9] 张媛, 胡则辉, 周志刚, 等. 利用RAPD-PCR与ISSR-PCR标记技术分析长江口刀鲚的群体遗传结构 [J]. *上海水产大学学报*, 2006, 15(4): 390-397.

## 黄独带芽茎段增殖和生根的初步研究

洪森荣, 尹明华\*, 赵美娜

(上饶师范学院 生命科学系, 江西 上饶 334001)

**摘要:**目的 对黄独带芽茎段的增殖和生根进行初步的研究。方法 采用单因子试验和植物组织培养的方法。结果 6-BA或KT与NAA组合有利于黄独带芽茎段增殖;蔗糖质量浓度过高将导致黄独带芽茎段愈伤化不利于黄独带芽茎段增殖;液体培养有利于黄独带芽茎段增殖;在一定范围内NAA质量浓度的增加有利于黄独带芽茎段生根,但质量浓度太高将会抑制生根。结论 黄独带芽茎段增殖的最佳培养基为MS+KT 2 mg/L+NAA 1 mg/L或MS+6-BA 2 mg/L+NAA 0.5 mg/L;黄独带芽茎段再生的最佳蔗糖量为30 g/L,最佳培养方式为液体培养,最佳的生根培养基为MS+NAA 2 mg/L。

**关键词:**黄独;带芽茎段;增殖;生根;组织培养

中图分类号:R282.2

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2008)10-1556-05

### Primary study on proliferation and rooting of stem with a bud in *Dioscorea bulbifera*

HONG Sen-rong, YIN Ming-hua, ZHAO Mei-na

(Department of Life Science, Shangrao Normal College, Shangrao 334001, China)

**Abstract: Objective** To study the effects of several factors on bud proliferation and rooting of *Dioscorea bulbifera* stem with a bud. **Methods** Single factor test and plant tissue culture methods were applied. **Results** The combination of 6-BA or KT and NAA helped the proliferation of stem with a bud in

收稿日期:2008-01-04

基金项目:江西省自然(青年)科学基金资助项目(0630103);江西上饶师范学院2008—2009年度院级科技资助项目

作者简介:洪森荣,男,江西永新人,硕士,讲师,主要从事生物技术方面的研究。

\*通讯作者 尹明华

*D. bulbifera*; high concentration sucrose led to callus growth of stem with a bud in *D. bulbifera* which didn't help the proliferation of stem with a bud in *D. bulbifera*; Liquid culture also helped the proliferation of stem with a bud in *D. bulbifera*; In a certain range, the increase of NAA concentration helped the rooting of stem with a bud in *D. bulbifera*. But it will inhibit the rooting with concentration in a higher level. **Conclusion** The best proliferation culture medium of *D. bulbifera*, stem with a bud is MS + KT 2 mg/L + NAA 0.5 mg/L or MS + 6-BA 2 mg/L + NAA 0.5 mg/L; For proliferation of *D. bulbifera* stem with a bud, the best sucrose concentration is 30 g/L sucrose, the best culture mode is liquid culture; The best rooting culture medium of *D. bulbifera* stem with a bud is MS + NAA 2 mg/L.

**Key words:** *Dioscorea bulbifera* L.; stem with a bud; proliferation; rooting; tissue culture

黄独 *Dioscorea bulbifera* L. 为薯蓣科薯蓣属植物,是世界广布种,在中国主要分布于浙江、江西、福建等地<sup>[1]</sup>。黄独的块茎又名黄药子、黄药脂等,性味苦、平,具有散结消瘿、清热解毒、凉血降火的功效,主要用于治疗各种甲状腺疾病和多种癌症,对食道癌、胃癌、直肠癌的近期疗效确切<sup>[2]</sup>。黄独中的主要有效成分为薯蓣皂苷、薯蓣毒皂苷、黄药子甲素以及黄药子乙素等,均具有抗肿瘤的作用,但又都是有成分,久服易引起蓄积中毒<sup>[3]</sup>,而黄独中的水溶性多酚类化合物则可能是止血、抑菌的有效成分<sup>[4]</sup>。因此,寻找其中既具有抗肿瘤作用,毒性又小、安全性好的化合物是今后研究的主要方向,而通过组培来获取这些药用成分是一条值得探索的途径。本实验对黄独带芽茎段的增殖和生根进行初步的研究,旨在为黄独的药用成分提取以及黄独试管苗的工厂化生产提供方法学参考和理论基础。

## 1 材料与方 法

1.1 材料:供试黄独材料取自上饶师范学院校园内,经上饶师范学院生命科学系何长水研究员鉴定,标本保存于上饶师范学院生命科学系植物组织培养室。

1.2 方法:将黄独带芽茎段(0.5~1.5 cm)用洗洁精浸泡0.5 h,并用自来水冲洗2.5 h。洗干净后在超净工作台上用70%酒精和0.1% HgCl<sub>2</sub>分别处理30 s和15 min,用无菌水各洗3次后,将茎段分别接种到再生培养基上。再生培养基以MS为基本培养基,附加不同质量浓度的2种激素,分别是6-BA或KT和NAA。培养基的设置:(1)MS(CK);(2)MS+KT 2 mg/L;(3)MS+KT 2 mg/L+NAA 0.1 mg/L;(4)MS+KT 2 mg/L+NAA 0.5 mg/L;(5)MS+KT 2 mg/L+NAA 1 mg/L;(6)MS+KT 2 mg/L+NAA 5 mg/L;(7)MS+6-BA 2 mg/L+NAA 0.1 mg/L;(8)MS+6-BA 2 mg/L+NAA 0.5 mg/L;(9)MS+6-BA 2 mg/L+NAA 1 mg/L,以上培养基蔗糖为30 g/L,凝固剂均

为7.5 g/L,pH值为5.8~6.0。筛选最佳培养基后进行其他单因子的实验,后续实验所用培养基中蔗糖设计为30、60 g/L,凝固剂设计为0、7.5 g/L,生根培养基设计为:(1)MS(CK);(2)MS+NAA 0.1 mg/L;(3)MS+NAA 0.5 mg/L;(4)MS+NAA 1 mg/L;(5)MS+NAA 2 mg/L;(6)MS+NAA 5 mg/L;(7)MS+NAA 10 mg/L,pH值为5.8~6.0。培养条件均为光照时间:12 h/d,培养温度:(25±1)℃,光强:1 000~1 400 lx。以上实验均在60 d时统计试管苗的新生芽数、平均根数、平均鲜质量和平均株高。

1.3 统计方法:以上实验均为单因子实验,重复3次,所有数据表示为 $\bar{x} \pm s$ ,实验数据用SPSS 13.5软件的One-Way ANOVA分析后,进行 $t$ 检验, $P < 0.05$ 为有统计学差异显著性。

## 2 结果与分析

2.1 植物生长物质对黄独带芽茎段增殖的影响:由表1可知,KT单独使用时,黄独带芽茎段也能增殖,但与NAA组合的效果更好,尤其以KT与0.5、1 mg/L NAA组合的效果较好。值得注意的是KT与NAA组合时,如NAA低于1 mg/L则容易发生茎段切口的愈伤化(图1-A),但NAA达到5 mg/L时,黄独带芽茎段增殖系数下降,并且出现死亡;6-BA与NAA组合的效果也较好,尤其以6-BA与0.5 mg/L组合的效果最好,但当NAA达到1 mg/L时,则黄独带芽茎段增殖系数下降;黄独带芽茎段增殖的最佳培养基为MS+KT 2 mg/L+NAA 1 mg/L或MS+6-BA 2 mg/L+NAA 1 mg/L,其试管苗的平均株高、平均鲜质量、平均叶片数和繁殖系数与其他培养基上的试管苗比较均具有显著性差异(图1-B)。

2.2 蔗糖对黄独带芽茎段增殖的影响:由图2可知,以MS+KT 2 mg/L+NAA 1 mg/L为增殖培养基(液体培养),30 g/L蔗糖更有利于黄独带芽茎段的再生,60 g/L蔗糖有利于黄独带芽茎段切口的

表1 植物生长调节剂对黄独带芽茎段再生的影响

Table 1 Effect of plant growth regulator on proliferation of *D. bulbifera* stem with a bud

培养基序号	形态指标			
	平均株高/cm	平均鲜质量/g	平均叶片数/片	增殖系数
1(CK)	2.46±1.36	2.364±1.323	2.34±1.32	1.36±1.09
2	5.64±1.14*	4.568±0.989*	5.64±0.69*	1.98±0.95*
3	6.78±0.89**	6.547±1.245**	6.31±1.63**	2.46±0.87*
4	7.86±0.97**	6.324±1.268**	7.32±2.32**	3.21±1.46*
5	10.56±0.64**	8.236±0.269**	9.64±1.69**	5.21±1.34**
6	4.65±0.78*	4.698±1.364*	5.34±2.31*	2.64±0.94*
7	5.46±0.69*	5.326±1.321*	4.68±3.10*	3.65±0.69**
8	10.26±1.31**	8.152±1.452**	8.98±1.34**	4.98±1.11**
9	6.45±0.68**	6.459±0.684**	5.64±0.98**	2.68±1.21*

\*与\*\*表示与对照比较在0.05和0.01水平上的差异性,下同

\* and \*\* represents difference at  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$  level. Followings are same

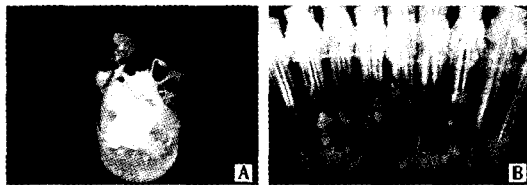


图1 黄独带芽茎段切口形成大量愈伤组织(4号培养基)(A)和植物生长调节剂对黄独带芽茎段再生的影响(B,从左到右依次为1~9号培养基)

Fig. 1 Induction of callus of *D. bulbifera* stem with a bud (No. 4 medium) (A); Effect of plant growth regulator on proliferation of *D. bulbifera* stem with a bud (left to right: No. 1—9 media) (B)

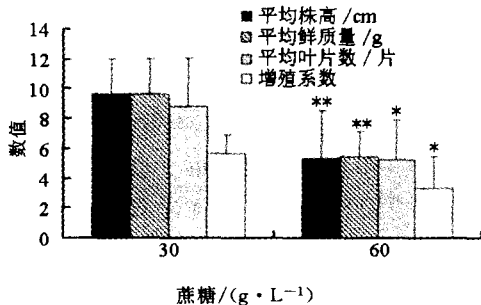


图2 蔗糖对黄独带芽茎段再生的影响

Fig. 2 Effect of sucrose on proliferation of *D. bulbifera* stem with a bud

愈伤化,在光照培养条件下,30 g/L 蔗糖使试管苗的平均株高、平均鲜质量、平均叶片数和繁殖系数与60 g/L 蔗糖培养的试管苗相比较具有显著性差异(图3)。

2.3 培养方式对黄独带芽茎段再生的影响:由图4可知,以MS+KT 2 mg/L +NAA 1 mg/L 为增殖培养基,培养方式对黄独带芽茎段的再生也有影响,其中最佳的培养方式为液体培养(琼脂为0 g/L)。在无冷凝脂的条件下,其试管苗的平均株高、平均鲜质

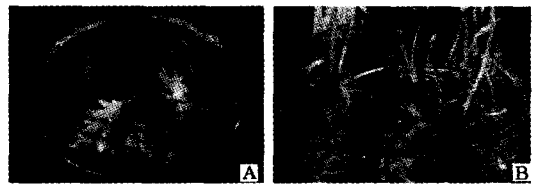


图3 蔗糖对黄独带芽茎段再生的影响

(A为60 g/L蔗糖,B为30 g/L蔗糖)

Fig. 3 Effect of sucrose on proliferation of *D. bulbifera* stem with a bud [60 g/L sucrose (A), 30 g/L sucrose (B)]

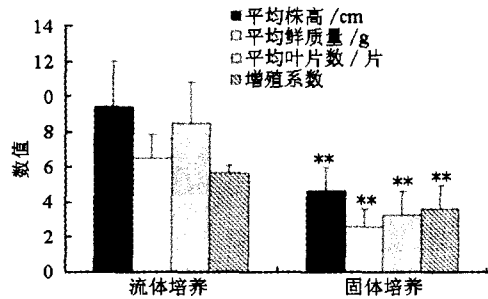


图4 琼脂对黄独带芽茎段再生的影响

Fig. 4 Effect of agar on proliferation of *D. bulbifera* stem with a bud

量、平均叶片数和繁殖系数与其他质量浓度下的试管苗相比较具有显著性差异(图5),这可能与液体培养有利于茎段切口代谢次生产物的扩散而不会累积在茎段周围影响带芽茎段的增殖有关。

2.4 NAA对黄独带芽茎段生根的影响:NAA对黄独带芽茎段的生根有显著影响,随着NAA质量浓度增加,生根数也不断增加,但NAA质量浓度过大时,将抑制植株生长,由表2可知,黄独带芽茎段生根的NAA以2 mg/L为好。在此质量浓度下,其试管苗的平均株高、平均鲜质量、平均叶片数和繁殖系数与不加NAA的试管苗相比较均具有显著性差异(图6)。



图5 琼脂对黄独带芽茎段再生的影响  
(左为液体培养,右为固体培养)

Fig. 5 Effect of agar on proliferation of *D. bulbifera* stem with a bud [liquid culture (left) and solid culture (right)]

表2 NAA对黄独带芽茎段生根的影响

Table 2 Effect of NAA on rooting of *D. bulbifera* stem with a bud

培养基序号	形态指标			
	平均株高/cm	平均鲜质量/g	平均叶片数/片	增殖系数
1(CK)	3.64±1.23	3.645±1.323	2.67±2.36	3.45±1.32
2	5.64±2.12*	4.566±0.965*	3.68±1.23*	4.64±0.98*
3	6.58±1.36*	5.364±0.856*	5.31±3.21*	5.67±1.23*
4	8.48±0.98**	5.624±1.234*	6.98±3.26*	6.61±0.84*
5	10.36±1.34**	7.268±0.984**	8.45±1.29**	9.41±1.23**
6	6.59±2.31*	5.784±1.442*	5.64±2.45*	10.64±1.05**
7	5.64±1.64*	4.621±1.236*	3.67±2.12*	12.31±0.85**

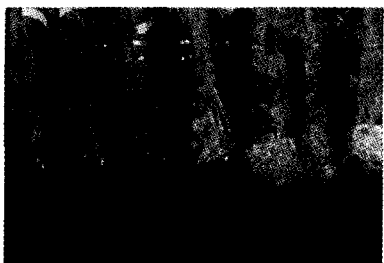


图6 NAA对黄独带芽茎段生根的影响(从左到右依次为0、0.1、0.5、1、2、5、10 mg/L)

Fig. 6 Effect of NAA on rooting of *D. bulbifera* stem with a bud (left to right: 0, 0.1, 0.5, 1, 2, 5, and 10 mg/L NAA)

的6-BA或KT与适宜质量浓度NAA组合的培养基,增殖系数高,反之,则增殖系数低。本实验的预试验表明,IBA、IAA对黄独带芽茎段生根的影响与NAA比较无显著差异性,并且由于IBA和IAA在高温灭菌中容易分解,因此在正式实验中,笔者只用NAA来进行黄独带芽茎段生根的研究,结果表明,NAA能够促进黄独带芽茎段生根,NAA越大,生根效果越显著,但过高质量浓度NAA抑制植株生长,本实验结果与任华等<sup>[7]</sup>在玫瑰天竺葵上的研究结果一致。

常规组织培养中,培养过程是在人为添加碳源

### 3 讨论

带芽茎段有较强的分生能力,是最理想的外植体,采用带芽茎段离体培养,直接萌发出芽,未经过愈伤组织阶段,有利于保持该品种遗传性状稳定<sup>[5]</sup>。激素对带芽茎段的再生起着至关重要的作用,不同激素、不同质量浓度对带芽茎段的再生有很大影响,而组织培养高频植株再生技术的难点和关键就是控制各种激素在培养基中的质量浓度<sup>[6]</sup>。在植物组织培养中,使用最多的激素是细胞分裂素类和生长素类,控制两者的质量浓度,可以控制芽或根的分化,细胞分裂素/生长素的比值大时有利于芽的形成,比值小时则有利于生根<sup>[6]</sup>。本实验表明,一定质量浓度

的环境下进行的。糖对试管苗芽的作用,主要为其生长提供碳源和调节渗透势<sup>[8]</sup>。一定程度范围内的糖质量浓度提高对生姜芽增殖都有明显的促进作用,但质量浓度太高则会导致植株生长不健壮,叶片发黄,并且对继代与生根都有抑制作用。在本实验的预试验中,发现20、30、40 mg/L蔗糖对黄独带芽茎段增殖无显著差异性,并且50、60 mg/L蔗糖对黄独带芽茎段增殖也无显著差异性,因此在正式实验中蔗糖设置为30、60 mg/L,结果发现适宜的蔗糖质量浓度对带芽茎段增殖有促进作用,但过高的蔗糖质量浓度培养会抑制试管苗的生长,并且导致茎段伤口愈伤化。

本实验表明,培养基中不添加琼脂有助于带芽茎段增殖,繁殖系数高。而添加了琼脂,培养基硬化,影响了养分的吸收,导致试管苗生长减慢,芽增殖减少,增殖系数降低。因此,采取固体培养方式或液体培养方式主要取决于植物种类。

#### 参考文献:

[1] 王筱璐,杭悦宇,周义峰,等.与黄独(*Dioscorea bulbifera*)性别相关的RAPD-SCAR标记研究[J].植物资源与环境学报,2007,16(2):1-5.  
[2] 唐迎雪.黄药子古今临床应用研究[J].中国中药杂志,1995,20(7):435-438.  
[3] 林厚文,张 翌,赵宏斌,等.黄药子的研究进展[J].中草

- 药, 2002, 33(2): 175-177.
- [4] Komori T. Glycosides from *Dioscorea bulbifera* [J]. *Toxicol*, 1997, 35(10): 1531-1535.
- [5] 刘金英, 徐有明, 李双来, 等. 佛手山药组织培养的研究 [J]. *植物研究*, 2006, 26(3): 323-328.
- [6] 王 忠. 植物生理学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2002.
- [7] 任 华, 王永清, 秦红玫. 玫瑰天竺葵组培快繁技术的研究 [J]. *湖南农业科学*, 2007, 1: 32-34.
- [8] 蒋泽平, 梁珍海, 李荣锦, 等. 光叶楮组织培养快速繁殖技术的研究 [J]. *江苏林业科技*, 2006, 33(6): 10-13.

## 小叶黑柴胡药材的 HPLC 指纹图谱研究

刘鄂湖<sup>1,2</sup>, 蔡光明<sup>1\*</sup>, 朱海升<sup>1</sup>, 黄鹤慧<sup>1</sup>, 周 伟<sup>1,2</sup>, 熊晗辉<sup>1,2</sup>

(1. 解放军 302 医院全军中药研究所, 北京 100039; 2. 湖南中医药大学药学院, 湖南 长沙 410004)

**摘要:**目的 建立小叶黑柴胡药材的 HPLC 指纹图谱。方法 以 Kromasil C<sub>18</sub> 为色谱柱, 流动相为乙腈-水梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 260 nm。结果 建立了小叶黑柴胡药材的 HPLC 指纹图谱, 确定了 14 个共有峰, 共有峰相对保留时间的 RSD 为 0.02%~1.49%, 相对峰面积的 RSD 为 6.12%~58.75%, 10 批样品的相似度均大于 0.9。结论 本方法简单可靠, 可用于小叶黑柴胡药材的质量控制。

**关键词:**小叶黑柴胡; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 相似度评价

**中图分类号:**R282.7 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2008)10-1560-03

### HPLC Fingerprint of *Bupleurum smithii* var. *parvifolia*

LIU E-hu<sup>1,2</sup>, CAI Guang-ming<sup>1</sup>, ZHU Hai-sheng<sup>1</sup>, HUANG He-hui<sup>1</sup>, ZHOU Wei<sup>1,2</sup>, XIONG Han-hui<sup>1,2</sup>

(1. 302 Hospital of PLA & PLA Institute of Chinese Materia Medica, Beijing 100039, China; 2. School of Pharmacy, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410004, China)

**Abstract: Objective** To establish the HPLC fingerprint of *Bupleurum smithii* var. *parvifolia*.

**Methods** Kromasil C<sub>18</sub> column was used, with acetonitrile and water as the mobile phase in gradient mode, the flow rate was 1.0 mL/min, and the detection wavelength was 260 nm. **Results** The HPLC fingerprint of *B. smithii* var. *parvifolia* was established; There were 14 common peaks in the fingerprint of ten samples. The RSD of the relative retention time of the common peaks was 0.02%—1.49% and the RSD of the relative peak area was 6.12%—58.75%. The similarity of ten batches of samples was over 0.9. **Conclusion** The method is simple, reliable, and can be used for the quality control of *B. smithii* var. *parvifolia*.

**Key words:** *Bupleurum smithii* Wolff var. *parvifolia* Shan et Y. Li; HPLC; fingerprint; similarity evaluation

小叶黑柴胡 *Bupleurum smithii* Wolff var. *parvifolia* Shan et Y. Li 主要分布于我国的青海、宁夏、西藏等地, 并作柴胡药用, 在青海为商品柴胡的主流品种, 具有解热、抗炎、镇痛、保肝和增强免疫的作用<sup>[1]</sup>, 入药部位主要为干燥地上部分, 其化学成分主要包括黄酮及其苷类(如槲皮素、芦丁等)、木脂素类、香豆素类、少量皂苷类等。由于受气候、生态环境的影响, 不同生长地区的小叶黑柴胡药材中所含的成分差别较大, 如果只针对其中某个特定有效成

分或指标成分进行定性、定量分析, 不能够有效的控制药材质量。为进一步开发利用小叶黑柴胡这一丰富资源, 笔者采用高效液相色谱法建立了小叶黑柴胡药材的指纹图谱, 并对 10 批小叶黑柴胡药材进行了相似度评价, 为药材的质量控制提供了更为科学有效的方法。

#### 1 仪器与试剂

HP1100 高效液相色谱仪、四元泵、二极管阵列检测器、HP 色谱工作站(美国安捷伦公司), KQ—

收稿日期: 2008-01-02

作者简介: 刘鄂湖(1981—), 男, 湖南娄底人, 硕士研究生, 主要从事中药新药研究与开发工作。 Tel: (010)66933324

E-mail: shenqian01@163.com

\* 通讯作者 蔡光明 Tel: (010)66933323 E-mail: cgm1004@vip.sina.com