

提示鳖甲伪品还有其他来源。至于其原动物是哪一种鳖, 还需进一步研究。而收集的 6 块鳖甲皆为正品, 由于野生鼋及斑鼋几乎绝灭, 山瑞鳖数量亦不多^[9], 因此这几种鳖掺伪的可能性不大。药材鳖甲伪品可能为一些从东南亚进口的鳖类。

在位点特异性鉴别引物设计时, 我们选择了鳖科 4 个属的 4 种代表动物以及 JP2 进行序列分析, 基本上包括了鳖甲常见伪品的原动物种类。又经过 10 件鳖甲样品鉴别试验, 鉴别引物 IT-L02 和 IT-H02 能够特异性的鉴别出全部中华鳖样品。该鉴别引物的理论 T_m 值, IT-L02 为 72, IT-H02 为 68。有了这对鳖甲鉴别引物后, 当鳖甲样品需要鉴定时, 只要从中抽提出 DNA, 鉴别引物进行 PCR 扩增, 经琼脂糖凝胶检测, 即可鉴别出真伪。

运用位点特异性引物鉴定中药材已在蛇类、龟甲等药材中取得成功^[10-12]。本研究设计的位点特异性鉴别引物可以配制成鉴定试剂盒, 从而便于药检部门用该分子标记技术鉴定鳖甲。

参考文献:

- [1] 中国药典[M]. 1995 年版. 一部.
- [2] 张孟闻, 宗 榆, 马积藩. 中国动物志[M]. 爬行纲. 第一卷. 总论. 龟鳖目. 鳄形目. 北京: 科学出版社, 1998.
- [3] 李军德, 涂海宁, 赵丽云, 等. 鳖甲的生药学研究[J]. 中国中药杂志, 1996, 21(9): 518-522.
- [4] 周晓英. 鳖甲与鼋甲的鉴别[J]. 中药材, 1998, 11(1): 32.
- [5] 王亚明, 周开亚, 吴 平, 等. 中药材龟板和鳖甲中 DNA 的提取与扩增[J]. 药学报, 1996, 31(6): 472-476.
- [6] 吴 平, 周开亚, 徐珞珊, 等. 用聚合酶链式反应产物直接测序技术鉴定中药材鳖甲[J]. 中国药科大学学报, 1998, 29(1): 28-30.
- [7] 刘忠权, 王义权, 周开亚. 从高温高压蒸煮过的中华鳖甲和骨骼中提取及扩增 DNA[J]. 中草药, 2000, 31(5): 343-345.
- [8] 吴 平, 周开亚, 杨 群. 亚洲产淡水和陆生龟类 12S rRNA 基因片段的序列分析和系统发生研究[J]. 动物学报, 1999, 45(3): 260-267.
- [9] 赵尔宓, 马积藩, 马长夫, 等. 中国濒危动物红皮书——两栖类和爬行类[M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [10] 王义权, 周开亚, 徐珞珊, 等. 金钱白花蛇及其伪品的 *Cyt b* 基因片段序列分析及 PCR 鉴别研究[J]. 药学报, 1998, 33(12): 941-947.
- [11] Wang Y Q, Zhou K Y, Xu L S, et al. Authentication of an animal crude drug, Zaoocys, by diagnostic PCR [J]. Biol Pharm Bull, 2000, 23(5): 585-588.
- [12] 刘中权, 王义权, 周开亚, 等. 中药材龟甲及原动物的高特异性 PCR 鉴定研究[J]. 药学报, 1999, 34(12): 941-945.

红树莓植株再生系统的建立

肖 娅 萍, 王 喆 之, 张 志 勤, 刘 全 宏

(陕西师范大学生命科学院, 陕西 西安 710062)

摘要: 目的 建立红树莓的再生系统, 短期内获得大量优质种苗。方法 利用红树莓的茎尖和茎段作为外植体, 采用正交实验设计筛选培养基。结果 筛选出了红树莓愈伤组织、不定芽及不定根的最佳诱导培养基, 在实验室建立了程序简单、重复性好的再生系统, 实现了红树莓组培苗的快速繁殖。结论 用 MS 培养基作为基本培养基, 附加 BA 0.2 mg/L + NAA 1.0 ~ 1.5 mg/L 适用于愈伤组织的诱导; 附加 BA 1 mg/L + NAA 0.1 ~ 0.2 mg/L + GA₃ 6 ~ 8 mg/L + CH 300 mg/L 适于芽的诱导; 附加 BA 1 mg/L + NAA 0.1 mg/L + GA₃ 2 mg/L 适于芽的繁殖; 附加 IBA 0.1 mg/L + NAA 0.5 mg/L 适于根的诱导。

关键词: 红树莓; 组织培养; 植株再生系统; 快速繁殖

中图分类号: R 282.13 文献标识码: B 文章编号: 0253-2670(2001)08-0738-04

Establishment of plantlet regeneration system of *Rubus idaeus*

XIAO Ya-ping, WANG Zhe-zhi, ZHANG Zhi-qin, LIU Quan-hong

(College of Life Science, Shanxi Normal University, Xi an Shanxi 710062, China)

Abstract: **Object** To establish a plantlet regeneration system of *Rubus idaeus* L. for the purpose to obtain a large number of high quality seedling in a short time. **Methods** Stem apex and part of the stem were used as the explant and the optimal culture media and conditions were selected by orthogonal design. **Results** An optimum culture medium for the induction of callus, adventitious bud and root was obtained which can be carried out in the laboratory with comparative ease and good repeatability. **Conclusion** A basic medium + BA 0.2 mg/L + NAA 1.0 ~ 1.5 mg/L was most suitable for the induction of callus; a

收稿日期: 2001-02-08

作者简介: 肖娅萍(1956-), 女, 1981年2月毕业于陕西师范大学生物系, 副教授。主要从事植物学及植物组织培养方面的教学与科研工作。近年来先后承担国家自然科学基金3项, 省部级研究基金1项。曾分别获得陕西省教委二等奖2项, 省政府三等奖2项, 发表学术论文20余篇。

medium + BA 1 mg/L + NAA 0.1 ~ 0.2 mg/L + GA₃ 6 ~ 8 mg/L + CH 300 mg/L was good for the induction of bud; a medium + BA 1 mg/L + NAA 0.1 mg/L + GA₃ 2 mg/L was suitable for propagation of the bud; and the basic medium + IBA 0.1 mg/L + NAA 0.5 mg/L was good for the induction of root.

Key words: *Rubus idaeus* L.; tissue culture; plantlet regeneration system; rapid propagation

红树莓 *Rubus idaeus* L. 又称覆盆子, 为蔷薇科 (Rosaceae) 悬钩子属 (*Rubus*) 多年生落叶半灌木。其果实为聚合果, 是一种营养丰富的水果, 可鲜食也可制作果酱。其糖含量可与苹果、梨及柑桔相近, 但其 Vit E 和 SOD (过氧化物歧化酶) 含量为水果之最, 且属高钾低钠果品, 为理想的保健食品^[1-3]。华盛顿州立大学的研究报道, 红树莓所含的鞣化酸抗癌物质大大高于核桃、草莓和越橘等, 被誉为癌症杀手。据前苏联的研究报道, 每 100 g 红树莓含有水杨酸 0.5 ~ 2.5 mg, 可用作发汗剂, 是治疗感冒、流感和咽喉炎的良好降热药。此外红树莓的根浸于酒中可养筋活血、消炎退肿, 茎叶煎水对于痔疮的治疗也有一定的效用。为此, 红树莓是一种具有开发潜力的药用植物。目前国内仅有小面积栽培, 产量较低, 远满足不了市场的需求。本文利用引进的优良红树莓品种进行组织培养, 建立红树莓再生系统, 在短期内可获得大量种苗, 为进一步获得脱毒红树莓苗及快速繁殖具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 材料: 材料取自陕西省果树研究所, 外植体为茎尖和茎段, 茎尖在早春腋芽刚萌动或长出 1 ~ 1.5 cm 嫩茎时剥取。茎段采用新梢先端基本未木质化的部分。

1.2 方法

1.2.1 无菌材料的获取: 外植体流水冲洗 0.5 ~ 2 h 后, 剪成带单芽的茎段, 置于三角瓶中, 70% 酒精处理 15 ~ 20 s, 0.1% 升汞表面消毒 7 ~ 15 min, 无菌水冲洗 4 ~ 5 次, 除去消毒液, 无菌条件下接种于起始培养基上。

1.2.2 培养基及培养条件:

a) 起始培养基: 采用 1/2 MS 培养基, 不添加任何激素, 附加 2% 的蔗糖, 0.5% ~ 0.8% 的琼脂粉, 调节培养基 pH 5.8 ~ 6.2, 于 0.11 MPa 压力和 121 温度下灭菌 25 ~ 35 min。

b) 诱导及增殖培养基: 为观察培养基成分对外植体生长发育、愈伤组织形成及分化、不定芽以及不定根发生的影响, 我们设置了三组诱导及增殖培养基, 分别用于诱导愈伤组织、不定芽的发生和增殖及根系的发生。三组分别用 MS 培养基和 B₅ 培养基作为基

本培养基, 附加不同浓度的 BA、IBA、NAA、GA₃、CH 等。诱导芽和愈伤组织的培养基加有 3% ~ 4% 的糖; 诱导根的培养基则加有 1.5% ~ 2% 的糖。培养基附加 0.5% ~ 0.8% 的琼脂粉, pH 5.8 ~ 6.2。

c) 培养条件: 培养室的温度保持 (25 ± 3) °C, 每天光照 10 ~ 12 h, 照度为 2 000 ~ 3 000 lx。

1.2.3 组培苗的快速繁殖: 取生长健壮的试管苗插植于增殖培养基中, 待试管苗长至 3 ~ 5 个节时, 剪取每苗近上方的几个节切段, 分别插植于增殖及根诱导培养基中进行培养。

1.2.4 试管苗驯化与移栽: 分别采用常规炼苗和生根-驯化一次完成法。¹ 常规炼苗法: 将已生长出根的培养瓶移入塑料大棚内, 自然光下壮苗 20 ~ 30 d, 打开器皿盖, 让小苗逐渐适应自然条件, 炼苗 3 ~ 5 d 后, 用清水洗去组培苗根部的培养基, 并剔除异常形态苗如玻璃苗、白化苗等, 将选好的组培红树莓苗假植于营养袋中, 营养袋集中放置在塑料大棚内。待营养袋中小苗生长至 6 ~ 8 片叶时, 可定植于大田。^④ 生根-驯化一次完成法: 剪取红树莓组培苗近上方的几个节切段, 插植于无糖生根培养基中进行培养, 待茎基部略膨大时 (约 8 ~ 15 d), 将培养瓶移入塑料大棚内, 半开放式培养, 15 ~ 25 d 后, 直接移入沙床。

2 结果与分析

2.1 红树莓再生系统的建立

2.1.1 外植体的灭菌: 植物组织培养的关键首先在于能否建立起无菌外植体。红树莓植株茎上有较多的刺, 常规表面消毒很困难, 为此我们采用了以下措施:

¹ 室内预培养: 将枝条用水冲洗干净后, 插入自来水中在室内培养, 促使其生出新枝, 用新枝作为外植体。

^④ 多次灭菌: 将外植体用自来水冲洗后, 置入 1% 次氯酸钠溶液中浸泡 1 h, 蒸馏水洗 2 ~ 3 次, 次日再置入 2% 次氯酸钠溶液中浸泡 30 min, 蒸馏水洗 2 ~ 3 次。然后常规升汞灭菌。

^④ 添加抗生素: 为防止某些侵入材料内部的病菌影响初代培养, 我们在培养基中添加了青霉素、链霉素等抗生素, 结果发现, 对于红树莓的组织培养而言, 青霉素的杀菌效果较好。

通过上述方法处理后, 灭菌效果明显, 污染率降

低,很快得到初代培养物。

2.1.2 培养基的筛选:在植物的组织培养中,培养基的种类、成分很多,而且这些成分之间还有相互影响和相互作用,所以首要的问题是找出最佳培养基

及最适合的条件。为此,我们采用正交实验设计了用于不同培养目的(如愈伤组织诱导、芽诱导、芽繁殖、根诱导等)的培养基成分。经多次筛选后的培养基组成见表 1。

表 1 红树莓培养基成分及生长状况

序号	用途	植物生长物质及添加物(mg/L)					生长状况
		BA	NAA	GA ₃	IBA	CH	
1	愈伤组织诱导	0.2	0.7				略显水浸状,生长缓慢,褐色
2		0.2	1				浅黄色,生长良好
3		0.2	1.5				浅黄色,生长良好
4	芽诱导	1	0.01	6		300	不定芽少,健壮
5		1	0.02	8		300	腋芽多,健壮
6		1	0.01	10		300	不定芽密集,细弱
7	芽繁殖	0.8	0.1	2			芽生长较快
8		1	0.1	2			芽生长快
9		3	0.1	2			芽生长较快
10	根诱导		0.5		0.1		根数目多、生长快
11			1		0.2		根数目少、生长缓慢
12			0.5		0.2		根数目多、生长快、细弱

由表 1 可知,红树莓在筛选后的各种培养基上均可生长,但是就愈伤组织培养而言,添加 NAA 在 1~1.5 mg/L 时,外植体培养 15~25 d,基部长出微黄色的愈伤组织,继续培养 20~30 d,愈伤组织变大,部分愈伤组织质地变硬、颜色逐渐变成浅绿色。将愈伤组织分别接入 1/4、1/2、3/4 号培养基继续培养 10 d 左右,这些致密浅绿的愈伤组织上开始出现胚状体及芽。对于芽的诱导,主要在培养基中加入 BA,利用细胞分裂素的持续作用,使腋芽不断分化和生长,逐渐形成芽丛,经反复切割,转移到新培养基中大量培养,便可得到大量的芽。BA 的浓度为 1 mg/L 时效果最好。在不定根的诱导中,植物生长物质起决定作用,生长素类均有诱导根的作用,红树莓不定根的诱导在培养基加入 0.5 mg/L 的 NAA 和 0.1 mg/L 的 IBA 时,根不仅生长得快而且比较粗壮,数目相对也多。

培养结果表明:植物生长物质对红树莓的组织培养影响较大的有 GA₃、NAA、IBA 及 BA。其中 GA₃ 有助于芽的萌发和生长,但浓度超过 6 mg/L 时才有显著作用,这可能与经高压灭菌后 GA₃ 效用降解有关。NAA 诱导愈伤组织的形成效果明显,但其浓度大于 0.5 mg/L 时则抑制胚状体的产生和芽的发育。CH 对胚状体的形成及芽的分化有一定的作用,但浓度过大时影响试管苗的生长。IBA 诱导根的分化最好,而对于芽的生长及分化则不明显。

从表 1 还可看出,培养基改良后对大多数红树莓的生长有利,部分植株生长势很好。整体而言,在 MS 培养基上的培养效果好于 B₅ 培养基。

由于从愈伤组织诱导芽分化,可能会引起遗传性变化^[4]。在红树莓的组培过程中,我们特别注意了从外植体直接诱导腋芽形成芽丛或诱导不定芽。以保持其遗传稳定性。表 1 中可看出:1/2 号培养基对于腋芽的诱导效果最好,而 1/4 号培养基诱导不定芽较好。

经过上述工作,我们利用引进的优良品种,在实验室建立起了程序简单、重复性好的红树莓再生系统。

2.2 红树莓再生系统建立过程中有关问题的讨论

2.2.1 红树莓外植体褐变问题:植物组织培养中的褐变严重影响外植体的生长和分化。褐变是由于存在于组织中的多酚氧化酶被激活,使细胞的代谢发生变化,酚类物质被氧化后产生棕褐色的醌类物质,逐渐扩散至培养基中,抑制其它酶的活性,对外植体造成明显毒害,甚或导致所有外植体死亡^[5]。在红树莓的组培中,也出现了这类问题。经过反复摸索、实验,我们采取了两种措施:①连续转移法:即在接种后 1 d 便转入新培养基,2 d 后再转,通常连续转 5 次,便可克服褐变。其目的是当酚类氧化形成的醌类尚未扩散至培养基中,对植物产生毒害时,该培养基就被换掉了。④抗氧化剂法:将外植体常规表面消毒后,先置入加有 PVP(聚乙烯吡咯烷酮)或抗坏血酸的液体培养基中进行振荡培养,3~5 d 后,在无菌条件下取出外植体,用滤纸将其表面吸干净后,接入固体培养基,可有效地减轻醌类物质的毒害。

2.2.2 影响红树莓组培苗快速繁殖的部分环境因子:通常在组织培养过程中,提高繁殖速度的方法不外乎改进培养基和改善培养条件等。我们在这两方面也做了大量工作,筛选出了适合红树莓快速繁殖

的培养基和适宜的培养条件。繁殖指数: 5~8/30 d。培养基的筛选如前所述, 培养条件主要考虑了温度及光照等因子:

1) 温度: 不同植物增殖的最适温度不同。大多数植物的最适温度为(25±3)^[4], 红树莓的培养最初也是在该温度下培养, 但植株生长速度过快, 苗较弱, 不易生根。考虑到引进的红树莓品种原产地的生态环境及所处的温度条件, 经多次实验发现, 采用(23±2) 的温度有利于红树莓快速繁殖。

2) 光照: 光对组培苗的生长繁殖有明显的影响, 表现在光照、光质和光周期等各方面。在本实验中我们仅观察了光照及光周期对红树莓组培苗的影响。

¹ 光照: 光照对不同植物生长的影响有所差异, 当光照低于 500 lx 时, 红树莓生长速度减慢, 部分幼嫩的叶子颜色变浅。光照在 1 500~3 000 lx 时, 红树莓生长发育正常, 腋芽不断生长分化, 形成芽丛, 处

于快速繁殖期。④光周期: 红树莓对光周期不很敏感, 12~18 h/d 光照下均可正常生长。

2.3 红树莓的生根与驯化: 红树莓再生系统产生的大量组培苗, 必须再转入生根培养基或直接栽入基质, 进一步长大才能成苗。在实验中我们分别采用了常规炼苗法与生根—驯化一次完成的方法。前者生根率 98%, 成活率 90%, 后者生根率 100%, 成活率 98%, 可见生根—驯化一次完成的方法, 既简化了移栽过程, 不影响多栽成活率, 又降低了成本。

参考文献:

- [1] 单广波. 果树新品—红树莓[J]. 中国林业, 1999(7): 9-10.
- [2] 故建刚. 黑树莓的组织培养[J]. 植物生理学通讯, 1994, 30: 356.
- [3] Partrik P M. Yield compensation of red rusberry following primary bud removal[J]. HortSciense, 1994, 29(6): 701.
- [4] 曹孜义, 刘国民. 实用植物组织培养技术教程(修订本)[M]. 兰州: 甘肃科学技术出版社, 1998.

水田七的生药鉴定

彭 菲¹, 胡永芳¹, 刘建存²

(1. 湖南中医学院药学院, 湖南 长沙 410004; 2. 湖南德康制药有限公司, 湖南 长沙 410013)

摘要: 目的 为用药准确和进一步开发利用该植物资源、制订药材标准提供依据。方法 直观鉴别、显微鉴别、理化鉴别相结合, 并对能否扩大药用部位进行初步探讨。结果 鉴别特征突出四点: ¹ 块茎呈肾形弯曲。④薄壁细胞多边形, 排列紧密间隙小。④淀粉复粒较多。¼ 含草酸钙针晶。块茎在紫外吸收光谱波长 241 nm 处有明显的吸收峰, 不定根则没有。结论 鉴别特征明显、易掌握; 块茎入药时必须去除其上的不定根。

关键词: 水田七; 性状鉴定; 显微鉴定; 紫外分光光度法

中图分类号: R 282. 710. 3

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2001)08-0741-03

Pharmacognostical identification of *Schizocapsa plantaginea*

PENG Fei¹, HU Yong-fang¹, LIU Jian-cun²

(1. College of Pharmacy, Hunan College of TCM, Changsha Hunan 410004, China; 2. Hunan DEKANG Pharmaceuti-cal CO., Ltd., Changsha Hunan 410013, China)

Abstract: **Object** To provide a basis for the further development, proper utilization and formulation of a standard for the medicinal materials. **Methods** By macro and microscopic studies in combination with physicochemical identification. The possible therapeutic value of other parts of the plant was briefly discussed. **Results** Four obvious distinctive features were observed: ¹ . Stem tuber showed a curved kidney like shaped. ④. Parenchymatous cells were polygonal shaped and densely packed together with limited intercellular spaces. ④. Rich in compound starch grains, and ¼ . Crystalline calcium oxalate. Clusters can be seen. The tubers had an absorbance peak in UV spectrum at λ_{241 nm}, but its adventitious root was devoid of such absorbance peak. **Conclusion** The distinctive features are clear and can be mastered easily. The adventitious roots must be discarded when the tubers were used as medicine.

Key words: *Schizocapsa plantaginea* Hance; characteristic identification; microscopic identification;

收稿日期: 2000-08-10

作者简介: 彭 菲(1963-), 女, 湖南长沙人, 副教授, 植物学硕士, 主要从事药用植物学教学和科研工作。研究方向为中药生物技术。Tel: 0731-5604460