

运用组织培养技术筛选盾叶薯蓣新品种

王志安¹, 王日照^{2*}

(1. 浙江省中药研究所, 浙江 杭州 310023; 2. 浙江省仙居县农业区划办公室, 浙江 仙居 317300)

摘要: 目的 繁育优质高产薯蓣新品种。方法 在筛选最佳的培养条件和外植体类型的基础上, 以高皂素含量和农艺性状表现突出的种质为材料, 开展快速繁育技术研究。结果 盾叶薯蓣的不同种质间产皂素含量有较大差异; 以叶柄为外植体在添加有 4 mg/L 2, 4-D 和 1.5 mg/L 6-BA 的 LS 培养基上诱导愈伤组织, 其出愈率可达 75.2%, 经不添加 2, 4-D 的 LS 培养基培养可产生再生植株; 共获得源于高皂素含量种质的试管苗 8 136 株, 田间成苗 6 830 株, 皂素含量达 2.48%。结论 运用组织培养技术选育优质高产薯蓣新品种是可行的。

关键词: 盾叶薯蓣; 组织培养; 新品种选育

中图分类号: R 282.21

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2002)04-0361-03

Selecting new species of *Dioscorea zingiberensis* contained high saponin by tissue culture

WANG Zhi-an¹, WANG Ri-zhao²

(1. Zhejiang Institute of TCM, Hangzhou Zhejiang 310023, China;

2. Zhejiang Xianju Agricultural Office, Xianju Zhejiang 317300, China)

Key words: *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright; tissue culture; selecting new species

盾叶薯蓣 *Dioscorea zingiberensis* C. H.

Wright 为薯蓣科植物, 其根茎所含的皂素是目前合成避孕药等多种甾体激素的起始原料, 国内外需求量很大。致使盾叶薯蓣野生资源长期遭受破坏性采挖, 自然恢复能力急剧下降。近年来国内一些单位开展了人工引种栽培技术研究, 由于引种的种质缺乏均一性, 是一个相对一致的混合群体, 田间整齐度较差, 致使产量和含量不十分理想并且皂素含量有逐年下降的趋势。而皂素化工企业对薯蓣的含量有明确的要求, 若皂素含量低于 1.5%, 就没有生产利润。因此, 高皂素含量的薯蓣新品种选育已成为解决薯蓣原料供不应求和保护薯蓣有限的野生资源的首选课题。本研究从高皂素含量种质的单株筛选入手, 通过组织培养快速繁育, 以获得可稳定遗传的高皂素含量的薯蓣新品种。

1 材料和方法

1.1 种质收集: 从盾叶薯蓣原产地陕西、湖北收集种质, 对收集到的种质开展形态学和外观性状分析, 选取种茎肥大、主茎较长的根状茎, 合计选得 108 个单株, 经编号后测定皂素含量和熔点。选取皂素含

量高于 2.5% 的种质 28 个。

1.2 外植体种类: 以根状茎、幼嫩茎切段、叶柄、叶子为外植体。

1.3 皂素含量和熔点测定: 每个种质准备 2 份样品, 每份 10 g 左右, 分别加入 2 mol/L 盐酸 300 mL, 水浴上加热水解 3.5 h, 吸滤, 用水洗去酸性, 残渣在 80 ℃ 烘干, 然后装入纸筒, 在脂肪抽提器中用石油醚 60 ~ 90 ℃ 抽提完全, 提取液蒸浓放冷, 滤集结晶, 用石油醚洗 2 次, 结晶在 80 ℃ 烘干后精确称重, 计算每份样品的皂素含量平均值。用毛细管法测定皂素的熔点。

1.4 培养基和培养方法: 常规方法灭菌后接种于附加有 4 mg/L 2, 4-D 和 1 mg/L 或 1.5 mg/L 6-BA 的 LS 培养基上, 培养基的蔗糖含量为 3%, 琼脂浓度为 0.8%, pH5.8, 诱导植株再生的培养基与上述培养基相同, 只是不添加 2, 4-D, 培养温度为 (21 ± 2) ℃。

2 结果和讨论

2.1 种质评价: 对收集到的种质开展形态学和外观性状分析, 选取种茎肥大, 主茎较长的根状茎, 合计

* 收稿日期: 2001-09-08

基金项目: “八五”浙江省攻关项目 (85-02-39) “薯蓣引种栽培和选育种研究”的一部分。

作者简介: 王志安 (1963-), 男, 浙江肖山人, 高级工程师, 硕士, 长期从事药用植物栽培育种和种质资源保护等研究工作, 曾主持国家 “九五”攻关项目浙贝母选育种研究, 国家 “九五”攻关项目元胡等 5 种药材 GAP 研究等, 目前正在主持国家 “十五”攻关项目益母草等 3 种药材 GAP 研究等项目, 是浙江省跨世纪学术和技术带头人培养人员。

Tel: 0571-85229946 0571-85229698 E-mail: wangshou@mail.hz.zj.cn

选得 108 个单株,经编号后测定皂素含量和熔点。测定结果表明,有 28 个单株的皂素含量高于 2.5% 并且熔点都在 200 以上,目前工业化生产的皂素含量仅限为 1.6%。因此,若这些种质是稳定遗传的,则选育高皂素薯蓣新品种的可能性和把握性就很大,为了进一步明确这些材料的特性,本研究开展了种质的形态性状、生长发育规律、丰产性等研究。结果表明(表 1),从总体上看 28 个材料的生长均较旺盛,田间的生长整齐度较好,其中 4 号生长极为旺盛,主要表现为植株形态建成较早,根深叶茂,茎秆粗壮,出苗较早(3 月 16 日)且出苗迅速,枯苗期较迟(11 月 29 日),有效生长期较长,有利于养分的积累和转化,具备良好的高产基础。从表 3 的产量测定结果也证明了这一点,4 号的根状茎增重率达到 30.1 倍,这是极好的丰产性状和经济性状,同时还可降低下种量和下种时的种子成本。

2.2 不同外植体对愈伤组织形成的影响:从表 2 可见,4 种外植体在 LS 培养基上均可形成愈伤组织,但不同的外植体和不同的培养条件对愈伤组织的形成有较大影响,以根状茎为外植体,在添加有 1 mg/L 6-BA 的培养基中培养的出愈率为最低,其出愈率为 26.7%,以叶柄为外植体,在添加有 1.5 mg/L 6-BA 的培养基中出愈率为最高,其出愈率为 75.2%,说明薯蓣组织在特定的培养条件下是比较容易诱导愈伤组织的,这为进一步开展利用组织培养技术快速形成愈伤组织打下了坚实基础。

表 1 优质种质产量和含量情况					
种质 编号	下种 重(g)	收获 重(g)	增殖 率(倍)	含量 (%)	熔点 ()
1	141	4 208	29.8	2.86	203~206
2	68	1 561	22.9	2.73	204~207
3	70	1 992	28.5	2.86	203~206
4	103	3 106	30.1	2.95	203~206
5	146	3 994	27.0	2.73	203~205
6	51	756	14.8	2.89	202~205
7	141	3 529	25.0	2.76	201~203
8	140	3 618	25.8	2.83	202~204

2.3 植株再生技术研究:愈伤组织断代培养到不加 2,4-D 的 LS 培养基上后,一般 7 d 左右就可见根样小突起,培养 20 d 后有一些小突起会直接发育成小苗,但大部分则发育成根状茎样组织,进而发育成小苗。小苗经 7 d 左右的炼苗,移栽到大田,都有较好成苗率,最高可达 85.3% (表 3)。

2.4 再生植株的皂素含量研究:从表 3 可见,种质经过组织培养形成的再生植株,其皂素含量均有不

表 2 培养基和外植体对愈伤组织形成的影响				
外植体 类型	6-BA (mg/L)	接种 数(块)	出愈 数(块)	出愈 率(%)
根状茎	1.0	105	36	26.7
	1.5	110	36	32.7
幼嫩茎切段	1.0	108	52	48.1
	1.5	10	38	35.2
叶柄	1.0	117	65	60.7
	1.5	109	82	75.2
叶子	1.0	105	45	42.9
	1.5	105	36	34.3

表 3 获得的试养苗数量和成苗情况及含量					
编号	原含 量(%)	试管苗 数(株)	田间成苗 数(株)	成苗 率(%)	新含 量(%)
1	2.90	3 152	2 638	83.7	2.20
2	2.81	2 103	1 736	85.5	1.93
3	2.91	985	732	74.3	1.97
4	2.87	1 768	1 508	85.3	2.53
5	2.91	1 239	896	72.3	2.00
6	3.00	1 135	635	55.9	2.16
7	3.10	2 018	1 462	72.4	1.73
8	2.85	673	381	56.6	1.89

同程度的下降,这主要是新形成的植株生长量相对较小,皂素积累还未达到峰值的原因引起的。当然,在种质收集评价时的皂素含量是基因型、表现型和环境相互作用的结果,并不表示收集到的高皂素含量的种质其后代一定是高皂素含量的。

2.5 快速繁殖优质种质:不论从田间种植的皂素含量测定情况还是试管苗的皂素含量测定情况看,4 号种质均表现突出,且具有较好的农艺性状。因此,本研究集中力量开展了 4 号种质的快速繁育研究,培养方法同前,共诱导出试管苗 8 136 株,田间成苗 6 830 株,成苗率达 83.9%。

2.6 新品种的性状评价:该品种生长极为旺盛,出苗较早,枯苗较晚,茎秆粗壮,根深叶茂,有很好的高产株型,产量测定结果表明,平均增重率达 28.1 倍,皂素平均含量为 2.48%,熔点为 203 ~ 206 。

3 小结

本研究结果表明,盾叶薯蓣的不同种质间皂素含量有较大差异,这为选育种工作提供了选育高含量品种的可能性,当然这种差异是基因和环境共同作用的结果,要选得基因型是高含量的种质,其后代才能是高含量的。

以叶柄为外植体在添加有 4 mg/L 2,4-D 和

1.5 mg/L 6-BA 的 LS 培养基上诱导愈伤组织,其出愈率可达 75.2%,经不添加 2,4-D 的 LS 培养基培养可产生再生植株,共获得源于高皂素含量种质的试管苗 8 136 株,田间成苗 6 830 株,皂素含量达 2.48%。这一结果表明源于高皂素含量的种质,经组织培养和田间种植,其无性后代的皂素含量仍能达

2.48%,说明高皂素含量性状是能稳定遗传的,选育是成功的。

参考文献:

- [1] 乔春峰,檀爱民,董辉,等. 国产闭鞘姜属植物中薯蓣皂甙元的含量测定[J]. 中国药科大学学报, 2000, 31 (2): 156-158.
- [2] 丁志遵,唐世容,秦慧贞,等. 甾体激素药源植物[M]. 北京: 科学出版社, 1983.

RP-HPLC 法同时测定丹参中丹参酮 A 和隐丹参酮的含量

闫豫君¹, 杨广德², 贺浪冲^{2*}

(1. 石河子大学药学院, 新疆 石河子 832002; 2. 西安交通大学药学院, 陕西 西安 710061)

摘要: 目的 研究丹参药材中新的质控指标。方法 采用细胞膜色谱法对丹参中的有效成分进行筛选,在此基础上建立 RP-HPLC 法同时测定丹参中丹参酮 A 和隐丹参酮含量的方法。色谱条件为 Lichrosorb C₁₈ 色谱柱,流动相为甲醇-水 (75:25); 270 nm 下检测; 流速 1.0 mL/min, 室温。药材用甲醇超声处理, 过滤后直接进样分析。结果 丹参酮 A 和隐丹参酮的回收率分别为 101.74% 和 99.28%, RSD 分别为 3.68% 和 1.78%。重现性的 RSD 分别为 1.88% 和 1.35%。所收集的 12 份丹参药材中丹参酮 A 含量为 0.607% ~ 0.148%, 隐丹参酮为 0.073% ~ 0.021%。结论 该方法快速、简便、准确, 当丹参用于治疗心血管疾病时, 可以同时将丹参酮 A 和隐丹参酮作为丹参药材及其制剂的质控指标。

关键词: 丹参; 丹参酮 A; 隐丹参酮; RP-HPLC

中图分类号: R 282.7 文献标识码: B 文章编号: 0253-2670(2002)04-0363-03

Quantitative determination of tanshinone A and cryptotanshinone in radix and rhizome of *Salvia miltiorrhizae* by RP-HPLC

YAN Yu-jun¹, YANG Guang-de², HE Lang-chong²

(1. College of Pharmacy, Shihezi University, Shihezi Xinjiang 832002, China; 2. College of Pharmacy, Xi'an Jiaotong University, Xi'an Shanxi 710061, China)

Key words: radix and rhizome of *Salvia miltiorrhizae* Bge.; tanshinone A; cryptotanshinone; RP-HPLC

丹参为鼠尾草属植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的根, 具有祛瘀止痛, 活血通经, 清心除烦之功效^[1], 为最常用的药材之一。文献报道丹参中的脂溶性部分具有抑菌^[2]、天然抗氧化、抗动脉粥样硬化及明显的抗肿瘤等药理作用^[3]。细胞膜色谱法^[4~6]是筛选中药有效成分的方法之一^[7], 李洪玲^[8]等报道用犬心肌和血管细胞膜色谱模型筛选, 并经血管动脉条和蛙心药理实验, 表明隐丹参酮为丹参的主要活性成分之一。因此, 丹参药材用于治疗心血管疾病时, 隐丹参酮可以作为新的质控指标之一。有关丹参中丹参酮 A 含量测定方法报道较多^[9, 10], 本研究在

活性筛选的基础上, 建立了用 RP-HPLC 法同时测定丹参酮 A 和隐丹参酮含量的方法, 并对 12 份不同产地丹参药材进行了测定。

1 仪器与试剂

1.1 仪器: Waters 液相色谱仪 (包括 486 型紫外检测器, 510 型色谱泵, 7125 型手动进样阀, 美国); ANASTAR 色谱工作站 (奥康科技有限公司); AS5150A 超声仪 (奥特塞恩斯仪器有限公司)。

1.2 试剂: 丹参酮 A (tanshinone A, TS) 和隐丹参酮 (cryptotanshinone, CT) 对照品 (中国药品生物制品检定所); 不同产地的丹参药材 (自购并由西

* 收稿日期: 2001-12-06

基金项目: 陕西省自然科学基金资助项目 (99SM 43)

作者简介: 闫豫君 (1975-), 女, 助教, 1997 年从新疆师范大学化学系毕业至今在石河子大学药学院工作, 现在西安交通大学药学院攻读药物分析研究生, 从事天然药用植物的基础性研究。

* 通信联系人 Tel: 029-5275142。