

金钗石斛的茎段组织培养与植株再生

高培元,陈健妙,甘 铨*

(海南热带植物组织培养研究中心,海南 海口 570216)

摘要: 目的 为了有效加速贵重药用植物金钗石斛的人工繁殖。方法 以带侧芽的金钗石斛嫩茎段作外植体;不同种类的培养基、同种培养基用不同配比的激素进行培养。结果 以 MS培养基附加 6-BA (0.5 mg/L)、NAA (0.2 mg/L) 诱导分化最佳,附加 6-BA (3.0 mg/L)、NAA (0.5 mg/L) 增殖最适,附加 IBA (0.3 mg/L)、NAA (0.1 mg/L) 对生根最适 (生根率 95%)。生根小苗在以椰渣、碎火山石块、碎砖块 (1:1:1) 的基质中覆以干蕨长势良好。结论 为确保金钗石斛资源的保持和可持续利用提供有效途径。

关键词: 金钗石斛;组织培养;植株再生

中图分类号: R282.13 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2002)11-1031-03

Tissue culture of stem segment and plantlet regeneration of *Dendrobium nobile*

GAO Pei-yuan, CHEN Jian-miao, GAN Quan

(Hainan Tissue Culture Research Center for Tropical Plant, Haikou 570216, China)

Abstract **Object** To speed up the artificial propagation of the costly medicinal plant *Dendrobium nobile* Lindl. **Methods** The tender stems with lateral buds were tried as the explants and cultured on various culture media with different portions of hormon. **Results** The best medium for bud induction was the MS basic medium with addition of 6-BA (0.5 mg/L), NAA (0.2 mg/L), while MS with the addition of 6-BA (3.0 mg/L) NAA (0.5 mg/L), was suitable for propagation, MS with addition of IBA (0.3 mg/L), NAA (0.1 mg/L) was better for root growing, the striking growth rate was up to 95%. The young sprout was cultured fine on the base material mixed with coco crumbs, volcanic rocks and brick fragments (1:1:1) and covered by dried pteridophyte. **Conclusion** To provide the effective ways to reserve the resources of *D. nobile* and last its utilization.

Key words *Dendrobium nobile* Lindl.; tissue culture; plantlet regeneration

金钗石斛 *Dendrobium nobile* Lindl. 属于兰科植物,多年生草本,其茎含有生物碱,主要为石斛碱 (dendrobine)、石斛次碱 (nobilonine)、6-羟基石斛碱 (6-hydroxydendrobine)、多糖和多种游离氨基酸^[1]等。金钗石斛总生物碱含量为 0.75%,多糖含量为 22.50%,属药用石斛上品。金钗石斛味甘平,具有滋阴清热、生津益胃、润肺止咳、抗衰老、增强人体免疫力、抗癌等功效。近年来从金钗石斛提取的菲类化合物在临床及中药复方中广泛用于肺癌、卵巢癌、白血病、抗衰老、肝病、眼病^[2]等。石斛属于附生植物,对生长环境要求苛刻,不能栽培于普通土壤中,多附生于大树干上或石壁石缝间。石斛开花多、结果少,种子细如粉尘,需与真菌共生才能萌发,有性繁殖困难^[3]。加之叶面小,光合强度低,对温暖湿润的气候条件要求十分严格,生长发育缓慢。为了解决石斛的原材料瓶颈,现在国内已有利用组织培养快繁铁皮石斛、霍山石斛,但金钗石斛作为贵重药用

石斛之一,国内目前还没有规模栽种。本研究有助于短期内提供大量的试管苗,通过人工栽培扩大资源,确保金钗石斛资源的保持和可持续利用。

1 材料和方法

1.1 材料:金钗石斛来源于重庆中医药研究院,种于以消毒碎椰块为基质的条形木箱中,一个月后,选取生长健壮、无病虫害的植株,剪取新萌嫩茎段做为外植体。

1.2 方法

1.2.1 无菌材料的获取:将嫩茎去掉叶片,用棉花蘸淡肥皂水轻轻擦洗,自来水冲洗 0.5 h,超净工作台上用 70% 酒精消毒 30 s,2% 次氯酸钠溶液灭菌 8 min,无菌水冲洗 5 遍后,用镊子轻轻将膜质叶鞘剥去,切取带有芽眼的嫩茎段 (长约 1~2 cm),稍斜接种于芽诱导培养基上。

1.2.2 培养基及培养条件:以 MS B₅ KC 为基本培养基,分别附加不同种类及浓度的激素, pH

5. 4~ 5. 8 具体如下:

a) 芽诱导培养基: I-1 MS+ 6-BA (0. 5 mg / L)+ NAA (0. 2 mg /L)+ 卡拉胶 (5. 1 g /L)+ 蔗糖 (30 g /L); I-2 B+ 6-BA (0. 5 mg /L)+ NAA (0. 2 mg /L)+ 卡拉胶 (10 g /L)+ 蔗糖 (20 g /L); I-3 KG+ 6-BA (0. 5 mg /L)+ NAA (0. 2 mg /L)+ 卡拉胶 (12 g /L)+ 蔗糖 (20 g /L). b) 增殖培养基: P-1 MS+ 6-BA (2. 0 mg /L)+ NAA (0. 5 mg /L)+ 卡拉胶 (5. 1 g /L)+ 蔗糖 (30 g /L); P-2 MS+ 6-BA (3. 0 mg /L)+ NAA (0. 5 mg /L)+ 卡拉胶 (5. 1 g /L)+ 蔗糖 (30 g /L); P-3 MS+ 6-BA (4. 0 mg /L)+ NAA (0. 5 mg /L)+ 卡拉胶 (5. 1 g /L)+ 蔗糖 (30 g /L); P-4 MS+ 6-BA (3. 0 mg /L)+ NAA (0. 2 mg /L)+ 卡拉胶 (5. 1 g /L)+ 蔗糖 (30 g /L); P-5 MS+ 6-BA (3. 0 mg /L)+ NAA (0. 8 mg /L)+ 卡拉胶 (5. 1 g /L)+ 蔗糖 (30 g /L). c) 生根培养基: S-1 MS+ IBA (0. 3 mg /L)+ NAA (0. 1 mg /L) + 卡拉胶 (5. 1 g /L) + 蔗糖 (30 g /L)+ 0. 2% 活性炭. d) 培养条件: 培养温度 (25± 2) °C ,光照 12 h /d,光照度 1 500~ 2 000 lx.

1. 2. 3 组培苗的快速繁殖: 一周后,叶腋处有侧芽萌发,切口处有少量白色粒状愈伤组织形成. 培养 30 d后,等组培芽苗长至 3~ 6个节时,切取茎段上小芽以及带有芽眼的再生嫩茎段在筛选出的最佳芽诱导和增殖培养基上再诱导增殖.

1. 2. 4 试管苗生根及移栽: 当芽长够一定量时,将长至 2~ 3 cm 的丛芽切成单芽转至生根培养基中,待 25 d后,苗壮根粗时,将瓶盖打开,置于自然光下炼苗 3 d,然后取出生根苗,洗去基部培养基,用干蕨类包裹住小苗根部,栽种于分装着椰壳碎块(或碎木块) 碎火山石、碎砖块 (1: 1: 1)的基质中,上覆干蕨,置于通风、75% 遮荫环境下,每天洁水喷雾保湿 1次,一周缓苗后每隔 3 d用 1/5 MS液体叶面喷施^[4]. 10 d后看到有新叶生长和茎节明显变粗,成活率达 85% 以上.

2 结果

2. 1 芽的诱导培养: 接种 15 d后观察结果. 不同的基本培养基诱导侧芽分化明显不同. 其结果如表 1 所示,不同的部位诱导情况不同.

2. 2 同是 MS培养基,不同浓度的 6-BA诱导芽的增殖和不同浓度的 NAA 对诱导壮芽效果不同,如表 2所示.

2. 3 在 MS附加 IBA (0. 3 mg /L), NAA (0. 1 mg /L) 培养基上培养 15 d后观察,根白绿色,条数

不多,短粗,苗长势良好.

表 1 不同基本培养基对芽诱导的影响

培养基	接种茎段	诱导芽数 (个)	芽长势	侧芽萌发率 (%)
I-1	30	76	良好	90
I-2	30	40	好	75
I-3	30	36	弱	58

注: 每个茎段有一个侧芽,顶芽茎段不在计数内;接种 7 d后计数

表 2 在 MS培养基上不同激素对侧芽增殖的影响

培养基	接种数 (个)	侧芽增殖量 (个)	侧芽增殖倍数	芽生长情况
P-1	20	42	2. 10	芽较少、细长
P-2	20	66	3. 30	芽较多、粗壮
P-3	20	92	4. 57	芽数最多、弱小
P-4	20	63	3. 15	芽数多、一般
P-5	20	57	2. 85	芽少、可以

注: 接种 15 d后计数

3 讨论

3. 1 在 6-BA 0. 5 mg /L, NAA 0. 2 mg /L, MS, KC, B培养基诱导侧芽能力不同. 从表 1中可看出, MS培养基上侧芽诱导率最高, B次之, KC最低. 在长势上, B、MS两种培养基上长得都很好, KC长势较弱. 这和霍山石斛的种子及幼苗在 KC培养基上长得比在 MS培养基上有所不同^[5]. KC培养基相对于 B、MS培养基,只是微量元素上有所不同,可能是金钗石斛比霍山石斛对微量元素更敏感些. 值得一提的是,本次实验,接种外殖体中也有带顶芽的(因不统一,没算在计数内) 茎段,但 7 d后开始统计时,顶芽茎段多数只是抽长,只有两个诱导出芽(芽小且多). 这与马森^[6]等研究的罗布麻茎段组织培养结果类似,有可能象他们分析的那样是由于植物内源激素在顶芽与侧芽之间分配差异问题. 金钗石斛的有效成分多聚在生长中心茎上梢部^[7],内源 IAA 含量肯定也以生长最旺盛的茎尖部居多,而 IAA 水平决定顶端优势的强弱^[8],顶端优势太强抑制分芽,适当加点多效唑可能会降低内源 IAA 含量从而促进分芽;也可能是与接种时外殖体切法有关,以上问题尚待进一步研究.

3. 2 在 MS培养基上, 6-BA 浓度为 2. 0~ 3. 5 mg /L时,随着浓度的增高,侧芽增殖倍数随之增大. 但当 6-BA 为 3. 5~ 4 mg /L时,增殖芽虽多却弱; NAA 为 0. 2~ 0. 5 mg /L,有利于壮芽的成长,当为 0. 8 mg /L,壮芽趋势不明显. 从表 2中可看出,当 6-BA 为 3. 0 mg /L时,不管 NAA 浓度是多少,侧芽增殖芽数相差不大,这与夏鸿西、张明^[9]等在石斛植株上做的植物生长调节剂对石斛生长的影响相一致,只是随着一定浓度的增高芽愈壮. 所以,金钗石斛在增殖过程中, 6-BA 以 2. 8~ 3. 2 mg /L 比较合

适, NAA以 0.3~0.5 mg/L合适

3.3 在 MS+ IBA (0.3 mg/L)+ NAA (0.1 mg/L) 培养基上,将金钗石斛小苗接进去 10 d时观察,白绿色的根短粗但根数少,在移栽基质上尽量选取比较透气的材料。据测,野外生长在杏树和喜树上的金钗石斛生物碱含量较生长在其他树种和石头上的总生物碱含量多^[10],据此可适当选取一些粗纤维类的碎椰渣或碎木块铺以碎火山石块(窝状缝隙大),碎砖块当基质,但考虑到苗小、根少,如基质间隙太大不利于固定和小苗吸收肥水,可用干蕨包裹住生根小苗栽种,面上再薄覆一层干蕨,既可保肥水又不影响透气,适合石斛的生长习性,利于快速缓苗,促进壮根生长,为以后移栽地面做好准备。

参考文献:

- [1] 吴庆生,丁亚平,徐玲,等.金钗石斛茎的不同部位中有效成分分析及其分布规律研究[J].中国中药杂志,1995,20(3): 148-149.
- [2] 王康正,高文远.石斛属药用植物研究进展[J].中草药,1997,28(10): 633-635.
- [3] 张明.石斛组织培养研究进展[J].中国中药杂志,2000,25(6): 323-326.
- [4] 石友亭,杨联合,施子棣,等.曲茎石斛放养研究[J].中国中药杂志,1995,20(3): 149-150.
- [5] 于力文.霍山石斛种子试管苗的培养[J].植物生理学通讯,1984(4): 35-36.
- [6] 马森,陆嘉惠,周玲玲,等.资源植物罗布麻的茎段组织培养与植株再生[J].中草药,2001,32(9): 841-843.
- [7] 吴庆生,丁亚平,徐玲,等.金钗石斛的不同部位中有效成分分析及其分布规律研究[J].中国中药杂志,1995,20(3): 148-149.
- [8] Wareing D F. Growth and Differentiation in Plants 3rd Ed [M]. Oxford: Pergamon Press, 1981.
- [9] 夏鸿西,朱利泉,张明,等.植物生长调节剂对石斛生长的影响[J].园艺学报,1999,26(4): 275-276.
- [10] 王康正,高文远.石斛属药用植物研究进展[J].中草药,1997,28(10): 633-635.

不同来源国产血竭的薄层色谱和紫外光谱鉴别

孙胜利¹,宓鹤鸣¹,吴青倩¹,姚庆芳²,胡因铭²,郑有顺^{2*}

(1. 第二军医大学药学院 药物分析教研室,上海 200433 2 广东名盛药业有限公司开发部,广东 广州 510240)

摘要:目的 比较 6种不同来源国产血竭的质量差异。方法 以剑叶龙血树含脂树皮及木质部为原料,采用回流提取、索氏提取、超声提取、低温膨化提取,并与市售的通过传统工艺提取的云南血竭和海南血竭为对照,对它们进行薄层层析和紫外光谱鉴别。结果 薄层对应斑点基本相同,紫外光谱基本一致。结论 6种不同来源的国产血竭的成分基本一致,而以龙血素 C 作为评价指标,其质量存在一定差异。

关键词: 国产血竭;薄层色谱;紫外光谱

中图分类号: R282.710.3

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2002)11-1033-04

Identification of *Resina Draconis* from different source by TLC and UV spectrophotometry

SUN Sheng-li¹, MI He-ming¹, WU Sheng-qian¹, YAO Qing-fang²,
HU Yin-ming², ZHENG You-shun²

(1. Department of Pharmaceutical Analysis, College of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Development, Guangdong Mingsheng Pharmaceutical Co., Ltd., Guangzhou 510240, China)

Abstract **Object** To compare the quality difference of six kinds of *Resina Draconis*. **Methods** Four kinds of *Resina Draconis* were extracted by reflux, Soxhlet method, ultrasonic extraction and cryogenic expansion from bark and cylem with fat in *Dranaena cochinchinensis* (Lour) S. C. Chen and compare with those sold in Yunnan and Hainan, which were identified by TLC and UV spectrophotometry. **Results** Six kinds of *Resina Draconis* were identical basically in TLC and UV. **Conclusion** The components of six kinds of *Resina Draconis* are identical basically, but there are some differences estimated by loureirin C as evaluate index.

Key words *Resina Draconis*; TLC; UV

血竭是珍贵的中药传统品种之一,性平,味甘、咸,有活血祛瘀、消肿止痛、收敛止血之功效,主要用于跌打损伤、内伤瘀痛、外伤出血、溃疡不敛等症。现代医学研究证实,血竭具有改善机体微循环,调整机

体新陈代谢、改善机体免疫功能等作用。血竭的基原包括棕榈科(Palmae)、龙舌兰科(Agavaceae)、豆科(Leguminosae)和大戟科(Euphorbiaceae)等 4 科 5 属 10 余种不同植物的树脂,以往全靠进口,价

* 收稿日期: 2002-10-12

作者简介: 孙胜利(1975-),男,黑龙江佳木斯市人,博士在读,研究方向为心脑血管药理及中药现代化研究。