

6.1 黄芪的采收: 黄芪第 1 年用种子繁殖小苗, 第 2 年定植, 以霜降后收挖的根质量最好、药用成分高, 一般在定植当年的 9~10 月地上部枯萎时采挖根部。黄芪主根深长, 采收时注意不要将根挖断, 应尽量深挖缓拔, 不得挖断或损伤根部, 以免造成减产和商品质量下降。

具体的操作步骤是: 先将地上部分枯萎植株割除, 先从地边挖开深沟, 然后逐渐向内采挖, 尽量保全根, 避免伤皮断根。

6.2 黄芪的初加工: 黄芪的初加工采用晒干自然干燥法。将收获的根按要求分等级, 放在通风向阳处晾晒至柔软不易折断时, 用手捋顺, 揉搓 2~3 次, 去掉表皮泥土, 除去残茎、须根和芦头, 晒至七到八成干时扎成直径 10~20 cm 的小把, 堆闷 1~2 d 后再晒至全干, 此即为条直质紧的成品, 可贮藏或出售。

7 结果

通过对蒙古黄芪道地产区甘肃陇西县黄芪的科技示范试验, 结果表明: 在蒙古黄芪种质繁育、育苗移栽和规范化栽培研究基础上, 形成了蒙古黄芪科

学的繁育技术, 所形成的蒙古黄芪种植生产技术是一种高产高效的生产措施, 对当地蒙古黄芪大面积栽培具有指导意义; 此外, 对蒙古黄芪常见病虫害和有效成分作了初步的研究, 为进一步利用当地的蒙古黄芪打下了基础。

References

- [1] Xiao P G, Yang L. *The Process Technique on Animal Feed and Plant Cultivations as Medicinal—A. membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* Bge. Hsiao (药用动植物种养加工技术—黄芪) [M]. Beijing: China Medico Pharmaceutical Science and Technology Publishing House, 2001.
- [2] Longxi County Ambition Comm ittee. *Longxi County Ambition* (陇西县志) [M]. Lanzhou: Gansu People's Publishing House, 1990.
- [3] Li X Y, Ding J G, Zhang Z J. The key technique of cultivation on *A. membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* Bge. Hsiao [J]. *Agric Techn Comm un* (农业科技通讯), 2000 (8): 13.
- [4] Chen S Z, Ji G W. cultivation technology and economy performance of *A. membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* Bge. Hsiao [J]. *Gansu Agric Sci Techn* (甘肃农业科技), 1999 (7): 46.
- [5] Cheng J S. The key technique of high-yielding and high-quantity of cultivation on *A. membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* Bge. Hsiao [J]. *Gansu Agric Sci Techn* (甘肃农业科技), 1999 (4): 19-20.

EMS 诱变的长春花细胞系突变研究

张秀省^{1,3}, 张荣涛², 曹 岚², 王 勇², 王宁宁², 王淑芳^{2*}

(1. 中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100094; 2. 南开大学生命科学学院, 天津 300071;
3. 聊城大学农学院, 山东 聊城 252000)

摘 要: 目的 通过化学诱变的手段筛选生长快且吲哚碱含量高的长春花突变细胞系。方法 用不同浓度的甲基磺酸乙酯(EMS)处理长春花愈伤组织, 挑选成活愈伤组织块继代扩大培养, 比较其与对照愈伤组织生长速率、吲哚总碱积累等方面的差异。结果 用 EMS 处理的长春花愈伤组织与对照相比, 不仅生长快, 并且吲哚总碱含量高。结论 EMS 处理的愈伤组织发生了变异, 变异种是所期望的比较理想的细胞系。

关键词: 长春花; 甲基磺酸乙酯(EMS); 愈伤组织; 过氧化酶; 细胞突变系

中图分类号: R 282 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2004)11-1293-04

Mutation in *Catharanthus roseus* induced by EMS

ZHANG Xiu-sheng^{1,3}, ZHANG Rong-tao², CAO Lan², WANG Yong²,
WANG Ning-ning², WANG Shu-fang²

(1. College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China; 2. College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China; 3. Agricultural College, Liaocheng University, Liaocheng 252000, China)

Abstract: **Object** To induce the mutant strains with fast-growth speed and high content of total indole alkaloids products in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don by chemical mutagenesis. **Methods** To select the survived calli which have been treated by EMS with different concentration. The selected calli were

* 收稿日期: 2004-01-13

基金项目: 天津市自然科学基金资助项目(013609211)

作者简介: 张秀省(1960—), 男, 山东莘县人, 聊城大学教授。Tel: (0635)8239956

subcultured. It was compared with that growth speed, content of total indole alkaloids etc. **Results** The calli treated with 0.3% EMS grows faster, contains higher content of total indole alkaloids than the contrast. **Conclusion** The calli treated with 0.3% EMS is an induced mutation which has the expected characters.

Key words: *Catharanthus roseus* (L.) G. Don; ethyl methyl sulfonate (EMS); callus; POD; mutation stains

长春花 *Catharanthus roseus* (L.) G. Don 是一种药用植物, 其次生代谢产物中含有丰富的药用成分, 如阿吗碱 (ajmalicine)、长春碱 (vinblastine)、长春新碱 (vincristine) 等, 对临床许多疑难病症如高血压、癌症等具有很好的疗效^[1]。这类药用成分均为吲哚类生物碱, 目前主要来源于植物体。但其在植物体内含量很低, 还因为植物的栽培条件难以很好的控制等因素, 造成市场供需矛盾紧张。因此, 筛选高产吲哚生物碱的稳定细胞系, 利用细胞工程技术获取药用成分, 有可能成为一种理想的替代途径。

化学诱变是人工获取突变体常用的手段之一, EMS (甲基磺酸乙酯) 又是较为常用的化学诱变剂^[2]。本实验用 EMS 处理长春花愈伤组织, 以期获得较为理想的细胞突变系。

1 材料和方法

1.1 材料: EMS, 分析纯, 购自上海生化试剂公司; 长春花愈伤组织, 由本实验室诱导继代培养所得。

1.2 培养基及培养条件: 长春花愈伤组织诱导培养基: MS + KT 1 mg/L + NAA 1 mg/L。长春花愈伤组织固体和液体生长培养基: MS + KT 1 mg/L + NAA 2 mg/L。光照强度: 1 000~1 500 lx。固体培养, 光照 12 h/d, 液体培养, 为暗培养。培养温度: 28~29℃。液体培养摇床转速为 80 r/min。

1.3 EMS 处理长春花愈伤组织: 将生长旺盛淡黄色长春花愈伤组织放入不同浓度的 EMS 溶液中, 悬浮共培养后, 转接到 MS 固体培养基中进行继代培养。

1.4 吲哚总碱的测定: 吲哚总碱的提取及含量测定: 按王宁宁的方法提取吲哚总碱^[3], 称重。所有数据均为 3 次平行重复测定的结果。

2 结果

2.1 EMS 处理对长春花愈伤组织成活率的影响: 用磷酸缓冲液 (pH = 3) 配制 0.7%、0.5%、0.3%、0.1%、0.05%、0.01% 体积分数的 EMS 溶液, 用 0.45 μm 无菌微孔滤膜滤过, 将培养至 16 d (处于对数生长期) 的 8 代淡黄色长春花愈伤组织转接到无菌瓶中, 悬浮培养 4 h, 无菌水洗涤 3 次后转接到固

体培养基中培养, 每瓶 3 个愈伤组织块。每瓶愈伤组织块的质量均为 0.45 g 左右。培养两周后, 用 0.7%、0.5% EMS 溶液处理的愈伤块完全变褐死亡; 0.05%、0.01% EMS 溶液处理的愈伤组织块与对照组比较变化不大; 0.3%、0.1% EMS 溶液处理, 却有不同程度的变褐死亡。统计存活的愈伤组织块数, 结果见表 1。

表 1 EMS 处理浓度对长春花愈伤组织成活率的影响

Table 1 Effect of EMS treatment with various concentration on calli surviving rate

EMS/%	处理愈伤组织数量/块	存活量/块	成活率/%
0.7	12	0	0
0.5	12	0	0
0.3	12	3	25
0.1	12	9	75
0.05	12	10	91.3
0.01	12	12	100
0	12	12	100

2.2 存活愈伤组织的继代培养: 将 0.3%、0.1%、0.05%、0.01 和 0% EMS 处理后存活愈伤组织块转接到 MS + KT 1 mg/L + NAA 2 mg/L 固体培养基上连续继代培养 6 次。初始接种量约为 0.45 g, 每隔 5 d 称其鲜重一次, 选取 2、4、6 代的测定结果见表 2。0.1%、0.05%、0.01% EMS 处理的愈伤组织在 2、4、6 代生长周期中的鲜重指标相互比较, 几乎没有差异。而用 0.3% EMS 处理后的长春花愈伤组织 2 代生长较对照缓慢, 4、6 代生长却明显快于对照组。

2.3 EMS 处理后长春花愈伤细胞的性状表现: 选 0.3% EMS 处理后的继代培养愈伤组织和普通愈伤组织转接到 MS + KT 1 mg/L + NAA 2 mg/L 固体培养基和液体培养基中进行多次继代培养 (初始接种量分别为 0.45 和 0.09 g)。选取固体培养中的 E6、E9、E12、N12 代及液体培养 E15、E18、E21、N21 代愈伤组织, 每隔 5 d 称鲜重并测定吲哚总碱含量, 其生长曲线如图 1 和 2 所示; 其吲哚总碱积累变化曲线如图 3 和 4 所示。E 表示 EMS 诱变的长春花细胞系; N 表示普通长春花愈伤细胞系; 6、8、9、12、15、17、18、21 表示继代次数。

表 2 不同浓度 EMS 处理存活的愈伤组织继代培养鲜重
Table 2 Fresh weight of survived calli treated with different concentration EMS regeneration culturing

EMS /%	代龄次 数	鲜重/g					
		10 d	15 d	20 d	25 d	30 d	35 d
0	2	3.17	5.42	6.55	7.78	7.32	7.25
	4	3.62	5.46	6.52	7.70	7.52	7.42
	6	3.76	5.52	6.66	8.02	7.73	7.61
0.01	2	3.61	5.32	6.48	7.52	7.41	7.25
	4	3.62	5.41	6.47	7.21	7.20	7.14
	6	3.69	5.46	6.61	7.51	7.48	7.32
0.05	2	3.53	5.32	6.48	7.52	7.41	7.25
	4	3.58	5.39	6.47	7.21	7.20	7.14
	6	3.60	5.46	6.61	7.51	7.48	7.32
0.1	2	3.61	5.34	6.32	7.36	7.32	7.30
	4	3.58	5.36	6.39	7.31	7.36	7.31
	6	3.63	5.49	6.42	7.47	7.45	7.40
0.3	2	2.88	3.91	4.52	5.66	5.68	5.69
	4	3.98	6.20	9.82	9.79	9.78	9.75
	6	4.50	5.90	10.30	10.00	9.82	9.70

2.3.1 N 和 E 固体和液体培养生长动力学分析: 图 1

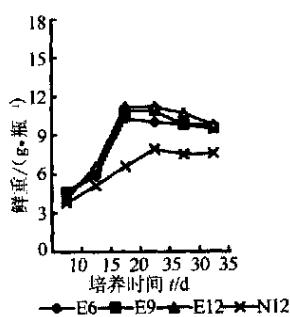


图 1 固体培养 E 与 N 生长的动态变化

Fig 1 Kinetics of growth in E and N for solid culture

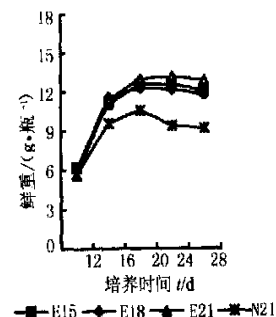


图 2 液体培养 E 与 N 生长的动态变化

Fig 2 Kinetics of growth in E and N for liquid culture

结果表明, 固体培养 N 1 生长较为缓慢, 在 25 d 时, 鲜重达到最高值 (7.9 g); E12 在 20 d 时达到最高值 (11.2 g), 比 N 提前了 5 d, 生长速度也比 N 高的很多。对于液体培养, 如图 2 所示, E 的生长比 N 快, 衰老慢, 在 20 d 以后的生长时间内, 其鲜重变化不大, 而 N 的下降较为明显。另外, 不管是固体培养还是液体培养, 几代 E 的生长曲线变化不大, 说明其生长性状比较稳定。

2.3.2 E 和 N 吲哚总碱积累动态变化: 如图 3 所示, 固体培养的 E, 其产碱量一直维持在较高水平上稳步增长, 在初生代谢较为旺盛的早期 (15 d) 吲哚总碱就达到 N 产碱量最高值 6.8 mg (35 d)。其中 E 最高产量是 N 最高产量的 1.56 倍。并且间隔几代的吲哚总碱积累曲线表现相似。对于液体培养而言, 正如图 4 所示, E 的吲哚生物碱积累要比 N 高。几代培养的吲哚生物碱积累曲线变化不大。可见, E 的生理性状特征较为稳定。

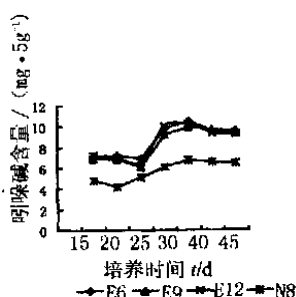


图 3 固体培养 E 与 N 吲哚总碱动态变化

Fig 3 The kinetics on accumulation of total indole alkaloids in E and N for solid culture

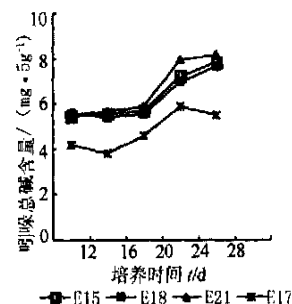


图 4 液体培养吲哚总碱积累动态变化

Fig 4 The kinetics on accumulation of total indole alkaloids in E and N for liquid culture

3 讨论

实验结果表明, EMS 诱变的长春花细胞系生长速率明显高于对照 (非诱变细胞系), 鲜重最高值净增 5.0 g/瓶; 生长周期较对照亦缩短了 4~5 d; 而吲哚总碱鲜重最高值净增 4.62 mg/5g。这些数据表明, 诱变细胞系比对照具有更优异的性状。两种不同细胞系进行光学显微镜观察时发现, 突变系的染色体发生了畸变, 由二倍体变成了多倍体 (本内容在整理中), 这必然引发其内在代谢规律的变化, 使其生长速率与吲哚生物碱积累都对对照有明显的不同。此突变细胞系可能成为今后采用细胞工程技术工业化生产药用吲哚碱的理想材料。有关 EMS 在遗传

水平上引起的细胞变异正在深入研究之中。

随着组培技术的不断发展和完善, 植物组织培养技术与化学诱变剂诱变相结合的离体诱变越来越显的相得益彰。近年来也受到国内外许多学者的高度重视, 实验结果表明, 虽然植物组织培养也会产生无性变异, 但离体诱变能使一些有益的性状突变频率提高。为今后药用植物增产的研究开辟了一条可尝试的新途径。

References:

- [1] Kutney J P, Boulet C A. Alkaloid production in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don cell cultures. XV. Synthesis [J]. *Heterocycle*, 1988, 27: 621-628.
- [2] Wang ZY, Hang SY, Xia M, et al. preliminary experiments on isolated cells from *Porphyra haitanensis* treated with

colchicines and EMS [J]. *J Jimei Univ* (集美大学学报), 1998, (3)2: 77-82.

- [3] Wang S F, Wang N N, Wang Y, *et al.* Study on enhancing accumulation of indole alkaloids in crown gall cells of *M adagascariensis* (Catharanthus roseus) [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1999, 30(2): 130-132.

[4] Zhao J, Zhu W H, Hu Q, *et al.* Regulation of indole alkaloids synthesis and related enzymes during callus initiation and culture of *Catharanthus roseus* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1999, 30(7): 533-539.

3 种石斛的光合特性研究

吕献康, 徐春华, 舒小英*

(国药集团杭州新亚有限公司, 浙江 杭州 310009)

摘要: 目的 探明铁皮石斛、广东石斛和重唇石斛光合速率的日变化特性及与光强和温度的关系, 明确各种石斛叶片中叶绿素含量。方法 测定一天中不同时段(7:30~16:30 每隔 1.5 h 测定一次)、不同光合有效辐射(0~1400 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)和温度(29.6~38.2℃)下的净光合速率, 测定叶片中叶绿素 a 和 b 的含量。结果 3 种石斛光合作用的净光合速率、光饱和点和光补偿点均较低; 净光合速率于早晨 8:00~10:00 处于高峰, 此后随温度升高、光照增强而迅速下降; 石斛叶片中叶绿素 b 的含量较高。结论 石斛的光合作用特性体现了其作为一种阴生植物对生长环境的高度适应性。

关键词: 铁皮石斛; 广东石斛; 重唇石斛; 光合速率; 叶绿素含量

中图分类号: R 282.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)11-1296-03

Characteristics of photosynthesis in three *Dendrobium* species

LU Xian-kang, XU Chun-hua, SHU Xiao-ying

(State Medicinal Group Hangzhou Xinya Co., Ltd., Hangzhou 310009, China)

Abstract: **Object** To determine the diurnal changes of photosynthesis, its relationships with light intensities and temperatures, and the contents of chlorophyll in leaves of *Dendrobium candidum* Wall. ex. Lindl., *D. wilsonii* Rolfe and *D. hercoglossum* Reichb. f. **Methods** The net photosynthetic rate (NPR) was measured at intervals of 1.5 h during daytime 7:30—16:30, under the photosynthetic affective rates 0—140 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, and under the temperatures 29.6—38.2℃; contents of chlorophyll a and b in leaves were measured. **Results** NPR, light saturation point and compensation point were low in each of the three *Dendrobium* L. species. The NPR peaked during 8:00 and 10:00 am, and thereafter decreased rapidly as the temperature and light intensity increased. Content of chlorophyll b was high in the leaves. **Conclusion** These results indicated that the *Dendrobium* L. species, which are sciophyte plants, have great adaptations to their growing habitats.

Key words: *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl.; *D. wilsonii* Rolfe; *D. hercoglossum* Reichb. f.; net photosynthetic rate; chlorophyll content

石斛是兰科石斛属植物, 具有补虚、益胃生津、滋阴清热、清音明目、抗癌、镇痛等功效, 能增强人的抗病免疫能力和延年益寿^[1]。石斛对适生环境要求严格, 大多分布在海拔 450~900 m 的温凉高湿地带, 受小环境内的相对湿度、温度、光照等气候因子影响较大, 与伴生植物混生的条件下生长发育最

好^[2]。由于石斛对生长条件的要求苛刻, 且自然条件下适宜其生长的时间相当少, 因此野生石斛的生长发育缓慢, 数量较少。然而长期以来, 由于开发利用过度, 造成石斛野生资源的严重破坏, 在我国已近枯竭, 严重制约着大量相关药品的供应。加强对石斛野生资源的保护刻不容缓, 而实现石斛可持续利用的

* 收稿日期: 2004-02-28

作者简介: 吕献康(1957—), 男, 1979 年毕业于浙江省宁波商业学校中药专业, 1990 年毕业于光明中药函授学院。主管中药师、执业药师、浙江省中药技术能手, 中国药学会会员, 浙江省药学会专家委员会成员。发表论文 10 篇, 其中《药用蛤壳及其混淆品的鉴别》获浙江省金华市科协优秀论文三等奖。Tel: (0571) 87177172