

和叶片显微结构,综合鉴定加倍植株,是一种快速、有效而且更可靠的方法。

致谢:黄涛老师在染色体根尖压片方面,张君芝副教授在实验过程中给予了热情帮助。

References:

[1] Feng Y X, Zhou Z Q. Review and prospects for industrial production and resources of diosgenin in China [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 1994, 6(3): 3.

[2] Qin T C, Zhang Y D, Zhang J Z. Distribution and utilization of *Dioscorea* resources in Hubei Province [J]. *Resource Dev Market* (资源开发与市场), 1997, 13(5): 200-202.

[3] Zhuang W Q, Ren Y Y. Prospect in *Panax ginseng* [J]. *J Jilin Agric Univ* (吉林农业大学学报), 1990, 12(1): 98-101.

[4] Zhang J E, Liu J H, Deng X X. Genetic variation of citrus of

calli revealed by the ploidy analyses [J]. *Acta Genet Sin* (遗传学报), 2003, 30(2): 169-174.

[5] Huang T, Zhang Y D, Zhang J Z, et al. Variation of chromosome number in *Dioscorea zingiberensis* [J]. *J Huazhong Agric Univ* (华中农业大学学报), 2002, 21(2): 158-160.

[6] Nie H T, Zhong G Y, Chen Z S. Preliminary study on the activity of peroxidase as a preselection index for spur type of cieras [J]. *J Fruit Tree Sci* (果树科学), 1991, 8(1): 46-48.

[7] Wang Z A, Wang S J. Preliminary study on tetraploid *Dioscorea zingiberensis* inducement [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1995, 20(6): 337-339.

[8] Cohen D, Yao J L. In vitro chromosome doubling of nine *Zantedeschia* cultivars [J]. *Plant Cell, Tissue Organ Cult*, 1996, 47: 43-49.

[9] Sari N, Abak K, Pitrat M. Comparison of ploidy level screening methods in watermelon: *Citrullus lanatus* (Thunb.) [J]. *Scientia Horticult*, 1999, 82: 265-277.

### 束花石斛快繁育苗技术的研究

史永锋,付开聪,张 宁,沈栋侠,姚德兴

(云南金陵植物药业股份有限公司,云南 思茅 665000)

摘要:目的 寻找束花石斛快繁育苗的有效途径。方法 采用组织培养和野生自然栖息的束花石斛诱导高位腋芽萌发等途径进行探索。结果 在组织培养中,改良 1/2MS 培养基的原球茎形成效果最好,调整不同浓度的 N、P、K 及外源激素对诱导束花石斛原球增殖、生根壮苗极为明显;外源激素对诱导束花石斛的高位腋芽萌发无明显效果,高位芽萌发与茎株生理年龄和营养状况有关。结论 人工种植束花石斛采用现代生物技术组培育苗和腋芽繁殖是目前快繁育苗的最有效途径,不仅育苗量大、周期短,且生长快、成活率高,两条途径对于束花石斛的产业化发展有重要意义。

关键词:束花石斛;组织培养;快繁育苗;外源激素;高位芽

中图分类号:R282.21

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2005)03-0438-04

### Rapid propagation and breeding seedling technique for *Dendrobium chrysanthum*

SHI Yong-feng, FU Kai-cong, ZHANG Ning, SHEN Dong-xia, YAO De-xing

(Yunnan Jinling Botanical Medicine Co., Ltd, Simao 665000, China)

Key words: *Dendrobium chrysanthum* Wall. ex. Lindl.; tissue culture; rapid propagation and breeding seedling; exo-hormone; high bud

束花石斛 *Dendrobium chrysanthum* Wall. ex Lindl. 为兰科石斛属植物,主要分布于云南、广西、贵州等省,是《中华人民共和国药典》收载入药的石斛中药材之一<sup>[1]</sup>。味淡、性微寒,有滋阴养胃、清热解毒的功效,在临床上多用于治疗慢性咽喉炎、眼科疾病、血栓闭塞性疾病,效果十分明显。因此,成为脉络宁、通塞脉片、石斛液光丸等著名中成药的主要原料之一,近年来由于过量挖采,野生资源已经濒临灭绝而成为稀缺药材<sup>[2]</sup>。为探索束花石斛快速育苗的最佳途径,笔者从 2001 年起开始采用组织培养、野生自然栖息的种源诱

导高位芽等方法进行探讨,取得了满意的效果。

#### 1 实验材料

组织培养的各种设备、实验苗床。硝酸铵、磷酸二氢钾、氯化钾、NAA(萘乙酸)、6-BA(6-苄基嘌呤)、GA(赤霉素)、IBA(吲哚丁酸)等。

采用思茅市民族传统医药研究所石斛品种园中人工栽培的束花石斛为实验材料,果实采用其成熟果实;河沙清洗干净。

#### 2 方法与结果

##### 2.1 组织培养

2.1.1 原球茎的培养:2001 年 2 月采用无菌播种的方法,用马铃薯提取液制作 MS、1/2MS 等 8 种培养基,每种 30 瓶,外加 6-BA 0.2~0.5 mg/L 和 NAA 0.5~1 mg/L。结果多种培养基都能使束花石斛种子的胚萌发形成原球茎,但不同培养基影响束花石斛形成原球茎的时间不同。其中,改良 1/2MS 60 d 可形成原球茎,1/2MS 需要 75 d,最长的需要 100 d 以上。见表 1。

2.1.2 N、P、K 比例的变化对束花石斛形成小苗的影响:根据对原球茎培养基的选择比较,改良后的 1/2MS 生长速度最快,因此就以该培养基为基本培

养基。本实验所用的 N 主要是硝酸铵,P 主要是磷酸二氢钾,K 主要是氯化钾,种源为以上培养的原球茎 30 瓶。结果:在组培中缺 N、P、K,束花石斛组培苗均不能正常生长,而缺 N、K 更严重:N、P、K 的比例以 2:1:3 最好,2:2:3 和 3:2:2 次之,高 N 或高 K、低 P 也不行,高 P 低 N、K 最差。见表 2。

2.1.3 6-BA 及 NAA 对束花石斛组培苗生长的影响:根据张明等研究<sup>[3]</sup>认为 6-BA 可以产生大量的丛生芽,曾宋君等人<sup>[4]</sup>认为 6-BA 质量浓度超过 1.0 mg/L 时,对胚发育和成苗均起抑制作用,低浓度的 NAA 对胚发育和成苗有促进作用。为了确定束花组培

表 1 束花石斛种子对培养基的选择

Table 1 Selection of medium for *D. chrysanthum* seed

培养基	培养时间/d						
	15	30	45	60	75	90	105
MS	不变色	吸水膨大	黄白色	黄绿色	绿色桑果状	绿色小圆球体	圆球体长出芽点,形成原球茎
1/2MS	吸水膨大	黄绿色	绿色桑果状	绿色小圆球体	圆球体变为原球茎	少数形成无根 1~2 叶状茎	部分淡绿色的茎,多数仍是球茎
Miller	吸水膨大	黄绿色	绿色	绿色桑果状	绿色小圆球体	圆球体变为原球茎	少数形成无根 1~2 叶状茎
Nitsch	不变色	吸水膨大	黄绿色	绿色	绿色桑果状	绿色小圆球体	圆球体变为原球茎
White	不变色	吸水膨大	黄绿色	绿色	绿色桑果状	绿色小圆球体	圆球体变为原球茎
B5	不变色	吸水膨大	黄白色	黄绿色	绿色	绿色桑果状	绿色圆球体
N6	不变色	吸水膨大	绿色	绿色桑果状	绿色小圆球体	圆球体变为原球茎	
改良 1/2MS	吸水膨大	黄绿色桑果状	绿色小圆球体	圆球体变为原球茎			

表 2 不同 N、P、K 比例对束花石斛形成小苗的影响

Table 2 Effect of different proportions of N, P, and K on *D. chrysanthum* seedling formation

条件	15 d			30 d			45 d		
	根增长/cm	茎增长/cm	叶增加/片	根增长/cm	茎增长/cm	叶增加/片	根增长/cm	茎增长/cm	叶增加/片
缺 N	0	0	0	0	0	0	0	0	0
缺 P	0	0	0	0.2	0.5	1	0.8	0.7	2
缺 K	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N:P:K (1:2:3)	0.2	0.3	1	0.4	0.5	1	1	0.9	2
N:P:K (2:2:3)	0.1	0.1	1	0.6	0.8	2	1.1	2	3
N:P:K (2:1:3)	0.4	0.5	1	0.5	0.8	2	1.2	2.3	3
N:P:K (3:2:2)	0.2	0.2	1	0.4	0.5	1	2	1.8	3
N:P:K (3:2:1)	0.1	0.2	0	0.4	0.5	1	0.6	0.6	1
N:P:K (2:3:1)	0.2	0.3	0	0.3	0.6	1	1	0.9	2

苗在各个培养期对 6-BA、NAA 的最佳需要量,分别用了每个浓度 30 瓶的培养基做实验。结果:在束花石斛的培养过程中,随着 6-BA 质量浓度的增加束花石斛发芽数也随着增加,但过多的增殖小苗影响组培苗的质量(植株变得非常瘦小),在不需要增殖的时候可以不用或少用,6-BA 质量浓度正常不超过 2.0 mg/L,1.5

mg/L 时发芽、生根和壮苗效果最好。NAA 小于 1 mg/L 时,根细而小,苗出瓶后成活率低;NAA 大于 2 mg/L 时,根过度粗壮,甚至出现肉质根;NAA 4 mg/L 时,有少量愈伤组织出现;NAA 正常在 1~2 mg/L,质量浓度为 1.5 mg/L 时,发芽、生根和壮苗效果最好。见表 3(表中各组发芽数以均值计)。

表 3 不同质量浓度 NAA 和 6-BA 对幼苗生长的影响

Table 3 Effect of different concentrations of NAA and 6-BA on *D. chrysanthum* seedling growth

外源激素	质量浓度 (mg · L <sup>-1</sup> )	发芽数/个	株高/cm	根数/条	叶片数/片	外源激素	质量浓度 (mg · L <sup>-1</sup> )	发芽数/个	株高/cm	根数/条	叶片数/片
6-BA	CK	1.8	1.3	1.2	1.8	NAA	CK	6.9	1.79	9.7	3.71
	0.1	2.1	1.17	4.2	1.2		0.1	6.47	1.97	16.9	4.12
	0.5	2.8	1.2	1.2	1.7		0.5	8.1	1.24	19.38	1.91
	1	2.91	1.2	1.45	1.1		1	11.00	2	21.33	1.65
	1.5	2.66	1.08	4.00	1.8		1.5	2.2	2.4	15.00	4.4
	2	3.00	1.37	3.4	1.1		2	3.00	1.38	9.5	4.5
	2.5	2.83	1.05	2.6	1.65		2.5	3.8	3.5	12	4.8
	3	3.2	1.3	1.4	1.14		3	6.3	2.9	18.4	4.8
	4	3.4	1.63	3.4	3.18		3.5	9.33	1.02	21.33	1.07
	4.5	5.2	1.74	5.6	2.5		4	5.6	2.04	12.6	3.79

2.2 高位腋芽培养实验:2002 年 5 月 6 日—2003 年 1 月 6 日,利用束花石斛有隐腋芽存在,一定条件下可以萌发形成高位芽,并生长成根、茎、叶齐全的植株的特性,从各角度做了以下实验,探索促进高位芽萌发的基本方法。

2.2.1 根据束花石斛合轴生长的特性,分别选取 1~6 年生茎株各 10 株(不剪段),按年龄分为 6 组,置于沙床上,室温、60%~90%空气湿度,经各种处理后,培养 120 d。结果在同等条件下 3 年生的茎株发芽效果最好;4 年生的次之;2 年生、5 年生和 6 年

生的最差。见表 4。

2.2.2 将 3 年生茎株每 3 个节剪为一段,10 段为一组置于沙床上,室温、60%~90%空气湿度,培养 120 d。结果剪段后发芽数大大降低,外源激素处理后效果并不明显。见表 4。

2.2.3 将野生自然栖息的种苗整簇(平均 7 根茎株为 1 簇)置于沙床上,室温、60%~90%空气湿度,培养 120 d,结果整丛平均发芽数低于 3 年生植株高位芽发芽数,外源激素对野生种源的侧芽萌发无明显效果。见表 4。

表 4 不同年龄完整茎株、剪段培养和整簇培养对高位芽产生的影响

Table 4 Effect of different age of complete stem, stem segment, and complete plant on high bud formation

培养基/ (mg · L <sup>-1</sup> )	每株平均发芽数						剪段每组总 发芽数	每段平均 发芽数	整簇总发 芽数	每株平均 发芽数
	一年生	二年生	三年生	四年生	五年生	六年生				
CK 组	0	1.8	4.5	3.4	1.1	0.2	11	1.1	20	2.8
NAA 0.1	0	1.6	4.1	3.3	1.5	0.3	15	1.5	19	2.7
6-BA 0.5	0	1.9	4.5	4	1.3	0.2	13	1.3	21	3
GA 0.25	0	2	4.7	3.5	1	0.4	10	1.0	18	2.6
IBA 0.1	0	1.3	4.4	2.8	1.2	0.2	12	1.2	18	2.6

3 讨论

3.1 本实验从束花石斛组培育苗和野生自然栖息的植株高位芽增殖两条途径进行探索,结果在组织培养中,调整不同的 N、P、K 及外源激素浓度对诱导束花石斛原球茎增殖、生根壮苗效果极为明显;外源激素对诱导束花石斛的高位芽萌发无明显效果。

3.2 组培快繁是束花石斛快速育苗的重要途径,具

有速度快,数量大的优点,但组培成本高,技术复杂,组培苗移栽后生长周期长,推广难度大。实验证明,当外源激素 6-BA、NAA 不超过 2.0 mg/L 时,对束花石斛的胚发育和成苗有促进作用,质量浓度为 1.5 mg/L 时,对发芽、生根和壮苗效果最佳,激素质量浓度比有关文献的报道略高,可能是束花组培的特点;N、P、K 为束花石斛形成小苗不可缺少的条

件,比例为2:1:3时效果最好。

3.3 利用束花石斛植株上具有隐腋芽的特性,进行了高位芽培植实验,该法操作简单,并且大大缩短了育苗周期,降低了成本。实验结果发现在同等条件下3年生的枝条发芽效果最好;4年生的次之;2年生、5年生和6年生的最差。而剪段后发芽率比例比整丛培养更差。

3.4 组培育苗和腋芽繁殖都是束花石斛快繁育苗的有效途径,各有优缺点,本实验只做了初步的探索,大量的工作还有待进一步完善。根据实际情况,

合理应用组培和高位芽培植两条途径快繁育苗,对于束花石斛人工产业化发展有重要意义。

#### References:

- [1] Ch P (中国药典) [S]. Vol I. 2000.
- [2] Xu H, Wang Z G, Ding J Y, et al. General aspect of biotechnology about medical *Dendrobium* [J]. *Chin Wild Plant Resour* (中国野生植物资源), 2001(1): 1-4.
- [3] Zhang M, Xia H X. Advances in research of tissue culture for *Dendrobium* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2000, 25(6): 325.
- [4] Zeng S J. Embryo culture and propagation of *Dendrobium in vitro* [J]. *Acta Horticult Sin* (园艺学报), 1998, 25(1): 77.

## HPLC 法测定金荞麦中(-)-表儿茶素含量

何美珊,钱炳辉,王兆龙,顾理群,王志勇,闫玉梅,王凤如

(南通精华制药有限公司,江苏南通 226005)

金荞麦为蓼科植物金荞麦 *Fagopyrum dibotrys* (D. Don) Hara 的干燥根茎。其有效成分为原花色素类缩合鞣质及其前体的混合物<sup>[1]</sup>,包括(-)-表儿茶素[(-)-epicatechin]及其衍生物的单体、二聚体和多聚体。金荞麦收载于《中华人民共和国药典》2000年版一部<sup>[2]</sup>,其质量标准中无含量测定项。文献报道的金荞麦药材含量测定方法采用比色法<sup>[3]</sup>和薄层扫描法<sup>[4]</sup>,本实验采用 HPLC 法测定金荞麦中(-)-表儿茶素的含量。

### 1 仪器、试剂与样品

Waters 600E 高效液相色谱仪、2487 双波长紫外检测器、Millennium<sup>32</sup> 色谱管理系统, Varian Cary 50 conc 紫外-可见分光光度计, Sartorius BP211D 电子天平, PHS-25 型 pH 计(上海雷磁仪器厂)。聚酰胺 30~60 目,批号 F20000817,中国医药(集团)上海化学试剂公司。乙腈为色谱纯,乙醇、甲醇、磷酸均为分析纯,水为去离子双蒸水。

(-)-表儿茶素对照品:批号 878-200001,中国药品生物制品检定所提供,高效液相色谱归一化法测定其纯度为 99.63%。

金荞麦药材由江苏省药品检验所和南通精华制药有限公司提供,经江苏省药品检验所刘舞霞主任药师鉴定为蓼科植物金荞麦 *F. dibotrys* (D. Don) Hara 的根茎。

### 2 方法与结果

2.1 色谱条件: Symmetry C<sub>18</sub> 色谱柱(150 mm × 3.9 mm, 5 μm); 流动相: 水(用磷酸调 pH 值至 3.00 ± 0.02)-乙腈(92:8); 体积流量: 0.8 mL/min。检测波长 280 nm; 柱温 35 °C; 进样量 10 μL。在此条件下金荞麦供试品溶液的(-)-表儿茶素峰与相邻峰能达到基线分离,其保留时间为 15.35 min,色谱柱理论板数按(-)-表儿茶素峰计算为 6 109,对照品与供试品的色谱图见图 1。

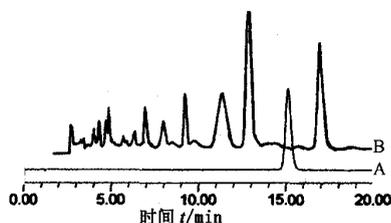


图1 (-)-表儿茶素(A)与金荞麦(B)的 HPLC 图谱  
Fig. 1 HPLC chromatogram of (-)-epicatechin (A) and *F. dibotrys* rhizome (B)

2.2 测定波长的选择:(-)-表儿茶素对照品的乙腈-水(1:9)溶液,经 Varian Cary 50 conc 紫外-可见分光光度计在 190~400 nm 进行光谱扫描,280 nm 左右峰形较好,最大吸收波长为 280.0 nm。

收稿日期:2004-05-28

作者简介:何美珊(1959—),女,江苏如皋人,高级工程师,学士,主要从事中药研究及开发工作。

Tel: (0513)5609133 Fax: (0513)5609115 E-mail: hems136@sina.com