

薄壁细胞含有大量多酚类化合物。因此,根据多酚类化合物的分布与分泌腔特有位置关系,生产上可以把分泌腔的分布密度做为多酚类物质含量多少的一个形态学指标,即分泌腔较多的根状茎应该含有较多的多酚类化合物。这样的药材品质较好,可认为是上品。同时,根据此特点在进行组织培养快速育苗过程中,可以选择这些含多酚类化合物较多的薄壁组织细胞,培养和筛选含有效成分较高的植株或者细胞株。

另外,根据观察比较,虽然根和根状茎中均具有大量分泌腔,但在根中分泌腔周围的薄壁组织细胞中多酚类化合物的量较少,加之,在根状茎中多酚类化合物合成部位大于根中(图1-1、5),而且根状茎中烷基酰胺的量明显大于根中^[16]。因此,生产上可以将具有发达根状茎的植株作为优良单株选育的形态指标。

References:

- [1] Wu L, Bae J, Kraus G, et al. Diacetylenic isobutylamides of *Echinacea*: synthesis and natural distribution [J]. *Phytochemistry*, 2004, 65(9): 2477-2484.
- [2] Kindscher, K. Ethnobotany of purple coneflower (*Echinacea angustifolia*, Asteraceae) and other *Echinacea* species [J]. *Econ Bot*, 1989, 43: 498-507.
- [3] Reith F J. Pharmaceuticals containing lactic acid derivatives and *Echinacea* [J]. *Ger Offen*, 1978, 2: 721-731.
- [4] Wacker A, Hilbig W. Virus inhibition by *Echinacea purpurea* [J]. *Planta Med*, 1978, 33: 89-102.
- [5] Perry N B, Burgess E J, Glennie V L. *Echinacea* standardization: analytical methods for phenolic compounds and typical levels in medicinal species [J]. *J Agric Food Chem*, 2001, 49(4): 1702-1706.
- [6] Molgaard P, Johnsen S, Christensen P, et al. HPLC Method validated for the simultaneous analysis of cichoric acid and alkamides in *Echinacea purpurea* plants and products [J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51(24): 6922-6933.
- [7] Tong W, Zhang J T, Liu W Z, et al. Pharmacognostical studies on identification of *Echinacea pallida* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(3): 266-269.
- [8] Barrett B. Medicinal properties of *Echinacea*: a critical review [J]. *Phytomedicine*, 2003, 10(1): 66-86.
- [9] Sloley B D, Urichuk L J, Tywin C, et al. Comparison of chemical components and antioxidants capacity of different *Echinacea* species [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2001, 53(6): 849-857.
- [10] Yao H, Wu H, Feng C H, et al. Relation between root structure and accumulation of anthraquinones of *Morinda officinalis* [J]. *Acta Biol Expt Sin* (实验生物学报), 2004, 37(2): 96-102.
- [11] Reeve R M. Histochemical tests for polyphenols in plant tissues [J]. *Stain Technol*, 1951, 26(2): 91-96.
- [12] Zhang S H, Qiu X Q, Huang Z L, et al. The anatomy of stem and histochemistry of phenol distribution in difficult-and easy-to-root *Eucalyptus* species [J]. *J South China Agric Univ* (华南农业大学学报), 2001, 22(3): 40-46.
- [13] Wang H Z, Liu H L. Histochemical research of polyphenol oxidase (PPO) in seed coat and the relationship between PPO and seed color in rape seed [J]. *Chin J Oil Crop Sci* (中国油料作物学报), 1991 (1): 30-33.
- [14] Esau K. *Anatomy of Seed Plants* [M]. New York: John Wiley & Sons, 1977.
- [15] Gray D E, Pallardy S G, Garrett H E, et al. Acute drought stress and plant age effects on alkamide and phenolic acid content in purple coneflower roots [J]. *Planta Med*, 2003, 69(1): 50-55.
- [16] Perry N B, Van Klink J W, Burgess E J, et al. Alkylamide levels in *Echinacea purpurea* (L.) Moench; a rapid analytical method revealing differences among roots, rhizomes, stems, leaves and flowers [J]. *Planta Med*, 1997, 63: 58-62.

花叶开唇兰种子非共生萌发的研究

周伟香^{1,2}, 龚宁^{1,2*}, 李光^{1,2}, 郑继军^{1,2}

(1. 贵州师范大学生物技术与工程学院, 贵州 贵阳 550001; 2. 贵州省山地环境信息与生态环境重点实验室, 贵州 贵阳 550001)

摘要:目的 筛选花叶开唇兰种子非共生萌发最佳培养基。方法 比较不同的基本培养基、蔗糖质量浓度、植物生长物质和培养方式对种子萌发的影响, 观察并统计种子萌发率。结果 花叶开唇兰种子萌发最适培养基为 1/4MS+NAA 0.1~0.5 mg/L+蔗糖 20 g/L, 液体悬浮培养。结论 首次报道了花叶开唇兰种子萌发最佳培养基, 为花叶开唇兰快速繁殖提供技术参考。

关键词:花叶开唇兰; 种子; 非共生萌发

中图分类号:R282.2

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)04-0610-04

收稿日期: 2006-07-10

基金项目: 贵州省高校发展专项资金自然科学类重点项目 (黔教科 2004110); 贵州省科学技术基金项目 [黔科合 J 字 (2005) 2040 号]。

作者简介: 周伟香 (1978—), 女, 浙江省松阳人, 在读研究生, 主要从事药用植物的研究工作。

Tel: (0851) 6701434 E-mail: zhouweixiang@163.com

* 通讯作者 龚宁 E-mail: gn2033@126.com

Seed germination of *Anoectochilus roxburghii* in asymbiotic cultureZHOU Wei-xiang^{1,2}, GONG Ning^{1,2}, LI Guang^{1,2}, ZHENG Ji-jun^{1,2}

(1. School of Biological Technology and Engineering, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China; 2. Guizhou Provincial Key Laboratory for Mountain Environment Information and Bio-environment, Guiyang 550001, China)

Key words: *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl.; seed; asymbiotic germination

花叶开唇兰 *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. 即金线兰,为兰科开唇兰属植物,全草入药,是民间珍稀名贵的中草药^[1],也是一种观赏价值较高的室内观叶植物,具有广阔的开发利用前景。花叶开唇兰的种子极为细小,一枚蒴果含有数千至上万粒种子,在自然条件下需由某种真菌侵入,将种子胚细胞中的淀粉转化为糖,才促进萌芽,因此萌发率很低^[2],野生资源稀少。利用组培方法进行种子非共生萌发,是兰科植物快速繁殖的重要途径,目前国内外有关花叶开唇兰种子非共生萌发研究报道很少,黄慧莲^[3]仅研究了基本培养基对种子萌发的影响,本实验首次系统研究了植物生长物质、蔗糖质量浓度和培养方式等多种因素对花叶开唇兰种子非共生萌发的影响,筛选出种子非共生萌发的最佳培养基,其结果可为花叶开唇兰的快速繁殖提供参考。

1 材料与与方法

1.1 材料:对栽植于实验园地的野生花叶开唇兰进行人工授粉获得的成熟蒴果。野生花叶开唇兰 *A. roxburghii* (Wall.) Lindl. 采自贵州省荔波县翁昂乡,由贵州师范大学王承录副教授鉴定。

1.2 方法

1.2.1 外植体消毒:野生花叶开唇兰尚未开裂的成熟蒴果,用 75% 酒精棉擦拭果皮,再置 10% 次氯酸钠溶液中浸泡 10~12 min 后,用无菌水冲洗 5~6 次。

1.2.2 培养基及培养方式:基本培养基对种子萌发的影响:培养基为 KC、改良 KC、N6、MS、1/2 MS (大量元素质量浓度是 MS 的 1/2,其余同 MS)、1/4 MS (大量元素质量浓度是 MS 的 1/4,其余同 MS) 以及 1/10 MS (大量元素质量浓度是 MS 的 1/10,其余同 MS)。

蔗糖质量浓度对种子萌发的影响:在最佳基本培养基中分别加 10、20、30、40 g/L 蔗糖。

植物生长物质对种子萌发的影响:在最佳基本培养基、最佳蔗糖质量浓度基础上分别添加不同质量浓度的 NAA 或 2,4-D。

培养方式对种子萌发的影响:最佳基本培养基,最佳蔗糖质量浓度,最佳的生长物质质量浓度条件

下考察固体、液体悬浮、液体静置培养对花叶开唇兰种子萌发的影响。

所有培养基 pH 均调至 5.6,除蔗糖试验外,所有培养基均加入 20 g/L 蔗糖,固体培养基加 10 g/L 琼脂。

1.2.3 接种、培养和观察:在超净工作台上,用无菌解剖针将消毒后的蒴果纵向剖成两半,用无菌镊子夹取少量种子,均匀地洒在培养基上。为使种子在培养基表面分布均匀,可滴数滴无菌水到接种后的培养瓶中,轻轻晃动。每种处理接种 8 瓶,用放大镜统计每处理接种种子数。

培养条件为光照 12 h/d,光照强度为 1 000~1 500 lx,温度为 (23±2) °C,液体悬液振荡的转速为 60 r/min。

每天用放大镜观察种子萌发情况,记录最早萌动日期及培养到 70 d 的萌发率。萌发标准为胚膨大形成白色原球茎^[4]。

2 结果

2.1 花叶开唇兰种子萌发过程:以 1/4 MS+NAA 0.3 固体培养为例,无菌播种 35 d 后胚明显膨大,40 d 后小球体陆续出现,45 d 后可以用肉眼明显看到白色原球茎,60 d 后原球茎继续膨大同时观察到原球茎基部外表面长满白色根毛状物。光下继续培养到 90 d,原球茎开始陆续转为绿色,并逐渐伸长分化。

2.2 几种基本培养基对花叶开唇兰种子萌发的影响:考察了 KC、改良 KC、N6、MS、1/2 MS、1/4 MS 以及 1/10 MS 7 种基本培养基对花叶开唇兰种子萌发的影响,结果显示花叶开唇兰种子在 7 种基本培养基上都能萌发,但开始萌发时间及萌发率有很大差异。在 N6 培养基上,种子萌发速度最快,但在 1/4 MS 培养基上种子萌发率最高,培养到 70 d 时萌发率达到 77.37%,原球茎生长状况最好,说明花叶开唇兰种子适宜在较低盐质量浓度下萌发。见表 1。

2.3 不同蔗糖质量浓度对花叶开唇兰种子萌发的影响:在 1/4 MS 基本培养基中分别加入不同质量浓度的蔗糖,观察对花叶开唇兰种子萌发的影响,结果表明在 20 g/L 时种子萌发率最高,30 g/L 次之。

同时观察到萌发后原球茎在 30 g/L 时生长膨大速度快。说明花叶开唇兰种子在相对较低蔗糖质量浓度(如 20 g/L)下易于萌发,萌发后及时转入较高蔗糖可促进原球茎的生长。见表 2。

表 1 不同基本培养基对花叶开唇兰种子萌发的影响

Table 1 Effect of various culture media on seed germination of <i>A. roxburghii</i>					
基本培养基	接种种子数	萌发种子数	萌发率/%	开始萌发时间/d	萌发特征
KC	436	300	68.80	40	生长整齐,萌发后原球茎较瘦小
改良 KC	460	333	72.39	40	萌发后原球茎生长迅速易变绿分化
N6	437	234	53.57	31	原球茎瘦小,萌发后生长速度较慢
MS	483	210	43.50	45	原球茎相对粗大
1/2 MS	435	220	50.57	45	原球茎整齐粗大
1/4 MS	411	318	77.37	38	原球茎整齐粗大,且不易分化
1/10 MS	455	105	23.08	50	原球茎较瘦小

表 2 不同蔗糖浓度对花叶开唇兰种子萌发的影响

Table 2 Effect of different sucrose concentration on seed germination of <i>A. roxburghii</i>				
蔗糖/(g·L ⁻¹)	接种种子数	萌发种子数	萌发率/%	开始萌发时间/d
10	393	42	10.69	50
20	411	318	77.37	38
30	386	286	74.09	45
40	463	203	43.85	55

2.4 植物生长物质对花叶开唇兰种子萌发的影响: NAA 对花叶开唇兰种子萌发有很大影响,从表 3 可知 NAA 在 0.1~0.5 mg/L 内都不同程度地促进种子萌发,萌发速度较快,0.3 mg/L 最高,萌发率达 87.18%。当高于 0.5 mg/L 时则抑制种子萌发,为 2.0 mg/L 时,萌发率只有 19.12%。同时实验中观察到当 NAA 高于 1.0 mg/L 时,原球茎表面易形成淡黄色的愈伤组织,但极易褐化。

2,4-D 在 0.2~2.0 mg/L 的处理只有 0.5 mg/L 处理萌发率较高,比对照高 1.18 个百分点,其他质量浓度的萌发率均低于对照,同时各组添加 2,4-D 后与对照相比开始萌发时间推迟到 60 d 左右,原球茎生长缓慢,始终保持乳白色原球茎不分化;而对照组最早萌发时间为 38 d 左右,继续培养原球茎变绿伸长,所以花叶开唇兰种子萌发一般不宜添加 2,4-D。

2.5 不同培养方式对花叶开唇兰种子萌发的影响: 结果见表 4,液体悬浮培养效果最佳,种子萌发提前,原球茎整齐粗大,生长速度也快,同时在液体培养基上继续培养不易分化,这为今后原球茎悬浮体

表 3 植物生长物质对花叶开唇兰种子萌发的影响

Table 3 Effect of plant growth substance on seed germination of <i>A. roxburghii</i>				
培养基/(mg·L ⁻¹)	接种种子数	萌发种子数	萌发率/%	开始萌发时间/d
1/4MS	411	318	77.37	38
1/4MS+NAA0.1	464	392	84.48	38
1/4MS+NAA0.3	390	340	87.18	38
1/4MS+NAA0.5	442	324	73.30	38
1/4MS+NAA0.7	400	176	44.00	40
1/4MS+NAA1.0	430	140	32.56	40
1/4MS+NAA2.0	408	78	19.12	40
1/4MS+2,4-D0.2	403	82	20.35	58
1/4MS+2,4-D0.5	415	326	78.55	58
1/4MS+2,4-D1.0	456	78	17.11	60
1/4MS+2,4-D1.5	422	52	12.32	60
1/4MS+2,4-D2.0	441	25	5.67	60

表 4 不同培养方式对花叶开唇兰种子萌发的影响

Table 4 Effect of different culture methods on seed germination of <i>A. roxburghii</i>				
培养方式	接种种子数	萌发种子数	萌发率/%	开始萌发时间/d
固体培养	390	340	87.18	38
液体静置培养	411	371	90.27	35
液体悬浮培养	438	408	93.15	35

系的建立提供了依据。

综上所述,花叶开唇兰种子非共生萌发最佳培养条件为 1/4 MS+NAA 0.1~0.5 mg/L+蔗糖 20 g/L,液体悬浮培养。

3 讨论

花叶开唇兰种子数量极多,快速繁殖应利用这一优势。实验室已通过种子无菌培养获得了大量种子苗,并且这些种子苗可在实验室增殖,已建立了无菌培养系(另文报道),利用这条途径培养苗比通过茎段诱导途径快,因此这一途径是种苗工厂化生产的一条重要途径,本文探讨的种子非共生萌发的最佳培养条件对于花叶开唇兰的快速繁殖具有很好的参考价值。

黄慧莲研究认为种子萌发的适宜培养基是 KC 培养基^[3],实验发现有比 KC 培养基更适合种子萌发的培养基,即 1/4 MS 培养基,花叶开唇兰种子在 1/4 MS 培养基上比在 KC 培养基上萌发更快,萌发率更高,萌发得到的原球茎更健壮。

蔗糖质量浓度实验表明 20 g/L 时萌发率最高,30 g/L 时萌发率略低于 20 g/L,但种子萌发得到的原球茎比较粗大,实际应用时可考虑用 30 g/L 蔗糖,或在较低蔗糖浓度下萌发后转入较高质量浓度下培养。

NAA 在 0.1~0.5 mg/L 均不同程度地促进种子的萌发,高于 0.5 mg/L 则不同程度地抑制种子

的萌发,这与文献^[5]报道石斛种胚萌发的结果相似。2,4-D 对种子萌发基本起抑制作用。其他生长物质以及各种生长物质的不同配伍对花叶开唇兰种子萌发的影响有待研究。

致谢:本实验得到了贵州师范大学生物技术与工程学院的乙引教授和陈庆富教授在实验场地方面给予的帮助。

References:

- [1] Delectis Florae Reipublicae Popularis Sinicae, Agendae Academiae Sinicae Edit. *Flora Reipublicae Popularis Sinicae*

(中国植物志) [M]. Tomus 17. Beijing: Science Press, 2000.

- [2] Chen Y, Lin S R, Guan Q K, et al. Biological characteristics and habitat characters of *Anoetochilus roxburghii* [J]. *Subtrop Plant Sci* (亚热带植物科学), 1994, 23(11): 18.
- [3] Huang H L, Liu X W, Wu X S, et al. Study on seedling from seed of *Anoetochilus roxburghii* [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2002, 25(1): 3-5.
- [4] Ding C C, Yu H, Liu F W. Factors affecting the germination of *Paphiopedilum armeniacum* [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 2004, 26(6): 673-677.
- [5] Zeng S J, Cheng S J, Zhang J L, et al. Embryo culture and propagation of *Dendrobium in vitro* [J]. *Acta Hort Sin* (园艺学报), 1998, 25(1): 75-80.

淫羊藿属 9 种淫羊藿叶中朝藿定 C 和淫羊藿苷量的考察

谢娟平¹, 王忠东², 孙文基^{1*}

(1. 西北大学 陕西省生物医药重点实验室, 陕西 西安 710069; 2. 洛阳陆生天然植物研究所, 河南 洛阳 471000)

淫羊藿属 *Epimedium* L. 药用植物,在我国有 29 种,产于川陕者 14 种^[1],具有多方面的药理活性。《中国药典》作为淫羊藿药材的有 5 种,分别为淫羊藿、朝鲜淫羊藿、箭叶淫羊藿、巫山淫羊藿和柔毛淫羊藿^[2],笔者在进行淫羊藿成分系统分离研究的基础上,对采集的川陕豫产 9 种习惯入药的淫羊藿品种^[3],将其叶中的主要成分朝藿定 C 和淫羊藿苷的量进行了考察,结果表明大部分品种朝藿定 C 量大于淫羊藿苷。

1 仪器、试剂及样品

1.1 仪器:美国 Beckman 高效液相色谱仪,125 型泵,168 型 PDA 检测器,32Karat 色谱工作站;HAMILTON 微量进样品(HAMILTON 公司);微孔滤膜 $\Phi=13$ mm, 4.5 μ m (天津市色谱科学技术公司);YCQ—300 型超声波清洗器(上海凯波超声设备有限公司)。

1.2 试剂:乙腈为色谱纯,水为双蒸水并经 0.45 μ m 水系滤膜滤过。

1.3 对照品:均为自行分离精制,并经 UV、IR、FAB-MS、¹HNMR、¹³CNMR 鉴定结构,HPLC 检测,面积归一化法计算质量分数,均大于 98%。

1.4 药材:各品种淫羊藿样品均由洛阳陆生天然植物研究所王忠东提供并鉴定。见表 1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性实验:色谱柱:BECKMAN COULTER—C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 10 μ m);流动相:乙腈-水,梯度洗脱(乙腈:0 min、20%, 5 min、30%, 10 min、50%, 35 min、50%),柱温:室温;灵敏度 0.02 AUFS;体积流量:1 mL/min;检测波长 270 nm;理论塔板数以朝藿定 C 计为 17 616 (1 号峰)、以淫羊藿苷计为 18 496 (2 号峰)。在本实验条件下,各对照品及样品的色谱图见图 1。

2.2 供试品溶液的制备:取各品种淫羊藿的干燥叶,60 °C 下烘 3 h,取烘干品,粉碎,过 40 目筛,取约 0.3 g,精密称定,置 50 mL 具塞锥形瓶中,加入 70% 乙醇 30 mL,称质量,超声提取 1 h,称质量并补足减失质量,滤过,弃去初滤液,取续滤液用微孔滤膜(4.5 μ m)滤过,作为供试品溶液。

2.3 对照品溶液的制备:精密称取朝藿定 C 6.02 mg,淫羊藿苷 5.35 mg,分别用甲醇溶解并定容于 5 mL 量瓶中,各取 0.1、0.3、0.5、0.7、0.9、1.0 mL 于 10 mL 量瓶中,混合,加甲醇稀释至刻度,摇匀作为混合对照品溶液。

2.4 标准曲线及线性范围的考察:精密吸取上述各混合对照品溶液进样 20 μ L,按色谱条件测定峰面积,以峰面积为纵坐标(Y),以对照品进样量(μ g)为横坐标(X),绘制标准曲线,朝藿定 C 和淫羊藿

收稿日期:2006-06-17

作者简介:谢娟平(1972—),女,陕西宝鸡人,工程师,现为西北大学生命科学院 2004 级硕士研究生,专业方向为中药有效成分分离分析与制备。Tel: 13319266304 E-mail: xjp_7312052@163.com

* 通讯作者 孙文基 Tel: (029) 88304569