

号”之间亲缘关系也较近,而“民勤1号”与其余3种亲缘关系较远。

3 讨论

甘草长期生长在甘肃、新疆恶劣气候条件下,其基因构成可能会产生不同程度的变异,而这种变异正是进行甘草新品系选育的基础。

“民勤1号”、“喀什1号”、“阿克苏1号”分别采集于甘肃、新疆等地的野生种群,笔者在对其进行引种栽培和优良品系选育的过程中,发现与常规人工栽培品系内蒙古乌拉尔甘草相比,在单位面积产量、抗性、产品品质等方面具有显著的优势。

UPGMA 聚类图表明4种来源乌拉尔甘草被划分为4组,并表现出不同远近的亲缘关系。遗传多样性分析显示,民勤1号的遗传多样性最大(0.2061),遗传多样性最小的是喀什1号(0.1952),这可能与生长环境有关:喀什较民勤生态环境恶劣,甘草生态位比较狭窄,遗传分化不如民勤明显。指纹图谱显示出“民勤1号”、“阿克苏1号”、“喀什1号”和内蒙古对照乌拉尔甘草相比具有的特异性谱带数量分别为6条、5条和2条。说明由于受到恶劣生长环境的长期影响,3个不同来源乌拉尔甘草经过较长时间的演变之后,已经各自形成了其独有的基因结构。因此

可以确定经过多年栽培选育的“民勤1号”、“喀什1号”和“阿克苏1号”可以作为乌拉尔甘草优良栽培新品系选育目标进行深入研究。

References:

- [1] Ch P (中国药典) [S]. 2005.
- [2] Zhou C M, Kong X F. A Study on cultivation techniques for *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. in Daxing County area, Beijing [J]. *China Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2000, 25(3): 140-143.
- [3] Zhou C M. The outline of the normative cultivation techniques for *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. [J]. *Res Infor Tradit Chin Med* (中药研究与信息), 2003, 5(2): 25-28.
- [4] Zhou C M. Cultivation techniques for *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. [J]. *Xinjiang Farmland Reclamation Sci Technol* (新疆农垦科技), 2006(1): 14-15.
- [5] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting [J]. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23(21): 4407-4414.
- [6] Sun Q L, Liang Y R, Ding Z T, et al. AFLP Molecular marker technique and its application to tea genetic and breeding research [J]. *J Tea* (茶叶), 2004, 30(4): 203-206.
- [7] Doyle J J, Doyle J L. Isolation of plant DNA from fresh tissue [J]. *Focus*, 1990, 12(1): 13-15.
- [8] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals [J]. *Genetics*, 1978, 89, 583-590.
- [9] Rohlf F J. *NTSYS-pc, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (Version 2.0 Exeter Software)* [M]. New York: Setauket, 1994.

佛手茎尖微嫁接技术研究

张桂芳,贺红*,徐鸿华,林小桦,吴立蓉

(广州中医药大学中药学院,广东广州 510006)

摘要:目的 探讨佛手茎尖微嫁接技术,为佛手无病毒木的培育奠定基础。方法 黑暗条件下培养柠檬实生苗用作砧木,以佛手茎尖为接穗,采用倒“T”字形法进行茎尖微嫁接试验,并对影响嫁接成活率的因素进行研究。结果 成功获得了佛手茎尖微嫁接苗,并优化了微嫁接的条件:选取苗龄为14d的柠檬实生苗为砧木,嫁接成活率较高;以带4个叶原基的佛手茎尖为接穗,效果较好,嫁接成活率可达65.2%;茎尖微嫁接后,切口外缠parafilm膜,能明显提高成活率。结论 建立了佛手茎尖微嫁接的方法,获得了嫁接成活苗。

关键词:佛手;茎尖微嫁接;成活率

中图分类号:R282.2

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)07-1081-04

Technique for shoot-tip grafting of *Citrus medica* var. *sarcodactylis*

ZHANG Gui-fang, HE Hong, XU Hong-hua, LIN Xiao-hua, WU Li-rong

(College of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Objective To study the technique for shoot-tip grafting of *Citrus medica* var. *sarcodactylis* in order to lay a foundation for culturing disease-free plantlets. **Methods** Using dark grown lemon

收稿日期:2006-09-08

基金项目:广东省自然科学基金项目(020792),国家中医药管理局研究课题(02-03ZP48)

作者简介:张桂芳(1980—),女,博士,从事药用植物组织培养及中药资源开发利用研究。

*通讯作者 贺红 Tel:(020)39358067 E-mail:hehong67@yahoo.com.cn

seedling as rootstock and shoot-tip of *C. medica* var. *sarcodactylis* as scion, the shoot-tip grafting was executed by grafting a scion in an inverted-T incision of lemon seedling. And the factors affecting the survival rate of shoot-tip grafting were studied. **Results** The micro-grafted plantlets of *C. medica* var. *sarcodactylis* were achieved. It was suggested that the more survival rate of grafting was obtained by using 14-day-old dark grown seedlings as rootstocks. The scions consisted of the apical meristem plus four leaf primordia were optimal for grafting, with survival rate of 65.2%. Moreover, the survival rate of grafting could be increased obviously if the grafting-incisions were twisted with parafilm. **Conclusion** A procedure of shoot-tip grafting *in vitro* has been established in *C. medica* var. *sarcodactylis* and micro-grafted survival plantlets have been obtained.

Key words: *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* (Noot.) Swingle; shoot-tip grafting; survival rate

佛手 *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* (Noot.) Swingle 为芸香科柑桔属植物,以干燥果实入药,具有疏肝理气、和胃止痛的功效^[1]。随着市场需求的扩大及产业化生产的发展,对佛手的产量和质量提出了更高的要求,需要在栽培管理、病虫害防治及优质种苗的培育等方面做好工作。笔者通过调查发现,影响佛手产量和质量的主要因素之一是病害的危害,尤其是佛手黄龙病。而且,由于佛手通常以扦插和嫁接繁殖,长期的无性繁殖,病原体逐代传递和积累,造成植株长势减弱、生活力下降、产量降低、品质变劣,严重威胁佛手的生产。运用现代生物技术培育无病原体苗,已成为佛手生产中极为迫切的问题。茎尖微嫁接技术可以脱除病原体,这项技术已在柑桔、沙田柚上获得成功,并逐步在生产上应用^[2~5]。本实验探讨了佛手茎尖微嫁接的方法并对影响嫁接成活率的因素进行研究,为佛手无病苗木的培育奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料:感染黄龙病的佛手 *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* (Noot.) Swingle 来源于广东省肇庆地区,通过电镜和 PCR 技术检测证明感染了黄龙病病原^[6];砧木为柠檬 *C. limon* (Linn.) Burm. f. 实生苗。

1.2 方法

1.2.1 砧木的培养:取成熟柠檬果实中的种子,经表面消毒,剥去种皮,接种于 MS 培养基上,在培养箱中黑暗条件下培养,培养温度为 28 ℃。

1.2.2 接穗的准备:采摘 2~3 cm 长的佛手病株嫩芽,切取 0.5~1 cm 茎尖,用蒸馏水冲洗几次,75% 酒精浸泡约 30 s,0.1% HgCl₂ 消毒 6 min,无菌水冲洗 4~5 次后,在双目显微镜下剥取 0.2 mm 左右的茎尖作为接穗(图 1-A)。

1.2.3 茎尖微嫁接:在无菌条件下,将砧木苗从培

养瓶中移出,选择根茎部直径较大的健壮苗,切去子叶和部分过长的根并去顶,留约 1.5 cm 长的上胚轴(图 1-B),在双目显微镜下,用自制的解剖刀在上胚轴上切成倒“T”字形切口,随后,将茎尖接到砧木的倒“T”字形切口上,根据实验要求分为外缠 parafilm 膜和不缠膜。

1.2.4 嫁接苗的生长:将嫁接苗移入带滤纸桥的液体培养基中,以 MT 为基本培养基,附加 6-BA 0.1 mg/L 和 7.5% 的蔗糖;培养温度为 (26±1) ℃,每天光照 12 h,光照强度为 2 klx。观察嫁接苗的长势,一个月后记录嫁接成活率。一般每个实验处理,嫁接的苗数为 20 个左右。

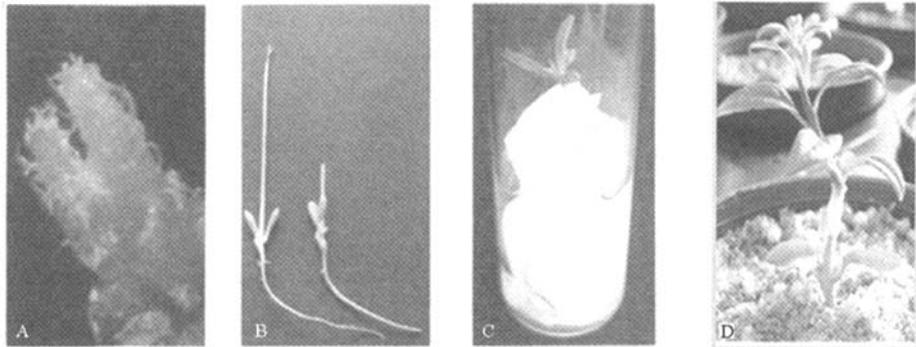
2 结果与分析

2.1 佛手茎尖微嫁接苗的获得:按照上述嫁接方法,在双目显微镜下,将切好的茎尖嫁接到砧木上胚轴的倒“T”字形切口上,外缠 parafilm 膜,再将整株移入带滤纸桥的液体培养基中。培养一周后,接穗和上胚轴切口处产生愈伤组织,嫁接苗开始成活。这时要及时除去砧木上长出的不定芽以减少对接穗萌发的影响;两周后,接穗开始萌生新叶,砧木也长出少量白色、幼嫩的新根;第 3 周,茎尖微嫁接苗长出 6~8 片真叶(图 1-C),此时,将其从培养室中移出,在室内自然光下培养 3 d,取出用蒸馏水洗净,置于 5 mg/L IBA 溶液中浸泡 24 h 后,单株移入混合土壤(50%的营养土:50%细砂)的营养钵中,注意植株的保湿,移栽时应使根系紧密接触土壤,用 1/2 MT 培养液充分湿润土壤。一个月后,茎尖微嫁接成活苗可以长出 10 片左右新叶(图 1-D)。

2.2 砧木苗龄对嫁接成活率的影响:为了考察砧木苗龄对嫁接成活率的影响,取苗龄为 8、10、12、14、16、18、20、22、26、32、36 d 的实生苗为砧木,以带 4 个叶原基的佛手茎尖为接穗,分别进行微嫁接,并在嫁接切口外缠 parafilm 膜。可以看到,培养两周时,

砧木苗龄在 8~18 d 的茎尖微嫁接苗长势良好,茎尖生长快,根系旺盛,长出许多白色、幼嫩的新根;随着砧木苗龄的增加,茎尖长势逐渐变差;而砧木苗龄为 32~36 d 的嫁接苗长势最差,茎尖生长缓慢,且逐渐萎蔫,根系变黄。一个月后统计成活率(图 2),砧木苗龄为 14 d,茎尖嫁接成活率最高,达 60.0%;苗龄小于 14 d 的砧木,其嫁接成活率较低;但随着

苗龄的增加,嫁接成活率也逐渐下降。当砧木苗龄为 36 d 时,嫁接成活率为 0,说明砧木苗龄对嫁接成活率影响较大。由于苗龄为 14 d 时,砧木长势良好,苗径围度较粗,且尚未纤维化,切口易产生愈伤组织,有利于和接穗愈合;接穗通过砧木可以及时获得水分和营养,所以嫁接成活率较高。因此,以下试验均选取苗龄为 14 d 的柠檬实生苗为砧木。



A-带 2 个叶原基的佛手茎尖(50 倍) B-砧木 C-茎尖微嫁接苗 D-移栽成活的茎尖微嫁接苗
A-microbud with apical meristem and two leaf primordial (50 times) B-rootstock
C-micro-grafted plantlet D-transplant micro-grafted plantlets

图 1 佛手茎尖微嫁接

Fig. 1 Shoot-tip grafting of *C. medica* var. *sarcodactylis*

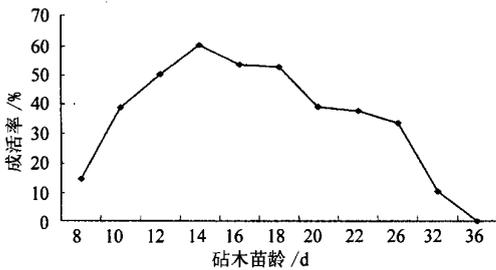


图 2 不同砧木苗龄对嫁接成活率的影响

Fig. 2 Effect of various rootstock ages on survival rate of shoot-tip grafting

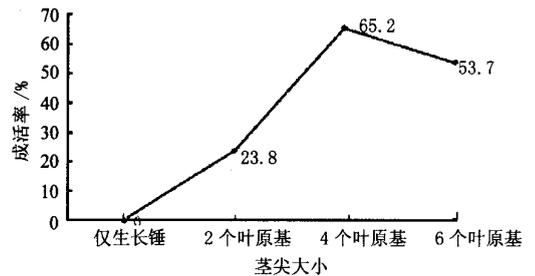


图 3 接穗大小对嫁接成活率的影响

Fig. 3 Effect of scion size on survival rate of shoot-tip grafting

2.3 接穗大小对嫁接成活率的影响:切取不同大小的茎尖,即无叶原基、带 2 个叶原基、带 4 个叶原基及带 6 个叶原基,分别进行微嫁接试验,切口外缠 parafilm 膜,结果见图 3。可以看出,接穗大小直接影响嫁接成活率,带 4 个叶原基的茎尖嫁接成活率最高,达 65.2%;6 个叶原基的茎尖嫁接成活率有所降低,这可能是因为砧木接口较细,接穗大时,造成砧木裂口较大,两者不易愈合;无叶原基的茎尖嫁接后,一般在 1~3 d 内就变褐、死亡,可能是因为仅有生长锥,活力有所下降,同时剥取时操作时间较长,分生细胞有一定损伤。根据 Navarro 等^[2]在柑桔上的研究证明,只有小于 0.18 mm(约 3 个叶原基)的茎尖是不带病原体的,因此综合考虑嫁接成活率及

脱病原体的效果,笔者认为接穗大小以带 3~4 个叶原基的茎尖为好。

2.4 切口外缠膜对嫁接成活率的影响:切取带 4 个叶原基的茎尖进行嫁接试验,分两种处理方式:切口外缠 parafilm 膜;不缠膜,结果见图 4。切口外缠 parafilm 膜者,在 5 d 内茎尖大多保持绿色,7 d 左右,茎尖开始长大,14 d 左右最大的可长至 1 cm,一个月后成活率达 55.6%;切口未缠膜者,在嫁接后 2 d,大多茎尖开始变褐、死亡,4 d 后已有将近一半变褐、干枯死亡,一个月后的成活率仅为 12.5%。其原因可能为不缠膜时砧木和接穗间的空隙大,不易愈合,茎尖得不到水分和营养,易于干枯死亡;而切口外缠膜,可使砧木和接穗之间的空隙减少,切口所产生

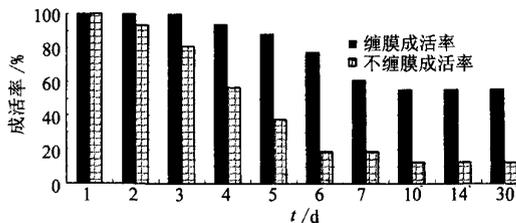


图 4 切口外缠膜对嫁接成活率的影响

Fig. 4 Effect of incision twisted with paraffin on survival rate of shoot-tip grafting

的愈伤组织可快速填满伤口,明显提高嫁接成活率。

3 讨论

柑桔属植物的病害较为严重,如黄龙病是由类细菌(类菌原体)侵染所致,以木虱作为传播媒介,是一种毁灭性的病害。现有的防治措施,主要是喷洒农药杀灭木虱及烧毁病株,从切断传染源方面来控制其蔓延,但对病害本身并没有有效的防治手段。同时农药残留超标,严重制约了高产、优质、低残留药材和水果的生产。因此,无病苗木的培育具有重要的意义。目前,柑桔属植物无病苗木的培育方法主要有热处理法、珠心胚培养、茎尖培养及茎尖微嫁接等 4 种。热处理法较为简便易行,但经处理后的苗木和接穗存活率较低,且对于病毒脱除困难^[7]。珠心胚培养会产生童期症状,且多变异^[8]。茎尖培养脱除病原体,在许多植物上获得成功并应用于生产,但柑桔属植物的离体实验表明,茎尖培养难以成活且存在生根难的问题^[5]。采用茎尖微嫁接可以克服此类困难,

自 Navarro 等^[2]首次应用于柑桔脱毒后,20 多年来得到了迅速的发展,并产生了巨大的经济效益。由于它既不会产生变异,也无童期现象,同时,又能脱除大部分病原体,因此已成为获得柑桔属植物无病原体苗木的最佳途径^[2~5]。通过茎尖微嫁接试验,笔者建立了佛手茎尖微嫁接方法,获得了较高的嫁接成活率,为培育佛手脱病原体苗奠定了基础。本实验首次报道佛手茎尖微嫁接技术,有关微嫁接苗病原体的检测及繁殖,还有待进一步研究。

References:

- [1] Xiao P G. *Modern Chinese Materia Medica I* (新编中药志 I) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2002.
- [2] Navarro L, Roistache C N, Murashige T. Improvement of shoot-tip grafting *in vitro* for disease-free citrus [J]. *Am Soc Hort Sci*, 1975, 100(5): 471-479.
- [3] Mukhopadhyay S. Micropropagation of Darjeeling orange (*Citrus reticulata* Blanco) by shoot-tip grafting [J]. *J Hortsci*, 1997, 72(3): 493-499.
- [4] Song R L, Wu R J, Ke C. Elimination of the main citrus virus and virus-like diseases by shoot-tip grafting [J]. *Acta Phytopathol Sin* (植物病理学报), 1999, 29(3): 275-279.
- [5] Dong G F, Li G G, Zhang L Y, et al. Studies on improving the successful frequency of shoot-tip grafting of Shatian Pomelo [J]. *Guihaia* (广西植物), 2001, 21(3): 273-276.
- [6] He H, Zhang G F, Pan C M, et al. New record of Huanglongbing on *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* (Noot.) Swingle in Guangdong [J]. *Acta Phytopathol Sin* (植物病理学报), 2005, 35(2): 190-192.
- [7] Murashige T, Bitters P, Rangan T S, et al. A technique of shoot-apex grafting and its utilization toward recovering disease-free citrus clones [J]. *Hortiscience*, 1972, 7: 118-119.
- [8] Brlansky R H. Citrus tristeza virus B popular in South Florida [J]. *Proc Fla State Hort Soc*, 1986, 99: 66-69.

海南胡椒药材的 HPLC 指纹图谱研究

张艳秋,洪金波

(海南省药物研究所,海南 海口 570314)

摘要:目的 建立胡椒药材的指纹图谱,为胡椒的质量控制提供新方法。方法 采用高效液相色谱法,选用 YMCC₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-水(65:35);体积流量为 1 mL/min;检测波长为 245 nm。结果 建立了胡椒药材的指纹图谱,并检测了不同来源 10 批胡椒药材 HPLC 指纹图谱,相似度较高,并且利用“中药色谱指纹图谱相似度评价软件”生成了胡椒药材的对照指纹图谱,共有指纹峰 12 个,各色谱峰分离良好;对比分析 4 批市售胡椒粉 HPLC 指纹图谱与对照图谱的相似度。结论 所建立的胡椒药材的指纹图谱有良好的精密性、重现性、稳定性,适于胡椒的质量控制。

关键词:胡椒;HPLC;指纹图谱;相似度

中图分类号:R282.7

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)07-1084-04

收稿日期:2006-10-20

基金项目:海南省自然科学基金项目(20103)

作者简介:张艳秋(1962—),女,吉林人,研究员,研究方向为中药质量控制的方法学研究和新品开发。

E-mail: zyq@hifda.gov.cn