

菊、怀大白菊、济菊、祁菊等北方药用菊花,通过主坐标分析将南方药用菊花进一步细分,可分为 2 个类群包括桐乡菊系列和其他菊系列。

本试验中采用系统聚类分析和主坐标分析所获得的结果基本一致,两种分析所表达的信息各有特点:系统聚类分析能提供丰富的数量信息,量化地体现种源之间的关系。主坐标分析能从不同的方向和层面更直观地提供更多的关于各种源或群体的关系。因此,两种方法并不重复,将系统聚类分析和主坐标分析结合起来使用,可以互相印证和补充。

参考文献:

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2005.
- [2] 盛 蒂,郭亚勤,王旭东,等. 七种栽培类型菊花的植物学特征、产量及有效成分比较研究[J]. 中草药, 2006, 37(6): 914-917.
- [3] 刘大会,朱端卫,周文兵,等. 氮、磷、钾配合施用对福田白菊产量和品质的影响[J]. 中草药, 2006, 37(1): 125-129.
- [4] 王德群,梁益敏,刘守金. 中国菊花品种演变[J]. 中国中药杂志, 1994, 24(10): 584-587.
- [5] 王德群,刘守金,梁益敏. 中国药用菊花的产地考察[J]. 中国中药杂志, 1999, 24(9): 522-525.
- [6] 徐文斌,郭巧生,李彦农,等. 药用菊花不同栽培类型内在质量的比较研究[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(21): 1645-1648.
- [7] 徐文斌,郭巧生,王长林,等. 药用菊花遗传多样性的 RAPD 研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(1): 18-21.
- [8] Gibert J E, Lewis R V, Wilkinson J, et al. Developing an appropriate strategy to assess genetic variability in plant germplasm collections [J]. *Theor Appl Genet*, 1999, 98: 1125-1131.
- [9] 雷 果,王 益,赵阿曼,等. 梔子道地药材遗传关系的 ISSR 证据[J]. 中草药, 2009, 40(1): 116-120.
- [10] 罗 群,马丹炜,王跃华. 川乌遗传多样性的 ISSR 鉴定[J]. 中草药, 2006, 37(10): 1554-1557.
- [11] 吴 卫,郑有良,陈 黎,等. 利用 ISSR 标记分析鱼腥草种质资源的遗传多样性[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2003, 5(1): 70-77.
- [12] 倪开诚,闵 芳,郭卫东,等. 采用 ISSR 分子标记进行草珊瑚 8 个种源的遗传多样性分析[J]. 中草药, 2008, 39(9): 1392-1396.
- [13] 邹喻苹,葛 颂,王晓东,等. 系统与进化植物学中的分子标记[M]. 北京:科学出版社, 2001.
- [14] 戴思兰,王文奎,黄家平. 菊属系统学及菊花起源的研究进展[J]. 北京林业大学学报, 2002, 24(5): 230-234.
- [15] 陈发棣,陈佩度,房伟民,等. 栽培小菊与野生菊间杂交一代的细胞遗传学初步研究[J]. 园艺学报, 1998, 25(3): 308-309.
- [16] 陈发棣,陈佩度,李鸿渐. 几种中国野生菊的染色体组分析及亲缘关系初步研究[J]. 园艺学报, 1996, 23(1): 67-72.

黄独脱毒苗快繁技术的研究

尹明华,洪森荣*

(上饶师范学院 生命科学系,江西 上饶 334001)

摘 要:目的 以黄独脱毒苗为试材,研究不同因素对黄独带芽茎段芽增殖和生根的影响,以期对黄独脱毒苗的快繁技术进行优化。方法 采用植物组织培养的方法进行茎尖培养和快繁研究,采用 RT-PCR 法对茎尖脱毒植株进行病毒检测。结果 黄独脱毒苗带芽茎段的最佳培养基是 MS+KT 2 mg/L+6-BA 1 mg/L+NAA 0.5 mg/L;黄独脱毒苗带芽茎段增殖的最佳蔗糖质量浓度和琼脂质量浓度分别是 30 和 0 g/L;黄独脱毒苗带芽茎段生根的最佳培养基是 1/2 MS+IBA 0.1 mg/L+NAA 0.5 mg/L+PP₃₃₃ 1 mg/L;黄独试管苗移栽的最好基质是珍珠岩:蛭石(2:1);黄独试管苗移栽时最佳的 PP₃₃₃ 质量浓度是 50 mg/L。结论 首次成功建立了黄独脱毒苗的快繁技术,为黄独脱毒苗的工厂化生产奠定了技术基础。

关键词:黄独;脱毒苗;快繁技术;优化

中图分类号:R282.2

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)12-1975-05

Rapid propagation technology of *Dioscorea bulbifera* virus-free plantlets

YIN Ming-hua, HONG Sen-rong

(Department of Life Sciences, Shangrao Normal University, Shangrao 334001, China)

Abstract: Objective Effects of different factors on proliferation and rooting of stems with a bud were studied by using *Dioscorea bulbifera* as test material to optimize the rapid propagation system of *D. bulbifera* virus-free plantlets. **Methods** Plant tissue culture method was used in shoot tip culture and rapid

收稿日期:2009-02-05

基金项目:江西省教育厅科技一般项目(GJJ09374);上饶师范学院 2009-2010 年度院级科技项目(SR0911)

作者简介:尹明华,女,硕士,讲师,研究方向为生物技术。

* 通讯作者 洪森荣

propagation study, and RT-PCR method was used in virus detection of virus-free plantlets. **Results** The best proliferation medium of *D. bulbifera* stems with a bud was MS+KT 2 mg/L+6-BA 1 mg/L+NAA 0.5 mg/L; The best sucrose and agar concentration of *D. bulbifera* stems with a bud was 30 g/L and 0 g/L, respectively; The best rooting medium of *D. bulbifera* stems with a bud was 1/2 MS+IBA 0.1 mg/L+NAA 0.5 mg/L+PP₃₃₃ 1 mg/L; The best transplanting matrix of regeneration plantlets from *D. bulbifera* stems with a bud was perlite-vermiculite (2 : 1); The best PP₃₃₃ concentration of *D. bulbifera* regeneration plantlets for transplanting was 50 mg/L. **Conclusion** The rapid propagation system of *D. bulbifera* virus-free plantlets is established successfully for the first time, which provides a technological basis for factory production of *D. bulbifera* virus-free plantlets.

Key words: *Dioscorea bulbifera* L.; virus-free plantlets; rapid propagation system; optimization

黄独 *Dioscorea bulbifera* L. 为薯蓣科 (Dioscoreaceae) 薯蓣属 (*Dioscorea* L.) 植物,是世界广布种,在中国主要分布于浙江、江西、福建等地^[1],其肉质块茎可入药,性味苦、平,具有散结消癥、清热解毒、凉血降火的功效^[2]。临床上常用于治疗甲状腺肿、抗肿瘤、抗炎、抗病毒等^[3]。目前关于黄独的研究,主要集中于黄独的化学成分^[4]、药理作用^[5]、临床应用^[6]、遗传多样性^[7]和栽培管理^[8]等方面,而关于黄独组织培养的研究,国内尚无研究,国外近几年才开始对它进行了研究,如 Narula 等^[9]分别对黄独的细胞培养进行了研究,Chu 等^[10]对黄独试管苗的再生进行了研究,但有关黄独组织培养的研究缺乏系统报道。而在生产中,黄独由于长期采用珠芽和块茎繁殖^[8],病毒感染严重,造成产量下降、品质退化。因此,如何脱除黄独的病毒,提高黄独产量,改善其品质是黄独生产中急需解决的重要问题。近年来,笔者通过茎尖培养获得了黄独的脱毒苗。本实验将对黄独脱毒苗的快繁技术进行优化,以期为黄独的产业化生产进一步提供理论依据和技术基础。

1 材料与方法

1.1 材料:黄独脱毒苗(上饶师范学院生命科学系植物组织培养室提供)。

1.2 方法

1.2.1 茎尖组培苗马铃薯 Y 病毒 (PVY) 检测:按照吴志明等^[11]提供的方法对茎尖组培苗进行 PVY 的 RT-PCR,结果进行琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.2 芽增殖条件的优化:根据病毒检测结果,从已经脱除病毒的黄独茎尖组培苗上切离带芽茎段 (0.5~1.5 cm) 接种至增殖培养基。增殖培养基以 MS 为基本培养基,附加不同浓度的 2 种生长调节剂 (6-BA 和 NAA,或 KT 和 NAA)。KT 为 0、1.0、2.0 mg/L,NAA 为 0、0.5、1.0 mg/L,6-BA 为 0、1.0、2.0 mg/L。按照正交表 L₉(3⁴) 设计试验

(表 1),其中 9 个试验号即为 9 种培养基序号。所用培养基中蔗糖量均为 30 g/L,冷凝脂量均为 7.5 g/L,pH 5.8~6.0。光照时间:12 h/d;光照强度:1 000~2 000 lx;温度:(25±1)℃。筛选最佳培养基后进行其他单因子实验,后续实验所用培养基中蔗糖量为 0、5、10、30、50、100 g/L。琼脂量为 0、1、2.5、5、10、15 g/L。以上实验均在 30 d 时统计试管苗的新生芽数和株高。

表 1 增殖培养基中 3 激素 (6-BA,KT,NAA) 3 水平正交设计
Table 1 Orthogonal design of three levels for three hormones (6-BA, KT, and NAA) in proliferation media

试验号	因 素		
	NAA/(mg · L ⁻¹)	6-BA/(mg · L ⁻¹)	KT/(mg · L ⁻¹)
1(CK)	1(0)	1(0)	1(0)
2	1(0)	2(1.0)	2(1.0)
3	1(0)	3(2.0)	3(2.0)
4	2(0.5)	1(0)	2(1.0)
5	2(0.5)	2(1.0)	3(2.0)
6	2(0.5)	3(2.0)	1(0)
7	3(1.0)	1(0)	3(2.0)
8	3(1.0)	2(1.0)	2(0)
9	3(1.0)	3(2.0)	1(1.0)

1.2.3 生根条件的优化:将黄独带芽茎段 (0.5~1.5 cm) 从增殖培养基上切离下来,接种于添加不同质量浓度 IBA、NAA 和多效唑 (PP₃₃₃) 的 1/2MS 培养基 (生根培养基) 上。IBA 为 0、0.1、0.5 mg/L,NAA 为 0、0.5、1.0 mg/L,PP₃₃₃ 为 0、0.5、1.0 mg/L。按照正交表 L₉(3⁴) 设计试验 (表 2),其中 9 个试验号即为 9 种培养基序号。所用培养基中蔗糖量均为 30 g/L,冷凝脂量均为 7.5 g/L,pH 5.8~6.0。光照时间:12 h/d;光照强度:1 000~2 000 lx;温度:(25±1)℃。以上实验均在 30 d 时统计生根启动时间、根数、根长、根粗等形态指标。

1.2.4 移植条件的优化:茎尖组培苗生根培养 30 d 后,在自然光下闭瓶炼苗 3 d,再打开瓶口锻炼 3 d

表 2 生根培养基中 3 激素 (IBA,NAA,PP₃₃₃) 3 水平正交设计
Table 2 Orthogonal design of three levels for three hormones (IBA, NAA, and PP₃₃₃) in rooting media

试验号	因 素		
	IBA/(mg · L ⁻¹)	NAA/(mg · L ⁻¹)	PP ₃₃₃ /(mg · L ⁻¹)
1(CK)	1(0)	1(0)	1(0)
2	1(0)	2(0.5)	2(0.5)
3	1(0)	3(1.0)	3(1.0)
4	2(0.1)	1(0)	2(0.5)
5	2(0.1)	2(0.5)	3(1.0)
6	2(0.1)	3(1.0)	1(0)
7	3(0.5)	1(0)	3(1.0)
8	3(0.5)	2(0.5)	1(0)
9	3(0.5)	3(1.0)	2(0.5)

后,洗去附着的培养基,即可移栽于培养钵的基质中。移栽基质设 4 个处理:(1)珍珠岩;(2)蛭石;(3)沙土;(4)珍珠岩:蛭石(2:1)。筛选最佳移栽基质后再进行 PP₃₃₃ 对移栽成活率的影响实验,每日浇灌附加不同浓度 PP₃₃₃ 的 MS 基本培养液,移栽后 30 d 调查成活率并测定成活苗的部分生理生化指标。

1.2.5 PP₃₃₃ 对移栽脱毒苗生理生化指标的影响:黄独茎尖脱毒苗移栽时用不同浓度的 PP₃₃₃ 处理后,测定成活苗的部分生理生化指标。总叶绿素(叶绿素 a 和叶绿素 b)量的测定用丙酮比色法^[12];根系活力的测定用 TTC 法^[12];可溶性糖定量测定用蒽酮比色法测定^[12]。过氧化物酶(POD)活性的测定用愈创木酚法^[12]。

1.2.6 黄独快繁再生苗马铃薯 Y 病毒(PVY)检测:按照吴志明等^[11]提供的方法对茎尖组培苗进行 PVY 的 RT-PCR,结果进行琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3 统计方法:以上实验均重复 3 次,每次处理样本数为 25±3,所有数据表示为 Mean±SD。实验数据用 SPSS 10.0 软件 One-Way ANOVA 分析后,进行 t 检验。

2 结果

2.1 黄独茎尖苗的 RT-PCR 法检测结果:采用 RT-PCR 法对黄独茎尖培养的不同株系(图 1)进行了 PVY 检测(图 2)。

由图 2 可以看出,4 和 5 号株系未跑出亮带,说明脱除了 PVY;2 和 6 号株系仅有微弱的亮带,说明带有极少量的 PVY;3 号株系跑出的条带较亮,说明未脱除 PVY,且带毒量较高。后续实验以 4 和 5 号黄独株系进行快繁技术的优化。

2.2 植物生长调节剂对黄独带芽茎段增殖的影响:本实验比较了不同植物生长调节剂组合对黄独带芽茎段增殖的影响,实验结果见表 3。

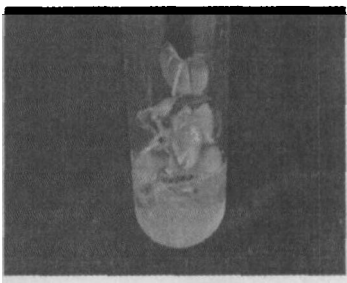
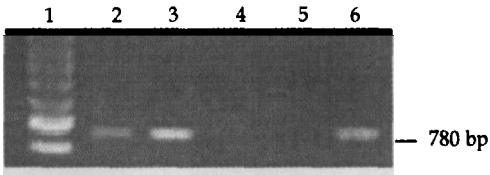


图 1 黄独茎尖再生苗
Fig. 1 Plantlets regenerated from *D. bulbifera* shoot-tips



1-Marker 2~6-黄独茎尖脱毒苗待测株系
1-Marker 2—6-*D. bulbifera* plantlets grown from shoot-tips
图 2 黄独茎尖脱毒苗中 PVY 的 RT-PCR 电泳结果
Fig. 2 RT-PCR Results of PVY in *D. bulbifera* plantlets grown from shoot-tips

表 3 植物生长调节剂组合对黄独带芽茎段增殖的影响
Table 3 Effects of plant growth regulators on proliferation of stems with a bud of *D. bulbifera*

培养基序号	芽 数	净增株高/cm
1	0.6±0.3fD	1.5±0.7eD
2	1.6±0.5eCD	3.1±1.1dCD
3	1.8±0.3deC	3.3±1.0dC
4	2.9±0.3bcB	6.2±0.6bcB
5	4.7±0.6aA	9.4±0.7aA
6	2.9±0.5bcB	5.3±0.5cB
7	3.5±0.3bB	6.7±0.5bB
8	2.5±0.7cBC	5.6±0.9bcB
9	3.2±0.4bcB	6.3±0.5bcB

同一例中大、小写字母分别表示在 0.01 和 0.05 水平上的差异性,下同

Capital and small letters in same row stand for significance on 0.01 and 0.05 levels, same as below

从表 3 可知,5 号培养基上黄独带芽茎段的芽数和株高与其他培养基比较均具有显著或极显著性差异,所以黄独脱毒苗带芽茎段增殖的最佳培养基是 5 号培养基即 MS+KT 2 mg/L+6-BA 1 mg/L+NAA 0.5 mg/L。

2.3 蔗糖对黄独带芽茎段增殖的影响:本实验比较了不同蔗糖质量浓度对黄独带芽茎段增殖的影响,实验结果见表 4。

从表 4 可知,添加 30 g/L 蔗糖后,其增殖芽数和株高与其他蔗糖质量浓度比较均具有显著或极显著性差异,所以黄独脱毒苗带芽茎段增殖的最佳蔗糖质量浓度是 30 g/L。

2.4 琼脂对黄独带芽茎段增殖的影响:本实验比较了不同琼脂质量浓度对黄独带芽茎段增殖的影响,实验结果见表 5。

表 4 蔗糖对黄独带芽茎段增殖的影响
Table 4 Effects of sucrose on proliferation of stems with a bud of *D. bulbifera*

蔗糖/(g·L ⁻¹)	芽数	净增株高/cm
0	1.7±0.4cC	2.1±0.3dD
5	2.4±0.5bcBC	3.0±0.5cdCD
10	3.1±0.5bB	5.5±0.9bB
30	4.7±0.8aA	8.7±1.0aA
50	3.3±0.4bB	5.3±0.9bB
100	2.5±0.6bB	4.2±0.6bcBC

表 5 琼脂对黄独带芽茎段增殖的影响
Table 5 Effects of agar on proliferation of stems with a bud of *D. bulbifera*

琼脂/(g·L ⁻¹)	芽数	净增株高/cm
0	6.7±1.0aA	9.7±0.8aA
1	2.6±0.7cC	3.5±0.8dC
2.5	3.4±0.5cBC	4.5±0.8dC
5	4.6±0.2bB	7.6±0.9bB
10	3.1±0.4cC	5.9±0.8cBC
15	2.8±0.4cC	4.1±0.3dC

从表 5 中可知,培养基不加琼脂,黄独脱毒苗的增殖芽数和株高与其他琼脂质量浓度比较均具有显著或极显著性差异,所以黄独脱毒苗带芽茎段增殖的最佳琼脂质量浓度是 0 g/L 即采用液体培养基。

2.5 植物生长调节剂对黄独带芽茎段生根的影响:本实验比较了不同植物生长调节剂组合对黄独带芽茎段生根的影响,实验结果见表 6。

表 6 植物生长调节剂对黄独带芽茎段生根的影响
Table 6 Effects of plant growth regulators on rooting of stems with a bud of *D. bulbifera*

培养基序号	生根时间/d	根数/个	根长/cm	根粗/mm
1	—	0eF	0fD	0bB
2	17~20	3.0±0.5 dDE	5.7±0.4cdeBC	0.9±0.2aA
3	11~30	6.7±0.8bB	7.6±1.1bBC	1.0±0.2aA
4	15~18	4.7±1.0cCD	6.1±0.6cdBC	0.9±0.1aA
5	10~12	9.8±1.1aA	6.8±0.8bcB	1.1±0.2aA
6	18~23	2.5±0.7dE	5.3±0.6deBC	0.5±0.3bB
7	12~15	5.7±0.8bcBC	9.8±1.0aA	1.0±0.2aA
8	19~23	1.9±0.3dE	4.6±0.9eC	0.5±0.3bB
9	14~16	5.3±0.8cBC	10.9±1.4aA	1.0±0.2aA

表 9 PP₃₃₃ 对移栽试管苗部分生理生化指标的影响

Table 9 Effects of PP₃₃₃ on physiological and biochemical indexes of regenerated plantlets of *D. bulbifera*

PP ₃₃₃ 浓度/ (mg·L ⁻¹)	总叶绿素的量/ (μg·g ⁻¹)	根活力/ μg·g ⁻¹ FW·h ⁻¹	可溶性糖的量/ mmol·g ⁻¹ FW	POD 活性/ U·g ⁻¹	SOD 活性/ U·g ⁻¹
0	0.671±0.122 eD	299.7±40.1 eD	149.2±17.3eD	0.193±0.028dC	56.7±7.1eE
10	0.981±0.140cBC	497.3±34.3dC	186.7±9.1cdBC	0.352±0.061cC	77.3±8.2dD
20	1.171±0.007bB	702.0±19.3bB	215.3±7.5bB	0.579±0.059bB	132.4±11.6bB
50	1.453±0.008aA	877.4±57.2aA	243.7±11.1aA	0.865±0.090aA	176.2±7.5aA
100	0.886±0.010cdCD	587.5±55.6cC	200.4±13.5bcBC	0.672±0.098bB	105.7±6.7cC
200	0.757±0.101deCD	502.3±53.9dC	179.3±4.5dC	0.554±0.067bB	75.4±6.6dDE

由表 6 可知,5 号培养基上黄独带芽茎段的生根时间最早,而且其试管苗根数和根长与其他培养基比较均具有显著或极显著性差异。从表 6 还可知,添加 PP₃₃₃ 的培养基上的试管苗根粗与未添加 PP₃₃₃ 的培养基上的试管苗比较,也具有显著或极显著性差异,表明 PP₃₃₃ 具有壮根的作用。所以黄独脱毒苗带芽茎段生根的最佳培养基是 5 号培养基即 1/2MS+IBA 0.1 mg/L+NAA 0.5 mg/L+PP₃₃₃ mg/L。

2.6 移栽基质对试管苗移栽成活率的影响:本实验比较了不同移栽基质对黄独试管苗移栽成活率的影响,实验结果见表 7。

表 7 移栽基质对试管苗移栽成活率的影响
Table 7 Effects of transplanting matrix on survival rate of regenerated plantlets of *D. bulbifera*

移栽基质	成活率/%	移栽基质	成活率/%
珍珠岩	64.9±5.6 bBC	沙土	66.4±8.6 bAB
蛭石	46.9±7.4 cC	珍珠岩:蛭石(2:1)	85.2±5.8 aA

从表 7 可知,蛭石为基质的试管苗成活率最低,其次是珍珠岩和沙土,而珍珠岩:蛭石(2:1)为基质的试管苗成活率最高,达 85%。所以黄独试管苗移栽的最好基质是珍珠岩:蛭石(2:1)。

2.7 PP₃₃₃ 对试管苗移栽成活率和部分生理生化指标的影响:本实验比较了不同 PP₃₃₃ 质量浓度对黄独试管苗移栽成活率的影响,并测定了经 PP₃₃₃ 处理后试管苗的部分生理生化指标,实验结果见表 8 和 9。

表 8 PP₃₃₃ 对试管苗移栽成活率的影响
Table 8 Effects of PP₃₃₃ on survival rate of regenerated plantlets of *D. bulbifera*

PP ₃₃₃ /(mg·L ⁻¹)	成活率/%	PP ₃₃₃ /(mg·L ⁻¹)	成活率/%
0	84.2±5.2bcBC	50	100.0±0.0aA
10	87.9±4.9bcABC	100	82.4±4.0bB
20	89.8±5.1bAB	200	76.8±7.6cC

从表 8 可知,经 50 mg/L PP₃₃₃ 处理后,黄独试管苗的成活率最高,与其他 PP₃₃₃ 质量浓度比较均具有显著或极显著性差异。所以黄独试管苗移栽时最佳的 PP₃₃₃ 质量浓度是 50 mg/L。

从表 9 可知,经 20 mg/L PP₃₃₃ 处理后,黄独试管苗的总叶绿素的量、根系活力、可溶性糖的量、POD 活性和 SOD 活性与其他 PP₃₃₃ 质量浓度比较均具有显著或极显著性差异。这些生理生化指标的增加,是黄独试管苗的成活率提高的根本原因。

2.8 黄独快繁再生苗的 RT-PCR 法检测结果:采用 RT-PCR 法对黄独带芽茎段的快繁再生苗(图 3)进行 PVY 检测,结果见图 4。

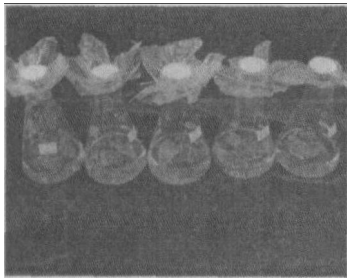


图 3 黄独带芽茎段再生的试管苗

Fig. 3 Plantlets regenerated from *D. bulbifera* stems with a bud



A-Marker B~F-黄独快繁再生苗待测株系
A-Marker B~F-*D. bulbifera* plantlets grown from stems with a bud

图 4 黄独快繁再生苗中 PVY 的 RT-PCR 电泳结果

Fig. 4 RT-PCR Results of PVY in *D. bulbifera* plantlets grown from stems with a bud

由图 4 可以看出,B、C 和 F 号株系未跑出亮带,说明脱除了 PVY;D 和 E 号株系仅有微弱的亮带,说明带有极少量的 PVY。RT-PCR 结果表明,以茎尖再生苗的带芽茎段进行快繁,可以保证黄独茎尖再生苗的脱毒效果。

3 讨论

茎尖培养是由感病植株获得无病毒材料的最有效手段^[13]。目前,茎尖培养脱病毒技术已在以营养繁殖为主的植物中得到广泛应用,并在马铃薯、甘薯等作物上取得了明显的增产效果。本实验表明,通过茎尖培养可以脱除严重影响黄独生产、且侵染普遍的马铃薯 Y 病毒。本实验进一步对检测无病毒的黄独试管苗进行快繁技术的优化。研究表明,带芽茎段有较强的分生能力,是最理想的外植体^[14]。生长调节剂对带芽茎段的增殖起着至关重要的作用^[15]。在植物组织培养中,使用最多的生长调节剂是细胞分裂素类和生长素类。本实验表明,使用高

质量浓度的 KT、低质量浓度的 6-BA 与 NAA 相互结合,黄独的繁殖系数高。这与廖飞雄等^[16]在菜薹上的试验结果一致。糖主要为试管芽苗的生长提供碳源和调节渗透势^[17]。本实验发现提高蔗糖质量浓度对黄独带芽茎段增殖有促进作用,但蔗糖质量浓度过高会抑制试管芽苗的生长,降低繁殖系数。这与 Chenevard 等^[17]对核桃试管苗再生的报道一致。本实验还表明,培养基中不加琼脂质量浓度低有助于带芽茎段增殖,繁殖系数高。但随着琼脂质量浓度的升高,培养基硬化,影响试管苗吸收养分,使其生长减慢,芽增生减少,繁殖系数降低。不定根的形成是组织培养过程中一个非常关键环节,它直接影响到组培苗移栽成活率的高低,关系到组织培养成败。PP₃₃₃ 是一种高效且低毒的植物生长延缓剂和广谱型杀菌剂,英文名是 Paclobutraol,中文名为多效唑,对植物具有促进生根等多种生理效应^[18]。本实验表明,PP₃₃₃ 对黄独增殖芽的生根具有显著效应,特别与一定质量浓度的 NAA 和 IBA 组合使用,能显著提高生根率,促进根增多、增长、增粗。这与李明军等^[19]对怀山药的研究结果一致。PP₃₃₃ 不仅能促进试管苗生根,还能提高再生苗的移栽成活率。本实验表明,50 mg/L 的 PP₃₃₃ 能显著提高黄独再生苗的移栽成活率。这与邱运亮^[20]在八仙花上的实验结果是一致的。不同基质对组培苗的移栽影响也较大。在本实验中,单独用蛭石作为移栽基质植株的成活率较低,植株长势极差,而珍珠岩与蛭石按 2:1 混合时,黄独组培苗的成活率非常高。这与王慧娟等^[21]在樱花组培苗上的实验结果是一致的。但草莓^[22]生根苗在全蛭石的基质上驯化,成活率却可达 98.33%,究其原因,可能是与植物种类有关。

参考文献:

- [1] Hong S R, Yin M H, Shao X H, et al. Cryopreservation of embryogenic callus of *Dioscorea bulbifera* by vitrification [J]. *Cryo Lett*, 2009, 30(1): 64-75.
- [2] 林厚文,张 罡,赵宏斌,等. 黄药子的研究进展 [J]. *中草药*, 2002, 33(2): 175-177.
- [3] 陈 勇,夏启松,程 明,等. 应有基因表达谱芯片研究黄药子对小鼠肝脏的毒性机制(简报) [J]. *分子细胞生物学报*, 2006, 39(6): 568-572.
- [4] Zhu X T, Yun Z, Yikun Z, et al. Capillary electrophoresis of the active ingredients of *Dioscorea bulbifera* L. and its medicinal preparations [J]. *Chromatographia*, 2006, 63, 617-622.
- [5] Komori T. Glycosides from *Dioscorea bulbifera* [J]. *Toxicol*, 1997, 35(10): 1531-1535.
- [6] 李建恒,潘 颖,于炳旗. 黄独不同溶剂提取物治疗恶性肿瘤临床疗效对比研究 [J]. *河北职工医学院学报*, 2002, 19(4): 1-2.
- [7] 郑玉红,夏 冰,杭悦宇,等. 黄独遗传多样性研究 [J]. *西*

- 北植物学报, 2006, 26(10): 2011-2017.
- [8] 孙伟, 李敬, 马淑坤. 东北地区栽种黄独技术要点[J]. 特种经济动植物, 2007, 4: 41.
- [9] Narula A, Kumar S, Srivastava P S. Abiotic metal stress enhances diosgenin yield in *Dioscorea bulbifera* L. cultures [J]. *Plant Cell Rep*, 2005, 24(4): 250-254.
- [10] Chu E P, de C'assia R, Ribeiro L F. Growth and carbohydrate changes in shoot cultures of *Dioscorea* species as influenced by photoperiod, exogenous sucrose and cytokinin concentrations [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 2002, 70(3): 241-249.
- [11] 吴志明, 时星, 谢晓亮, 等. 河北省马铃薯Y病毒株系分子鉴定及其RT-PCR检测[J]. 河北农业大学学报, 2005, 28(3): 54-59.
- [12] 张志良主编. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2003.
- [13] 柏新富, 蒋小满, 毕可华, 等. 芋脱毒苗的组培快繁及田间试验[J]. 应用与环境生物学报, 2002, 8(1): 52-55.
- [14] 洪森荣, 尹明华, 赵美娜. 黄独带芽茎段增殖和生根的初步研究[J]. 中草药, 2008, 39(10): 1556-1560.
- [15] 洪森荣, 尹明华, 邵兴华. 野葛高频植株再生体系相关因子的优化[J]. 亚热带植物科学, 2008, 37(1): 29-32.
- [16] 廖飞雄, 潘瑞炽, 何晓明. 菜薹茎尖培养中的激素与热激调控[J]. 园艺学报, 2003, 30(2): 224-226.
- [17] Chenevard D, Jay-Allemand C, Gendraud M, et al. The effect of sucrose on the development of hybrid walnut microcuttings (*Juglans nigra* × *Juglans regia*). Consequences on their survival during acclimatization [J]. *Ann Sci For*, 1995, 52: 147-156.
- [18] 贾洪涛, 党金鼎, 刘风莲. 植物生长延缓剂多效唑的生理作用机理及应用[J]. 安徽农业科学, 2003, 31: 323-324.
- [19] 李明军, 张嘉宝, 张海波. 怀山药零余子愈伤组织诱导及植株再生的研究[J]. 西北植物学报, 2000, 20: 772-777.
- [20] 邱运亮. PP₃₃₃对八仙花试管快繁的影响研究[J]. 中国农学通报, 2005, 21(4): 56-58.
- [21] 王慧娟, 孟月娥, 赵秀山, 等. 樱花组培苗的移栽技术研究[J]. 河南农业科学, 2006, 11: 99-101.
- [22] 何欢乐, 阳静, 蔡润, 等. 草莓茎尖培养快繁体研究[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2003, 21(增刊): 61-65.

川芎药材的 HPLC 指纹图谱及模式识别研究

王文燕¹, 赵强², 张铁军¹, 朱宏吉², 黎阳³

(1. 天津药物研究院, 天津 300193; 2. 天津大学化工学院, 天津 300072; 3. 天津中医药大学, 天津 300193)

摘要:目的 研究川芎药材的质量控制方法。方法 采用高效液相色谱建立了川芎药材的 HPLC 的指纹图谱, 收集了不同批次的 23 批样品进行测定, 并使用聚类分析和主成分分析对指纹图谱进行了模式识别研究。结果 建立川芎药材的指纹图谱。结论 该方法可用于川芎质量控制及综合评价。

关键词: 川芎药材; 指纹图谱; 主成分分析

中图分类号: R282.7

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)12-1980-05

HPLC Fingerprint and chemical pattern recognition method of *Rhizoma Chuanxiong*

WANG Wen-yan¹, ZHAO Qiang², ZHANG Tie-jun¹, ZHU Hong-ji², LI Yang³

(1. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China; 2. School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China; 3. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

Abstract: **Objective** To establish a method for quality control of *Rhizoma Chuanxiong*. **Methods** A high performance liquid chromatographic method was developed to establish the fingerprint of *Rhizoma Chuanxiong*, and 23 samples from various batches were analyzed. Cluster analysis and principal component analysis were applied to studying HPLC fingerprint and chemical pattern recognition. **Results** The fingerprint of *Rhizoma Chuanxiong* was set up. **Conclusion** The method provides an academic reference for controlling the quality of *Rhizoma Chuanxiong*.

Key words: *Rhizoma Chuanxiong*; fingerprint; principal component analysis

川芎为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎^[1]。具有活血化瘀、理气定痛、养心安神之功效。目前, 多用盐酸川芎嗪这单一成分作为川芎的质控指标, 难于全面地控制川芎的内在

质量, 不能对其真伪优劣做出判断^[1~5]。通过 HPLC 方法建立药材的指纹图谱, 并将聚类分析和相似度分析的数据分析技术应用于药材的指纹图谱已有少量报道^[6,7], 本实验通过此法分析、比较不同