

析,发现不同种源的有效成分含量之间存在明显差异。结果表明,东部地区的知母中菰苈皂苷元含量都在 1% 以上,其中河北易县、涿鹿、北京松山和黑龙江泰康为含量较高,最高可达到 2.4%,最低的河北涉县含量为 0.6%。西部地区的 11 个产地的平均值为 0.77%,经统计分析东西两地产知母有效成分含量存在极显著差异,详见表 1。因此,为确保知母的疗效,建议使用知母药材时考虑道地性因素。

表 1 不同产地野生知母菰苈皂苷元含量($\bar{x} \pm s$) %

地区	产地	含量	地区	产地	含量
东部	大庆	1.06 ± 0.22	西部	辉县	0.19 ± 0.04
	泰康	2.13 ± 1.03		灵丘	0.29 ± 0.09
	突泉	1.04 ± 0.12		孟县	3.47 ± 0.12
	通辽	1.78 ± 0.62		榆社	0.59 ± 0.12
	赤峰	1.23 ± 0.40		繁峙	0.53 ± 0.03
	松山	1.97 ± 0.34		陵川	1.33 ± 0.02
	涿鹿	2.44 ± 0.07		绛县	1.47 ± 0.19
	易县	1.79 ± 0.31		榆林	0.63 ± 0.12
	内丘	1.22 ± 0.22		吴旗	0.56 ± 0.01
	平山	0.84 ± 0.08		定边	1.73 ± 0.47
	涉县	0.60 ± 0.16		固原	0.58 ± 0.03

n = 3

3 种质的保存

课题组每年将收集的种质,分别种植在河北易县、北京密云,在当地分别建立一定规模的资源圃,按照相关的管理章程对资源圃进行管理,对生长状况定期进行调查收集数据并对种子进行相应的收集保存。

4 对中药资源可持续发展的探讨

中国工程院院士肖培根指出,我国急需建立中药资源可持续发展系统,应利用高技术手段对中药资源产量、蕴藏量、主产区分布及需求量进行数据库管理,形成中药材信息管理系统、中药材资源蕴藏-需求预测系统和决策系统。根据需要生产,克服泛栽滥种,力求做到适时、适度、合理,并且规范中药材栽培种植,以保证中药材安全。李隆云等^[4]认为保存和研究中药材品种资源是

中药新品种选育的需要,是物种多样性保护的需要,有利于生态环境和自然资源的保护和中药的可持续利用发展。因此结合相关政策和课题组调查情况认为完善政策和加强基层管理是亟待解决的问题。

4.1 完善政策法规,加强保护力度 目前国家已经制定相应的关于保护药用物种的法规、条例,如《野生药材资源保护条例》、《国家重点保护野生药材物种名录》、《中华人民共和国野生动物保护法》等。以上政策的正式施行使中药资源保护与管理有法可依,丰富和发展了资源保护的内容,对维持生态平衡、保护和合理利用中药资源有着极其重要的意义。杨卫彬等^[5]建议应密切关注受威胁的物种,对过度利用的物种采取强有力的保护措施。健全中药资源管理法规,加强中药资源保护宣传,唤起公众对中药资源重要性的认识和对中药资源的保护意识,为中药资源保护工作的开展争取有利的外部环境。

4.2 加强基层管理 中药资源保护工作顺利成功地进行要以国家政策的合理制定和地方的积极有效的响应为前提,地方要根据具体的实际情况(当地经济状况、自然条件等)准确地落实政策,以保证政策的有效开展。

通过调查了解到,目前基层从事中药事业相关人员的知识结构不系统、完整,所以加强从业人员的专业素质和思想觉悟是非常有效和必要的。

参考文献:

- [1] 陈万生,乔传卓. 知母本草学研究[J]. 中药材,1997,20(1):53.
- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典(上)[M]. 上海:上海人民出版社,1977:1366.
- [3] 周峰,陈万生,乔传卓. 中药知母商品及资源调查[J]. 时珍国医国药,2000,11(7):672.
- [4] 李隆云,钟国跃,卫莹芳,等. 中国中药种质资源的保存与评价研究[J]. 中国中药杂志,2002,27(9):641.
- [5] 杨卫彬,王永炎. 加强中药资源管理的建议[J]. 中国中药杂志,2006,31(10):863.

罗汉果组培苗繁育标准操作规程研究

莫长明¹, 白隆华^{1,2}, 马小军^{1*}, 蒋向军³, 蒲瑞翎¹

(1. 广西壮族自治区药用植物园, 广西 南宁 530023;

2. 中国医学科学院 中国协和医科大学药用植物研究所, 北京 100094;

3. 桂林亦元生现代生物技术有限公司, 广西 桂林 541000)

摘要:该操作规程明确规定了罗汉果的种质特性、种源地环境和组培苗生产技术规程。

关键词:罗汉果组培苗; 种质特性; 种源地环境; 繁育技术; 标准操作规程

中图分类号:S567 **文献标识码:**A **文章编号:**1008-0805(2008)09-2092-03

Standard Operating Procedure on Tissue - cultured Seedlings Multiplication of *Siraitia grosvenorii* (Swingle) C. Jeffrey

MO Chang-ming¹, BAI Long-hua^{1,2}, MA Xiao-jun^{1*}, JIANG Xiang-jun³, PU Rui-ling¹

(1. Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plant, Guangxi Nanning 530023, China; 2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100094, China; 3. Guilin Sunnyside Modern Bio - Tech Co. Ltd, Guangxi Guilin 541000, China)

Abstract: This standard operating procedure (SOP) of Seedlings multiplication definitely gives the regulations on germplasm characters, natural conditions in seed resource bases, multiplication technologies of tissue - cultured seedlings of *Siraitia grosvenorii* (Swingle) C. Jeffrey.

收稿日期:2007-10-07; 修订日期:2008-02-20

基金项目:国家科技支撑计划课题(No. 2006BAI06A11-01); 国家“十五”科技攻关项目(No. 2004BA721A29); 广西科技攻关项目(No. 0537017-4)

作者简介:莫长明(1977-),男(汉族),广西灵川人,现任广西药用植物园助理研究员,硕士学位,主要从事生物技术育种研究工作。

*通讯作者简介:马小军(1958-),男(回族),北京人,现任广西药用植物园研究员,博士学位,主要从事药用植物育种研究工作。

Key words: *Siraitia grosvenorii* tissue - cultured seedlings; Germplasm charaters; Habitat conditions of seed resources; Multiplication technologies; Standard operating procedure

2002 年《中药材生产质量管理规范(试行)》(以下简称中药材 GAP)的颁布与实施,标志着我国中药材生产将从传统的自发式的落后状态,逐步向现代化、规范化水平转化。对中药材生产全过程各环节进行有效的质量控制,是保证中药材质量“稳定、均一、可控”,保障中医临床用药“安全、有效”的重要措施,其核心是针对各地的生产品种、环境特点、技术状态、经济实力和科研实力,制定出切实可行的、达到中药材 GAP 要求的方法和措施,即标准操作规程(SOP)。罗汉果植物学名“光果木鳖”,别名拉汉果,假苦瓜。《中国药典》(2005 年版, I 部)记载的罗汉果来源于葫芦科(Cucurbitaceae)罗汉果属 *Siraitia* 罗汉果 *Siraitia grosvenorii* (Swingle) C. Jeffrey ex Lu et Z. Y. Zhang (Momordica grosvenori Swingle) 的果实^[1]。罗汉果野生资源零星分布于热带、亚热带区域内,在北纬 21~25°,东经 106~111°之间,垂直分布于海拔 250~1 000 m 间,气候温暖,雨量充沛,土层深厚肥沃的土壤中,在较荫蔽、凉爽、多湿、多雾、日照短、日温差大的山谷林下或湿润山坡上^[2-5]。罗汉果野生变家种已有数百年历史,20 世纪 50 年代开始,人工种植规模不断扩大,现以广西桂北地区为主,广东、湖南、福建、贵州、江西等省区也已引种栽培。为了满足逐步走向规范化、规模化的中药制药的需要,笔者于 2002 年起,开展了罗汉果种苗繁育的专项研究,并初步制定出其标准操作规程。

1 主要内容与适用范围

按照我国中药材 GAP,制定了广西壮族自治区罗汉果组培苗规范化繁育生产操作规程,明确规定了罗汉果的种质特征、种源地环境、育苗技术等,分别从品名、种源地、生长环境、组培苗生产等内容进行了论述。本规程适用于广西罗汉果主要产区。

2 引用标准

- 2.1 GB5084-92 农田灌溉水质标准。
- 2.2 GB3095-96 环境空气质量标准。
- 2.3 GB 15618-1995 土壤环境质量标准。
- 2.4 GB4285-89 农药安全使用标准。GB/T8321(所有部分)农药合理使用准则。

3 种源基地自然条件

3.1 自然地理 广西壮族自治区北部地区是罗汉果的主要产区,至今已有四百多年的种植历史。该地区气候温和湿润,冬暖夏凉,昼夜温差大,年平均温度 19.3℃,降雨量 1 891 mm,无霜期 312~332 d。土壤属红壤土带,以红壤为主。土层深厚,耕作性好。

3.2 生态环境检测 按照中药材 GAP 和《绿色食品产地环境质量标准》,在桂北的兴安、永福和龙胜县范围内,选择远离工矿区

和公路铁路干线、避开工业和城市污染源的罗汉果适生地作为罗汉果种源基地,对其土壤和水质两项环境质量进行检测。根据广西测试分析研究中心检测结果,土壤质量优于《土壤环境质量标准》(GB15618-1995)中的二级标准,灌溉水水质符合《农田灌溉水质标准》(GB5084-92)中的标准。

3.3 立地条件选择 选择避风向阳水源充足的山坡地或地势较高的平地、水田种植,忌在风口、低洼积水处种植。土层为深厚,疏松、湿润、肥沃、排水良好, pH 值 6~7 的壤土。

4 植物生物学特性及生长习性

4.1 生物学特性 罗汉果为多年生草质攀援藤本。茎暗紫色,单叶互生,卵形、长卵形或卵状三角形,卷须生于腋侧,顶端二分叉。雌雄异株。瓠果矩圆形,种子淡黄色,扁长圆形。罗汉果在广西产区,3~4 月,旬温 15℃以上时,块茎颈部休眠芽开始萌动,4 月中下旬抽梢,新蔓在 5~8 月生长迅速,每天可长 3~10 cm;6~9 月中旬,旬温 22.5~28.5℃,结果蔓陆续或间隙显蕾、开花,7 月为盛花期,9 月下旬后所开的花为无效花,果实不会膨大,8~11 月果实分批分期成熟,果实生长期 60~85 d;11 月中旬后,旬温降至 15℃,地上部分逐渐枯萎倒苗,从块茎部上 10~15 cm 剪断,将地下块茎培土越冬。全年生长期 240~262 d。罗汉果的结果年龄,因品种、栽培技术而有差别。用传统种薯种植,青皮果两年开始结果,少数 1 年也能结果;拉江果 2~3 年结果;长滩果 3~4 年才结果^[6,7]。青皮果盛果期 3~6 年,长滩果盛果期长达 10~12 年。用组培苗种植,一般当年结果。

4.2 生长习性 罗汉果在生长发育过程中对生态条件的要求。喜温,怕霜冻。早春低于 15℃新梢停止生长,13℃以下就出现枯梢,22~28℃生长良好,35℃以上高温对其生长发育不利,果实发育受阻,坐果率明显下降。罗汉果要求空气湿度在 75%以上、田间持水量在 60%~80%的条件下生长。因此要求栽培地雨量充沛,年降雨量为 1 366~1 929 mm 左右。罗汉果为短日照植物,幼苗期耐荫,忌强光,在半荫蔽的环境中生长发育良好,每天有 6~8 h 光照就可以满足其生长发育需要。罗汉果对土壤要求不很严格。除砂土、粘土和排水不良的低洼地外,一般土壤均能生长。以排水良好、土层深厚、含腐殖质多的壤土,红黄壤最为适宜。

5 种质特性

经调查,罗汉果在广西壮族自治区桂林市野生品种较少分布,以栽培品种为主。主要栽培品种有青皮果、长滩果、拉江果、红毛果、冬瓜果、茶山果,此外还有大罗汉、马铃果、红仔仔果等其余 25 个品种。其中青皮果抗逆性较强,产量较高^[8-10],是目前广西桂北地区栽培面积最广的品种^[11]。不同品种植物形态生长特征见表 1。

表 1 罗汉果不同品种植物形态和生长特性比较

品种	叶	叶柄	果实	生长特性
青皮果	叶片心脏形,长 11~15 cm,宽 10~13 cm	长 3.5~6.0 cm,粗 0.3~0.45 cm	圆形横径 4.9~6.3 cm,纵径 5.1~6.8 cm,鲜果重 59~97 g,果面具脉纹,被短白柔毛	结实早,产量高,抗病力强,适应性强
长滩果	叶片心脏形,长 17~22 cm,宽 12~19 cm	长 5.5~8.0 cm,粗 0.25~0.35 cm	长椭圆形,横径 4.6~6.1 cm,纵径 7.0~7.9 cm,鲜果重 44~91 g 果面具细纹,被稀柔毛	品质好,抗病力一般,适应性差
拉江果	叶片心脏形,长 16~18 cm,宽 8~13 cm	长 6.5~8.5 cm,粗 0.15~0.25 cm	椭圆形,横径 4.6~5.9 cm,纵径 6.1~7.2 cm,鲜果重 52~97 g,被锈色柔毛	品质好,抗病力较强,适应性强
红毛果	叶片心脏形,长 11~16 cm,宽 10~14 cm	长 3.5~6.0 cm,粗 0.3~0.45 cm	梨状短圆形,横径 3.5~4.5 cm,纵径 3.5~5.2 cm,鲜果重 59~97 g 被短柔毛	高产,果小,抗病力较强,适应性强
冬瓜果	叶片三角状心脏形,长 14~25 cm,宽 10~16 cm	长 4.0~5.5 cm,粗 0.25~0.40 cm	长圆柱形,横径 5.1~6.2 cm,纵径 6.1~7.5 cm,鲜果重 71~85 g,具六棱形,被短柔毛	高产,优质,抗病力强,适应性强
茶山果	叶片心脏形,长 11~16 cm,宽 10~14 cm	长 3.5~6.0 cm,粗 0.3~0.45 cm	圆形,横径 3.6~4.6 cm,纵径 3.7~4.6 cm,鲜果重 37~62 g,被短白柔毛	

6 室内培养方法

6.1 外殖体取材及处理 在罗汉果无检疫性病虫害的原种圃或果

园内,选择无病虫害、性状优良的植株为采集对象。于罗汉果生长旺盛期选择在晴天的上午 10 点以前采集外殖体,在采集的头天

下午及采集前 2 h, 对选定好的植株用杀菌剂喷雾灭菌。选取长势强壮, 无病虫害危害, 已现蕾的嫩枝 20~30 cm, 剪除部分叶子保留叶柄, 整齐放入保鲜袋内封口, 然后放入已放置冰块或冰袋的保温容器中, 材料与冰块之间用纸隔开, 避免冻伤材料, 并要防止冰块溶化的水进入保鲜膜内。以最快的方式运回组培室进行消毒灭菌。灭菌前用手术刀把多余的叶子切去, 再切成 3~5 cm 带腋芽的茎段, 按老嫩程度分别放入灭菌过的玻璃瓶内, 每瓶材料所占空间不超过瓶子容积的 1/3。再放入 0.1% 升汞溶液放在振荡器上进行振荡消毒 6~8 min。然后用无菌水冲洗 4 次以上。

记录包括品种名称、种植地点、种植户、海拔高度、田间环境简况、取材时间、取材人等, 以便跟踪观察。

6.2 诱导培养

6.2.1 接种 将灭菌好的茎段切成 1~2 cm 长的带芽茎段, 用镊子夹起斜插入诱导培养基上, 腋芽朝上, 尽量让腋芽刚好与培养基表面接触, 拧紧瓶盖。及时放入培养室进行暗培养。

6.2.2 诱导培养 暗培养一个星期左右, 当外植体材料长出无菌芽后每天给予一定的光照, 无菌芽长到相当高度时剪成带一个腋芽的茎段接种于继代培养基中, 茎尖接种于配方为: MS + BA 0.3~0.6 mg/L + NAA 0.04~0.08 mg/L + 椰子水 100 ml + 白糖 2.5% + 琼脂 4.0 mg/L, pH 5.6 的诱导培养基中。在接种 3~5 d 后检查培养材料有无真菌和细菌污染。待苗长出 3 片以上功能叶时进行是否带毒检测。及时清除带病小苗。茎尖长势太慢时, 应及时变换配方诱导出芽。

6.2.3 继代培养 把诱导培养的材料剪取每个节间及顶芽用微型扦插的方法转入配方为: MS + BA 0.2~0.5 mg/L + NAA 0.04/IAA 0.1 mg/L + 白糖 2.5% + 琼脂 4.0 mg/L, pH 5.7 的增殖培养基中。在暗室培养 5~7 d 长出愈伤组织和芽 1~1.5 cm 时逐渐加强光照, 每天开荧光灯照射 1~2 h, 在材料长至 2~3 cm 时每天光照 4~5 h, 当材料达到所需高度时, 每天光照 10 h, 强度为 2 000 Lx。培养间的温度应白天保持在 24~28℃, 夜间保持在 20~24℃。当苗势弱时, 应马上进行转接, 并适当加大激素浓度^[12,13]。

6.2.4 生根培养 把继代培养好的材料剪取每个节间及顶芽用微型扦插的方法接入配方为: MS + BA 0.05 mg/L + IBA 0.12 mg/L + IAA 0.08 mg/L + 活性炭 0.1 g/L + 白糖 2% + 琼脂 4.3 mg/L, pH 5.8 的生根培养基后, 放入暗室中带盘堆放 5 d, 翻堆清除污染苗, 再培养 3 d, 待其根系长出时移至培养架上摆放, 根据苗的长势, 逐步加强光照, 至叶绿茎粗。培养前期温度白天保持在 30℃ 左右, 夜间保持 20~24℃, 以利根原基的形成。当苗高达 3 cm 以上时, 逐步降低培养间温度至 15℃, 再把苗拿至大棚炼苗^[12,13]。

7 移栽炼苗

7.1 大棚选址构建及灭菌 温室大棚应选择背风向阳、地势高、供排水良好、便于管理、交通方便、无任何污染的地方构建。温室大棚应采用透光性强、保温性好的塑料薄膜或阳光板作为覆盖材料。棚内应有配套的喷淋设备、控温设备、调湿设备、遮阳设备、防虫网。大棚密闭用熏蒸剂消毒处理。

7.2 苗床的构建及基质准备 苗床宽 1.2 m, 高于地面 10 cm, 各苗床之间应留有 0.3 m 宽的工作通道。苗床表面铺一层隔离物(煤渣、板材)将营养杯与地面隔开, 避免苗床积水以及线虫危害。加温设施的管线放在隔离物下面, 苗床每公顷撒用 6 000 kg 石灰消毒。

取土质疏松、透气、透水、肥效好的水库泥与鸡粪生物肥充分拌匀制作营养土(比例为 7:3), 以保证土壤湿度在 60% 以内, 避免结块。定植前 5 d 再用生物类制剂按比例兑水浇透营养杯土, 消毒灭菌, 杀灭线虫。

7.3 移栽炼苗 二月上旬将瓶苗移进大棚, 按一定距离摆放在大棚里进行为期 15 d 的炼苗, 避免强烈阳光直射, 避免过高、过低温度的出现, 让其逐步适应自然条件。在移栽前 3 d 将瓶盖打

开, 用杀菌剂对小苗喷雾。防止小苗受细菌、真菌的危害而染病。移栽的前 1 d 给瓶苗内淋入少许纯净水使培养基软化。

用镊子将瓶苗夹入水盆中, 用吸水球将根部黏附的培养基清洗干净, 按高度将种苗分等级放开, 栽种不宜过深, 以固定好植株不倒, 根不外露为宜。栽种做到根土密接, 浇透定根水。苗床每隔 1 m 用一根竹骨架支撑。用塑料薄膜覆盖成小拱棚, 薄膜四周压实, 大棚用 90% 遮阳网遮阴, 避免光照过强灼伤幼苗。

7.4 育苗管理

7.4.1 温度控制 前期棚内温度保持在 24~30℃。白天温度控制在 35℃ 以下。温度过高时启动降温设备, 并将小拱棚开口通风。夜间保持 20℃ 左右, 最低不低于 5℃。为保证棚内温度变化平缓, 低温天气应加温。后期应去掉小棚, 去掉大棚遮阳网, 让其适应外界气温变化。温度过高时采取通风降温措施。

7.4.2 湿度控制 幼苗移栽后维持在相对湿度为 80% 环境中, 发现基叶片较干时, 可进行适当的喷雾, 在定植后的 7 d 内苗床应密闭, 此后可逐渐多开口通风、或使用抽湿机降低湿度, 后期揭开小棚适应外部环境。

7.4.3 光照控制 保持大棚薄膜的清洁, 增加透光度。前期要拉上遮阳网, 避免阳光直射。在确保苗床温度的前提下, 小拱棚中期要少揭多盖。后期全部揭开小拱棚, 去掉大棚遮阳网, 延长光照时间, 增加光照强度。

7.4.4 水肥管理 渡过缓苗期后, 用 800 倍富华农叶面肥、稀土微肥交替喷淋, 7 d/次。无论人工、半自动喷灌都要求喷洒均匀, 水滴成雾状, 避免过大水滴击伤幼苗或冲走营养土。20 d 左右, 待新根新叶长出后补充硼、钙肥。应将死苗、病株及时剔除, 及时补苗。

7.4.5 苗期病虫害的防治 幼苗较嫩弱, 应密切注意温度、湿度和光照的变化, 防止高温高湿引起病害。每隔 7 d 喷施 50% 的多菌灵可湿性粉剂 1 000 倍液或 1 000 倍猝枯灵。视苗的状态喷施霜霉威、广枯灵、翠贝防治炭疽病、疫病、霜霉病。视虫害情况喷施富华农叶面清洁剂, 防治害虫。

7.4.6 装筐出苗 育苗时间达到 45 d 以上时(一般为 4 月上旬), 将茎秆粗壮、叶色浓绿的健康苗按高矮分别装入竹筐或塑料筐, 每筐苗数一致, 及时浇透水, 做好种子标签, 运输前做好植物检疫, 手续随车同行。运输车应有车箱遮蔽风雨在夜间行车, 避免高温烧苗。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中国药典, I 部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [2] 钟仕强. 7 种中草药高效益栽培[M]. 北京: 金盾出版社, 1998.
- [3] 李 锋, 李典鹏, 蒋水元, 等. 罗汉果栽培与开发利用[M]. 北京: 中国林业出版社, 2003.
- [4] 黄志江, 黄 捷, 孙滢川, 等. 罗汉果的药用研究[J]. 广西师范大学学报(自然科学版), 1998, 16(4): 75.
- [5] 温 进, 陈进民, 李小平. 广西罗汉果生态气候特征分析[J]. 广西气象, 1984, 4(2): 36.
- [6] 中国科学院北京植物所. 中国高等植物图鉴[M]. 北京: 科学出版社, 1975: 359.
- [7] 路安明, 张志耘. 中国罗汉果属植物[J]. 广西植物, 1984, 4(1): 27.
- [8] 庄伟良, 林治良. 罗汉果染色体组型的研究[J]. 热带亚热带植物学报, 1997, 5(2): 23.
- [9] Darlington C D, Wyhe A P. Chromosome Atlas of Flowering Plants. 1953, 99.
- [10] 周良才, 张碧玉. 罗汉果品种资源调查研究和利用意见[J]. 广西植物, 1981, 1(3): 29.
- [11] 李 锋. 罗汉果种子繁殖及其栽培研究[J]. 广西植物, 1990, 10(3): 261.
- [12] 张振钰. 罗汉果营养器官的结构[J]. 云南植物研究, 1988, 10(2): 154.
- [13] 林 荣, 王秀琴, 王润珍. 罗汉果叶组织培养的研究[J]. 广西植物, 1981, 1(1): 18.