

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2013.02.012

包英华 白音 陈珺霞. 金钗石斛生物碱的组织化学定位研究[J]. 广西植物 2013, 33(2): 199–202

Bao YH, Bai Y, Chen JX. Histochemical localization of alkaloid in *Dendrobium nobile* [J]. *Guihaia* 2013, 33(2): 199–202

金钗石斛生物碱的组织化学定位研究

包英华^{1,2}, 白音^{1*}, 陈珺霞¹

(1. 韶关学院 英东生命科学学院, 广东 韶关 512005; 2. 广州中医药大学 中药学院, 广州 510006)

摘要: 利用组织化学定位方法对金钗石斛不同生长年限和不同营养器官的生物碱分布和积累进行比较分析。结果表明, 金钗石斛茎生物碱主要分布于基本组织, 三年生金钗石斛的生物碱含量高于一年生和二年生金钗石斛。金钗石斛根部生物碱含量同样较多, 主要分布于皮层薄壁细胞中; 金钗石斛叶片生物碱含量较低, 存在于上下表皮细胞中, 与铁皮石斛和铜皮石斛完全不同。说明三年生金钗石斛作为最适宜采收期, 而且金钗石斛根部具有很好的开发利用价值。金钗石斛叶片表皮细胞中呈现生物碱的原因尚未清楚, 需要进一步研究。

关键词: 金钗石斛; 生物碱; 组织化学定位

中图分类号: Q949.95 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2013)02-0199-04

Histochemical localization of alkaloid in *Dendrobium nobile*

BAO Ying-Hua^{1,2}, BAI Yin^{1*}, CHEN Jun-Xia¹

(1. *Yingdong College of Life Sciences, Shaoguan University, Shaoguan 512005, China*; 2. *School of Chinese Herbal Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China*)

Abstract: The alkaloid contents in *Dendrobium nobile* of different developmental stages and organs were analyzed by using histochemical localization method. The results showed that the alkaloid was located in the fundamental tissue of stem, cortex of root and epidermis of leaf. Furthermore, the alkaloid contents of *D. nobile* of three-year-old were higher than that of one-year-old and two-year-old. And in different organs of this species, the alkaloid content in stem was almost equal to that in root, while it was general higher than that in leaf. These results implied that the best collection period of *D. nobile* was three-year old and the root of *D. nobile* had a good development and utilizable value. It is necessary to further study why epidermis of leaf of *D. nobile* had alkaloid.

Key words: *Dendrobium nobile*; alkaloid; histochemical localization

金钗石斛(*Dendrobium nobile*)为兰科(Orchidaceae)石斛属附生型多年生草本植物,主要分布在贵州、四川、广西和云南等省区(吉占和,1999),是我国常用名贵中药材,被历版《中国药典》收载,以新鲜或干燥茎入药,具有滋阴清热,益胃生津之功效,对胃阴虚和肾阴虚证的治疗有显著疗效(国家

药典委员会,2010)。其中石斛生物碱(alkaloid)是主要有效成分,现代药理学研究表明金钗石斛生物碱对白内障、心血管和胃肠道等疾病具有一定疗效(龙艳等,2008;李向阳等,2010)。随着我国药用石斛开发利用水平的不断提高以及社会需求量的日益增加,导致我国野生金钗石斛资源蕴藏量急剧减少。

* 收稿日期: 2012-09-25 修回日期: 2012-11-23

基金项目: 广东省科技计划项目(2011B060400004); 香港铭源基金(2009-1, 2010-9)

作者简介: 包英华(1973-),女(蒙古族),内蒙古通辽人,在读博士,副教授,从事药用植物资源开发与利用研究。(E-mail) byinghua@126.com。

通讯作者: 白音,博士,副教授,主要从事药用植物资源开发与利用研究。(E-mail) baiyin7346@vip.163.com。

近年来,国内外诸多学者研究药用石斛不同器官的开发利用价值,力争改变以茎入药的传统石斛用法,扩大使用部位,以满足社会需求。研究表明,不同年龄或不同器官铁皮石斛(*D. candidium*)和铜皮石斛(*D. moniliforme*)中的生物碱含量存在差异,生物碱主要分布于茎薄壁细胞、根皮层细胞和叶片的叶肉细胞,叶片总生物碱含量高于茎和根(吕洪飞等,2006)。金钗石斛茎干不同部位的生物碱含量也存在差异,茎干上部的生物碱积累比其中部和下部较多(吴庆生等,1995)。但尚未见有关金钗石斛不同器官中生物碱的分布和积累方面的研究报道。本文采用切片技术和组织化学定位方法,比较分析了金钗石斛不同器官中生物碱的分布和积累情况,以期金钗石斛的综合开发利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

2011年10~12月份,取不同生长年限(一年生、二年生和三年生)金钗石斛的根、茎和叶片。所有材料来自于韶关学院石斛种质圃,原植物由白音博士鉴定。

1.2 方法

采用徒手切片制作方法,制作金钗石斛根、茎和叶片以及不同生长年限茎干徒手切片。用改良碘化铋钾试液染色5~10 min后,在Leica DM LS显微镜下观察块状或颗粒状生物碱。各取9张不连续切片,每张切片观察3个不同视野,采用生物显微测微尺计数板统计其生物碱的数量。根据生物碱的分布密度,划分为4个等级“++++”级,10个以上块状或颗粒状生物碱,属于高密度“+++”级,有7~9个块状或颗粒状,属于中等密度“++”级,有4~6个块状或颗粒状生物碱,属于较低密度“+”级,块状或颗粒状生物碱很少或无,属于低密度。

2 结果与分析

2.1 不同生长年限金钗石斛生物碱的分布和积累特征

金钗石斛的茎主要由表皮、基本组织和维管束三部分组成,属于典型的单子叶植物茎组织构造。表皮细胞为一层,细胞壁加厚特征属于不均匀加厚型(白音等,2011),表皮外侧覆盖一层角质层。基本组织由薄壁细胞组成,细胞大小不均匀,靠近表皮处分

布一些细胞壁稍加厚的厚角组织。维管束散生于基本组织中,靠近表皮的维管束数量多于茎中部的维管束,维管束外侧有若干层的厚壁组织(图版I)。

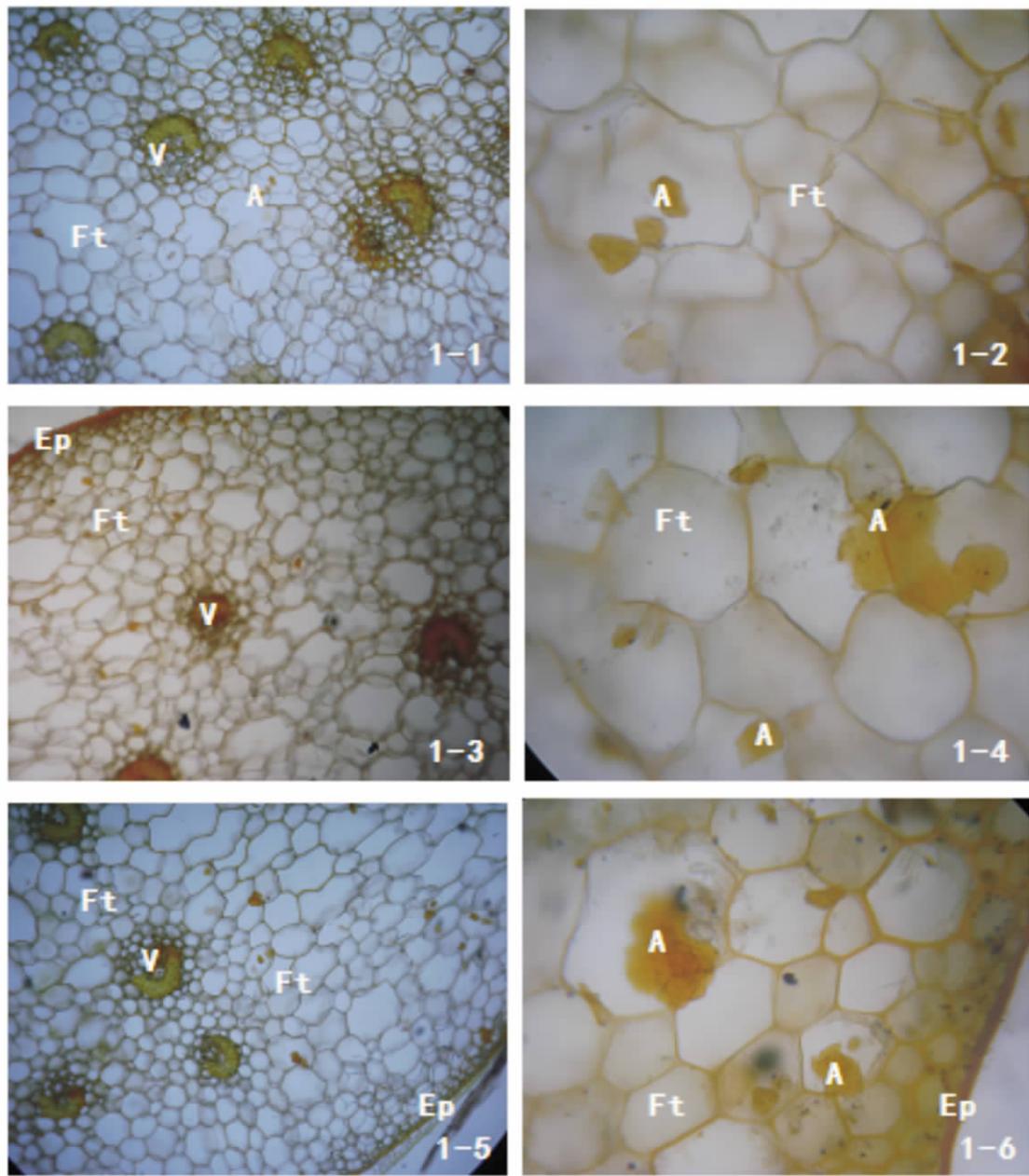
组织化学定位研究结果表明,生物碱主要分布于金钗石斛茎基本组织中,而表皮细胞和维管束内几乎没有生物碱的分布。基本组织中生物碱多以块状形式存在,分布不均匀,形状多样(图版I)。金钗石斛茎中生物碱的积累与其生长年限有一定关系,生长年限越长,则生物碱的积累越多,三年生金钗石斛茎生物碱含量明显高于一年生和二年生,而且块状生物碱的集聚化也比较普遍(表1)。

2.2 金钗石斛不同营养器官中生物碱的分布和积累特征

金钗石斛的根由根被、皮层和维管柱组成。根被细胞排列紧密而多层,细胞壁通常有带状或网状加厚的木质化构造,以减少皮层细胞水分过度散失。皮层由外皮层、皮层薄壁细胞和内皮层组成,外皮层和内皮层均为环状一层细胞排列而成,中间是很多薄壁细胞组成的皮层部分。维管柱位于根中心部位,其木质部和韧皮部相间排列,导管和筛管清晰可见。金钗石斛根部生物碱主要分布于皮层薄壁细胞中,而在根被和维管柱中未见有生物碱分布。皮层薄壁细胞中的生物碱呈圆形或椭圆形,分布较多(图版II:1,2)。金钗石斛叶片由表皮、叶肉和叶脉组成。叶肉由同化组织构成。金钗石斛叶片中,生物碱主要分布于上表皮和下表皮细胞中,而在叶肉中很少看到有生物碱的分布(图版II:3,4)。金钗石斛不同营养器官中,茎和根部生物碱含量比较接近,而叶片中含量较少(表2)。

3 结论与讨论

生物碱是石斛属植物的主要活性成分,目前从13种石斛属植物中共分离获得29个生物碱,其中5种植物含石斛类生物碱(即倍半萜类生物碱),8种植物含其他类型且无共同母核的生物碱(图1)(周荣汉等,2005)。金钗石斛生物碱在三年生茎中积累较多,说明金钗石斛的最适宜采收期为生长三年的金钗石斛鲜条,该研究结果符合实际生产中通常认为三年生金钗石斛的优质特点。金钗石斛生长到第四年时各种代谢活动逐渐衰退,如果不及时采收会出现腐烂等现象,为此本研究没有对四年生金钗石斛的生物碱进行观察分析。金钗石斛根部生物碱主



图版 I 不同生长年限金钗石斛茎横切片 1 2. 一年生茎(10×4; 10×40); 3 4. 二年生茎(10×4; 10×40); 5 6. 三年生茎(10×4; 10×40)。Ep. 表皮; Ft. 基本组织; V. 维管束; A. 生物碱。

Plate I Transverse section of stems in different developmental stages of *D. nobile* 1 2. One-year-old stem; 3 4. Two-year-old stem; 5 , 6. Three-year-old stem. Ep. epidermis; Ft. fundamental tissue; V. vascular; A. alkaloid.

表 1 不同生长年限金钗石斛茎生物碱分布及数量的比较

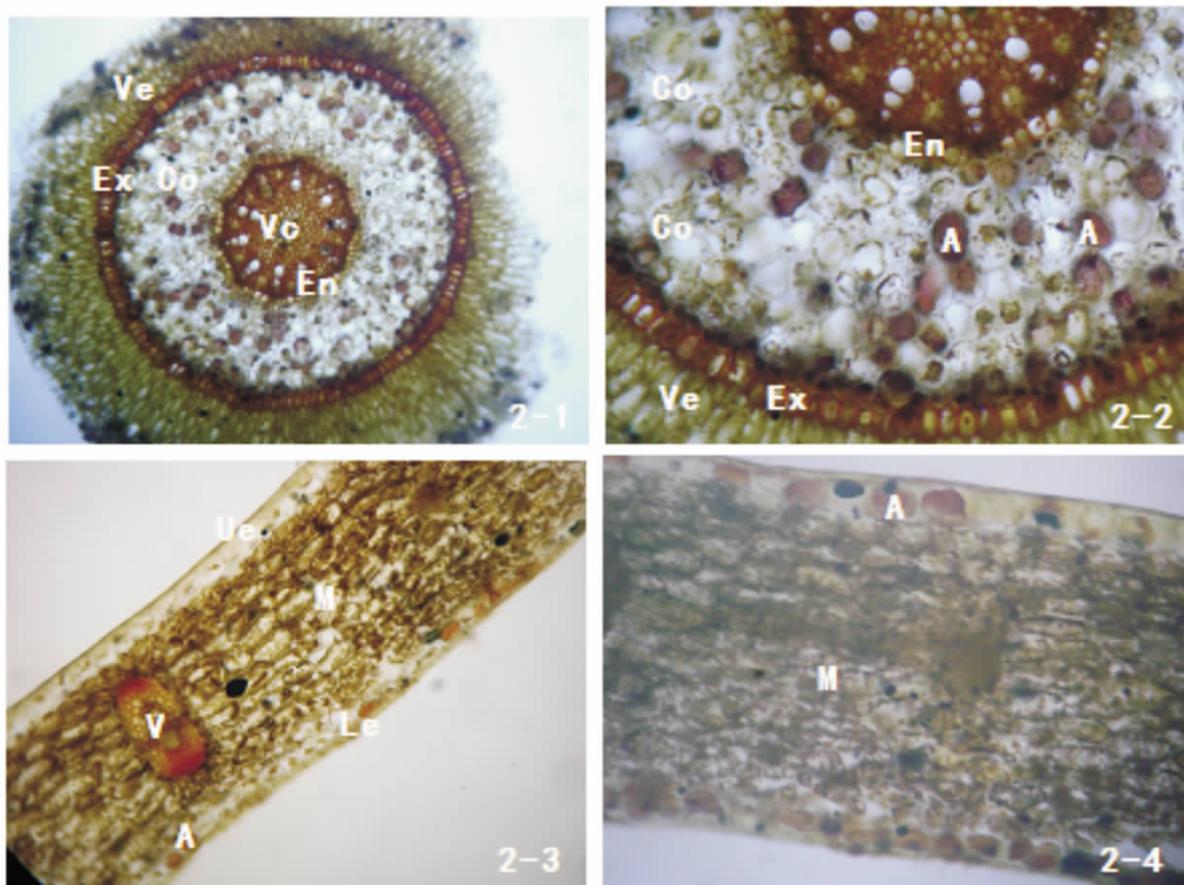
Table 1 Comparison of the distribution and amount of alkaloid stems in different developmental stages of *D. nobile*

生长年限 Growth year	分布 Distribution	数量等级 Amount level
一年生 One-year-old	基本组织	++
二年生 Two-year-old	基本组织	+++
三年生 Three-year-old	基本组织	++++

表 2 金钗石斛不同器官中生物碱分布及含量的比较

Table 2 Comparison of the distribution and amount of alkaloid in different organs of *D. nobile*

营养器官 Vegetative organ	分布 Distribution	数量等级 Amount level
根 Root	皮层	++++
茎 Stem	基本组织	++++
叶 Leaf	表皮细胞	++



图版 II 金钗石斛根和叶片横切片 1 2. 根部横切片(10×4; 10×40); 3 4. 叶片横切片(10×4; 10×10)。Ve. 根被; Co. 皮层; ex. 外皮层; en. 内皮层; Vc. 维管柱; Ue. 上表皮; Le. 下表皮; Bo. 基本组织; V. 维管束; M. 叶肉; A. 生物碱。
 Plate II Transverse section of root and leaf of *D. nobile* 1 2. Transverse section of root; 3 4. Transverse section of leaf. Ve. velamen; Co. cortex; Ex. exodermis; En. endodermis; Vc. vascular cylinder; Ue. upper epidermis; Le. lower epidermis; Bo. basic organization; V. vascular; M. mesophyll; A. alkaloid.

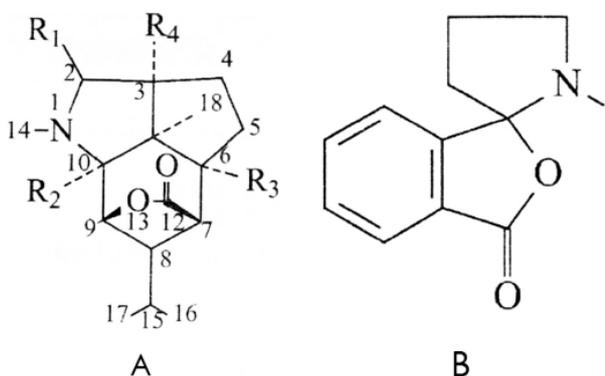


图 1 石斛生物碱 A. 石斛碱 (R1 = H, R2 = H, R3 = H, R4 = H); B. 石斛宁。
 Fig. 1 Alkaloid of *Dendrobium* A. dendrobine; B. shihunine.

要分布在皮层薄壁细胞 积累也较多, 与其茎干生物碱含量较接近, 这与铁皮石斛的茎和根部分析结果基本一致(吕洪飞等, 2006)。金钗石斛为多年生草本植物, 每年从茎基部产生很多新芽和根, 并逐步形成新的植株, 尤其是根逐年增加, 在总生物量中所占比例也逐年增多, 因此应重视金钗石斛根部的合理开发与利用。植物叶片内生物碱主要分布在叶肉细胞中或不含生物碱(吕洪飞等, 2006; 彭斯文等, 2009; 马英姿等, 2009), 但金钗石斛则不同, 生物碱分布在其叶片的表皮细胞中。我们认为金钗石斛叶片内的生物碱很可能在叶肉细胞中合成, 然后积累在表皮细胞中, 这有待于进一步深入研究。

参考文献:

吉占和. 1999. 中国植物志(第19卷) [M]. 北京: 科学出版社 (下转第190页 Continue on page 190)

参考文献:

- 王关林,方宏筠. 1998. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京: 科学出版社: 421
- 中国科学院植物研究所. 1979. 中国高等植物科属检索表[M]. 北京: 科学出版社: 47-52
- 全国中草药汇编编写组. 1975. 全国中草药汇编(下册)[M]. 北京: 人民卫生出版社: 345-349
- 张维铭. 2003. 现代分子生物学实验手册[M]. 北京: 科学出版社: 26-28
- 恭维. 2007. 孪生植物银杏的分子亲缘地理学研究[M]. 杭州: 浙江大学: 342
- Han SZ(汉素真), Wang YK(王有科), Li J(李捷) et al. 2011. ISSR genetic diversity analysis of *Zanthoxylum bungeanum* in Gansu Province(甘肃省主产花椒品种 ISSR 遗传多样性分析)[J]. *J Gansu Agric Univ(甘肃农业大学学报)* 46(6): 46-51
- He ZW(何正文), Liu YS(刘运生), Chen L(陈立) et al. 1998. Orthogonal design-direct analysis for PCR optimization(正交设计直观分析法优化 PCR 条件)[J]. *Bull Hunan Med Univ(湖南医科大学学报)* 23(4): 403-404
- Li R(李嵘), Wang Z(王喆). 2008. Establishment and orthogonal optimization of ISSR-PCR amplification system in *Salvia miltiorrhiza*(丹参 ISSR-PCR 反应体系的建立与正交优化)[J]. *Guihaia(广西植物)* 28(5): 599-603
- Ma YZ(马英姿), Wang P(王平), Wang XM(王晓明) et al. 2009a. *In vitro* culture and plant regeneration system of *Zanthoxylum Dissitum*(药用植物蚬壳花椒的离体培养及再生体系的建立)[J]. *J Hunan Norm Univ: Nat Sci Edit(湖南师范大学学报·自然科学版)* 32(1): 106-111
- Ma YZ(马英姿), Wang P(王平), Yang BH(杨波华) et al. 2009b. Extracting technology of alkaloids from the stem of *Zanthoxylum dissitum*(蚬壳花椒总生物碱的提取工艺)[J]. *J Centr S Univ For & Technol(中南林业科技大学学报)* 29(2): 68-72
- Peng JQ(彭继庆), Cao FX(曹福祥), Xu RX(许若娴). 2011. Genetic diversity of the *Mytilaria laosensis* in Guangxi detected by ISSR markers(广西壳菜果遗传多样性的 ISSR 研究)[J]. *J Hunan Norm Univ: Nat Sci Edit(湖南师范大学学报·自然科学版)* 34(6): 222-225
- Sun XW(孙小文). 1996. Research progress of medicinal plants of *Zanthoxylum*(花椒属药用植物研究进展)[J]. *Acta Pharm Sin(药学报)* 31(3): 231-240
- Wang P(王平), Ma YZ(马英姿), Wang XM(王晓明) et al. 2008. *In vitro* embryonic culture of *Zanthoxylum dissitum*(药用植物单面针离体胚培养的研究)[J]. *J Centr S Univ For & Technol(中南林业科技大学学报)* 28(1): 130-133
- Wang JB(王建波). 2002. ISSR markers and their applications in plant genetics(ISSR 分子标记及其在植物遗传学中的应用)[J]. *Hereditas(遗传)* 24(5): 613-616
- Zietkiwicz E, Rafalshi A, Jabuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat(SSR)——anchored polymerase chain reaction amplification[J]. *Genomics* 20: 176-183
-
- (上接第 202 页 Continue from page 202)
- 社: 67-146
- 国家药典委员会. 2010. 中华人民共和国药典(2010 版一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社: 85-87
- 周荣汉, 段金殿. 2005. 植物化学分类学[M]. 上海: 上海科学技术出版社: 1151-1154
- Bai Y(白音), Bao YH(包英华), Wang WQ(王文全). 2011. Characters and its authentication value of stem epidermal cell of medicinal plant in *Dendrobium* Sw. and their adulterants(石斛属植物及其混淆品茎表皮细胞特征及其鉴别价值)[J]. *Chin Trad Herb Drugs(中草药)* 43(3): 593-597
- Huang XQ(黄雪群), Li XE(李续娥), Huang CZ(黄彩珠). 2011. Effect study of dendrobium in traditional Chinese medicine on stomach-heat syndrome in rats(中药石斛对大鼠胃热证的作用研究)[J]. *Chin J Rat Drug Use(临床合理用药杂志)* 4(5B): 4-6
- Li XY(李向阳), Gong QH(龚其海), Wu Q(吴芹) et al. 2010. Effects of *Dendrobium nobile* polyose on hyperlipemia and liver fatty degeneration in rats(金钗石斛多糖对大鼠高脂血症和肝脏脂肪变性的影响)[J]. *Chin Pharm J(中国药学杂志)* 45(15): 1142-1144
- Long Y(龙艳), Wei XY(魏小勇), Zhan YJ(詹宇坚) et al. 2008. *In-vitro* experimental study on the extract of *Dendrobium nobile* in counteracting cataract in rats(金钗石斛提取物抗白内障的体外实验研究)[J]. *J Guangzhou Univ Trad Chin Med(广州中医药大学学报)* 25(4): 345-349
- Lü HF(吕洪飞), Luo WJ(罗文姬), Sheng XY(盛仙永) et al. 2006. Histochemical localization of alkaloid in *Dendrobium* and *Pholidota chinensis*(二种石斛属植物和小叶石仙桃生物碱的组织化学定位)[J]. *Chin Pharm J(中国药学杂志)* 41(11): 824-867
- Ma YZ(马英姿), Hu ZH(胡忠红), Yang BH(杨波华) et al. 2009. Study on anatomical structure of vegetative organs and alkaloids distribution in *Zanthoxylum dissitum*(蚬壳花椒营养器官解剖结构及其生物碱分布)[J]. *J Hunan Agric Univ(湖南农业大学学报)* 35(3): 242-245
- Peng SW(彭斯文), Zhang MS(张明生), Wang YF(王玉芳). 2009. The preliminary study on histochemistry localization of alkaloid in *Cremastra appendiculata*(杜娟兰生物碱组织化学定位初步研究)[J]. *World Sci Tech-Mod Trad Chin Med Mat Med(世界科学技术-中医药现代化)* 11(5): 728-730
- Wu QS(吴庆生), Xu L(徐玲). 1995. 金钗石斛茎的不同部位中有效成分分析及其分布规律研究[J]. *Chin J Chin Mat Med(中国中药杂志)* 20(3): 148-149