

# 观赏植物远缘杂交和多倍体育种研究进展

段超 张启翔\* (北京林业大学园林学院, 国家花卉工程技术研究中心, 北京 100083)

**摘要** 介绍了植物远缘杂交不亲和、远缘杂种不育的原因及克服方法, 概括了远缘杂交及多倍化在观赏植物育种中取得的成就, 指出远缘杂交和多倍体育种是目前观赏植物商业化育种的两大重要手段。

**关键词** 远缘杂交; 多倍体; 2n 配子

中图分类号 S603 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)15-06954-03

## Research Progress of Distant Hybridization and Polyploid Breeding of Ornamental Plants

DUAN Chao et al (College of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, National Research Center of Engineering Technology for Floriculture, Beijing 100083)

**Abstract** Introduced the reasons and overcoming methods of distant cross-incompatibility and distant hybrid sterility. Summarized the achievement of distant hybridization and polyploidy in breeding of ornamental plants, pointed that distant hybridization and polyploid breeding was two main means in commercialized breeding of ornamental plants.

**Key words** Distant hybridization; Polyploid; 2n gamete

公元前2000多年, 枣椰子就有了第一次人工授粉的报道<sup>[1]</sup>, 1900年孟德尔遗传规律的发现为杂交育种提供了理论依据, 几千年来, 人们利用杂种优势创造出了大量观赏植物新类型和新品种。随着科学技术的发展, 杂交育种特别是远缘杂交育种研究工作的不断深入, 使杂交亲本的应用范围不断扩大, 杂交成功率显著提高, 远缘杂交育种与多倍体育种技术相结合, 已成为观赏植物商业育种的两大重要手段<sup>[2]</sup>。

### 1 远缘杂交

远缘杂交是指植物分类学上不同种、属或亲缘关系更远的物种之间的杂交。近100年来的经典遗传学、人工杂交试验和近年来分子系统学、分子遗传学、比较基因组学的大量研究表明, 天然分化种群(亚种、种或属)之间的完整基因组有性杂交和有性渐渗杂交(introgressive hybridization)是高等植物基因组进化和新物种形成的原动力之一<sup>[3]</sup>。虽然自然界中花期相遇的物种间可产生天然杂种, 然而受精前后的生殖障碍导致其产生率很低。

**1.1 克服远缘杂交不亲和的方法** 杂交前期育性障碍即杂交难交配性主要表现为: 花粉在异种柱头上不萌发; 花粉虽能萌发, 但花粉管不能伸入柱头; 花粉管伸入柱头后生长缓慢, 甚至破裂; 花粉管虽正常生长, 但由于长度不够等原因而不能到达子房; 花粉管能到达子房, 但雌雄配子不能结合受精而形成合子等。障碍程度可分为花柱上部抑制和下部抑制, 前者在授粉12~24 h后出现, 花粉只形成很短的花粉管; 后者则出现在授粉3~4 d后, 花粉管只能到达母体植株花柱1/2处。Van Tuyl等<sup>[4]</sup>改进和完善了花柱切割(CSM)、柱头嫁接(GSM)等技术, 有效的克服了远缘杂交不亲和现象, 成功用于百合的商业育种<sup>[4]</sup>, 并在观赏葱<sup>[5]</sup>、萱草<sup>[6]</sup>、郁金香<sup>[7]</sup>等花卉育种中试验成功。加强栽培管理、改善植物营养条件, 对花粉、花柱进行处理, 如混合授粉, 蒙导、先驱授粉<sup>[8]</sup>, 高温处理花柱、花粉等、使用外源激素<sup>[9]</sup>包括花器官提取物、生长调节剂及特殊的蛋白质和脂类物质如乙酰

胆碱(acetylthio choline)、cAMP(3,5-环腺苷酸)和游离泛素(Ub)<sup>[10]</sup>等对克服受精前障碍均有一定作用。

**1.2 克服远缘杂种不育的方法** 杂交后期育性障碍的主要表现为: 受精后幼胚不发育, 发育不正常或发育中途停止;

杂交种幼胚、胚乳和子房组织之间缺乏协调性, 胚乳不能为杂种胚提供正常生长所需要的营养。受精后障碍可通过培养子房切片、胚珠和胚拯救等技术克服。早期, 由于胚太小不易从胚珠中解剖出来, 且幼胚完全处于异养状态, 对培养条件要求较高, 一般采用子房和胚珠培养克服远缘杂种不育。Kano, Van Tuyl等先后采用子房切片培养技术拯救百合、萱草、石蒜的杂交胚<sup>[11]</sup>, 并取得了很好的效果。子房切片培养形成的胚较少, 培养效果较低, 而胚培养可以用简单的培养基处理只有0.2 mm的幼胚。且幼胚成活率较高。据文献报道, 子房切片、胚珠培养和胚拯救技术已应用于羽扇豆<sup>[12]</sup>、宫灯百合属<sup>[13]</sup>、六出花属<sup>[14]</sup>等的育种中, 成功获得了这些花卉的远缘杂交杂种并投放市场。

**1.3 离体授粉** 离体授粉从授粉到果实成熟都在试管中进行, 能更有效的克服受精前、后的障碍, 获得远缘杂种。该方法是在花蕾成熟、开放前将其采下、消毒, 将花柱放入试管中培养, 当柱头有分泌物时, 用消过毒的花粉对其进行授粉。现代百合中很多远缘杂种就是通过离体授粉技术培育而成的。该技术在金鱼草、黄花烟草、紫花矮牵牛<sup>[15]</sup>、郁金香、石蒜、朱顶红<sup>[16]</sup>远缘杂交育种中均有成功报道。但目前球根花卉如百合、郁金香等还无法实现体外受精。

远缘杂交可打破种(或科、属)间界限, 使不同物种间的遗传物质进行交流或结合, 将2个或多个物种经过长期进化积累的有益性状结合起来, 形成具有近缘杂交所不能获得的优良性状新类型和新品种。远缘杂交不仅可改善植物的数量性状如抗性等, 而且在改善植物质量性状如花型、抗性、瓶插寿命等方面也有极大的潜力, 是创造观赏植物新种质和新品种的重要途径。

### 2 多倍体育种

根据经典遗传学理论, 多倍体由于适应度(fitness)较低, 在进化上的潜力低于其二倍体亲本。因此, 包括Sebbins在内的许多进化生物学领域的权威学者认为, 多倍体化对进化产生的效力较小(Polyploidy has contributed little to progressive

基金项目 “十一五”科技支撑计划课题“主要商品花卉新品种选育”(2006-4-C08)948 重大项目“花卉新品种创制技术引进与创新”(2006BAD01A08)。

作者简介 段超(1983-), 女, 内蒙古乌兰察布市人, 硕士研究生, 研究方向: 花卉种质资源与育种。\* 通讯作者。

收稿日期 2009-02-20

evolution)<sup>[17]</sup>。但近年来的基因组学研究表明,即使原来被认为是典型二倍体的拟南芥和水稻等小基因组植物在其进化历程中也经历了多倍化事件,因此使得“被子植物中可能没有真正二倍体”<sup>[18]</sup>的观点得到越来越多的支持,而其中异源多倍体的普遍性也证明了远缘杂交和多倍化在新种形成和进化上的重要意义,为观赏植物远缘杂交和多倍体育种提供了理论支持。

**2.1 无性多倍化与有性多倍化** 多倍体育种可分为无性多倍化育种和有性多倍化育种。无性多倍化是人工通过物理或化学的方法使植物体细胞染色体加倍。物理方法有:温度激变、机械创伤(切伤、嫁接、反复摘心法)、辐射、改变渗透压、离心力、热冲击、超声波、干旱等环境胁迫、逆境处理等。化学处理药剂如:秋水仙碱、吲哚乙酸、萘乙烷、茚三酮、苯及其衍生物、有机砷、藜芦碱及其他植物碱、麻醉剂等均可诱导染色体加倍。近年来,有研究报道一些微管抑制剂类除草剂如二苯基胺、磷酰胺(APM)、苯基酰胺(promamide)、戊炔草胺(Pronamide)、安磺灵(Oryzalin)、及氟乐灵(Trifluralin)等也可使植物染色体加倍。该类除草剂对微管蛋白有很高的亲和力,在较低浓度时对微管蛋白的解聚能力更强,加倍频率更高,且对植物的毒害作用较小。

一般来说,远缘杂种除通过完整基因组加倍形成异源多倍体外,在绝大多数情况下会被亲本之一回交同化而不能产生新物种,且远缘杂种无法正常结实,不能将杂种优势传递下去,而多倍化可克服远缘杂交当代不孕性和不结实性。首个麝香百合系粉红品种‘Hegart Lady’即为栽培种与野生种间杂交(*L. longiflorum* ‘Gehia’ × *L. rubellum*) 获得不育的F1代,然后通过染色体加倍恢复育性,再与亲本回交育成,该品种表现出很高的观赏性与抗逆性<sup>[19]</sup>。许多百合LO、LA、OA及远缘杂种都是以多倍体为基础育成的。

表1 部分利用多倍体技术恢复远缘杂种F1代育性的观赏植物

Table 1 Some ornamentals for resuming the fertility of distant hybrid F1 generation by using polyploidy technology

植物名	杂交种	参考文献
Plant name	Hybrid	Reference
Astroemeria	<i>A. aurea</i> × <i>A. caryophyllaea</i>	Lu 等(1997)
Cyclamen	<i>C. persicum</i> × <i>C. purpurescens</i>	Hizaka 等(1995)
Delphinium	<i>D. zaili</i> × <i>D. nudicaule</i>	Legro (1964)
Dendranthema	<i>D. grandiflorum</i>	Erdo 等(1997)
Hebe	<i>H. cultivars</i>	Aisumi (1964)
Iris	<i>I. laevigata</i> × <i>I. ensata</i> ; <i>I. hollandica</i> × <i>I. tingiana</i>	Yabuya (1985) Van Eijk 等(1990)
Impatiens	<i>I. platyptera</i> × <i>I. moreana</i>	Aisumi (1978)
Lilium	<i>L. longiflorum</i> × <i>L. henryi</i> ; <i>L. candidum</i> × <i>L. henryi</i> ; <i>L. longiflorum</i> × <i>Asiatic</i> , <i>Oriental</i> × <i>Asiatic</i> ; <i>L. longiflorum</i> × <i>Oriental</i> ; <i>L. longiflorum</i> × <i>L. rubellum</i> and others	Asano (1982) Van Tuyl 等 (1989,2000,2002)
Nerine	<i>N. bowdenii</i> × <i>Amaryllis belladonna</i>	Mijer 等(1998)
Nicotiana	<i>N. trigonophylla</i> × <i>N. tabacum</i>	Chung 等(1996)
Tagetes	<i>T. erecta</i> × <i>T. patula</i>	Bolz (1961)

在形态上,多倍体植物叶片增厚、增大,花大,重瓣性强、花色浓艳;在生理上,由于多倍体植物核体积增大,表现出耐辐射、耐紫外光、耐寒、耐旱等特性;这些特征无疑增加了花

卉的欣赏价值和商品价值。Ensweller 发现,若干四倍体麝香百合比对应二倍体花朵大2/3,花梗较厚实,耐储运能力特强。研究表明,与二倍体百合相比,四倍体百合花头数减少,花茎短且柔韧,在栽培、运输及销售中耗损较少,二倍体东方百合叶边焦枯现象的发生频率为72.2%,而四倍体仅为2.3%<sup>[20]</sup>。

有性多倍化育种是通过未减数分裂的配子(即2n配子)或多倍体亲本间相互杂交获得多倍体后代的一种方法,其中2n配子应用更广泛。有性多倍化具有更高的发生频率和更高的杂合度,通过近缘二倍体的基因渗入,创造植物遗传多样性进而得到杂合多倍体群体,克服了无性多倍化易产生嵌合体、分离鉴定难度大、育种周期长等问题。且无性多倍化加倍后,后代不同亲本部分同源染色体(homologous)易分离,使后代向双亲类型分化而无法保持杂种优势。许多研究表明,2n配子在杂合性(heterozygosity)和上位性(epistasis)传递中具有特殊的价值,利用2n配子获得的杂交后代对提高植物杂种优势,实现低倍性和高倍性基因的集中组合具有重要价值。

**2.2 2n配子** 通常,未加倍的种间杂种无法产生正常、可育的花粉,1976年Wägle和Pasutti发现种间杂种产生了一定比例的可育花粉,试验证明为2n配子。至1983年10月有文献报道的自然发生2n配子的植物有13个科74个种(或杂种、变种),1983~1994年又报道了20个种<sup>[21]</sup>。

表2 部分观赏植物中自然产生2n配子的种

Table 2 Some species of ornamentals producing 2n gamete naturally

植物种	杂交种	文献
Plant species	Hybrid	Reference
Astroemeria	Interspecific hybrids	Kantra 等(1999)
Antoxanthum	Species	Bretagnolle (2001)
Lilium	Interspecific hybrids	Van Tuyl (1989), Li 等(2001)
Narcissus	Cultivated Narcissus	Bardham (1986)
Gadidus	Cultivated Gadidus	Lu 等(1997)
Gentiana	Species	Yuan 等(1998)
Ranunculus	Interspecific hybrids	Okada H (1984)
Rosa	Interspecific hybrids	Gesped 等(2002)
Orchidaceae	Species interspecific hybrids	Mitzk 等(2003)
Hebe	Cultivated Hebe	Tonkins 等(2001)
Hypericum	Species	Mitzk 等(2003)
Tilip	Species	Kroon 等(1986)
Primula	Interspecific hybrids	Kato 等(2000), Kato 等(2001)

2n配子的产生机制分为:核重组(第一次分裂重组FDR和第二次分裂重组SDR)、缺少减数分裂的第一次或第二次分裂、细胞质早分裂、缺少第二次细胞质分裂和减数分裂后的融合。依据不同异常途径产生的2n配子的遗传效果,学术界将2n配子的遗传学机理归纳为等价于FDR和SDR方式。其中FDR型具有较高的杂合度和上位性,在育种中的应用潜力较大,产生的后代具有高产优势。最近Li 提出,百合中2n配子存在第三种产生机制IMR(Indeterminate meiotic restitution)<sup>[22]</sup>。

除植物偶尔自发产生2n配子外,X射线、射线、高温、低温或变温处理均可诱导植物2n配子形成。利用减数分裂和2n配子对环境的敏感性,通过环境胁迫也可有效诱导2n配子产生。对不加温温室中栽培的百合进行4h,8h,30 热

激处理,可显著提高 $2n$ 配子的比率<sup>[23]</sup>。花科Glia属植物在贫瘠条件下产生的 $2n$ 配子较其在肥沃土坡上产生的 $2n$ 配子约高900倍<sup>[24]</sup>,改变光周期也可提高 $2n$ 配子的产生频率,18h光周期条件下马铃薯 $2n$ 花粉的比例最高达16%。

可成功诱导 $2n$ 配子的化学药剂有:N亚硝基N-乙基脒、N亚硝基N-甲基脒、氯仿、秋水仙素等,除草剂戊炔草胺(Proxamide)、安磺灵(Oryzalin)、氟乐灵(Tifluralin)也可成功诱导苹果、梨、李和樱桃等产生 $2n$ 配子。Ki-Byung Lim用咖啡因成功诱导出百合 $2n$ 配子<sup>[25]</sup>。气态药剂MNU对苹果及 $N_2O$ 对百合 $2n$ 配子的产生也有较好的促进作用<sup>[26-27]</sup>。

鉴别可育 $2n$ 雄配子常用的证据有:正反交杂交后代中出现意外倍性个体;花粉粒体积呈现二型分布;小孢子母细胞减数分裂四分体时期出现二分体或三分体。1989年以后,流式细胞仪被用来迅速而准确的检测特定基因型 $2n$ 花粉的育性<sup>[28]</sup>,醋酸洋红、醋酸地衣红、二乙酸荧光素(fluorescein diacetate,FDA)染色或花粉萌发试验也可鉴定植物 $2n$ 花粉的育性。

$2n$ 配子在植物进化及遗传改良中具有独特的优越性:通过 $2n$ 配子杂交可使子代的倍性提高,同时可克服体细胞加倍等无性多倍化使杂种育性和生活力下降的问题;通过 $2n$ 配子可将亲本的杂合性和上位性高频率地传递给子代,且子代表现型的一致性得到提高;通过 $2n$ 配子和 $n$ 配子杂交,可直接获得三倍体种质而无需四倍体亲本,缩短了育种周期;用HSH、GFH、MAS等分子标记技术对百合、六出花<sup>[29]</sup>、百合科沙龙掌属植物与芦荟属植物<sup>[30]</sup> $2n$ 配子育成的远缘杂种进行鉴定,结果表明,杂种中部分同源染色体片段间发生易位重组,因此, $2n$ 配子杂交被认为是目的性状基因渐渗非常有效的途径,且杂交后代具有更广泛的遗传变异<sup>[31]</sup>,同时,杂交后代性状稳定。

各种杂交新技术与多倍体诱导相结合,使观赏植物的育种工作有了很大突破。荷兰已成功培育出百合栽培种与野生种、野生种间的远缘杂交种(如:*L. longiflorum* × *L. concolor*, *L. longiflorum* × *L. dauricum*, *L. longiflorum* × *L. henryi*, *L. longiflorum* × *L. martagon*, *L. longiflorum* × *L. candidum*, *L. henryi* × *L. candidum*),另外,该国通过各杂种系间的杂交,已成功创造出LA、LO、OA等观赏价值更高、抗性更强的品种。随着 $2n$ 配子的应用,相信不久的将来,可以将东方百合、亚洲百合、麝香百合的优点结合起来,创造出更加优良的百合品种。

### 3 小结

我国被誉为世界园林之母,拥有丰富的观赏植物资源,但我国观赏植物产业始终缺少自主知识产权。充分利用各种技术手段,立足于我国丰富的种质资源,相信我国观赏植物育种工作必将取得新突破。

### 参考文献

[1] 程金水. 园林植物遗传育种学[M]. 北京:中国林业出版社,2000.  
 [2] Van TUYL J M, KI-BYUNG LIM. Interspecific hybridisation and polyploidisation as tools in ornamental plant breeding[J]. Acta Hort, 2003, 612: 13-22.  
 [3] RIESEBERG L H. Hybrid origins of plant species[J]. Annual Review of Ecology and Systematics, 1997, 28: 359-389.  
 [4] Van TUYL J M, Van DEN MP, Van CREIJ M G M, et al. Application of in vitro pollination, ovary culture and embryo rescue for overcoming incongruity barriers

in interspecific Liliaceae crosses[J]. Part Science, 1991, 74: 115-126.  
 [5] DUBOUZET JOSEPH G, KENICHI ARISUMI, TAKEOMI ETOH. Studies on the development of new ornamental allium through interspecific hybridization III. Hybridization of autumn-flowering species through pull-style pollination, cutflower culture and embryo rescue[J]. Mémoires of the Faculty of Agriculture Kagoshima University, 1994, 30: 35-42.  
 [6] AHN MS, LEE K J, JENG J S. Investigation on pollination methods for the intergeneric hybrid between Hemerocallis and Liliaceae[J]. Acta Horticulturae, 2003, 620: 305-310.  
 [7] Van CREIJ M G M, KERCKHOFFS D M F J, Van TUYL J M. Application of three pollination techniques and hormone treatments for overcoming interspecific crossing barriers in Tulipa[J]. Acta Hort, 1997, 430: 547-557.  
 [8] Van TUYL J M, CLARA MARCUCCI M, VISSER T. Pollen and pollination experiments[J]. Euphytica, 1982, 31: 613-619.  
 [9] ASCHER P D. The effect of pre-pollination stilar flush on pollen tube growth in heat-treated styles of Liliaceae[J]. Incompatibility Newsletter, 1973, 3: 4-6.  
 [10] TEZUKA TAKAFUMI, AKITA ISAMU, YOSHINO NAISUKO, et al. Regulation of self-incompatibility by acetylcholine and cAMP in Liliaceae[J]. Journal of Plant Physiology, 2007, 164(7): 878-885.  
 [11] Van TUYL J M, BINO R J, CUSTERS J B M. Application of in vitro pollination, ovary culture, ovule culture and embryo rescue techniques in breeding of Liliaceae, Tulipa and Nerine[M]// de JONG J. Integration of in vitro techniques in ornamental plant breeding. Wageningen: CPO P, 1990: 86-97.  
 [12] GUPTA S, BURCHELL B J, COWING W A. Interspecific reproductive barriers and genomic similarity among the rough-seeded Lupinus species[J]. Part Breeding, 1996, 115: 123-127.  
 [13] MORGAN E R, BURGE G K, SEELYE J F, et al. Wide crosses in the Cichaceae: Sandersonia aurantiaca (Hook.) × Littonia modesta (Hook.) [J]. Euphytica, 2001, 121: 343-348.  
 [14] DEJEU MJ, JACOBSENE. Early post-fertilisation ovule culture in Astrocenaria L. and barriers to interspecific hybridisation[J]. Euphytica, 1995, 86: 15-23.  
 [15] 王文和, 赵洁, 吴禄平. 被子植物的试管受精及其意义[J]. 沈阳农业大学学报, 2002, 33(1): 67-70.  
 [16] Van CREIJ M G M, KERCKHOFFS D M F J, Van TUYL J M. The effect of ovule age on ovary-slice culture and ovule culture in intraspecific and interspecific crosses with Tulipa gesneriana L. [J]. Euphytica, 1999, 108: 21-28.  
 [17] STEBBINS G L. Chromosomal evolution in higher plants[M]. London: Edward Arnold, 1971.  
 [18] HUBB, WENDEL J F. Non-Mendelian phenomena in allopolyploid genome evolution[J]. Curr Genomics, 2002, 3: 489-506.  
 [19] Van TUYL J M, MAASI W G M, IIMK B. Introgression in interspecific hybrids of lily[J]. Acta Hort, 2002, 570: 213-218.  
 [20] OKAZAKI K, HANE Y. Comparison of diploid and chimeric forms (4x/2x) of Asiatic hybrid lilies (Lilium spp.) under natural and early forcing culture[J]. New Zealand J. Hort Sci, 2005, 33: 261-267.  
 [21] 张新忠, 闫立英, 刘国俭, 等.  $2n$ 配子在植物育种和种质创新中利用的研究进展[J]. 华北农学报, 2003, 18(4): 30-35.  
 [22] IIMK B, RAMANNA MS, DEJONG J H, et al. Indeterminate mitotic restitution (IMR): a novel type of mitotic nuclear restitution mechanism detected in interspecific lily hybrids by GISH[J]. Theor. App. Genet, 2001, 103: 219-230.  
 [23] LOKKER A C, RODRIGO BARBA GONZALEZ, KI-BYUNG LIM, et al. Genotypic and environmental variation in production of  $2n$  gametes of oriental × asiatic lily hybrids[J]. Acta Hort, 1997, 673: 453-456.  
 [24] 孙静贤, 丁开宇, 王兵益. 植物多倍体研究的回顾与展望[J]. 武汉植物学研究, 2005, 23(5): 482-490.  
 [25] IIMK B, RODRIGO BARBA GONZALEZ, ZHOU S Z, et al. Mitotic polyploidization with homeologous recombination induced by caffeine treatment in interspecific lily hybrids[J]. Korean J of Genetics, 2005, 27(3): 219-226.  
 [26] MASAKO AKUTSU, SATOMI KITAMURA, RYO TODA. Production of  $2n$  pollen of Asiatic hybrid lilies by nitrous oxide treatment[J]. Euphytica, 2007, 155: 1-2.  
 [27] RODRIGO BARBA GONZALEZ, MILLER CHAD T, RAMANNA MUNKOIE S, et al. Nitrous oxide ( $N_2O$ ) induces  $2n$  gametes in sterile F1 hybrids between Oriental × Asiatic lily (Lilium) hybrids and leads to intergeneric recombination[J]. Euphytica, 2006, 148: 3.  
 [28] Van TUYL J M, DE VRIES J N, BINO R J, et al. Identification of  $2n$  pollen producing interspecific hybrids of Liliaceae using flow cytometry[J]. Cytologia, 1989, 54: 737-745.  
 [29] KAMSTRA S A, RAMANNA MS, DEJEU MJ, et al. Homeologous chromosome pairing in the distant hybrid Astrocenaria aurea × A. inodora and the genome composition of its backcross derivatives determined by fluorescent in situ hybridisation with species specific probes[J]. Hereditas, 1999, 82: 69-78.

**1.2.2.2** 电位滴定法<sup>[4]</sup>。精密吸取上述样品液各5 ml, 分别置于100 ml 的烧杯中, 精确加入0.04 ml/L 硫酸溶液20 ml, 置水浴上温热, 除去氯仿, 室温下放冷, 用笔式pH 计指示pH 值, 以0.02 ml/L 氢氧化钠标准液滴定, pH 值5.1 为滴定终点。

**1.2.2.3** 计算方法。总生物碱含量以延胡索乙素(C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>4</sub>) 计算, 1 ml 0.04 ml/L 硫酸溶液相当于7.108 4 ng 延胡索乙素。

**1.2.3** 加样回收率试验。分别取已知含量的延胡索生品、醋制延胡索和米泔水制延胡索粉各6 份, 每份约0.5 g, 分别加入与延胡索生品、醋制延胡索和米泔水制延胡索粉相等的

延胡索乙素标准品, 通过酸碱滴定法和电位滴定法测定总生物碱含量, 计算回收率。

## 2 结果与分析

**2.1** 延胡索生品及2 种炮制品中总生物碱含量的测定 精密吸取延胡索生品、醋制延胡索和米泔水制延胡索样品液各5 ml, 每种样品液设3 个组, 分别用酸碱滴定法和电位滴定法进行测定, 取其平均值。由表1 可知, 与延胡索生品相比, 延胡索经米泔水制和醋制后能提高水煎液中总生物碱含量, 并且米泔水制比醋制的总生物碱含量高。

表1 延胡索生品及2 种炮制品中总生物碱含量

Table 1 Total alkaloid content of crude funitory samples and two kinds of roasted samples of *Corydalis yanhusuo* %

处理 Treatment	酸碱滴定法 Acid-alkali titration method				电位滴定法 Potentiometric titration method			
	1	2	3	平均含量 Average content	1	2	3	平均含量 Average content
生品 Crude samples	0.105 6	0.123 8	0.123 8	0.117 7	0.124 2	0.131 6	0.132 6	0.129 5
米泔水制 Samples processed with rice washed water	0.226 5	0.248 4	0.248 0	0.240 9	0.236 5	0.245 8	0.245 6	0.227 9
醋制 Samples processed with vinegar	0.198 5	0.184 0	0.184 7	0.191 3	0.212 3	0.206 8	0.203 8	0.207 6

**2.2** 加样回收率试验 取已知含量的延胡索生品、醋制延胡索和米泔水制延胡索粉各6 份, 精密称定, 分别加入与延胡索粉中质量相等的延胡索乙素, 以酸碱滴定法和电位滴定法测定总生物碱含量, 通过测得量、原有量和加入标准品量计算回收率。由表2 可知, 酸碱滴定法平均回收率的 RSD > 3%, 而电位滴定法的 RSD < 2%, 表明电位滴定法的测定结果更加准确。

表2 加样回收率试验结果

Table 2 The results of addition recovery test %

处理 Treatment	酸碱滴定法 Acid-alkali titration method		电位滴定法 Potentiometric titration method	
	平均回收率 Average recovery rate	RSD	平均回收率 Average recovery rate	RSD
	生品 Crude samples	101.24	3.51	94.58
米泔水制 Samples processed with rice-washed water	101.58	3.53	97.61	1.74
醋制 Samples processed with vinegar	100.96	3.51	96.59	1.77

## 3 讨论

延胡索是临床常用中药, 通常用其炮制品, 镇痛成分为

生物碱, 游离生物碱难溶于水。该试验采用米泔水制和醋制2 种方法测定延胡索及其炮制品中总生物碱的含量, 比较了延胡索炮制前后生物碱的含量变化, 结果表明: 与延胡索生品相比, 延胡索经米泔水制和醋制后能提高其水煎液中总生物碱含量; 在延胡索炮制过程中, 米泔水制比醋制的生物碱含量高。

对于总生物碱测定方法, 文献报道有多种<sup>[5-6]</sup>。碱滴定法简便, 结果偏差大; 两相滴定法氯仿层易与水层发生乳化现象, 终点难观察; 非水滴定法因提取物本身色素干扰, 终点颜色变化不明显; 电位滴定法终点易确定, 不受颜色干扰。该试验利用酸碱滴定法与电位滴定法对比, 发现前者指示剂变色范围大, 滴定终点时溶液pH 值相差较大(同时利用pH 计指示), 造成结果不稳定, 变异系数大, 故以电位滴定法为佳。

## 参考文献

- [1] 张华, 张学兰. 延胡索炮制现代研究[J]. 山东中医药大学学报, 2001, 25(2): 64-65.
- [2] 杨雄志, 曹岚. 醋制延胡索新工艺的研究[J]. 中药材, 2007, 30(3): 276.
- [3] 沙世炎, 徐礼, 严敏如, 等. 中草药有效成分分析法 上册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982.
- [4] 张丽筑, 朱珠, 郝小燕. 延胡索生物总碱两种提取方法的比较[J]. 贵阳医学院学报, 2006, 31(3): 280.
- [5] 窦志英, 孙巍. 不同炮制方法对延胡索中延胡索乙素含量的影响[J]. 天津中医药大学学报, 2006, 25(3): 186-187.
- [6] 朱秀华, 蒋松美. 延胡索炮制方法对总生物碱含量影响[J]. 浙江中医学院学报, 1999, 23(2): 47.

proery[J]. Chromosoma, 1997, 105: 342-348.

- [30] TAKAHASHI C, LEITCHI J, RYANA, et al. The use of genomic in situ hybridization (GISH) to show transmission of recombinant chromosomes by a partially fertile bigenetic hybrid, *Gasteria lutzii* × *Aloe aristata* (Aloaceae), to its
- [31] BEERS CARLA M, RODRIGO BARBA GONZALEZ, ALEX A VAN SILFHOUT, et al. Mitotic and meiotic polyploidization in lily hybrids for transferring Botrytis resistance. poster IXth international symposium on flower bulbs [J]. Acta Hort, 2005, 673: 449-452.

(上接第6956 页)

- [30] TAKAHASHI C, LEITCHI J, RYANA, et al. The use of genomic in situ hybridization (GISH) to show transmission of recombinant chromosomes by a partially fertile bigenetic hybrid, *Gasteria lutzii* × *Aloe aristata* (Aloaceae), to its