



AN PEIYUJISHU

杨志玲 杨 旭 谭梓峰 编著

耐荫药用植物

石蒜 培育技术



中国林业出版社

耐荫药用植物石蒜培育技术

杨志玲 杨 旭 谭梓峰 编著

中国林业出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

耐荫药用植物石蒜培育技术 / 杨志玲, 杨旭, 谭梓峰编著. - 北京: 中国林业出版社, 2010. 9

ISBN 978-7-5038-5921-2

I. ①耐… II. ①杨…②杨…③谭 III. ①石蒜-栽培 IV. ①S567. 23

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2010) 第 171510 号

出版 中国林业出版社(100009 北京西城区刘海胡同7号)

E-mail forestbook@163.com 电话 (010)83222880

网址 www.cfph.com.cn

发行 中国林业出版社

印刷 北京北林印刷厂

版次 2010 年 9 月第 1 版

印次 2010 年 9 月第 1 次

开本 787mm×960mm 1/16

印张 13

字数 230 千字

印数 1~1000 册

定价 40.00 元

自序

道地药材是近年来科学家研究和药农种植的热门话题，不过开发利用森林药材新品种更是满足人们治愈新疾病的重要之举，也是科研工作者的重要职责。特别是随着人类文明不断地向前发展，全球范围内生态环境日益恶化，人类疾病谱随之缓慢发生着改变，野生药用植物在预防和治疗某些慢性病、疑难病和老年病方面尤有所长。近年来，国内外兴起从野生药用植物资源中开发新药的热潮，这为野生药用植物资源开发利用带来了宝贵的机遇。大量科研实践发现，对野生药用植物驯化培育和规模化种植在一定程度上能为人类日常保健、医疗卫生和健康用药提供保证。

自 20 世纪 70 年代西方发达国家瑞典、丹麦、挪威、美国及亚洲的日本等国进入老龄社会后，至 2000 年全球总人口 60 亿，而老年人口已达 6 亿，老年人口占 10%，正式宣告全球进入了老龄化社会。在老龄化社会，老年人群健康状况日益受到关注。科学家研究认为：心脑血管病、恶性肿瘤、中风和阿尔茨海默病 (Alzheimer' disease, 简称 AD) 是影响老年人群健康最重要的四大疾病。其中 AD 病，常起病于老年或老年前期，多缓慢发病，随年龄增长逐渐进展，发病时间长达 3 ~ 20 年，对其治疗已引起了全球科学家重视。

科学家已研究证实加兰他敏 (Galantamine) 对治疗老年高危人群中 AD 病具有双重益处，其药效作用获得了世界神经病学会认可。该药于 2000 年 7 月被欧盟批准后在英国、爱尔兰首次上市，2001 年获美国 FDA 许可用于治疗 AD，已获准在美国以及欧洲的 22 个国家上市。随着全球人口老年化进展的加快，AD 治疗药物市场呈现十分旺盛的需求景象。初步统计全球对该药年需求达到 1500 kg，但受资源供应量的限制，目前全球加兰他敏 (Galantamine) 供应量仅几百公斤，药品缺口量非常巨大，这为国内外医药公司、中间供应商提供了极大的发展空间。

与此同时，科学家不断研究能提取加兰他敏 (Galantamine) 的新植物资源，已发现在石蒜科 (Amaryllidaceae) 多个属植物能提取该药用成分。据不完全统计，石蒜属 (*Lycoris* Herb.) 植物在全世界约有 20 多种，主要分布于亚洲，其中我国 17 种 (含 1 变种)、日本 6 种、朝鲜 2 种、老挝 1 种、缅甸 1 种，属中国—日本东亚分布区。该属植物半数以上产于我国，而其中有 12 种为中国特有；日本次之，

特有种仅血石蒜(*L. sanguinea*)。该属植物在我国主要分布于华东、华南、华中、西南等亚热带广大地域的 16 个省份。我国分布的石蒜属野生植物资源,引起了国内外制药企业的极大兴趣,人们为了追求眼前的利润,近期内野生石蒜植物资源遭到近乎掠夺式的采挖和开发利用,导致其野生种质资源量和遗传多样性被严重破坏。基于生产实践中石蒜植物资源短缺问题,项目组认为只有对其野生植物资源开展引种驯化研究,应用集成技术进行规模化培育,才能够在短期内获得较多优质资源和提供制药生产应用,保证其资源既能造福人类又不遭受破坏。

基于以上现状,自 2003 年起项目组研究人员坚持不懈地努力,先后获得浙江省一新制药股份有限公司横向合作项目“石蒜药用种性恢复培育的施肥技术”、浙江省科技厅重点农业项目“药用石蒜优质资源选育、野生驯化培育及离体培养再生技术体系的建立”(编号:2004C22041)、浙江省林业厅财政补助专项“林药(石蒜)生态经济型培育模式关键技术与示范”(编号:07A03)、科技部林业公益性专项“南方林源多用途药用植物种质保护和选育技术”(编号:200704022)等项目资助,本书出版也是在以上项目经费的资助下完成,在此表示衷心的感谢!

在以上多个项目资助下,项目组开展了相关科学研究,从石蒜全分布着手种质资源收集、不同居群形态和物候期观察、居群遗传多样性、人工无性繁殖、体胚培养、野生驯化培育、施肥对石蒜生长及药效成分的影响、石蒜生长对杂草群落物种影响等基础性研究。迄今为止,项目组承担的 5 个石蒜项目中前 4 个已得到浙江省科技厅等相关部门的鉴定和验收。科技部林业公益性专项在 2009 年 8 月和 11 月顺利通过国家林业局科技司组织的中期现场查定和中期评定,在中期评定时经过专家评分和主持项目专家互评,项目组承担的项目在 28 个同类项目中名列第 6 名。此外,项目组还培养了以石蒜为毕业论文的博士研究生 1 名、硕士研究生 2 名。项目组科研人员在国内外核心期刊共发表了与石蒜相关的高质量学术论文 23 篇,研究工作取得了阶段性的可喜进展。主要技术成果总结如下:

(1)开展林药(石蒜)生态经济型培育模式关键技术研究,筛选出林木与石蒜 7 种培育模式:桤木(*Alnus cremastogyne* Burk.) + 石蒜(*L. radiata*)、重阳木[*Bischofia polycarpa* (Levl.) Airy Shaw] + 石蒜(*L. radiata*)、栲树(*Koelreuteria paniculata* Laxm) + 石蒜(*L. radiata*)、杜英(*Elaeocarpus sylvestris* Poir) + 石蒜(*L. radiata*)、鹅掌楸[*Liriodendron chinense* (Hemsl.) Sarg.] + 石蒜(*L. radiata*)、灯台树(*Cornus controversa* Hemsl.) + 石蒜(*L. radiata*)、枫香(*Liquidambar formosana* Hance) + 石蒜(*L. radiata*),认为前 4 种模式下培育的石蒜生长发育、生物量和

药效成分均较好,确定为林下石蒜培育的理想模式;确定重阳木、栲树、杜英初植密度分别为 $4\text{ m} \times 3\text{ m}$, 桫欏木初植密度为 $4\text{ m} \times 4\text{ m}$, 石蒜种植密度为 $10\text{ cm} \times 15\text{ cm}$;通过分析确定叶绿素、叶绿素 a/b 及叶绿素荧光参数(F_v/F_m)作为评价石蒜耐荫性生理生态指标;采用灰色关联度及回归分析等数理统计方法评价微环境条件对石蒜生长影响,认为相对湿度和土壤水分是影响石蒜生长的关键微环境因子,建议选择土壤含水量 $20\% \sim 28\%$ 、相对湿度 $\geq 62\%$ 、光强 $17.9 \sim 26.6\text{ Lx}$ 环境条件培育。营建了4种林药(石蒜)培育模式示范基地,面积525亩。

(2)从石蒜种质资源入手,开展了不同居群形态特性、物候期差异、繁殖差异、子鳞茎质量等基础性研究。研究认为不同野生居群石蒜单个鳞茎叶片数量相对稳定,多数在6片左右。52.38%的居群叶片长度集中在 $18.36 \sim 21.56\text{ cm}$, 85.71%的叶片宽度在 $0.50 \sim 0.70\text{ cm}$, 71.43%的叶片面积在 $9.22 \sim 12.95\text{ cm}^2$, 61.90%的叶片叶绿素为 $57.68 \sim 64.73\text{ SPAD}$ 。不同野生居群间石蒜表型性状的差异是其生存的地理气候条件及小环境共同作用的结果,它们的存在也为该植物开发利用和遗传改良提供了种质材料。对居群间生长性状与地理气候条件的相关性分析,发现越往南、年均温升高、日照时数减低、降水量增多,叶片变宽、叶面积增大、叶片数量减少,但叶片长度未表现显著水平变化,可见热量及降水量变化制约着叶片宽度、叶片面积和叶片数量的变化,叶绿素总量与日照时数略微相关,但与其所处的地理位置无关。研究发现来自亚热带南部地区的居群初叶期比中部和北部地区的居群分别早 $3 \sim 5\text{ d}$ 及 $6 \sim 8\text{ d}$ 。来自南部地区的居群落叶期比上述两个地区的居群也早约1周,所有居群落叶期大约为 $20 \sim 25\text{ d}$,时间在4月初至4月下旬。各居群休眠期在4月底至9月初,时间约 $123 \sim 128\text{ d}$ 。休眠后期、出叶前期有个明显的开花生理过程,花期集中在8月中旬到下旬初,时间大约 $10 \sim 14\text{ d}$ 左右。同时,研究发现所有居群繁殖系数在 $4.10 \sim 9.20$ 之间变化,均值为5.81,来自亚热带南部居群的繁殖系数均值(7.68)比居群繁殖系数均值高出1.87,而中部和北部居群繁殖系数难以区分差异性。初步选育 YL16、YL13、YL22 等3个加兰他敏接近或超过 $300\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 居群,建议作为一类优质资源开发利用。

(3)结合现代分子生物学手段,利用石蒜叶片基因组 DNA 为模板,建立其 ISSR 分析的最优化反应体系及应用程序: $25\text{ }\mu\text{L}$ 反应体系中,有 20 ng 模板 DNA、 $0.5\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 随机引物、 $150\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTPs、 $2.0\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}\text{ Mg}^{2+}$ 、 1.0 U Taq DNA 聚合酶。反应程序为: 94°C 预变性 300 s ; 然后45个循环:每个循环 94°C 变性 45 s , 55°C 退火 60 s , 72°C 延伸 120 s ; 循环结束后 72°C 延伸 420 s 。

利用 ISSR 分子标记技术对 14 个野生石蒜居群进行遗传多样性分析, 结果表明: 物种遗传多样性很高, 多态位点百分率为 92.31%, Shannon 指数 h 为 0.4597, Nei 指数 I 为 0.3025; 居群水平遗传多样性较低, 多态位点百分率平均为 49.65%, Shannon 指数 h 平均为 0.2620, Nei 指数 I 平均为 0.1763; 居群间的遗传分化系数 G_{st} 为 0.5035, 基因流 N_m 为 0.6983。而 AMOVA 分子变异分析显示: 居群间遗传分化程度高, 46.12% 的变异发生在居群内, 53.88% 的变异发生在居群间。生境的片段化使居群间的基因流受阻, 可能是居群间高遗传分化和居群水平低遗传多样性的主要原因。

(4) 田间实验设计 3 种施肥措施能增加石蒜的干、鲜物质。肥料种类对增加鳞茎体积由好到差排序: 钾肥 > 复合肥 > 氮肥。影响石蒜生物产量构成因素效果的肥料种类排序也是钾肥 > 复合肥 > 氮肥, 实践中发现钾肥连续施用导致鳞茎自然分蘖增多, 可提供制药原料的鳞茎数量减少。盆栽试验发现钾肥能提高根系活力、根系 CEC 差异和加兰他敏含量, 三者年度变化曲线十分相似。增施钾肥 $0.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $0.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 鳞茎的根系活力、根系 CEC 差异和加兰他敏含量比对照均有小幅增长; 增施钾肥 $0.9 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, 鳞茎的根系活力、根系 CEC 差异和加兰他敏含量均达到最大值 ($97.35 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$ 、 $9.67 \text{ cmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $276.4054 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$); 施钾肥继续增长到 $1.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, 上述指标反而降低。

(5) 石蒜自然繁殖系数为 2.495 ~ 2.656。在不同生长发育期进行无性繁殖, 繁殖系数呈现双高峰曲线图, 其值则在 0.80 ~ 6.8 之间变动; 欲获得较高无性繁殖系数, 建议在休眠期的 6 月、7 月及初叶期的 9 月繁殖; 欲获得较大质量的子鳞茎宜在初叶期的 9 月和落叶期的 4 月繁殖; 欲获得横径较大的子鳞茎宜在 6、7、9 和 4 月份繁殖; 在 3 ~ 7 月和 9 月进行繁殖, 获得子鳞茎的根系发育良好。中国石蒜 (*Lycoris chinensis*) 母鳞茎个体之间繁殖系数差异从 1 ~ 19 个不等, 繁殖系数均值为 7.09, 母鳞茎质量不能作为挑选获得较多繁殖系数的标志。

通过对石蒜离体培养诱导胚性愈伤组织及其分化。优化培养条件后建立起高效的离体再生繁殖体系。结果表明: 改良 MS + BA $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组合胚性愈伤组织诱导率最高, 3 个月诱导率可达 100%; 改良 MS + BA $1.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + KT $0.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + peptone $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理对胚性愈伤增殖和分化效果较好, 且分化苗可再次被诱导出胚性愈伤组织; MS + BA $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + KT $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + YE $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + Sugar 8% 是较好的优化处理组合, 能有效缓解胚性愈伤组织玻璃化严重问题以及维持相对稳定的增殖与分化速度。

(6)石蒜在民间长期用作土农药杀灭杂草,但关于石蒜的化感作用未能得到重视,据此研究了石蒜生长对群落杂草组成及物种多样性的影响。野外调查显示,石蒜分布对群落的组成造成很大的影响,能减少群落中商陆、蹄盖蕨及禾本科部分杂草数目及密度,使得群落中其他物种种类和分布发生一定的改变,群落的物种多样性指数降低,群落均匀度提高。群落相似度与没有石蒜分布的群落相比显著降低。说明石蒜生长改变了杂草的群落结构,有利于抑制杂草发生及减少危害。

在以上项目研究过程中,得到了国家林业局亚热带林木育种重点性开放实验室副主任费学谦研究员及实验室全体工作人员的协调和配合。同事杨旭助理研究员除开展了第五章石蒜生长对杂草群落组成和物种多样性影响的研究,还参与了其他章节研究,并进行了细致的数据处理、文献校对、图表整理等工作;谭梓峰高级工程师承担了大量的石蒜种质资源野外调查工作;同事欧阳彤副研究员开展了无性繁殖技术中体胚培养一节的研究;项目组培养的几位硕士生:甘光标、左慧、于会华、冯刚利、舒泉、周彬清、刘若楠,扎扎实实、连续不断地在基地观察和开展繁琐的实验室分析工作,其中左慧、冯刚利和于会华参与了第六章不同野生居群石蒜遗传变异中不同野生居群遗传多样性一节的研究,甘光标参与了第三章石蒜驯化培育技术的研究;硕士生王洁、孙迎春、檀国印也参加了部分实验和文字校对工作;杨政、王剑在实验基地建设方面亦做了许多仔细的工作。此外,特别感谢上海大学理学院何海波博士、雷秋云实验师及钱丹等助手,他们对石蒜主要药效成分——加兰他敏开展了详细的分析工作。最后,感谢参考文献作者对项目组研究的帮助和启迪。

本书仅是有关石蒜研究过程阶段性总结,由于项目组研究人员水平和能力有限,书中难免会有许多不足之处,希望科研同行提出宝贵的意见及读者朋友提供有益的帮助,期待在今后科研工作中改正和提高。

杨志玲

2010年6月10日

目 录

第一章 石蒜研究综述	(1)
1.1 研究背景	(1)
1.2 研究目的和意义	(3)
1.3 国内外研究现状及评述	(4)
1.3.1 国内外研究现状	(4)
1.3.2 前期研究评述	(24)
第二章 石蒜无性繁育技术	(26)
2.1 无性繁殖	(28)
2.1.1 不同方式无性繁殖	(28)
2.1.2 不同生育期无性繁殖	(28)
2.1.3 不同母鳞茎无性繁殖	(33)
2.1.4 小 结	(40)
2.2 体胚培养	(44)
2.2.1 无菌体系建立	(44)
2.2.2 不同外植体培养效果	(44)
2.2.3 不同生长发育期鳞片诱导能力	(44)
2.2.4 不同培养阶段培养基筛选	(45)
2.2.5 胚性愈伤组织诱导	(46)
2.2.6 炼苗与移栽	(49)
2.2.7 其他培养条件	(49)
2.2.8 小 结	(49)
第三章 石蒜驯化培育技术	(51)
3.1 试验地概况与试验材料	(52)
3.1.1 试验地概况	(52)
3.1.2 试验材料	(54)
3.2 微环境差异	(55)
3.2.1 光照效应	(55)

3.2.2	气温效应	(60)
3.2.3	湿度效应	(65)
3.2.4	土壤含水量差异	(67)
3.2.5	土壤养分差异	(68)
3.2.6	小 结	(70)
3.3	石蒜生长差异	(72)
3.3.1	生物学性状差异	(72)
3.3.2	年份间生长性状、营养和药效成分差异	(76)
3.3.3	不同生长发育期石蒜营养和药效成分差异	(80)
3.3.4	石蒜生理指标差异	(84)
3.3.5	生物量差异	(90)
3.3.6	加兰他敏含量差异	(93)
3.3.7	小 结	(94)
3.4	微环境因子与石蒜生长的灰色关联度分析	(96)
3.4.1	性状指标及数据处理	(97)
3.4.2	灰色关联度分析	(97)
3.4.3	小 结	(98)
3.5	石蒜生长与微环境因子回归分析	(98)
3.5.1	生长性状与微环境因子回归分析	(98)
3.5.2	生理指标与微环境因子回归分析	(102)
3.5.3	石蒜生物量与微环境因子回归分析	(103)
3.5.4	营养成分与微环境因子回归分析	(103)
3.5.5	药效成分与微环境因子回归分析	(104)
3.5.6	小 结	(105)
第四章	施肥对石蒜生长和药效成分的影响	(106)
4.1	大田施肥	(107)
4.1.1	施肥对石蒜物质积累和分配的影响	(107)
4.1.2	肥料种类对石蒜生长的影响	(111)
4.1.3	小 结	(120)
4.2	盆栽施肥	(121)
4.2.1	施钾肥对石蒜根系影响	(121)
4.2.2	施钾肥对石蒜加兰他敏含量影响	(123)

4.2.3 小 结	(124)
第五章 石蒜生长对杂草群落组成和物种多样性影响	(126)
5.1 试验地设计及数据处理	(127)
5.1.1 样地的设置和调查	(127)
5.1.2 数据统计和分析	(127)
5.2 石蒜生长对群落杂草组成影响	(128)
5.2.1 群落结构	(128)
5.2.2 群落种类组成	(129)
5.2.3 石蒜生长对群落杂草密度的影响	(130)
5.3 石蒜群落植物种类多样性	(131)
5.3.1 石蒜样地中的物种生态位	(132)
5.3.2 石蒜生长对群落相似性的影响	(132)
5.4 小 结	(134)
第六章 不同野生居群石蒜遗传变异	(136)
6.1 不同野生居群石蒜生长性状多样性	(139)
6.1.1 形态多样性	(139)
6.1.2 叶片性状变异	(140)
6.1.3 小 结	(145)
6.2 不同野生居群石蒜物候期差异	(146)
6.2.1 物候规律	(146)
6.2.2 小 结	(148)
6.3 不同野生居群石蒜繁殖能力差异	(148)
6.3.1 繁殖系数	(148)
6.3.2 子鳞茎性状	(148)
6.3.3 小 结	(149)
6.4 不同野生居群石蒜加兰他敏含量差异	(150)
6.4.1 加兰他敏含量	(150)
6.4.2 优质居群资源	(152)
6.5 不同野生居群石蒜遗传多样性	(153)
6.5.1 遗传多态性 ISSR 分析体系建立	(153)
6.5.2 不同野生居群石蒜遗传变异	(158)
6.5.3 小 结	(160)

第七章 研究结论与展望	(164)
7.1 研究结论	(164)
7.2 存在问题	(167)
7.3 研究展望	(168)
附录 A: 字母缩写对照表	(170)
附录 B: 科研过程中石蒜照片	(172)
附录 C: 项目组发表的石蒜论文	(178)
参考文献	(180)

第一章 石蒜研究综述

1.1 研究背景

21 世纪人类所面临的人口老化问题已引起全社会的高度关注。随着老龄化社会的来临,许多慢性病困扰着老年人。阿尔茨海默病 (Alzheimer' disease, 简称 AD) 是一种在老年期发生的以进行性痴呆为主要特征的神经元退行性疾病。该病的主要临床表现记忆受损,日常生活受到严重影响。其逐渐减退的功能包括:①记忆与认知功能严重下降,不能分辨时间、季节,经常迷路、走失等。②行为精神症状,包括幻觉、被害妄想、易激惹和攻击倾向等。③无法参与公众活动,日常生活能力逐渐丧失,甚至不能自理。AD 病成为老年人群继心脑血管病、恶性肿瘤和中风之后威胁健康的第四大“杀手”,被世界卫生组织定为 21 世纪五大重点疾病之一,成为全球医学界研究的热点^[1~4]。据统计,每 7 秒钟地球上就新增一名老年 AD 病患者,目前 69 岁、85 岁老年发病率分别为 10%、40%,美国患病人数超过 550 万,中国近 660 万,国际阿尔茨海默病协会 (ADI) 最新发布《2009 年阿尔茨海默病全球报告》指出,2010 年全球将超过 3560 万人患痴呆症,比 2005 年美国《柳叶刀》统计全世界 2430 万增长近 10%。随着人口老龄化水平的加剧,这一类患者的数量将激增。研究还表明,AD 病病程一般较长,约为 3~20 年,长期需要药物治疗。由此可见,AD 病的发生给社会、家庭带来沉重的精神压力和经济负担,给老年人群带来极大的痛苦。

目前,全世界医药界对于 AD 病患者的治疗方法有以下几类:①丁酰胆碱酯酶抑制剂;②氢溴酸加兰他敏 (galantamine hydrobromide, Reminyl);③干扰淀粉状蛋白质候选药物;④热休克蛋白 (heat shock protein, HSP);⑤反义分子治疗 AD 病;⑥人类胚胎干细胞途径;⑦其他方法辅助治疗^[5,6]。现代医药研究已证实,乙酰胆碱 (Ach) 与人体的认知功能有关。许多科学家研究已证实,依据胆碱能学说采用胆碱酯酶抑制剂治疗 AD 是较为成功的方法。加兰他敏 (Galantamine) 作为第二代乙酰胆碱酯酶抑制剂,药效表现为易为病人耐受,且不良反

应少,没有肝毒性,其治愈病例临床有效率为70%以上。其作用机理:①提高AD患者脑内乙酰胆碱(Ach)浓度,阻止乙酰胆碱(Ach)的分解,增强乙酰胆碱酶的刺激作用和去极化作用,调节乙酰胆碱(Ach)受体的表达,从而达到改善记忆及认知功能的目的,延缓脑细胞功能减退的进程^[7],同时加兰他敏(Galantamine)可修饰、改变受体结构,起着激活乙酰胆碱(Ach)受体的作用;②调节烟碱的乙酰胆碱(Ach)受体,加大乙酰胆碱(Ach)信号的传递,烟碱受体对神经细胞有保护作用,延缓AD的发生。患者用药后,由心理学家评定的进行性衰退指标PDS、记墙值MQ提高方面明显优于其它药物。洛杉矶加利福尼亚大学的Small博士认为,当前AD的治疗向预防的方向发展,加兰他敏(Galantamine)的优势尤其值得关注,其双重益处能产生更大的影响,在AD高危人群中潜在的公众健康益处是有重大意义的,也会增大其市场。加兰他敏(Galantamine)药效作用获得了世界神经病学学会认可。该药于2000年7月被欧盟批准后在英国、爱尔兰首次上市,2001年获美国FDA许可用于治疗AD,已获准在美国、主要欧洲市场等22个国家上市^[7~12]。

据联合国人口部门发表的报告预测,全世界60岁以上的老人,在2050年将增加近两倍,即由当前的6.06亿增加到20亿。我国60岁以上老年人口比重于2000年已达10%,约1.3亿;预测到2020年将超过16.7%,达2.43亿,年龄结构呈现快速老化的态势。老年用药市场需求潜力很大,统计2007年美国老年用药市场已达800亿美元,其中AD病患者用药占有相当大的市场份额。AD治疗药物市场前景看好,这主要是:①患病人群的数量增多。该类药物的市场销售额一直在稳步增长,1995年世界销售额已达50亿美元,到21世纪初该类药物的销售额有可能超过现在排列在前三位的治疗心血管病药物、治疗胃肠道病药物和抗感染药物市场的份额,达到70亿美元。②药物市场供给不足。从调查的医生信息反馈来看,8.16%的医生认为市场供给严重不足,63.2%的医生认为市场供给不足。③服用治疗药物时间长。该疾病类似于糖尿病需要长期服用治疗药物,因此其用药市场随着人口老龄化增长而逐渐扩大。④加兰他敏(Galantamine)的药效显著而销量快速增长。在治疗老年痴呆症药物主要品种中,1999年加兰他敏(Galantamine)销量排列第12位,但是到2000年其销量剧增550%,并有持续增长的态势。但受石蒜资源供应量限制,全世界每年提取的加兰他敏(Galantamine)仅几百公斤,按每个早老痴呆患者年需药量10~15g计算,每年最多只能有几万个病人得到治疗。相对现有全球AD病病例数量而言,加兰他敏药品需求达到1500kg,国内市场作为治疗脊髓灰质炎引起的瘫痪、重症肌无力年需求加

兰他敏约 200 kg, 而作为 AD 治疗药物, 国内市场年需求量约为 100 kg, 药品缺口量非常巨大, 市场开发空间极大^[13]。近年来, 我国对加兰他敏抗 AD 病这一新用途陆续开展了研究, 并受理、审批相关的生产批准文号。到目前为止, 国内已批准生产加兰他敏原料药、各类制剂生产厂家共计 16 家, 估计还会有不少厂家加盟进来^[13]。

1.2 研究目的和意义

鉴于 AD 病发病特点及其造成的巨大社会负面影响, 科学家将其治疗药物作为世界性难题和焦点而加以深入研究。加兰他敏的独特疗效和蕴含的巨大市场前景亦导致对于其人工合成、萃取和来源植物的研究日益受到各领域研究专家的高度重视^[4, 14-21]。近 10 年来, 各国都在积极寻找加兰他敏的新植物资源, 尤其是第三世界国家。目前, 发现含有加兰他敏的新资源植物主要集中在石蒜科 (Amaryllidaceae), 比如文殊兰属 (*Crinum* L.) 植物; 网球花属 (*Haemanthus* L.) 植物: 网球花 (*H. albiflos*); 水鬼蕉属 (*Hymenocallis* Sausb) 植物: 水鬼蕉 (*H. littoralis* (Jacq.) Sausb); 雪片莲属 (*Leucojum* Vernal) 植物: 夏雪片莲 (*L. aestivum*); 石蒜属 (*Lycoris* L.) 植物: 中国石蒜 (*L. chinensis*), 鹿葱 (*L. squamigera*), 石蒜 (*L. radiata*); 水仙属 (*Narcissus* L.) 植物: 中国水仙 (*N. tazetta*); 还有原产欧洲的胜博斯石蒜和斯特伦勃石蒜等。但因受资源供应量的限制, 全世界每年从植物中提取的加兰他敏仅几百公斤, 按每个早老痴呆患者每年需药量 10 ~ 15 g 计算, 每年最多也只能有几万个病人得到治疗^[4, 16]。相对现有全球 AD 病病例数量而言, 加兰他敏的药品缺口量非常巨大, 市场开发空间极大^[13]。

在我国亚热带广大地域内, 广泛分布着能提取加兰他敏的原植物石蒜, 引起了国内外制药企业的密切关注。但是加兰他敏在野生石蒜中含量仅 0.02 ~ 0.046%, 提纯 1 kg 加兰他敏消耗资源量高达 5 ~ 10 t^[20]。从加兰他敏低含量及消耗的资源量来看, 改正加兰他敏传统生产工艺能耗高、损耗大、周期长等缺点, 应用新的提取方法将是现阶段最大限度提高产量的有效方法。基于这一认识, 有关学者建立新提取技术, 如栾伟建立密闭微波辅助提取—气质联用 (PMAE/GCMS) 和密闭微波辅助提取—反相高效液相色谱联用 (PMAE/HPLC) 分析加兰他敏^[14]; 肖观秀用超临界萃取 (SC-CO₂) 技术在减少工艺步骤、排污量及有机溶剂残留等问题有优越之处^[15]; 范华均建立微波辐射溶剂回流法

(PM IRE) 提取加兰他敏, 并就其动力学模型、动力学机理和热力学机理等方面进行不断的探索^[22-26]; 令狐昱慰经仔细研究、确定加兰他敏最佳提取工艺为 5 倍量 95% 乙醇 85℃ 提取三次, 每次 2 h^[27]; 李霞采用正交实验法对石蒜中加兰他敏和石蒜碱的一步法提取工艺进行摸索, 考察乙醇质量分数、提取温度、固液比例及提取时间对加兰他敏和石蒜碱得率的影响, 结果表明: 在浸提 3 次条件下, 最佳工艺条件为, 75% 乙醇、提取温度 65℃、提取时间 4 h、固体: 液体比例为 1:6 ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), 加兰他敏和石蒜碱的得率分别为 0.04793% 和 0.03643%^[28]。

从资源保护和合理利用角度而言, 高含量石蒜品种选育、扩大优质资源人工培育及提供制药企业生产有利于获得较好质量加兰他敏产品。当前, 国内外学者对石蒜培育研究集中在花卉领域^[29-36], 对于石蒜高含量加兰他敏优质资源选育、无性繁殖和驯化培育等没有形成集成技术规程。石蒜种子为不耐贮藏的顽拗性类型种子, 极易失水导致发芽率极低。在自然生长条件下, 石蒜鳞茎自然分裂繁殖, 母鳞茎年均仅分裂 1~2 个子鳞茎, 繁殖系数相当低。许多学者就石蒜繁殖方法进行研究, 发现运用基底法切割繁殖可以提高繁殖系数, 但存在几个关键问题: ①无性繁殖需要大量人工, 人力成本费用极高; ②无性繁殖时部分鳞茎极易腐烂, 造成资源浪费; ③并未解决在什么生长节律期进行无性繁殖; ④未形成一套完整的配套技术措施; ⑤无性繁殖获得的小鳞茎, 能够作为药用和花卉时间长达 4~5 年。

由此可见, 石蒜引种驯化和人工培育还有许多重要技术问题有待解决。本书着重研究野生石蒜不同居群遗传多样性、驯化繁育关键技术问题, 初次涉及高含量加兰他敏优质资源选育。

1.3 国内外研究现状及评述

1.3.1 国内外研究现状

1.3.1.1 种质资源种类和分布

全世界有 20 多种石蒜属植物。它们主要分布于亚洲的暖温带至亚热带, 主产于中国、日本和韩国, 少数分布于缅甸、朝鲜、尼泊尔和印度尼西亚等地, 中国有 18 种 (含 2 变种)、日本 6 种、朝鲜 2 种、老挝 1 种、缅甸 1 种, 属于中国—日本东亚分布。该属植物半数以上产于我国, 其中有 12 种为我国特有种, 日本次之, 仅特有 1 种血石蒜 (*L. sanguinea*)。目前, 国内石蒜资源基本上处于

野生状态,分布于长江流域至华东、华南、西南、西北地区等 16 个省份。江苏种类最多,约有 13 种,浙江次之,约有 9 种,其余省份一般不超过 2、3 种。江苏、浙江及安徽三省资源量最丰富,共有种类有 13 种,占国内资源种类的 77% 以上。在华东地区的众多种类中,几乎包含所有的花色和性状,也几乎包含能反映种间重要进化关系的花被合生的不同程度种类,还包括 3 种不同季节出叶的类型及鹿葱的生态或物候类型。显而易见,华东地区无疑是该属植物分布的多度中心(分布中心)和多样化中心(演化中心)^[37]。

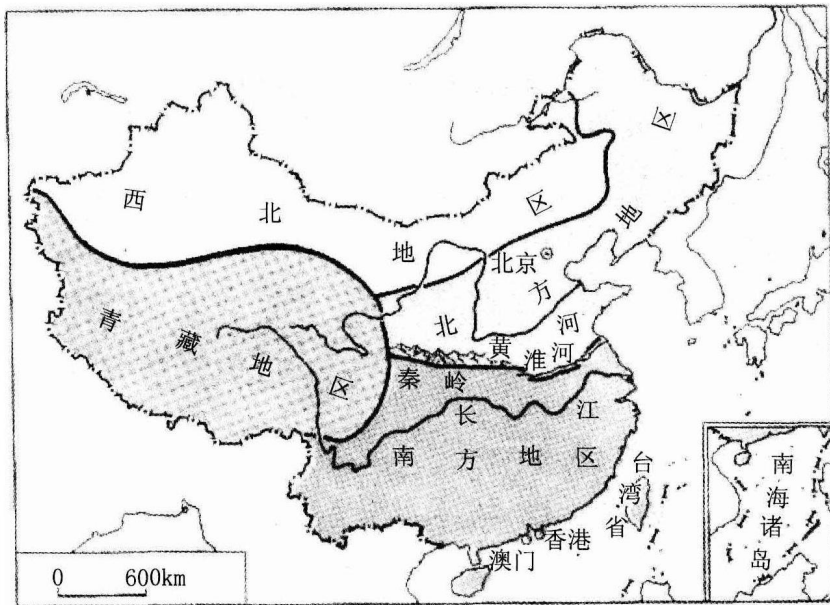


图 1-1 石蒜属种质资源分布图

(注:包括图中的南方地区、苏北及山东等,本图来自网络)

Fig1-1 The distribution map of *Lycori* plants in china (Note: Southern Distric, North Jiangsu and Shandong. The map comes from internet)

石蒜是该属植物垂直分布幅度最广的物种,从我国东部海滨延续到西部海拔 2700 m 的高山均可见,是目前发现分布海拔最高的种类。其次是忽地笑,西南山地海拔 2300 m 处亦可见。分布最北的种类是鹿葱,由于适应冬季寒流的加剧,它从我国华东的浙江、江苏向北分布到山东的青岛,再往北沿日本暖流区一直分布到日本北方。在这一分布的渐进过程中,鹿葱由花后秋季有短暂叶片的物候型(华东),逐渐变成仅有春季叶型的物候型(日本北方),即花后不再出叶就进入冬眠。有冬眠习性的物种占半数,在地域上与冬绿物种交错无明显区域性。分