

黄芩同源四倍体的诱导及细胞形态学观察

李富雄, 张东向, 李善文

(齐齐哈尔大学 生命科学与工程学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

摘要: 在组织培养条件下, 把带有绿色芽点的黄芩(*Scutellaria Baicalensis* Georgi)愈伤组织通过在培养基中添加不同浓度的秋水仙素的培养基上培养的方法, 或经 0.1%、0.2%、0.3% 秋水仙素溶液浸泡一定时间后再进行培养, 均可诱发黄芩多倍体的产生, 前者以 20 mg/L 的秋水仙素浓度诱导效果最好, 诱导率可达 20%, 而后者以 0.2% 秋水仙素溶液浸泡 12 h 效果较好, 诱导率可达 43.3%。

关键词: 黄芩; 同源四倍体; 组织培养; 秋水仙素

中图分类号: S 567.7⁺9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)03-0119-03

黄芩为唇形科黄芩属植物, 其干燥根是我国的传统中药材, 最早收载于《神农本草经》, 被列为草根药的上品, 中医认为黄芩具有清热燥湿、泻火解毒、止血安胎等功效^[1]。其主要成分黄芩甙(baicalin)具有抗菌、抗病毒、抗炎、抗氧化、清除氧自由基、抗癌、抗血栓等作用^[2]。近年来, 黄芩的药用量逐年上升, 有限的野生资源遭到了掠夺性采挖。以前, 黄芩药材生产主要采用种子或无性扦插繁殖, 于百功等采用无性繁殖技术, 取得一定的增产效果^[3], 但是还是满足不了现在市场对于黄芩的需求, 所以应该侧重于应用基础方面面临的问题。该试验利用组织培养技术进行黄芩同源四倍体诱导的研究, 目的在于为进一步选育有效成分含量高、根部药材粗大、产量高的优良品种打下基础, 从而使多倍体所具有的根、茎、叶的“巨大性”在药材生产中得以充分利用。

1 材料和方法

1.1 组织培养材料和方法

黄芩种子购于河北省安国市药材市场。选取饱满的黄芩种子, 用 40 mg/L 赤霉素溶液浸泡 12 h, 打破种子休眠。然后均匀播种于温室育苗盆中。(25±1)℃培养。待苗长到 5~7 cm 时, 选取根为外植体, 参照张东向^[4]的方法将无菌外植体接种于附加 0.2 mg/L 的 2, 4-D 和 2.0 mg/L 的 6-BA MS 培养基中 (25±1)℃暗培养 20 d 后得到淡黄色的愈伤组织, 将此愈伤组织转入附加 2.0 mg/L 的 6-BA 和 0.2 mg/L 的 NAA 的 MS 培养基中, 每天光照 16 h, 光强 1 200 lx, 培养室温度 (25±1)℃, 约 20 d 后愈伤组织表面分化出绿色芽点, 如继续培养可得丛生芽。生根培养基为 1/2MS+0.3 mg/L NAA。

第一作者简介: 李富雄(1982-), 女, 在读硕士, 主要从事黄芩多倍体诱导方面的研究。E-mail: lf_x_0105@sina.com。

收稿日期: 2008-09-17

1.2 人工诱导多倍体的方法

当黄芩愈伤组织表面分化出绿色芽点时, 将带绿色芽点愈伤组织切成直径 0.4 cm 的小块, 分别用 2 种方法进行处理: 将愈伤组织块接种在添加不同浓度秋水仙素的 MS+2.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA 培养基上, 1 个月后将培养物转到不含秋水仙素的上述培养基中, 使其分化成苗, 再进行继代扩大培养并编号建立株系, 之后进行生根培养; 将愈伤组织块用经过高压灭菌的 0.1%、0.2%、0.3% 秋水仙素水溶液分别浸泡 4、8、12、16、20 h, 再用无菌水洗 3 次, 然后接种在 MS+2.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA 培养基上, 使其分化成苗, 再进行继代扩大培养并编号建立株系, 之后进行生根培养。

1.3 细胞遗传学观察

于早晨 8:00~9:00 切取刚萌发的试管苗根 0.5 cm 左右, 在蒸馏水中漂洗干净, 放入 0.1% 秋水仙素溶液中室温下处理 30 min, 取出后用蒸馏水洗 3 次, 再放入卡诺氏液中冰箱固定 3 h, 然后依次用 95% 乙醇、70% 乙醇、蒸馏水各洗 3 次, 用 1 M 盐酸于 60℃下离析 6~7 min, 蒸馏水洗 3 次并在蒸馏水中低渗 20 min。镜检时小心切取根尖, 置载玻片中央, 加事先配好的放置 2 周的卡宝品红染液 1 滴, 30 min 后盖上盖玻片并轻敲轻压至根尖压成一薄层, 用显微镜进行观察并摄影。

1.4 黄芩试管苗的移栽试验

当黄芩试管苗在生根培养基上长到约 2 cm 时, 取掉封口膜在室温下练苗 2~3 d, 用镊子小心取出植株, 在温水中洗去根上的琼脂, 傍晚时将苗栽入以珍珠岩和碳渣(1:3)为基质的苗床中, 始终让其保持湿润, 大约 15 d 后移栽入土壤中。

1.5 黄芩四倍体植株的形态学分析

对经 3 次以上显微鉴定确认时四倍体的植株, 进行扩大繁殖, 对移栽到土壤 2 个月的黄芩试管苗植株进行

气孔和保卫细胞大小、保卫细胞密度、植株高度、茎粗及叶片大小等进行一系列性状进行分析。

2 结果与分析

2.1 黄芩同源四倍体的诱导

结果发现,把带绿色芽点的愈伤组织接种在含秋水仙素的培养基上或经秋水仙素溶液浸泡后再进行培养,组培材料的生长和分化都不同程度受到抑制,而且部分死亡,而且随着浓度的增大,死亡率增大,且随着浸泡时间的延长,死亡的数量就越大,因为浸泡在溶液里愈伤组织处于缺氧的状态,所以死亡的比例就增大,但是存活的材料都能够继续分化成苗。将其存活下来的苗进行继代扩大繁殖,并进行生根培养,用茎尖进行染色体鉴定,鉴定结果见表 1、2。

表 1 培养基中附加秋水仙素对黄芩四倍体诱导的影响

接种愈伤组织数	秋水仙素浓度	存活愈伤组织数	获四倍体数	诱导率 / %
30	0	30	0	0
30	5	30	1	3.3
30	10	28	2	6.7
30	20	24	6	20.0
30	40	18	4	13.3
30	60	11	2	6.7

表 2 秋水仙素溶液浸泡愈伤组织对黄芩四倍体诱导的影响

秋水仙素浓度 / %	接种愈伤组织数 / 个	浸泡时间	存活愈伤组织数	获四倍体数	诱导率 / %
0.1	30	4	30	0	0
0.1	30	8	26	1	3.3
0.1	30	12	22	2	6.7
0.1	30	16	20	2	6.7
0.1	30	20	16	3	10.0
0.2	30	4	26	2	6.7
0.2	30	8	24	6	20.0
0.2	30	12	22	13	43.3
0.2	30	16	19	10	33.3
0.2	30	20	11	7	23.3
0.3	30	4	24	3	10.0
0.3	30	8	19	4	13.3
0.3	30	12	14	4	13.3
0.3	30	16	10	5	16.7
0.3	30	20	7	2	6.7

2.2 黄芩四倍体和二倍体植株比较和倍性鉴定

由表 3 比较四倍体与二倍体叶片的气孔和保卫细胞大小结果表明,诱变的四倍体气孔和保卫细胞比二倍体的明显增大,四倍体气孔的长和宽分别为 18.43 μm 和 9.42 μm ,比二倍体增加 23%和 25%;保卫细胞的长和宽分别是 37.58 μm 和 9.34 μm ,比二倍体增加 49%和 19%。

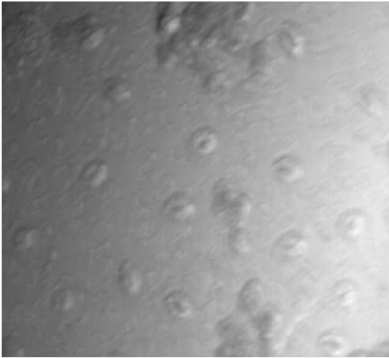


图 1 黄芩二倍体保卫细胞 (× 400) 图 2 黄芩同源四倍体保卫细胞 (× 400) 图 3 黄芩二倍体染色体 2n= 2x= 18(× 1000)

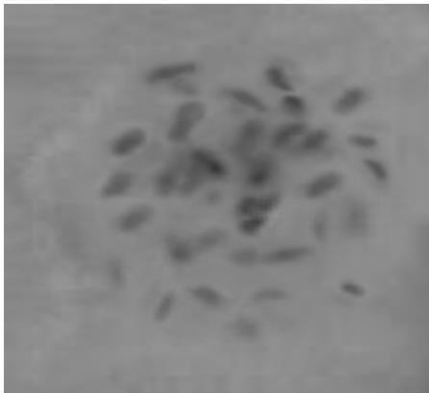


图 4 黄芩四倍体染色体 2n= 4x= 36(× 1000)

表 3 四倍体与二倍体叶片气孔及保卫细胞大小比较

植株倍性	气孔长 / μm	气孔宽 / μm	保卫细胞长度 / μm	保卫细胞宽度 / μm
二倍体	15.06	7.51	25.26	7.87
四倍体	18.43	9.42	37.58	9.34
相对性 %	123.00	125.00	149.00	119.00

表 4 四倍体与二倍体植株性状比较(平均值)

植株倍性	植株高度 / cm	茎粗 / mm	叶片长度 / mm	叶片宽度 / mm
二倍体	11.07	1.05	23.31	6.23
四倍体	13.11	1.40	29.72	8.32
相对性 %	118.00	133.00	128.00	134.00

由表 4 可知,四倍体植株叶片平均长和宽分别为 29.72 μm 和 8.32 μm ,比二倍体增加 28%和 34%;四倍体植株平均高度 13.11 μm ,比二倍体增加 18%,四倍体

平均茎粗 $1.40 \mu\text{m}$, 比二倍体增加 33%。

而且 40 倍镜下 (42 mm^2) 一个视眼范围气孔个数二倍体平均为 29.50, 四倍体平均为 10.64, 变化很明显, 见图 1、2; 四倍体植株的叶片明显比二倍体植株增厚, 叶面变粗糙, 且叶片变紫; 四倍体植株的根部比二倍体明显增粗。黄芩四倍体植株的这些特性明显的显示出了多倍体植株的巨大型的特征。经过 3 遍的染色体鉴定确认为四倍体, 见图 3、4。

3 讨论

3.1 组织培养技术诱导黄芩同源四倍体诱导的优越性

该试验植物组织培养技术进行黄芩同源四倍体的诱导与常规植株或种子诱变方法相比, 具有明显的优越性。首先, 在组织培养条件下, 可以反复大批量地在培养瓶中处理黄芩愈伤组织诱导而来的丛生芽, 从而大大提高了诱导成功率, 这在植株上或种子处理中是难以做到的; 其次, 在组培条件下, 诱导条件容易控制, 可以大大缩短诱导时间; 另外, 组织培养条件下诱变后的黄芩同源四倍体植株, 用试管苗进行根尖染色体鉴定比在田间诱变后挖取根部逐株鉴定简便得多, 可以在短期内快速鉴定大批量株系, 从而筛选出多倍体。筛选出的多倍体可以立即应用组织培养技术在短期内迅速繁殖出大量的试管苗, 以进行田间鉴定、生产试验和示范推广, 而且繁殖出来的种苗纯度高、质量好, 没有病虫害, 这对提高植物的产量和质量十分有利; 而且, 该试验较为系统的研究了 2 种方法分别在不同的秋水仙素浓度下的诱导率, 从而得出了 2 种方法的最佳处理浓度。

3.2 多倍体在药用植物育种中的特殊地位

药用植物是一类具有特殊用途的经济植物。在我国, 药用植物经过几千年的应用和发展, 已经形成了具有悠久历史的传统中医药。在国内, 应用组织培养技术

已对宁夏枸杞 (*Lycium barbarum* L.)^[5]、杜仲 (*Eucommia ulmoides* Oliv.)^[6]、党参 [*Codonopsis pilosula* (Franch.) Nann.]^[7]、丹参 (*Salvia miltiorrhiza* Bunge)^[8]、铁皮石斛 (*Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl.)^[9] 等药用植物进行了多倍体育种, 取得较好效果。多倍体植株由于染色体的加倍, 器官常表现出“巨大性”, 即根、茎、叶等营养器官明显增大, 而药用植物多是以根、茎、叶入药, 所以多倍体诱导可更大幅度的提高药材的产量; 另外, 药用植物由于染色体的倍数增加, 也使得染色体上基因调控有效化学成分含量较正常二倍体也增高, 使得次生代谢产物含量也明显的增加, 从而进一步提高了药用植物的质量。目前生态环境遭到严重的破坏, 野生药用植物资源数量急剧减少, 为了更好的解决这一矛盾, 开展药用植物的多倍体诱导是非常重要的。

参考文献

- [1] 南京药学院, 江苏生物研究所. 中国医学科学院药物研究中药志 (第一册) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1959: 546.
- [2] 许文杰, 丁启龙. 黄芩素的药理学研究进展 [J]. 江苏药学与临床研究, 2006, 15(2): 25-39.
- [3] 于百功, 李统育, 李训东. 黄芩无性繁殖的大田管理及有效成分 [J]. 中药材, 1995, 18(4): 167-168.
- [4] 张东向. 培养条件对齿瓣延胡索愈伤组织生长及延胡索乙素含量的影响 [J]. 植物研究, 2003, 23(1): 86-90.
- [5] 秦金山, 王莉, 牛德水, 等. 枸杞同源四倍体新物种类型的建立 [J]. 遗传学报, 1985, 12(3): 200-203.
- [6] 毕春侠, 张存旭, 郭军战, 等. 杜仲多倍体的诱导 [J]. 河北林果研究, 1999(2): 148-150.
- [7] 陈素萍, 王莉, 宋秀清. 党参多倍体育种的研究 [J]. 中草药, 1991, 22(5): 224-227.
- [8] 高山林, 徐德然, 蔡朝晖, 等. 丹参同源四倍体新物种的培育 [J]. 中国药科大学学报, 1992, 23(4): 224-228.
- [9] 廖苏梅. 铁皮石斛多倍体诱导及鉴定 [D]. 浙江大学硕士学位论文, 2002.

The Inducing of Autotetraploid of *Scutellaria baicalensis* Georgi

LI Fu-xiong, ZHANG Dong-xiang, LI Shan-wen

(College of Life Science and Technology, Qiqihar University, Qiqihar, Heilongjiang 161006 China)

Abstract: In tissue culture conditions, autotetraploid of *S. baicalensis* Georgi can be induced by adding colchicine in medium, or by immersing the callus of *S. baicalensis* Georgi in 0.1%, 0.2%, 0.3% colchicine solution for a period of time prior to culture. The former was that 20 mg/L concentration of colchicine induced by the best, with an inducing ratio of 20%. And the latter was that 0.2% colchicine solution soaking 12 h was better-performing, with an inducing ratio of 43.3%.

Key words: *Scutellaria baicalensis* Georgi; Autotetraploid; Tissue culture; Colchicin