

· 药材与资源 ·

黄芩组织培养快速繁殖技术的优化

高山林, 陈柏君*

(中国药科大学 遗传育种教研室, 江苏 南京 210038)

摘要:目的 建立和优化黄芩组织培养克隆化快速繁殖技术, 为保护黄芩的野生资源, 发展人工资源和探讨育种新途径奠定基础。方法 在组织培养条件下进行黄芩愈伤组织的诱导、分化, 试管苗复壮和生根等一系列技术优化试验。结果 黄芩试管苗的节、节间都很容易诱导出愈伤组织, 诱导率均达 100%, 而叶片的愈伤组织诱导率低, PP₃₃₃对黄芩试管苗的生长有着显著的矮壮作用。结论 黄芩试管苗的节是诱导愈伤组织的理想外植体, 在培养基中适当添加 PP₃₃₃能显著改善试管苗的素质; PP₃₃₃与激素的配合使用, 能十分有效地调控黄芩愈伤组织的分化、试管苗的生长与生根, 并能显著提高移栽成活率。

关键词: 黄芩; 组织培养; 快速繁殖

中图分类号: R 282. 21

文献标识码: A

文章编号: 0253 - 2670(2004)03 - 0312 - 04

Optimization on cloning rapid-propagation technology
by tissue culture in *Scutellaria baicalensis*

GAO Shan-lin, CHEN Bai-jun

(Department of Genetics and Breeding, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China)

Abstract: **Object** To establish and optimize the technology of cloning rapid propagation by tissue culture in *Scutellaria baicalensis* Georgi for the protection and development of nature resource as well as seeking for new breeding way of *S. baicalensis* by biotechnology. **Methods** Research on the optimized technology of tissue culture including callus inducing, differentiation, plantlet propagation, and rooting were designed. **Results** Callus could be induced from nodes and internodes easily with 100% inducing rate compared with that from leaves. PP₃₃₃ has significant stocky effect to the plantlets. **Conclusion** The nodes are good explant source in inducing callus. PP₃₃₃ in certain concentration which is added to culture media could improve and regulate the differentiation of callus and growth of plantlets as well as increase the survival rate of cultivated seeding.

Key words: *Scutellaria baicalensis* Georgi; tissue culture; rapid-propagation

黄芩为唇形科植物 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根, 具有清热、燥湿、解毒、止血之功效; 用于治疗发热烦渴、肺热咳嗽、泻痢热淋、湿热黄疸、胎动不安、痈肿疮毒等症。黄芩的临床疗效确切, 为常用中药之一。近年来, 临床上对黄芩药材的需求量大增, 黄芩野生资源破坏严重, 因此, 不少学者呼吁对黄芩的资源进行保护和培育的研究, 黄芩组织培养是解决黄芩资源短缺的有效途径之一。有关研究目前已有一些报道: 日本山本久之等^[1]将黄芩茎切成 5 mm 长的节断接种于 LS 培养基中, 得到了淡褐色的愈伤组织; 秦金山等^[2]用黄芩种子发芽的子叶和下胚轴为外植体, 接种在 MS 培养基上, 经培养

可得到愈伤组织, 继续培养, 即可从愈伤组织直接分化出苗, 但分化率较低, 仅为 12%。黄芩试管苗生根率最高为 41.7%, 而且苗生根少而细弱, 或较短, 且生长缓慢。由此可见黄芩组织培养虽然能够成功, 但是要达到黄芩试管苗克隆化, 规模化生产, 在技术上有较大的难度。为此, 在承担国家中医药局重点科研项目——黄芩组织培养多倍体育种技术研究中, 把黄芩的组织培养技术的优化和大量快速繁殖作为重点需要解决的难点, 进行了一系列培养基试验, 获得了较好的结果。现报道有关的试验结果, 本研究对于保护黄芩的野生植物资源, 培育黄芩优良品种并进行克隆化快速繁育, 在尽量短的时间内繁育出优良

* 收稿日期: 2003-10-08

基金项目: 国家中医药局重点科研项目 (97A 302)

作者简介: 高山林 (1946—), 男, 江苏省江阴市人, 硕士, 1967 年毕业于南京农业大学遗传育种专业, 现任中国药科大学教授, 长期从事药用植物生物技术研究。

品种种苗,供生产上示范推广具有重要意义和应用价值。

1 材料和方法

1.1 材料:黄芩种子由我国黄芩道地产区——河北省承德地区药材公司提供,经中国药科大学药学博士余伯阳教授鉴定为 *Scutellaria baicalensis* Georgi。

1.2 方法

1.2.1 黄芩无菌试管苗的获得:取黄芩种子用自来水漂洗干净后放入 75% 乙醇中消毒 1 min,转入 0.1% 氯化汞溶液中消毒 10 min,然后用无菌水冲洗 5 次,接种在 MS 基本培养基上无菌萌发,15 d 后获得无菌苗,在附加 6-BA 0.2 mg/L 的 MS 培养基上不断继代保存。

1.2.2 黄芩愈伤组织的诱导:取黄芩试管苗 0.5 cm 左右的节、节间和切成 0.5 cm 见方的叶片分别接种于 MS+6-BA 2.0 mg/L+IAA 0.2 mg/L 及 MS+6-BA 1.0 mg/L+IAA 0.2 mg/L 两种培养基中,其中含蔗糖 3%,pH 5.8,培养条件为 (25±1) °C,暗培养。

1.2.3 黄芩愈伤组织分化试验:把在 MS+6-BA 2.0 mg/L+IAA 0.2 mg/L 培养基中继代保存的黄芩愈伤组织切成 0.3 cm 见方的小块,分别接种到附加不同浓度 6-BA 及 IAA 的 MS 培养基中,其中含蔗糖 3%,pH 5.8。培养条件:每天光照 16 h,光强 1 200 lx,培养温度 (25±1) °C。

1.2.4 黄芩试管苗的复壮实验:将在 MS+6-BA 0.1 mg/L 培养基中继代保存的黄芩试管苗切成带一个节的小段,接种于附加一系列浓度的多效唑 Paclobutrazol (PP₃₃₃), 6-BA 0.1 mg/L,蔗糖 5%,pH 5.8 的 MS 培养基中,培养条件同上。

1.2.5 黄芩试管苗生根试验:将黄芩试管苗切成带 1~2 个节的小段,分别接种于附加 PP₃₃₃ 0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L 的 1/2 MS+NAA 0.1 mg/L 培养基上,培养条件同上。

2 结果与分析

2.1 黄芩愈伤组织的诱导:黄芩试管苗的节和节间接种到培养基上,几天后,在一部分节的叶腋处便长出腋芽,节和节间开始膨大,约 10 d 后,节和节间的两端和一部分节的叶腋处可见肉色的愈伤组织,以后愈伤组织逐渐增大。叶片接种到培养基上后,逐渐皱缩、变厚,随着培养时间的延长,大部分叶片颜色发褐而枯死,只有小部分从叶缘切口长出愈伤组织,而且生长很缓慢。结果见表 1。

从表中结果可以看出,黄芩试管苗的节、节间都

表 1 不同外植体接种于两种培养基中诱导愈伤组织的结果
Table 1 Results of callus induced from different explants inoculated on two kinds of MS media

外植体	激素 /(mg·L ⁻¹)		接种数	出现愈 伤组织 时间/d	30 d 后 愈伤组 织数	形成率 /%	生长 状况
	6-BA	IAA					
节	2.0	0.2	60	8	60	100	快
	1.0	0.2	60	10	60	100	快
节间	2.0	0.2	60	10	60	100	慢
	1.0	0.2	60	14	60	100	慢
叶	2.0	0.2	60	17	23	38.3	最慢
	1.0	0.2	60	20	16	26.7	最慢

很容易诱导出愈伤组织,诱导率均达 100%,其中以节间产生愈伤组织的速度最快,而叶片的愈伤组织诱导率很低,并需要较长的诱导时间;3 种不同外植体在 MS+6-BA 2.0 mg/L+IAA 0.2 mg/L 培养基中产生愈伤组织所需时间均比在 MS+6-BA 1.0 mg/L+IAA 0.2 mg/L 培养基中的短,表明较高的 6-BA 水平有利于黄芩愈伤组织的形成。在节的叶腋处形成的愈伤组织生长速度最快,节间次之,叶最慢。

2.2 黄芩愈伤组织的分化:将暗培养中的黄芩愈伤组织转入分化培养基后,4~5 d 愈伤组织开始转绿,然后表面出现绿色的芽点,继续培养便陆续形成小植株。结果见图 1 和表 2。

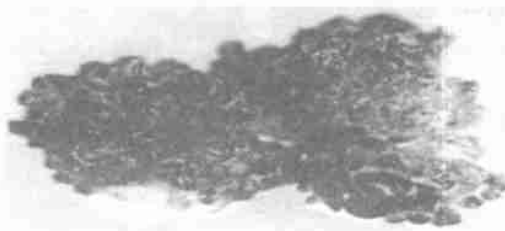


图 1 用黄芩节间部分诱导获得的愈伤组织在培养基上分化出大量丛生芽

Fig. 1 Callus induced from internodes forms a lot of buds on media

表 2 6-BA, IAA 及 PP₃₃₃ 的不同配比对黄芩愈伤组织分化的影响

Table 2 Effects of different combinations of 6-BA, IAA, and PP₃₃₃ on callus differentiation

组别	激素 /(mg·L ⁻¹)			接种数	成芽时间 /d	得苗率 /%	植株 性状
	6-BA	IAA	PP ₃₃₃				
1	0	0	0	80	12	100	细弱
2	0.1	0	0	80	12	100	细弱
3	0.1	0.1	0	80	12	100	细弱
4	0.1	0	0.5	80	19	91.3	粗壮
5	0.5	0	0	80	16	72.5	细弱
6	0.5	0.2	0	80	18	66.3	细弱
7	0.5	0	0.5	80	23	61.7	粗壮

表 2 的结果表明,黄芩愈伤组织有着强烈的分

化能力, 在不合任何激素或只含低水平细胞分裂素的培养基中能很快分化形成丛生苗, 分化率达 100%, 而当细胞分裂素水平提高时, 其分化率反而明显下降, 这可能是因为黄芩愈伤组织中内源激素水平较高, 添加较高浓度的外源激素加快了细胞的分裂速度, 反而不利于细胞的分化。从试验的 7 种培养基效果看, 6-BA 0.1 mg/mL + PP₃₃₃ 0.5 mg/L 的培养基上, 分化出的丛生芽多, 愈伤组织的分化率接近 100%, 同时试管苗也比较粗壮。同时凡是添加了植物生长延缓剂 PP₃₃₃ 0.5 mg/L 的培养基上(4 和 7 号培养基)长出来的试管苗均较粗壮, 叶色绿, 株形紧凑。结果预示: PP₃₃₃ 对于壮苗有较好的效果。为此进一步进行一系列 PP₃₃₃ 添加试验。

2.3 黄芩试管苗单节培养扩大繁殖和添加 PP₃₃₃ 的复壮试验: 根据黄芩试管苗比较高, 节又比较多的特点, 为了尽可能地扩大黄芩繁殖系数, 同时尽量减小黄芩试管苗在扩大繁殖过程中发生变异的可能性, 在已经建立的愈伤组织培养产生丛生芽的基础上, 又进一步探讨建立了单节培养 (Single-node culture)^[3] 的方法进行黄芩试管苗的继代及扩大繁殖试验, 将从丛生芽诱导获得的黄芩试管苗(一般 5 个节, 较细长)按每个节切成段, 接种在繁殖培养基上, 10~15 d 后, 节上的侧芽启动并发育成新植株, 这一繁殖方法的成功, 使黄芩的繁殖系数在原来的基础上又提高了 5 倍。另一方面, 由于黄芩试管苗生长很快, 特别是节间的伸长生长很快, 致使试管苗较细弱, 而且叶绿素合成不足, 叶片呈黄绿色, 而在前述黄芩愈伤组织的分化试验中, 当在培养基中添加了生长延缓剂 PP₃₃₃ 后, 可明显改善成苗的质量。为此, 在进行继代繁殖和单节繁殖时我们仍添加 PP₃₃₃, 并对其合适的浓度进行了试验, 以期进一步复壮黄芩试管苗。结果见表 3。

表 3 不同浓度 PP₃₃₃ 对黄芩试管苗生长的影响

Table 3 Effects of different concentrations of PP₃₃₃ on growth of plantlets

组别	PP ₃₃₃ 浓度 (mg · L ⁻¹)	节间长度 /mm	茎直径 /mm	叶片特征
1	0	16.9	0.70	小且浅绿
2	0.1	14.7	0.77	小且浅绿
3	0.5	11.0	0.86	大且绿
4	1.0	7.6	0.91	大且绿
5	2.0	4.0	0.96	巨大且深绿
6	5.0	2.1	1.03	巨大且深绿

节间长度和茎直径均是随机取苗 30 棵测量的平均值

Length of internodes and diameters of stem were average of 30 random samples

表中结果表明, PP₃₃₃ 对黄芩试管苗的生长有着显著的矮壮作用, 随着添加浓度的增大, 其矮壮作用更加明显, 试管苗的节间明显缩短, 茎明显增粗, 植株由浅绿色转变成深绿色。当 PP₃₃₃ 的浓度增加到 2.0 和 5.0 mg/L 时, 会使试管苗过分矮化, 而不利于进行扩大繁殖和生根移栽, 因此, PP₃₃₃ 合适的添加浓度为 0.5~1.0 mg/L。我们通过单节培养的方法结合应用 PP₃₃₃ 进行黄芩试管苗的继代扩大繁殖, 取得良好的效果。这种促进侧枝增殖的方法是建立在愈伤组织培养大量增殖芽的基础上的, 因此每经一个流程, 嫩枝就以指数扩增, 能完全满足快速繁殖的目的。另一方面, 由于茎尖组织在培养条件下容易发生基因型的改变。我们在实验过程中也注意到, 用单节培养的方法在繁殖过程中极少出现试管苗的变异现象, 这对于保持各株系的遗传稳定性具有重要的意义。

2.4 黄芩试管苗的生根试验结果: PP₃₃₃ 对黄芩试管苗生根的影响, 在以上黄芩试管苗的繁殖试验中, 应用生长延缓剂 PP₃₃₃ 收到良好的效果。另据文献报道^[4,5], PP₃₃₃ 还能促进试管苗的生根及提高试管苗的移栽成活率, 为此, 考察了不同浓度 PP₃₃₃ 对黄芩试管苗生根的影响。结果见表 4。

表 4 不同浓度 PP₃₃₃ 对黄芩试管苗生根的影响

Table 4 Effects of different concentrations of PP₃₃₃ on rooting ratios

组别	PP ₃₃₃ 浓度 (mg · L ⁻¹)	接种数	生根率 /%	每苗平均根数	平均根长/mm	平均苗高/mm
1	0	80	81.2	1.7	44.3	82.5
2	0.1	80	84.3	5.3	25.1	68.7
3	0.5	80	86.7	6.7	18.4	43.6
4	1.0	80	78.4	9.1	15.1	28.3
5	2.0	80	61.4	4.7	7.2	18.6

每苗根数、根长度及苗高度是随机取苗 20 棵测量的平均值

Root number, length, and plant height were average of 20 random samples

表 4 结果可以看出, 黄芩试管苗可以在不附加任何激素的 1/2MS 培养基上自发生根, 生根率可达 80% 以上, 但根的数量较少, 且苗细弱, 显然不利于试管苗的移栽。添加 PP₃₃₃ 对生根率有一定提高, 并且一方面增加根的数量, 另一方面使苗矮壮, 但当其浓度超过 1.0 mg/L 时, 反而会抑制生根, 而且苗的过度矮化也不利于移栽。所以, 认为在生根培养基中添加 0.5 mg/L 左右 PP₃₃₃ 较为合适。初步移栽试验也表明, 在添加 PP₃₃₃ 的生根培养基中生长的试管苗, 其移栽成活率明显高于对照组。结合前几项试验结果可以发现, PP₃₃₃ 在黄芩的组织培养中发挥了十

分重要的作用,是完善黄芩离体培养激素调控系统的一种有效的调节剂。

3 讨论

3.1 本研究为应用生物新技术培育黄芩优良品种奠定了基础,同时为培育成功的黄芩优良品种今后在生产上的克隆化快速繁殖和示范推广提供了有效的技术手段。通过对黄芩愈伤组织的诱导、分化,黄芩试管苗的继代扩大繁殖、生根等一系列优化试验,有效地解决了黄芩试管苗大规模克隆化生产的技术难点。在本研究建立的优化了的组织培养克隆技术条件下:(1)黄芩试管苗的节和节间可以大量诱导出愈伤组织,并且愈伤组织保持着较强的再分化能力,能在较短的时间里从愈伤组织再生出苗;(2)在试管苗繁殖中,应用单节培养的方法可以较大幅度地提高黄芩繁殖速度,真正达到大量克隆化生产水平;(3)黄芩试管苗生长培养基中适当添加植物生长延缓剂 PP₃₃₃能显著改善试管苗的素质,可明显提高生根率,改善根的质量和苗的性状,提高移栽成活率,在今后生产上可以有效地应用。

3.2 本实验报道了普通植物生长延缓剂 PP₃₃₃在黄芩组织培养中的重要作用。PP₃₃₃是目前广泛应用于农业和园艺的植物生长调节剂之一,具有明显的增

产效应。其作用机制与 GA₃(赤霉素)有关,通过抑制植株体内贝壳杉烯氧化酶的活力,阻碍 GA₃的生物合成,因而使植株明显矮化^[6]。我们在黄芩的组织培养过程中,应用 PP₃₃₃取得了很好的效果,其与外源性激素的配合使用,能十分有效地调控黄芩试管苗的生长与生根,并能显著提高移栽成活率,因此进一步拓宽了 PP₃₃₃在组织培养中的应用价值。对其他经济作物的组织培养具有一定的参考意义。

References:

- [1] Hisaka Y, Nobuyasu C, Kume W, et al. Effect of carbon sources on the growth and flavonoid formation of *Scutellaria baicalensis* stem callus cultures [J]. *J Pharm acol* (生药学杂志), 1986, 40(1): 19.
- [2] Qin J S, Wang L, Chen S P. Preliminary studies on organogenesis in *Scutellaria baicalensis* [J]. *Plant Physiol* (植物生理学通讯), 1985(6): 38.
- [3] Pierik R L M. *In Vitro Culture of Higher Plant* [M]. Netherlands: Martinus Nijhoff Publishers, 1987.
- [4] Su C J. Effect of paclobutrazol on growth of *Gypsophila elegans* in vitro [J]. *J Nanjing Agric Univ* (南京农业大学学报), 1996, 19(2): 112.
- [5] Shi S E, Ma B K. Application of PP₃₃₃ in rooting and transferring of apple plantlets [J]. *J Hebei Agric Univ* (河北农业大学学报), 1993, 16(3): 76.
- [6] Wang Z X, Duan M Y. Effect of PP₃₃₃ on regeneration of the plantlet of banana [J]. *Plant Physiol* (植物生理学通讯), 1994, 30(5): 346.

山银花茎、叶、花中绿原酸分布规律研究

耿世磊^{1,2}, 徐鸿华², 赵 晟¹, 姚飞平¹, 卢章会^{1*}

(1. 华南农业大学生命科学学院, 广东 广州 510642; 2. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510405)

摘要:目的 揭示山银花茎、叶及花中绿原酸的分布状况,为确定金银花药材合理的药用部位及良种选育特征提供依据。方法 利用荧光显微镜观察山银花茎、叶及花中有效成分绿原酸的分布规律。结果 绿原酸在花中主要分布于萼筒-子房壁外表皮细胞及其下3~5层细胞,花冠外表皮细胞及其下1~2层细胞和花冠内表皮纤毛细胞;在叶片中主要分布于上表皮细胞和下表皮纤毛细胞;在茎中仅零星分布于次生韧皮部细胞。结论 花中绿原酸分布最为广泛,含量最丰富,叶片次之,茎中最少;花冠内表皮纤毛和花冠外表皮腺毛的密集程度,以及萼筒和花冠的长度可作为山银花的育种特征。

关键词: 绿原酸; 分布; 山银花; 茎; 叶; 花

中图分类号: R 282.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)03-0315-04

Distribution of chlorogenic acid in branch, blade, and flower of *Lonicera confusa*

GENG Shi-lei^{1,2}, XU Hong-hua², ZHAO Sheng¹, YAO Fei-ping¹, LU Zhang-hui¹

(1. College of Life Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. College of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

Abstract: Object To show the distribution of chlorogenic acid in branch, blade, and flower of

* 收稿日期: 2003-07-09

基金项目: 国家科技部重大专项(2001BA701A-23-03); 广东省科技攻关项目(2KB01201S); 华南农业大学校长基金项目(4600-K03156)

作者简介: 耿世磊(1965—), 男, 华南农业大学生命科学学院副教授, 现于广州中医药大学在职攻读中药学博士学位, 主要从事中药资源开发与利用方向的研究和教学工作。Tel: (020)85280193