

果顶端的羽状冠毛对发芽有很大影响,去除羽状冠毛的缬草种子可以正常发芽,而未去除的发芽率极低,甚至不发芽。缬草种子是否存在休眠或者说是否羽状冠毛与种子的休眠状态的解除有一定关系,尚值得进一步研究。

缬草的繁殖可以用种子,也可以用根茎移栽,采用根茎存活率高,但繁殖系数低,在大规模栽培中不适用,仍以种子繁殖为主。为了提高种子的发芽率,提高繁殖效率,建议采用优质的野生缬草亲本经驯化栽培2~3年后,收获缬草种子,可以当年秋季播种,最迟至次年春季播种,在常温条件下,保存时间不宜超过1

年。如需较长时间保存,则宜于冰箱低温保存。

致谢:北京植物园刘永刚研究员、北京大学陈虎彪教授、武汉植物园王有为研究员、沈阳植物园王文元老师、捷克布拉格植物园 Pavel Sekerka 博士惠赠缬草种子及给予的指导帮助。

References:

- [1] Zhang Z X, Yao X S. The development and research advances in bioactivity for the medicinal plant *Valeriana officinalis* [J]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2000, 17(3): 222-225.
- [2] Shao Y D, Gao W Y, Liu D, et al. Quality control of plant extract [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2003, 28(10): 899-903.

盾叶薯蓣四倍体诱导的研究

李运合¹, 胡春根², 姚家玲^{1*}, 张友德¹

(1. 华中农业大学生命科学技术学院, 湖北 武汉 430070; 2. 华中农业大学园艺林学学院, 湖北 武汉 430070)

摘要:目的 选育盾叶薯蓣 *Dioscorea zingiberensis* 新种质资源, 以期为高产、高皂苷元含量薯蓣育种打下基础。方法 以刚露出绿色芽点的盾叶薯蓣愈伤组织块为材料, 采用两种方法处理: ①愈伤组织块浸泡到秋水仙素水溶液中。②培养基中添加秋水仙素。结果 成功获得了染色体数加倍的薯蓣新材料, 其中以 1×10^3 mg/L 秋水仙素水溶液浸泡 24 h 效果最好, 诱导率达到 35.2%, 四倍体植株与二倍体亲本相比, 二者在外观形态、生理指标、显微结构上有明显区别。结论 四倍体植株体型大、具生长优势, 离体条件下利用愈伤组织块诱导多倍体是盾叶薯蓣倍性育种的一条有效途径。

关键词: 盾叶薯蓣; 秋水仙素; 四倍体

中图分类号: R282.21

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)03-0434-05

Inducement of tetraploid *Dioscorea zingiberensis*

LI Yun-he¹, HU Chun-gen², YAO Jia-ling¹, ZHANG You-de¹

(1. College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 2. College of Horticulture and Forestry Sciences, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Objective To create new tetraploid resource of *Dioscorea zingiberensis* in the hope of potential breeding materials with high yield and high level of diosgenin. **Methods** Callus with tiny green buds were directly soaked in colchicine solution or cultured in medium plus with colchicine to prohibit the isolation of chromosomes and induce tetraploid mutants. **Results** Tetraploids were achieved successfully. The most efficient treatment for inducing tetraploid was soaking the tiny buds in 1×10^3 mg/L colchicine solution for 24 h, the inducing rate could be up to 35.2%. The induced tetraploids exhibited notable difference with common wild type (diploids) in morphology, physiology, and microscopic structure. **Conclusion** The tetraploid plants show the advantages of gigantic size and vigorous growth. Thus, the established technique system to induce tetraploid from tissue cultured callus would provide an efficient alternative pathway for medicinal plants of *Dioscorea* L. breeding.

Key words: *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright; colchicine; tetraploid

收稿日期: 2004-05-12

作者简介: 李运合(1977—), 男, 河南新乡人, 现中山大学生命科学学院 2003 级博士生, 研究方向为植物发育及分子生物学。

* 通讯作者 Tel: (027)87286292 E-mail: yaojlm@mail.hzau.edu.cn

盾叶薯蓣 *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright, 俗称黄姜、火头根等,是薯蓣科薯蓣属 (*Dioscorea* L.)植物,为我国特有种。其根状茎是提取薯蓣皂苷元(diosgenin)的主要原料。薯蓣皂苷元是合成肾上腺皮质激素、性激素和蛋白同化激素等 3 大类甾体激素药物的重要原料。人工合成甾体激素药物的路线长,收率不高^[1]。目前,工业上主要是从盾叶薯蓣中提取薯蓣皂苷元,通过半合成生产这类药物。但目前盾叶薯蓣野生资源濒临枯竭,种质衰退极其严重,皂苷元含量急剧下降,过去最高达 16.15%,而现在下降到 1%~1.5%,甚至更低^[2]。对于药用植物来说,可以利用其多倍体的巨大性提高它的产量,旺盛的新陈代谢能力来提高有效成分^[3]。因此,利用秋水仙素对盾叶薯蓣进行了四倍体诱导处理,以期获得盾叶薯蓣四倍体植株,为进一步选育新品种提供物质基础。

表 1 不同处理方式、秋水仙素浓度及处理时间诱导盾叶薯蓣染色体加倍的结果

Table 1 Inducement of *D. zingiberensis* chromosome doubled by two ways with various colchicine concentration treatments at different times

编号	质量浓度/(mg·mL ⁻¹)	处理方式	处理时间	处理块数	萌发块数	死亡率/%	成苗数/株	四倍体数/株	四倍体诱导率/%
1	1	加入培养基中	28 d	25	25	0	180	0	0
2	2	加入培养基中	28 d	23	23	0	162	0	0
3	5	加入培养基中	28 d	30	28	1.5	156	0	0
4	10	加入培养基中	28 d	29	27	6.9	141	0	0
CK1	0	未加秋水仙素	28 d	19	19	0	86	0	0
5	0.5×10 ³	浸泡	24 h	22	22	0	110	3	2.7
6	1×10 ³	浸泡	24 h	27	20	25.9	105	37	35.2
7	2×10 ³	浸泡	24 h	18	8	55.6	55	15	27.3
8	4×10 ³	浸泡	24 h	23	4	82.6	32	8	25
CK2	0	无菌水浸泡	24 h	23	23	0	120	0	0
9	0.5×10 ³	浸泡	48 h	25	18	28	89	4	4.5
10	1×10 ³	浸泡	48 h	20	8	60	78	29	37.2
11	2×10 ³	浸泡	48 h	22	3	86.4	14	4	28.6
12	4×10 ³	浸泡	48 h	21	0	100	0	0	0
CK3	0	无菌水浸泡	48 h	29	26	10.3	123	0	0

1.2.2 倍性鉴定:盾叶薯蓣四倍体的鉴定采用流式细胞仪检测及常规染色体压片计数相结合的方法。流式细胞仪检测:流式细胞仪为德国 Partec 公司产品,参照张俊娥^[4]测定方法。分别测定对照和诱导材料幼嫩叶片细胞核中的 DNA 含量。根尖染色体计数:参照黄涛^[5]的方法。

1.2.3 形态结构及生理指标的比较:比较盾叶薯蓣四倍体植株与二倍体植株的株高、叶长、叶宽、叶绿素含量,保卫细胞内叶绿体的数目及过氧化物酶(POD)活性。

2 结果与分析

2.1 四倍体材料的诱导

2.1.1 两种不同处理方法诱变效果的比较:从表 1 可以看出,在培养基中直接添加秋水仙素来诱导四

1 材料与方法

1.1 材料:用于诱导盾叶薯蓣四倍体的材料“99025”取自华中农业大学农场实验地(引自陕西石泉)。

1.2 方法

1.2.1 盾叶薯蓣四倍体的诱导:采用本实验室建立的盾叶薯蓣再生体系,诱导出愈伤组织块。待其分化出绿色芽点后,用两种方法处理(表 1)。(1)将愈伤组织块接种在添加不同浓度秋水仙素增殖培养基上培养 4 周,然后将培养物转移到不含秋水仙素的壮苗培养基中壮苗 4 周,转入生根培养基中生根;(2)将愈伤组织块浸泡于抽滤灭菌的不同浓度秋水仙素水溶液中,在转速为 60~70 r/min 的摇床中黑暗处理不同时间,处理温度为 24℃。用无菌水冲洗 3 次,进行增殖培养 4 周,然后将培养物转移到不含秋水仙素壮苗培养基中壮苗 4 周,转入生根培养基中生根。

倍体盾叶薯蓣是不合适的。1~4 号处理的盾叶薯蓣,外观形态上没有发现明显变异的植株。虽然在第 2 号组合中发现其叶片较少且细长,但流式细胞仪检测了 10 个植株,常规根尖压片检测了 20 个植株,结果表明没有四倍体植株产生。1、3、4 号每个处理都取 20 个植株进行常规根尖压片,未发现有四倍体,所以,1~4 号处理的多倍体诱导率为 0%。

秋水仙素水溶液浸泡处理对盾叶薯蓣四倍体诱导是有效的。在 5~12 号处理中,12 号处理全部死亡,没有成苗。其余的 7 个组合中,不同浓度、不同浸泡时间均能诱导出加倍植株。因此,秋水仙素浸泡愈伤组织块是诱导盾叶薯蓣多倍体的有效途径。

2.1.2 不同浓度及处理时间对四倍体盾叶薯蓣诱导率的影响:从表 1 可以看出,采用秋水仙素水溶液

浸泡愈伤组织块,加倍植株的诱导率与质量浓度密切相关。 0.5×10^3 mg/L 秋水仙素水溶液浸泡处理 24 h,没有愈伤组织块死亡,但产生的四倍体植株很少,只有 2.7%;浸泡时间延长到 48 h,死亡率为 28%,四倍体诱导率也只有 4.5%。6 号处理,用 1×10^3 mg/L 秋水仙素溶液浸泡处理 24 h,有少部分材料死亡,四倍体诱导率为 35.2%,处理时间延长到 48 h,诱导率虽然最高,为 37.2%,但可能由于处理时间过长,秋水仙素的毒害作用积累,造成愈伤组织块死亡率高达 60%,成苗较少。用 2×10^3 mg/L 秋水仙素处理时,处理 24 h(7 号处理)的材料死亡率为 55.6%,处理 48 h(11 号处理)的死亡率高达 86.4%,成苗的四倍体诱导率为 28.6%。当秋水仙素质量浓度增高至 4×10^3 mg/L 时,处理 24 h(8 号

处理)的死亡率为 82.6%,延长到 48 h(12 号处理)则全部死亡,可见 4×10^3 mg/L 秋水仙素水溶液是浸泡愈伤组织块诱导多倍体的最高限定浓度。结合考虑愈伤组织的成活率和最后成苗的四倍体诱导率,诱导盾叶薯蓣染色体加倍的最适体系为: 1×10^3 mg/L 秋水仙素溶液浸泡愈伤组织块 24 h。

2.2 诱变植株的倍性检测及细胞学鉴定

2.2.1 流式细胞仪检测:试管苗进入壮苗阶段时,分别取盾叶薯蓣对照株和变异株的幼嫩叶片,流式细胞仪检测其倍性。每株材料取上下两片叶片分别测定,每一处理测定数不少于 5 000 个细胞。测定结果见图 1。本试验中,形态发生比较明显变异的 213 株材料中,随机抽取 107 株进行检测,确定为四倍体的共有 48 株。

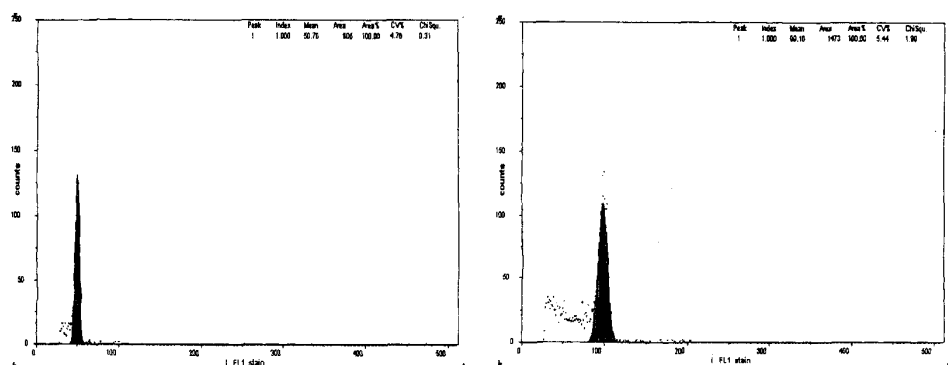


图 1 未处理(A)和秋水仙素处理(B)的盾叶薯蓣叶片 DNA 含量分布图

Fig. 1 DNA distribution chart of *D. zingiberensis* leaves with control (A) and with colchicine treatment (B)

采用 Partec DPAC 软件对流式细胞仪自动测定的 DNA 含量分布图进行分析表明,图 1-A 所示的对照盾叶薯蓣叶片 DNA 含量分布图,只有一个峰,峰值为 50.70,说明对照为纯倍体;图 1-B 为处理的盾叶薯蓣叶片 DNA 含量分布图,只有一个峰,为纯倍体,峰值为 99.10,与对照峰值相比为 1.982,约等于 2,这说明处理的盾叶薯蓣叶片 DNA 为染色体加倍了的纯倍体。

2.2.2 常规染色体压片检测:每种材料观察 30 个以上的中期分裂相细胞,其中若有 85% 以上的细胞染色体数为 $2n=2x=40$ 时,则确定其为四倍体植株。经常规染色体压片观察盾叶薯蓣 99025 号材料(对照)染色体数目为 $2n=20$,为二倍体,流式细胞仪确定为染色体加倍的植株生根后,经常规染色体压片检测,根尖细胞染色体数目为 $2n=40$,为四倍体植株。通过流式细胞仪倍性检测,结合根尖压片的细胞学鉴定,可知秋水仙素诱导处理的样品为诱导产生的四倍体植株。

2.3 盾叶薯蓣四倍体与二倍体植株生物学特征比较(图 2)

2.3.1 外形比较:秋水仙素处理后长成的植株与对照植株比较,幼苗时,有相当多植株的叶片等营养器官的形态发生了变异,如叶片变长变宽,颜色加深,茎秆变粗,变红等。

试管苗移栽到基质上 3 周时,四倍体的株高平均为 10.31 cm,对照株(二倍体)平均高 9.61 cm,二者差异不显著。四倍体植株的茎粗 1.18 mm,二倍体植株茎粗 0.83 mm,二者差异比较明显。对照株的叶片平均长度为 2.08 cm,而四倍本植株的叶片平均长度为 2.72 cm。四倍体的叶片长度为对照株的 131%。对照株叶片平均宽度为 2.15 cm,四倍体的叶片平均宽度为 2.70 cm,四倍体的叶片宽度为对照株的 126%。

2.3.2 叶片显微结构比较:盾叶薯蓣四倍体与二倍体相比,叶片显微结构发生了明显变化,见表 2。其中二倍体与四倍体分别取 100 个样本进行观察计算。

表 2 四倍体盾叶薯蓣和二倍体盾叶薯蓣显微结构比较($\bar{x} \pm s, n=100$)

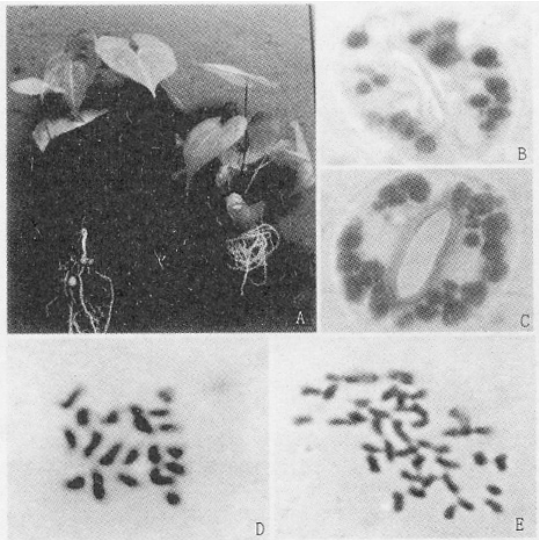
Table 2 Comparison of microstructure between tetraploid *D. zingiberensis* and diploid *D. zingiberensis* ($\bar{x} \pm s, n=100$)

倍性	气孔长/ μm	气孔宽/ μm	气孔长/气孔宽	气孔密度/(个 $\cdot\text{mm}^{-2}$)	叶绿体数(2个保卫细胞)	染色体数
二倍体	8.85 ± 1.80	4.12 ± 0.74	2.17 ± 0.35	914.57 ± 1.84	14.79 ± 2.83	20
四倍体	12.65 ± 1.87	5.00 ± 1.06	2.60 ± 2.20	661.17 ± 2.39	24.93 ± 3.24	40

表 3 不同倍性盾叶薯蓣生理指标比较

Table 3 Comparison of physiological index between tetraploid *D. zingiberensis* and diploid *D. zingiberensis*

植 株	二倍体 /($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	四倍体 /($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	四倍体/ 二倍体/%
叶绿素 a	0.72	1.31	182
叶绿素 b	0.39	0.49	126
叶绿素	1.11	1.80	162
过氧化物酶活性	91.7	50	54.4



A-四倍体植株与二倍体植株(移栽苗),左为四倍体植株,右为二倍体植株;B-二倍体植株气孔及保卫细胞中的叶绿体;C-四倍体植株气孔及保卫细胞中的叶绿体;D-二倍体植株根尖染色体, $2n=20$;E-四倍体植株根尖染色体, $2n=40$

A-left is tetraploid plant, right is diploid plant (transplant seedling); B-stomata of diploid plant and chloroplasts of guard cell; C-stomata of tetraploid plant and chloroplasts of guard cell; D-chromosome number of diploid plant root tip, $2n=20$; E-chromosome number of tetraploid plant root tips, $2n=40$

图 2 盾叶薯蓣四倍体植株与二倍体植株的比较
Fig. 2 Comparison of tetraploid with diploid plants of *D. zingiberensis*

从表 2 可以看出,变异株的叶绿体数目为对照株的 169%,说明多倍体植株的光合条件优越,光合作用能力强,因而生物产量高。

2.3.3 生理指标的差异:从表 3 可以看出,盾叶薯蓣四倍体与二倍体相比,叶绿素含量明显增加,过氧化物酶活性减弱。已有的研究表明,过氧化物酶是一种与生长密切相关的酶,能氧化吲哚乙酸,抑制生长^[6]。多倍体一般都表现为生长势强,在茎、叶、花、果、地下营养器官等表现为巨大性,四倍体盾叶薯蓣表现的过氧化物酶活性低可能与其生长势强及器官的巨大性有关。

3 讨论

3.1 盾叶薯蓣四倍体诱导:王志安^[7]用秋水仙素浸泡种子获得过多倍体,其诱导率最高为 42%。本试

验采用秋水仙素水溶液浸泡带芽点的盾叶薯蓣愈伤组织块,此方法与常规植株或种子诱变方法相比,具有明显的优越性。在组培快繁体系中,愈伤组织块的繁殖系数可达到 10~15,经过继代,可以获得相当多的四倍体植株,大大提高了诱变率。在 6 号处理中,利用 20 个愈伤组织块诱导获得了 37 株四倍体植株。同时,确认的多倍体植株,可以应用组织培养技术在短期内迅速繁殖出大量试管苗,进行田间鉴定、生产试验和示范推广,繁殖出来的种苗纯度高、质量好、无病虫害,这对提高盾叶薯蓣产量和质量十分有利。而且在组织培养条件下,用试管苗进行根尖染色体鉴定比在田间诱变后取根尖逐株鉴定简便得多,可以在短期内快速鉴定大批量植株,从而能较快地筛选出多倍体。有望加快盾叶薯蓣多倍体选育种的进程。

3.2 多倍体鉴定:常规染色体压片法在细胞学研究和倍性鉴定中发挥了巨大作用,但费时费工,而且难以在试管苗早期将多倍体植株鉴定出来。流式细胞仪通过检测变异植株和对照植株叶片细胞 DNA 的相对含量,可以快速鉴定出加倍植株,省时高效,而且在增殖阶段就能够将多倍体鉴定出来。本研究结果表明,流式细胞仪倍性检测与细胞学压片的结果是相吻合的,但流式细胞仪检测无法得到被检测植株的细胞染色体数,需要结合根尖压片法鉴定诱导植株的倍性和染色体数目。研究表明,不同倍性植株叶片的气孔大小、保卫细胞内叶绿体数目等常是不同的,可以作为植物倍性鉴定的依据^[8,9],而且简单易行,对植株损伤不大。本实验利用流式细胞仪在诱导植株生长早期,大量检测变异植株,并对检测出的加倍植株进行细胞学鉴定,成苗后观测其外部形态

和叶片显微结构,综合鉴定加倍植株,是一种快速、有效而且更可靠的方法。

致谢:黄涛老师在染色体根尖压片方面,张君芝副教授在实验过程中给予了热情帮助。

References:

- [1] Feng Y X, Zhou Z Q. Review and prospeccts for industrial production and resources of diosgenin in China [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 1994, 6(3): 3.
- [2] Qin T C, Zhang Y D, Zhang J Z. Distribution and utilization of *Dioscorea* resources in Hubei Province [J]. *Resource Dev Market* (资源开发与市场), 1997, 13(5): 200-202.
- [3] Zhuang W Q, Ren Y Y. Prospect in *Panax ginseng* [J]. *J Jilin Agric Univ* (吉林农业大学学报), 1990, 12(1): 98-101.
- [4] Zhang J E, Liu J H, Deng X X. Genetic variation of citrus of calli revealed by the ploidy analyses [J]. *Acta Genet Sin* (遗传学报), 2003, 30(2): 169-174.
- [5] Huang T, Zhang Y D, Zhang J Z, et al. Variation of chromosome number in *Dioscorea zingiberensis* [J]. *J Huazhong Agric Univ* (华中农业大学学报), 2002, 21(2): 158-160.
- [6] Nie H T, Zhong G Y, Chen Z S. Preliminary study on the activity of peroxidase as a preselection index for spur type of cieras [J]. *J Fruit Tree Sci* (果树科学), 1991, 8(1): 46-48.
- [7] Wang Z A, Wang S J. Preliminary study on tetraploid *Dioscorea zingiberensis* inducement [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1995, 20(6): 337-339.
- [8] Cohen D, Yao J L. In vitro chromosome doubling of nine *Zantedeschia* cultivars [J]. *Plant Cell, Tissue Organ Cult*, 1996, 47: 43-49.
- [9] Sari N, Abak K, Pitrat M. Comparison of ploidy level screening methods in watermelon: *Citrullus lanatus* (Thunb.) [J]. *Scientia Horticult*, 1999, 82: 265-277.

束花石斛快繁育苗技术的研究

史永锋,付开聪,张 宁,沈栋侠,姚德兴

(云南金陵植物药业股份有限公司,云南 思茅 665000)

摘要:目的 寻找束花石斛快繁育苗的有效途径。方法 采用组织培养和野生自然栖息的束花石斛诱导高位腋芽萌发等途径进行探索。结果 在组织培养中,改良 1/2MS 培养基的原球茎形成效果最好,调整不同浓度的 N、P、K 及外源激素对诱导束花石斛原球增殖、生根壮苗极为明显;外源激素对诱导束花石斛的高位腋芽萌发无明显效果,高位芽萌发与茎株生理年龄和营养状况有关。结论 人工种植束花石斛采用现代生物技术组培育苗和腋芽繁殖是目前快繁育苗的最有效途径,不仅育苗量大、周期短,且生长快、成活率高,两条途径对于束花石斛的产业化发展有重要意义。

关键词:束花石斛;组织培养;快繁育苗;外源激素;高位芽

中图分类号:R282.21

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2005)03-0438-04

Rapid propagation and breeding seedling techneque for *Dendrobium chrysanthum*

SHI Yong-feng, FU Kai-cong, ZHANG Ning, SHEN Dong-xia, YAO De-xing

(Yunnan Jinling Botanical Medicine Co., Ltd, Simao 665000, China)

Key words: *Dendrobium chrysanthum* Wall. ex. Lindl.; tissue culture; rapid propagation and breeding seedling; exo-hormone; high bud

束花石斛 *Dendrobium chrysanthum* Wall. ex Lindl. 为兰科石斛属植物,主要分布于云南、广西、贵州等省,是《中华人民共和国药典》收载入药的石斛中药材之一^[1]。味淡、性微寒,有滋阴养胃、清热解毒的功效,在临床上多用于治疗慢性咽喉炎、眼科疾病、血栓闭塞性疾病,效果十分明显。因此,成为脉络宁、通塞脉片、石斛液光丸等著名中成药的主要原料之一,近年来由于过量挖采,野生资源已经濒临灭绝而成为稀缺药材^[2]。为探索束花石斛快速育苗的最佳途径,笔者从2001年起开始采用组织培养、野生自然栖息的种源诱

导高位芽等方法进行探讨,取得了满意的效果。

1 实验材料

组织培养的各种设备、实验苗床。硝酸铵、磷酸二氢钾、氯化钾、NAA(萘乙酸)、6-BA(6-苄基嘌呤)、GA(赤霉素)、IBA(吲哚丁酸)等。

采用思茅市民族传统医药研究所石斛品种园中人工栽培的束花石斛为实验材料,果实采用其成熟果实;河沙清洗干净。

2 方法与结果

2.1 组织培养