

粉葛组织培养及同源四倍体诱导

周堂英, 李惠波, 向素琼, 梁国鲁

(西南农业大学园艺园林学院, 重庆 400716)

摘要:目的 建立粉葛的组织培养体系; 培育粉葛同源四倍体新种质。方法 以MS培养基为基本培养基, 培养外植体茎尖或茎段获得组培再生植株; 用不同体积分数的秋水仙素对无菌苗茎尖进行不同时间的处理, 诱导遗传物质加倍的同源四倍体。结果 其最适宜组织诱导培养基为MS+6-BA 1.0 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L, 分化和增殖培养基为MS+6-BA 1.0 mg/L+2,4-D 0.2 mg/L, 生根培养基为1/2 MS+IBA 0.2 mg/L; 从长出约1 cm的丛生芽上切取0.3~0.5 cm的茎尖用0.4%~0.5%的秋水仙素处理48 h效果较好, 体积分数过低或过高和处理时间太短或太长都不易成功。结论 同源四倍体粉葛为葛根中药用物质质量分数的提高提供了基础。

关键词: 粉葛; 组织培养; 秋水仙素; 同源四倍体

中图分类号: R282.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)08-1230-04

Tissue culture and induction of autotetraploid of *Pueraria thomsonii*

ZHOU Tang-ying, LI Hui-bo, XIANG Su-qiong, LIANG Guo-lu

(College of Horticulture and Landscape, Southwest Agriculture University, Chongqing 400716, China)

Abstract: Objective To establish a tissue culture system of *Pueraria thomsonii* and to cultivate a new breed autotetraploid. **Methods** Using the MS medium as the basic medium, the explants shoot apices and stem segments were cultured to differentiate the regenerations. The autotetraploid with genetic material doubled was achieved by treating shoot tips with colchicine of different concentrations for different long times. **Results** The proper media MS+6-BA 1.0 mg/L + 2,4-D 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L is for protocorm inducing, MS+6-BA 1.0 mg/L + 2,4-D 0.2 mg/L for differentiation and propagation, and 1/2 MS+IBA 0.2 mg/L for rooting. The best effect of the autotetraploid induction can be achieved by treating the 0.3~0.5 cm shoot tips cut from the 1 cm plantlets with 0.4%~0.5% colchicine for 48 h, and it is unlikely to succeed by treating shoot tips with colchicine of very low or high concentration or for very long or short time. **Conclusion** The autotetraploid gives a chance to improve the content of medical materials in the root of *P. thomsonii*.

Key words: *Pueraria thomsonii* Benth.; tissue culture; colchicine; autotetraploid

葛根是一味常用中药, 其原植物主要是豆科葛属植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 和粉葛 *P. thomsonii* Benth.。葛根主要含有异黄酮类(isoflavones): 大豆苷元, 又名大豆素(daidzin)、大豆黄素(daidzein)、葛根素(puerarin)等; 葛根苷A(pueroside A)、B、C; 三萜类(triterpenoid saponin)和生物碱类物质。具有升阳解热、透疹止泻、除烦止渴的功用。用于伤寒、湿热身痛、烦热消渴、泄泻、痢疾、斑疹不透、高血压、耳聋^[1]。葛根素可以舒张冠脉及肋血管平滑肌, 降低心肌耗氧量, 改善心肌收缩功能及微循环, 在临床上广泛应用。国内已有科技工作

者对野葛和三裂叶野葛做过组织培养的研究^[2,3]。我国有丰富的葛根资源, 但栽培葛主要是粉葛, 其药用成分低; 多倍化是植物进化变异的自然现象, 也是促进植物发生进化改变的重要力量; 多倍体基因组中存在大量重复基因, 这些重复基因很可能会发生功能分化, 并伴随蛋白质序列中氨基酸加速的替代过程和加速的过量的表达的正选择促进的结果^[4]。因此本实验旨在通过组织培养和秋水仙素诱导培育粉葛同源四倍体, 为获得药用成分高的葛根新种质打下基础。

1 材料与方法

收稿日期: 2004-09-11

作者简介: 周堂英(1978—), 女, 汉族, 四川宜宾人, 硕士, 细胞生物学专业, 从事细胞学和多倍体育种方面的研究。

Tel: (0691)8980990 E-mail: zhouty509@163.com

1.1 外植体的准备及培养条件的选择:选择田间当年生、健壮的枝条上的茎尖或茎段为外植体,自来水加土温浸泡 30 min,自来水冲洗 1 h。然后转入超净工作台内,用 75%酒精消毒 20~30 s,0.1%升汞灭菌 8~10 min,无菌水冲洗 3~5 次。接种到愈伤组织诱导培养基上。

以 MS 培养基为基本培养基,生根培养基为 1/2 MS,植物生长调节剂类别和量的选择参照安利佳^[5](表 1),pH 5.6~5.8,蔗糖 3%,卡拉胶 0.6%。培养温度(25±2)℃,光照强度 1 500~2 000 lx,光照时间 10~12 h/d。

表 1 愈伤组织诱导、分化和生根培养的
植物生长调节剂浓度

Table 1 Concentration of plant growth regulators for induction and differentiation of calli and rooting

培养基编号	植物生长调节剂/(mg·L ⁻¹)			
	2,4-D	6-BA	IBA	NAA
I ₁	1	0.5		0.2
I ₂	2	0.5		
I ₃	1	1		0.2
I ₄	2	1		
D1	0.5	1		
D2	0.2	1		
D3	0.5	2		
D4	0.2	2		
D5		1		
D6		2		0.5
R1			0.2	
R2			0.2	0.1
R3				0.1
R4			0.4	

I-代表诱导培养基 D-代表分化培养基 R-代表生根培养基

I-represents induction media D-represents differentiation media R-represents rootage media

1.2 秋水仙素诱导多倍体:采用酒精灭菌配制分别为 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%的秋水仙素水溶液,从刚长出约 1 cm 的生长健康旺盛的丛生芽上取 0.3~0.5 cm 的茎尖分别浸泡 36、48 和 72 h 后,无菌水冲洗 3~5 次,接种到增殖培养基上。根尖和茎尖的染色体数检查采用李懋学^[6]的去壁低渗火焰干燥法,Giemsa 染色,检查 5 次以上。

测量四倍体和二倍体试管苗最大顶生叶片的叶形指数、叶面积、气孔密度和随机选取 30 个以上保卫细胞统计其叶绿体的平均数,气孔密度以 20 倍视野下的气孔个数计,随机选取 30 个视野,取平均数。测量 10 片以上,再取平均数。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织诱导和丛生芽的发生途径:粉葛的茎

尖或茎段在加有 6-BA 和 2,4-D 的 MS 培养基中比较容易形成愈伤组织,7~15 d 开始出现乳白色或淡黄色愈伤组织,在加少量 NAA 的 I₃ 培养基中愈伤生长最好,更利于丛生芽的分化。将比较致密的愈伤接种到分化培养基后,愈伤组织继续生长并逐渐变褐色,表面产生淡绿色芽点或绿色瘤状物,约一个月后分化出丛生芽。实验表明,D2 分化培养基最利于葛根丛生芽分化和生长。不加激素的培养基不能产生愈伤。在没有激素的 1/2MS 生根培养基上长出的根少且细,很难栽出成活。如果加入少量的 IBA,7~10 d 就长出 4~6 个健壮的小根,25 d 左右便有 3~5 cm 长并有须根长出,移栽成活率达 90%。如增加 IBA 的量或再加入 NAA,仍能长出健壮的根,但同时容易长出愈伤组织,因此 R1 为最适生根培养基。另外,同源四倍体葛对培养基的要求不如二倍体严格,在 D1、D2 两种培养基上都能生长良好,这可能是同源四倍体适应性增强的结果;并且生根较二倍体晚,10~15 d 才能长出根来,约 1 个月后才可移栽。另外,直接将带有腋芽的茎段接种到 D2 培养基上,丛生芽从腋芽发生处长出,这样也可以获得大量的组培苗。

2.2 秋水仙素对粉葛茎尖存活率及加倍的影响:粉葛茎尖经过秋水仙素处理后生长明显比对照缓慢,但经过低体积分数和短时间处理不会使其致死,一个月左右又开始分化出愈伤和新的丛生芽,几乎不发生倍性变异。从表 2 可以看出,用 0.6%的秋水仙处理 36 h 和 0.1%处理 72 h 后茎尖仍很少致死,说明粉葛对秋水仙素的忍耐性较强,选择较高的秋水仙素处理较为理想。高体积分数处理长时间后植株存活率太低且生长非常缓慢,不利于后期筛选。而用 0.4%~0.5%的秋水仙处理后茎尖有一半以上存活,并能在 1~2 月之内分化出新的植株。因此选择 0.4%~0.5%的秋水仙素处理 48 h 效果最佳。第一次筛选时最好取其茎尖检测,即使第一次检测茎尖为四倍体的植株仍很可能为嵌合体,由它再分化出的植株又会出现明显差别。因此尽快地进行切割繁殖和筛选多倍体显得尤为重要。继续多次进行检测,有的多倍体植株逐渐趋于稳定,不再分化出二倍体植株,其染色体数为 $2n=4x=44$ (图 1)。

2.3 四倍体植株性状特征:加倍后的植株在培养基中比二倍体长得高,叶片变大,叶柄变粗,茎变粗(图 2),叶形指数变小,叶片气孔增大,气孔密度变小,单个气孔的叶绿体个数增多(表 3)。栽出后生长健壮,叶片逐渐表现出变异,嫩叶有很明显皱缩(图 3)。

表 2 秋水仙素的不同浓度和不同处理时间
对诱导多倍体的影响

Table 2 Effect of colchicine at different concentration
and different long time on polyploid induction

处理时 间/h	秋水仙 素/%	处理茎 尖数	存活 率/%	加倍 株数	混倍 株数	加倍 率/%
36	0.1	30	100	0	0	0.00
36	0.2	25	100	0	0	0.00
36	0.3	38	100	0	0	0.00
36	0.4	28	100	0	2	0.00
36	0.5	25	88.0	1	5	4.00
36	0.6	30	76.7	2	8	6.67
48	0.1	25	100	0	0	0.00
48	0.2	34	100	0	1	0.00
48	0.3	28	89.3	1	3	3.57
48	0.4	32	87.5	4	6	12.5
48	0.5	27	70.4	8	9	29.63
48	0.6	18	50.0	2	5	11.11
72	0.1	30	100	0	1	0.00
72	0.2	24	79.17	1	5	4.17
72	0.3	21	71.43	2	6	9.52
72	0.4	32	66.7	3	6	9.37
72	0.5	27	48.15	1	8	3.70
72	0.6	32	34.3	0	2	0.00

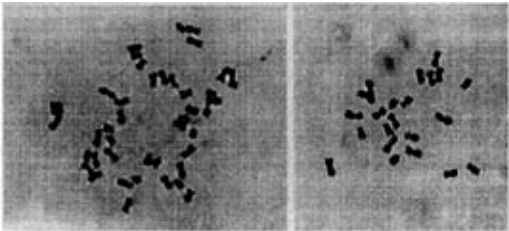


图 1 四倍体(2n=4x=44)和二倍体(2n=2x=22)的
中期染色体

Fig. 1 Chromosomes of tetraploid (2n=4x=44)
and diploid (2n=2x=22)

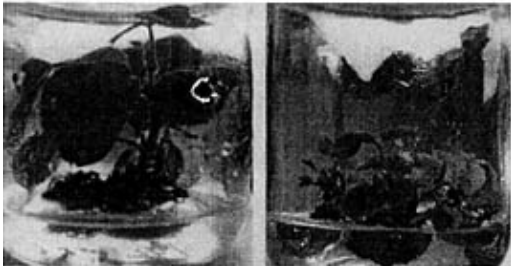


图 2 四倍体和二倍体的组培苗(L:4x,R:2x)

Fig. 2 Plantlets of diploid and tetraploid (L:4x, R:2x)

3 讨论

3.1 四倍体的诱导及检测:实验结果表明:高浓度、短时间的秋水仙素处理更利于多倍体的产生,这与

表 3 四倍体植株的几个性状特征

Table 3 Several characteristics of tetraploid

材 料	叶绿体 数/个	叶面积 /cm ²	叶形指数	气孔密 度/个
同源四倍体	9.37	9.2	1.13	29.20
二倍体	7.08	6.9	1.38	48.14

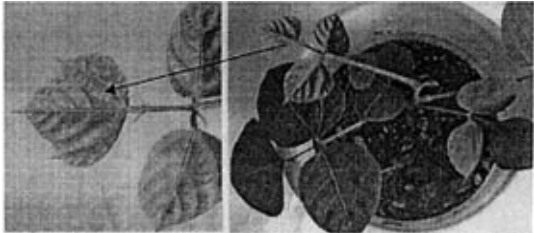


图 3 栽出 25 天后的同源四倍体粉葛苗及叶片的放大
Fig. 3 Seedling of autotetraploid 25 d after planted in soil
and amplification of it's leaves of *P. thomsonii*

前人^[7]的研究结果相一致。低质量浓度长时间处理后发生多倍化的细胞由于处理时间过长被毒害或继续多倍化,而二倍体细胞生长容易占优势,使筛选难度变大。过高的秋水仙素对植物产生很强的毒害作用,也不利于多倍化的发生。因此选择适当的高质量浓度在其分裂周期内迅速的使分裂细胞发生多倍化,然后及时给予适宜的营养环境使其分裂增殖,这样才有利于多倍化了的细胞不断分化并占优势。秋水仙素诱导很容易产生嵌合体,要获得纯的四倍体必须通过多次分离检测。另外,加倍植株的巨大性有时表现不一,染色体数鉴定和气孔的显微观察是必要的。本实验还发现在进行倍性的检测时选择的检测部位很重要,特别是第一次进行筛选时,虽然检测到根部细胞绝大部分是多倍体,特别是从愈伤上长出的根比较容易发生倍性变异,但是植株仍长得跟二倍体一样,再检测其茎尖,仍为二倍体。说明只是部分愈伤发生了变异或植株部分多倍化,二倍体细胞的生长占明显优势。因此第一次检测最好选其茎尖,为后面检测打下较为可靠的基础,节省工作量。

3.2 粉葛四倍体的应用前景:葛根味甘,祛风发散,温症往来,止渴解酒,是一味常用中药。葛根品种很多,不同的品种药效不同,有的还可能有毒。据冯瑞芝等报道,野葛的葛根素质量分数为 1.03%~6.44%,总黄酮大于 5%,家养粉葛葛根素为 0.019%~0.89%,总黄酮小于 2%,峨嵋葛藤和三裂叶葛藤的葛根素分别为 0.21%~0.48%和 0.002 5~0.023%,总黄酮分别为 1.27%~1.85%和 1.58%。可见野葛的药用价值最高,粉葛次之。但目前商品葛根大部分来源于栽培的粉葛,中医在开

药方的时候都直接写成粉葛;另外,可供大量开发利用的野生葛根资源有限,同时又可能造成对生态环境的破坏。因此,对粉葛进行多倍体育种是有必要的。通过染色体加倍后得的多倍体植株往往根、茎、叶变大,即表现为产量增加,同时往往表现出有效化学成分明显高于二倍体的基因调控的正选择结果,还可能产生新的物质。如四倍体的曼陀罗和月见草的药效都比二倍体好。并且葛根主要药用部分是根部,主要通过营养繁殖繁殖,多倍化所带来的育性下降、不能结实等负效应并不会影响其利用,通过多倍体育种可望筛选出产量高、药效好的葛根新品种。本实验所得到的四倍体的有效成分含量还有待测定。

References:

- [1] Zheng S Q, Zeng M. Resources investigation of medicinal plants of *Pueraria* DC. in Yunnan Province [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(8): 755-756.
- [2] Yu S H, Li L. Tissue culture of *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi and plantlet regeneration [J]. *J Plant Res Environment* (植物资源与环境), 1999, 8(1): 63-64.
- [3] Shi H P. Plantlet regeneration from the petiole and stem of *Pueraria phaseoloides* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31(7): 550-553.
- [4] Hughes M K, Hughes A L. Evolution of duplicate genes in a tetraploid animal *Xenopus laevis* [J]. *Mol Biol Evol*, 1993, 10: 1360-1369.
- [5] An L J, Li F X, Zhang J M, et al. Study on tissue cultures of legume plants [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1992, 34(10): 743-752.
- [6] Li M X, Chen R Y. *Chromosomes of Crops and Research* (作物染色体及其研究) [M]. Beijing: China Agricultural Press, 1992.
- [7] Guo Z P, Jin Q B. *Crops Breeding* (作物育种学) [M]. Beijing: Higher Education Press, 1987.
- [1] Zheng S Q, Zeng M. Resources investigation of medicinal

9种“藏茵陈”原植物中的7种有效化学成分研究

杨慧玲^{1,2}, 刘建全^{1*}

(1. 中国科学院西北高原生物研究所 青藏高原生物进化与适应开放实验室, 青海 西宁 810001;

2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要:目的 研究藏药市场上9种“藏茵陈”植物中有效化学成分, 根据所含成分的差异及其生理活性, 确定这些植物的药用价值。方法 采用HPLC法测定7种成分的量。结果 9种植物的有效成分差异很大。结论 针对不同的化学成分用途, 选择不同的植物, 有效利用资源。

关键词:藏茵陈; 成分; HPLC

中图分类号: R282.6

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)08-1233-05

Seven constituents in nine species used as Tibetan medicine “Zangyinchen”

YANG Hui-ling^{1,2}, LIU Jian-quan¹

(1. Laboratory of Qinghai-Tibet Plateau Biological Evolution and Adaptation, Northwest Institute of Plateau

Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China; 2. Graduate School of Chinese

Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Key words: Zangyinchen; active constituents; HPLC

“藏茵陈”的原植物是龙胆科川西獐牙菜 *Swer-tia mussotii* Franch.^[1], 在藏药中用途较广, 用于治疗肝炎、胆结石、消炎、清热、抗病毒和细菌引起的各种疾病等^[2,3]。从“藏茵陈”类植物中分离出的化学物质主要有齐墩果酸、獐牙菜苦苷、芒果苷、当药黄素和各种吡酮类物质^[1]。齐墩果酸被证明在治疗多种肝中毒具有显著作用^[3], 还发现其通过降低毒性代

谢产物来保护急性肝损伤, 提高葡萄糖酶增加解毒作用, 是“藏茵陈”治疗肝炎的主要活性成分^[4]。獐牙菜苦苷经检验主要具有清热、消炎等生理作用^[5~8]。当药黄素虽然具有保肝作用, 但最重要的是其对CCl₄引起的转氨酶升高有降低作用^[3,8,9]。芒果苷主要具有抗氧化^[9,10]、抗结核^[11]和抗菌作用^[12,13]。吡酮、1,8-二羟基-3,5-二甲氧基吡酮、1,5,8-三羟基-

收稿日期: 2004-10-12

基金项目: 归国留学人员重点科研项目; 中国科学院知识创新工程方向性项目(KSCX-SW-106); 中国科学院“西部之光”人才培养计划和全国优秀博士论文专项基金资助

* 通讯作者 刘建全 E-mail: ljqudx@public.xn.qh.cn