

盾叶薯蓣四倍体的鉴定和薯蓣皂苷元的定量分析

谢彩侠¹, 史会齐¹, 高山林², 白雨³, 赵颖^{3*}

(1 河南中医学院药学院, 河南 郑州 450008; 2 中国药科大学中药学院, 江苏 南京 210038;

3 天津天士力集团研究院, 天津 300410)

摘要:目的 提高盾叶薯蓣药材的品质。方法 采用高效液相色谱法, 对组织培养条件下诱导获得的盾叶薯蓣四倍体株系试管苗薯蓣皂苷元的量和部分株系一年生田间苗薯蓣皂苷元的量进行了分析, 并对部分株系一年生田间苗农艺性状进行了鉴定。结果 经诱导获得的四倍体株系试管苗与对照相比薯蓣皂苷元的量有较大差异; 而且四倍体株系试管苗与一年生苗薯蓣皂苷元的量有较强的相关性, 大部分四倍体株系表现出典型的多倍体性状。结论 在组织培养的基础上, 利用多倍体育种来改善盾叶薯蓣的品质是可行的。

关键词: 盾叶薯蓣; 同源四倍体; 农艺性状; 薯蓣皂苷元

中图分类号: R282.6

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)08-1314-03

盾叶薯蓣 *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright 属薯蓣科薯蓣属根状茎, 又名黄姜、火头根, 其根茎内薯蓣皂素的量一般为 2% 左右, 是目前世界上最好的激素类药源植物。同时具有清肺止咳、利湿痛淋、通络止痛、解毒消肿的功能, 可治肺热咳嗽、湿热淋痛、风湿腰痛、痈肿恶疮、跌打扭伤、蜂螫虫咬; 其水溶性甾体皂苷成分对心肌缺血、胸痹、高脂血症等有明显治疗作用。

盾叶薯蓣是我国特有资源植物, 是世界上薯蓣皂素量最高的种类, 最高单株达到 16.5%, 超过了世界王牌——墨西哥小穗花薯蓣 15% 的纪录。据调查我国 10 个省市都有盾叶薯蓣分布, 其中湖北、湖南、陕西、四川分布最为集中, 目前在陕西安康地区、湖北郧西地区、湖南安化地区、河南南阳地区都有一定规模的种植面积。实现人工栽培后, 虽然解决了皂素供应问题, 而黄姜原料依旧短缺, 主要原因是产量低、皂素量变化较大, 质量难以控制。因此有必要进行品种选育和提纯复壮的工作。植物多倍体研究已有报道^[1], 鉴于此, 笔者利用组织培养技术进行了盾叶薯蓣多倍体诱导技术的研究, 进行盾叶薯蓣多倍体新品种的选育, 以期最终选育出含有效成分量高, 根部药材产量高的优良品种, 从而使多倍体所具有的根茎叶巨大型性在药材生产中得以应用。

1 材料与方法

1.1 材料来源: 盾叶薯蓣原植物采自江苏省中国科学院植物所植物园, 经秦惠贞、丁志遵研究员鉴定为盾叶薯蓣。选取幼嫩的盾叶薯蓣叶片和茎段, 肥皂

水清洗 15 min, 用流水冲洗 1 h 左右, 在超净工作台上, 先在 75% 酒精中浸泡 30 s, 再放入 0.1% 升汞溶液中 (加 3~5 滴聚山梨酯-20) 消毒 15 min, 无菌水冲洗 5 次。接种在含 BA 0.1 mg/L + 病毒唑 5.0 mg/L 的 MS 培养基上, 得到无菌试管苗作为试验材料。

1.2 多倍体的诱导: 采用 3 因素 4 水平的正交实验, 将盾叶薯蓣幼芽浸泡在秋水仙素质量浓度 (%) 为 0.2、0.3、0.4、0.5; 浸泡时间 T 为 12、24、36、48 h; 培养基中添加秋水仙素的浓度 (10^{-6}) 为 0、20、40、60 的不同处理中, 每处理 25 棵芽, 每瓶接 5 棵芽。培养一个月后统计各处理芽的死亡率, 将存活芽转接到 MS + BA 0.05 mg/L + 病毒唑 5.0 mg/L 培养基中, 使其分化成苗, 继代培养, 建立株系并编号。

1.3 试管苗的生根和染色体的鉴定: 将处理得到的各株系接种在 $1/2$ MS + IAA 0.5 mg/L + 病毒唑 5.0 mg/L 培养基上诱导生根, 待根长至 0.5~1.0 cm 时切取根尖, 做染色体鉴定, 结果见图 1, 经 3 次以上观察确认为四倍体的株系予以保留并扩大繁殖。

1.4 盾叶薯蓣试管苗薯蓣皂苷元的测定^[2~5]

1.4.1 色谱条件: Agilent 1100 Series 高效液相色谱仪; Microsorb-MV100 C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m) 色谱柱; 流动相: 无水甲醇; 进样量 10 μ L, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 203 nm, 柱温为室温。

* 收稿日期: 2008-12-28

作者简介: 谢彩侠 (1977—), 女, 河南内乡人, 讲师, 博士, 长期从事中药质量控制研究的教学、科学工作, 已发表论文 15 篇, 获奖 2 项。

Tel: 13673651577 E-mail: nanyang.xcx@163.com

1.4.2 线性关系考察:精密称取薯蓣皂苷元对照品(由中国药品生物制品检定所提供,质量分数 $>98.8\%$) 2 mg,用无水乙醇配成质量浓度为 1.0 mg/mL 的对照品溶液。精密吸取对照品溶液 1、2、4、6、8、10 μ L,按上述 HPLC 色谱条件测定峰面积,以峰面积积分值为纵坐标,进样量为横坐标进行回归处理,得回归方程为 $Y = -3.5241 + 64.87X$, $r = 0.9978$,线性范围 1.0~10.0 μ g。

1.4.3 样品制备及定量测定:盾叶薯蓣试管苗在 1/2 MS+IAA 0.2 mg/L+NAA 0.2 mg/L 培养基上诱导生根,待苗长至 30~35 d,洗净根上的培养基,将根剪掉,在 60 $^{\circ}$ C 下烘干,粉碎,过 60 目筛,精密称取盾叶薯蓣粉末 1.5~2.0 g,置于三角瓶中,加 2.0 mol/L 的硫酸 50 mL,在 100 $^{\circ}$ C 水解 4 h,放冷滤过,药渣用蒸馏水洗至中性,60 $^{\circ}$ C 干燥后,用石油醚(60~90 $^{\circ}$ C) 50 mL 索氏提取 5 h,提取液回收至干,用无水乙醇溶解,滤过置 5 mL 量瓶中,用无水乙醇定容,得供试品溶液。以上述色谱条件作 HPLC 分析,样品中薯蓣皂苷元与其他成分达到良好分离(图 1),以外标 1 点法计算各样品中薯蓣皂苷元的量。

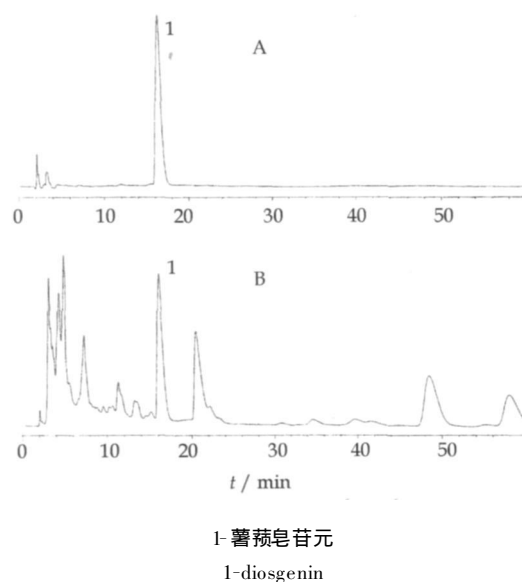


图 1 薯蓣皂苷元对照品 (A) 和盾叶薯蓣样品 (B) 的 RP-HPLC 图谱

Fig. 1 RP-HPLC Chromatogram of diosgenin reference substance (A) and sample of *D. zingiberensis* (B)

1.5 盾叶薯蓣试管苗的移栽试验:于 4 月份将盾叶薯蓣试管苗接种在生根培养基上,30 d 后开瓶在室温下炼苗 2~3 d。取出小植株,洗去根上的培养基,傍晚时将苗栽入以珍珠岩-煤渣(1:3)为基质的苗床中,每日喷雾 2 h,在苗床中生长约 40 d 后移

栽至田间。

1.6 盾叶薯蓣部分四倍体植株薯蓣皂苷元定量测定和农艺性状的初步鉴定

1.6.1 材料:由于盾叶薯蓣试管苗移栽成活率较低,导致一年生四倍体株系材料有限,因此仅对 6 个株系的薯蓣皂苷元量和农艺性状进行了分析与鉴定。

1.6.2 薯蓣皂苷元的测定:精密称取盾叶薯蓣粉末 0.2~0.3 g,其他样品处理和测定方法同 1.4。

1.6.3 农艺性状的鉴定:每个株系选 10 株,在植株的相同部位测定叶长、叶宽及茎粗。叶长、叶宽均用直尺测量,茎粗用螺旋测微器测定。

2 实验结果

2.1 盾叶薯蓣同源四倍体株系的染色体鉴定和快速繁殖:前期实验^[9]表明,0.2%秋水仙碱浸泡 36 h,转接在添加 40×10^{-6} 秋水仙碱的 MS+BA 0.1 mg/L+病毒唑 5 mg/L+PP₃₃₃ 0.5 mg/L 的培养基上是诱导盾叶薯蓣多倍体的最佳方法,其死亡率为 62.0%,诱导率为 15%。经过 3 次重复根尖染色体的鉴定,最后获得了 32 个同源四倍体株系。进一步对诱导获得的四倍体株系进行了根尖染色体鉴定和确认。由图 2 可以看出,盾叶薯蓣二倍体植株根尖染色体数目为 $2n=2x=20$ 条,与文献报道相符;四倍体植株根尖染色体数目为 $2n=4x=40$ 条,染色体数目增加了 1 倍,为同源四倍体。同时在试管苗扩繁期间根据生长情况,淘汰掉长势差,生长率低的四倍体株系,最终确定了 19 个盾叶薯蓣同源四倍体株系进行田间的选育工作。

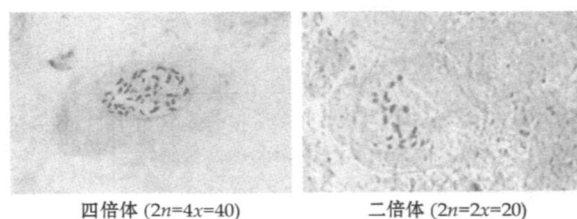


图 2 盾叶薯蓣的染色体

Fig. 2 Chromosome of *D. zingiberensis*

2.2 盾叶薯蓣试管苗同源四倍体薯蓣皂苷元量的分析:对诱导获得的 19 个四倍体株系试管苗的薯蓣皂苷元量进行了初步分析,结果见表 1。部分株系测定图谱见图 3。结果显示,19 个盾叶薯蓣四倍体株系中,有 10 个株系的薯蓣皂苷元量高于二倍体,平均比二倍体株系高出 30.8%。其中 10-1、12-4、y9、3-1、y24、11-10,分别比二倍体株系高出 75%、50%、50%、33%、25%、25%。

表 1 盾叶薯蓣四倍体株系薯蓣皂苷元

Table 1 Content of diosgenin in autotetraploid lines of *D. zingibiernsis*

株系	薯蓣皂苷元/%	株系	薯蓣皂苷元/%
C12	0.09	Y15	0.09
13-6	0.05	12-2	0.07
10-1	0.21	Y24	0.15
13-3	0.14	G11	0.08
Y23	0.13	Y3	0.07
3-5	0.09	G2	0.14
3-13	0.12	12-4	0.18
16-8	0.06	10-10	0.13
11-10	0.15	3-1	0.16
Y9	0.18	二倍体	0.12

2.3 盾叶薯蓣部分四倍体植株薯蓣皂苷元定量测定和农艺性状的初步鉴定

2.3.1 薯蓣皂苷元测定: 对田间 6 个多倍体株系试管苗的薯蓣皂苷元量进行了分析, 结果见表 2。

结果表明, 试管苗阶段薯蓣皂苷元量高的株系在生长 1 年后, 薯蓣皂苷元量也相应较高, $r = 0.9922$, 因此试管苗阶段测定薯蓣皂苷元量可以对优良株进行初步选育。

2.3.2 农艺性状初步鉴定: 在试验田进行了栽培, 定期对田间各株系生长情况、农艺性状进行观察记载, 作为性状鉴定和品系选育的依据。由表 3 可知, 大部分四倍体株系在叶长、叶宽或茎粗的某些或全

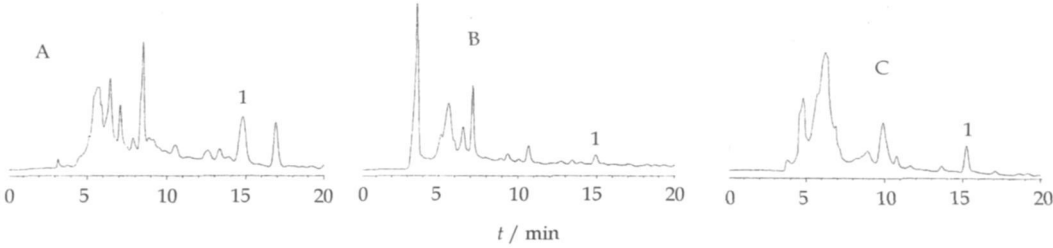


图 3 10-1 株系薯蓣皂苷(A), 13-16 株系薯蓣皂苷(B)和二倍体株系薯蓣皂苷(C) HPLC 色谱分析图

Fig. 3 HPLC Analysis of diosgenin of 10-1 lines (A), diosgenin of 13-16 lines (B), and diosgenin of diploid lines (C)

表 2 试管苗与一年生苗薯蓣皂苷元

Table 2 Content of diosgenin in plantlet and that in one year growth plant

株系	试管苗薯蓣皂苷元/%	一年生苗薯蓣皂苷元/%
10-1	0.21	1.52
G11	0.08	0.95
Y3	0.07	0.89
Y24	0.15	1.29
12-4	0.18	1.43
13-16	0.05	0.75
CK	0.12	1.19

表 3 四倍体株系一年生苗农艺性状

Table 3 Agronomy character of one year growth autotetraploid plants

株系	叶长/cm	叶宽/cm	茎粗/cm
10-1	3.5±0.2	2.4±0.1	0.12±0.01
G11	4.0±0.5	3.0±0.1	0.21±0.03
Y3	3.2±0.1	2.7±0.1	0.18±0.02
Y24	3.0±0.1	2.8±0.2	0.14±0.01
12-4	2.8±0.1	2.6±0.1	0.22±0.03
13-16	2.5±0.1	2.0±0.2	0.19±0.01
二倍体	2.7±0.1	2.4±0.1	0.15±0.02

部性状均优于二倍体。这充分表现了多倍体某些器官巨型性这一特征。

3 讨论

盾叶薯蓣部分四倍体株系一年生苗的农艺性状和薯蓣皂苷元量的测定结果表明: 大部分四倍体株系的农艺性状均优于二倍体株系, 而且四倍体株系试管苗与一年生苗薯蓣皂苷元量有较强的相关性; 说明试管苗阶段, 通过测定薯蓣皂苷元量对株系进行前期筛选是可行的。

实验为盾叶薯蓣同源四倍体育种研究的一部分, 还将继续进行盾叶薯蓣同源四倍体优良品种的选育, 经过 2~3 年盾叶薯蓣质量和化学指标的评价和考察, 最终培育出高产优质的盾叶薯蓣新品种。

参考文献:

[1] 董志渊, 郭华春. 盾叶薯蓣三倍体自然变异类型的发现及其主要经济性状评价[J]. 中草药, 2008, 39(9): 1397-1399

[2] 都述虎, 夏重道, 付铁军, 等. 穿龙薯蓣总皂苷水解条件的优化[J]. 中成药, 2000, 22(9): 608-610

[3] 王 俊, 杨克迪, 陈 钧. 均匀设计法优选穿山龙的水解工艺条件[J]. 中药材, 2002, 9: 659-660

[4] 王铁杰, 刘中博, 文琪璐, 等. RP-HPLC 法测定黄山药和穿龙薯蓣中薯蓣皂苷的含量[J]. 中药材, 2005, 2(12): 1074-1075

[5] 赵景婵, 郭治安, 成小飞, 等. 穿龙薯蓣中薯蓣皂苷元的高效液相色谱法测定[J]. 药物分析杂志, 2000, 2(1): 27-28

[6] 谢彩侠, 高山林, 秦慧贞, 等. 盾叶薯蓣同源四倍体的诱导与鉴定[J]. 药物生物技术, 2005, 12(1): 15-18