

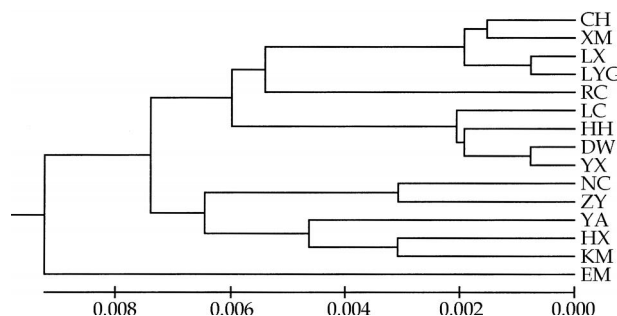


图 2 中国不同地理居群鱼腥草的 UPGMA 树

Fig 2 UPGMA Dendrogram based on Nei's genetic distance of *H. cordata* of different geographical populations in China

能会使居群一致度较高。但是本实验通过远距离采样,没有研究其克隆多样性,也避免了其克隆多样性对本研究结果的影响。同时,地理隔离(包括河流、山脉、冰川以及人为的公路和沟渠)阻碍居群间基因交流,因此对居群遗传结构具有重要的影响,通常导致高的居群分化水平^[10]。鱼腥草分布广泛,常见于山坡、田埂、溪谷旁,所处地理环境异质度高、地理地形复杂,以此来看适应差别以及采样点之间相距较远,基因交流有限也可能是鱼腥草居群间分化的原因之一^[11]。

本研究利用 AFLP 分子标记技术对我国鱼腥草种质资源遗传多样性和遗传结构进行分析,为鱼腥草这一药用植物的引种驯化、遗传育种、繁育栽培

和标准化种植提供理论依据。同时,为建立鱼腥草中药材及其优良品种的 DNA 指纹图谱奠定基础。

参考文献:

- [1] Hayashi K, Kamiya M, Hayashi T, et al. Virucidal effects of the steam distillate from *Houttuynia cordata* and its components on HSV-1, influenza virus, and HIV [J]. *Planta Med*, 1995, 61: 237-241.
- [2] Chiang L C, Chang J S, Chen C C, et al. Anti-herpes simplex virus activity of *Bidens pilosa* and *Houttuynia cordata* [J]. *Ame J Chin Med*, 2003, 31(3): 355-362.
- [3] 任玉翠,周彦钢,凌文娟,等. 鱼腥草营养液升白细胞作用的研究[J]. 预防医学文献信息,1999,5(1):5-6.
- [4] 姜建国. 鱼腥草的开发利用[J]. 特种经济动植物,2007,10(9):37-38.
- [5] 吴卫,郑有良,陈黎,等. 利用 ISSR 标记分析鱼腥草种质资源的遗传多样性[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2003,5(1):70-85.
- [6] 彭帅,伍贤进,罗玥佳,等. 17 份鱼腥草种质亲缘关系的 ISS 分析[J]. 安徽农业科学,2007,35(12):3484-3486.
- [7] 蓝云龙,吴令上,袁波音,等. 鱼腥草 RAPD 分子标记的多态性[J]. 浙江林学院学报,2008,25(3):309-313.
- [8] Vos P, Hogers R, Bleeker M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting [J]. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23(5): 4407.
- [9] 梁汉兴. 论三白草科的系统演化 and 地理分布 [J]. 云南植物研究, 1995, 17(3): 255-267.
- [10] Corre V, Dumolir-Lapegus S, Kremer A. Genetic variation at allozyme and RAPD loci in sessile oak *Quercus petraea* (Matt.) Liebl.: the role of history and geography [J]. *Mol Ecol*, 1997, 6: 519.
- [11] 陈小勇,王希华,宋永昌. 华东地区青冈种群的遗传多样性及遗传分化[J]. 植物学报,1997,39(2):149.

秋水仙素诱导茴香多倍体的研究

任安祥,潘春香*,何金明,张振明,肖艳辉,林舒

(韶关学院英东生物工程学院,广东 韶关 512005)

摘要:目的 探讨不同秋水仙素浓度和不同处理时间诱导茴香多倍体的效果。方法 采用种子浸泡法以不同秋水仙素浓度、不同处理时间诱导下的种子的萌发率和诱变率、胚根诱变体的外部形态、染色体数量、内部组织构造以及精油量和成分进行了比较。结果 诱导液质量浓度为 0.13%,处理时间为 24 h 时的诱导效果最好;诱导后的突变体胚根与对照相比,表现粗大、染色体数目明显增加、胚根的内部细胞数量明显增多、4 种主要精油成分中除蒎烯、柠檬烯略低于对照外,柠檬醛、反式-茴香脑和蒎烯 3 种成分均显著提高。结论 秋水仙素诱导的突变体可以较大幅度地提高茴香主要精油成分的量,为茴香高精油量多倍体新品种的培育提供了依据。

关键词:茴香;多倍体;秋水仙素;诱导

中图分类号:R282.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2010)02-0288-04

* 收稿日期:2009-05-12

基金项目:国家自然科学基金(31370151);内蒙古自然科学基金(2009MS0311);内蒙古自治区人才开发基金(No2009-12)

作者简介:任安祥(1960—),男,内蒙古呼和浩特市人,教授,长期从事园艺植物栽培与生理方面的研究。

E-mail:renanxiang@163.com

*通讯作者 潘春香 Tel:(0751)8124909 E-mail:pcx992@yahoo.com.cn

Polyploidy of *Foeniculum vulgare* induced by colchicine

REN An-xiang, PAN Chun-xiang, HE Jin-ming, ZHANG Zhen-ming, XIAO Yan-hui, LIN Shu

(College of Yingdong Bioengineering, Shaoguan University, Shaoguan 512005, China)

Abstract : Objective To explore the induced effects of colchicine in different concentration and times on *Foeniculum vulgare* polyploidy. **Methods** Seed germination rate and mutation rate, morphology of radicle induced mutants, chromosome number, tissue structure, and content and component of essential oil, which induced by colchicine in different concentration and times were investigated using the method of soaking seeds. **Results** The results showed that 0.13% of colchicine concentration and 24 h inducing time had the best induction on *F. vulgare* polyploidy. Compared to the control, the radicle of mutant was thicker, the chromosome number increased clearly, and the cell number in radicle manifolded distinctly. Among the four main components of essential oil, the contents of Dill apiol in anamorphosis radicle was a little lower than that of the control, but the contents of limonene, (*E*)-anethole, and camphene in anamorphosis radicle were all remarkably higher than that of the control after induced by colchicine. **Conclusion** The content of main essential oil components in fennel mutant induced by colchicine is remarkably enhanced. The study provides the theoretical basis for the breeding of *F. vulgare* new varieties of high oil content.

Key words : *Foeniculum vulgare* Mill.; polyploidy; colchicine; induction

茴香 *Foeniculum vulgare* Mill. 是伞形科茴香属植物,全株含有挥发性芳香油,主要精油成分为反式-茴香脑、柠檬烯、蒈烯、莰烯及蒾烯^[1]。茴香精油在抗菌、抗氧化、杀虫、医药、日化以及食品添加剂等方面得以广泛应用^[2]。特别是精油中的主要成分反式-茴香脑作为升白治疗癌症及长期接触放射线或药物所致或原因不明的低白细胞症具有较好的治疗效果^[3]。因此,培育高精油量,特别是高反式-茴香脑茴香新品种具有重要的实际意义。多倍体植物由于染色体的增加,使植株器官常表现巨大性,同时,也使染色体基因上调控的有效化学成分量比正常二倍体增加,从而可增加初生代谢和次生代谢产物量^[4~6]。所以茴香多倍体育种工作的开展,可望大幅度提高茴香的精油产量和药用价值。

1 材料与方法

1.1 材料:采用 2007 年内蒙古巴彦淖尔产的内蒙古茴香的种子。

1.2 方法:实验于 2008 年 9 月至 2008 年 12 月在韶关学院英东生物工程实验室进行。用不同质量浓度秋水仙素溶液浸泡种子;将在无菌水中浸泡 16 h 的吸水膨胀的种子取出,用滤纸拭干,浸泡在 0.09%、0.11%、0.13%、0.17% 的秋水仙素溶液中,分别处理 8、16、24 h。以蒸馏水浸泡为对照,各设 3 次重复,每个重复 100 粒种子,然后置于无菌的培养盘中,在 25℃ 培养箱中培养。每天换水 1 次,观察和统计发芽率和诱变率。

1.3 多倍体鉴定

1.3.1 形态学鉴定法:形态学鉴定法是最直观的鉴定方法。发生突变的多倍体外部形态特征发生了明显变化。

1.3.2 染色体数观察^[7,8]:将胚根用蒸馏水洗干净后,用 Carnoy 固定液[无水乙醇-冰醋酸(3:1)],在 4℃ 的冰箱中固定 4 h。水洗后,放入已在 60℃ 的干燥箱中预热的解离液中,在 60℃ 恒温条件下处理 5~10 min,当根尖的伸长区透明而分生区成米黄色或乳白色时即可取出,然后将解离好的材料用蒸馏水洗干净后,取一根软化好的根尖放在载玻片上,用刀片切去伸长区,只留下 1~2 mm 的分生组织,滴一滴改良石炭酸品红染色液,染色 10~30 min,压片,镜检。

1.3.3 精油提取:以质量浓度 0.13%、处理时间 24 h、截取大约 2 cm 长的胚根进行精油的提取和成分分析,3 次重复。方法:称量(各称取 0.3 g)→浸泡在正己烷溶液中(3 mL, 30 min)→超声波(30 min)→离心(15 min, 0~4℃, 5 000 r/min)→取液于磨口试管中(取液体部分即可)→GC/MS 分析,具体方法参照文献报道^[9]。

1.3.4 内部组织构造的观察:采用徒手切片法对胚根进行切片,厚度 8~10 μm,番红染色,德国莱卡 LEICA DM LS2 显微镜观察, Nikon COOL PIX 4500 数码相机进行显微成像。

2 结果与分析

2.1 植物形态鉴定:秋水仙素处理的茴香种子发芽慢,发出的胚根粗而短,且胚轴明显膨大;根尖分生区变成棕褐色,部分胚轴基部有转绿现象。未经处理的茴香种子发芽率高,胚根细而长,生长快,根尖细长且正常(图 1)。

2.2 染色体数检测:茴香二倍体 $2n = 2X = 22^{[10]}$, 本实验采用压片法也观察到茴香染色体数是 22 条(图 2-A),但是经秋水仙素处理的染色体数目较多,无法精确统计其数字,但可以看出比未经处理的数目明显增多(图 2-B)。

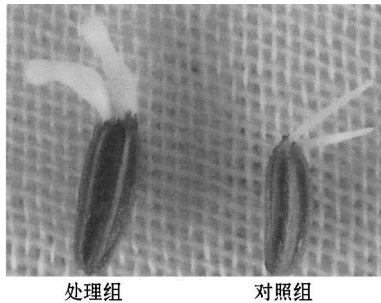


图 1 秋水仙素处理后发芽小茴香种子的形态学比较

Fig 1 Morphologic comparison of germinating fennel seed after treated by colchicine

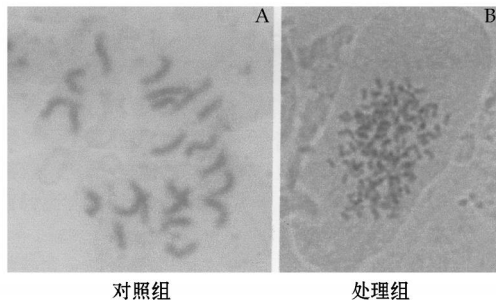


图 2 小茴香染色体观察比较

Fig 2 Comparison of fennel chromosome

2.3 秋水仙素浓度和处理时间对种子萌发率和诱变率的影响:由表 1 可见,清水浸泡 8、16、24 h 的对照组的萌发率在 81.6%~86.7%,与秋水仙素处理的相比差异均达到了极显著水平。秋水仙素处理时间相同时,萌发率随着秋水仙素质量浓度的增加而呈降低趋势,而诱变率随着处理质量浓度的增加而增加。当处理质量浓度相同时,萌发率随着处理时间的延长而降低,诱变率随着处理时间的延长而提高。其中,处理时间 24 h,质量浓度 0.13% 的诱变率最高,达 43.34%,除处理时间 24 h,质量浓度 0.17% 的组合之外,与其他组合相比差异均达到了显著性水平,且除了处理质量浓度 0.17%,时间 8、16、24 h 的 3 个组合之外,其余均达到了极显著水平,而且萌发率也达到 42.1%。萌发率和诱变率是

衡量秋水仙素诱变植物多倍体效果的两个重要指标,寻找一个诱变率较高,而萌发率又不会受到太大影响的适宜的秋水仙素溶液质量浓度和处理时间很重要,本实验认为秋水仙素溶液 0.13%,处理时间 24 h 这一组具有较高实用性。

表 1 秋水仙素处理浓度和时间对茴香种子萌发率和诱变率的影响

Table 1 Effects of colchicine in different concentration and times on germination and induction rate of fennel seeds

处理时 间/h	秋水仙 素/%	萌发率 /%		处理时 间/h	秋水仙 素/%	萌发率 /%	
16	0	86.70 a	A	24	0.13	43.37 a	A
8	0	85.50 a	A	24	0.17	40.47 ab	AB
24	0	81.60 a	A	16	0.17	36.59 b	ABC
8	0.09	64.93 b	B	8	0.17	35.47 b	ABC
16	0.09	61.93 bc	B	8	0.13	28.77 c	BCD
24	0.09	59.60 bc	BC	16	0.13	26.43 cd	CDE
8	0.11	57.27 cd	BCD	24	0.11	26.37 cd	CDE
16	0.13	51.13 de	CDE	16	0.11	26.23 cd	CDE
16	0.11	50.49 e	CDE	8	0.11	23.60 cd	DE
8	0.13	50.30 e	CDE	24	0.09	20.50 de	DE
24	0.11	49.60 e	CDE	8	0.09	18.20 e	E
8	0.17	48.50 ef	DE	16	0.09	17.53 e	E
16	0.17	45.93 ef	EF	8	0.09	0.00	
24	0.13	42.10 fg	EF	16	0.00	0.00	
24	0.17	36.50 g	F	24	0.00	0.00	

诱变率是以萌发率为基数;各列数字后字母表示 Duncan's 检测的差异水平,小写字母表示 0.05 水平显著;大写字母表示 0.01 水平显著

Inducton rate is based on germination rate; Means within a column followed by different letter show Duncan's difference level, small letters are 0.05 level significant difference, and capital letters are 0.01 level significant difference among treatments

2.4 秋水仙素诱导后精油成分和量的比较:经过分析测试,茴香品种胚根精油主要成分为反式-茴香脑、苧烯、柠檬烯和蒾罗芹菜脑。经秋水仙素处理的茴香精油成分的相对量除蒾罗芹菜脑之外,均与对照差异较显著,分别是对照的 179%、157%、138%,特别是药用价值较高的反式-茴香脑增加最显著,是对照的 179%(表 2)。

表 2 秋水仙素诱导后小茴香胚根精油主要成分相对质量分数的比较

Table 2 Comparison of relative contents of four main components in essential oil of fennel radicle after induced by colchicines

名称	精油成分/%			
	反式-茴香脑	苧烯	柠檬烯	蒾罗芹菜脑
处理	14.47 ± 3.62	3.88 ± 0.02	32.56 ± 2.35	7.54 ± 6.22
对照	8.08 ± 2.06	2.47 ± 0.41	23.65 ± 0.05	10.76 ± 1.86
对照的倍数	179	157	138	70

2.5 秋水仙素处理后胚根内部组织构造的观察比较:由图3可见,茴香根的基本构造由表皮、皮层、内皮层和中柱构成,维管束呈二原型。而经秋水仙素处理的胚根诱导体的细胞较对照排列紧密且多,细胞壁较厚,细胞形状较扁,内含物较多。但由于到目前为止,从解剖学角度研究秋水仙素诱导植物多倍体的效果尚未见报道,所以,没有参考文献支撑,其原因也无法进行分析,尚有待于进一步深入研究,找到其理论依据。

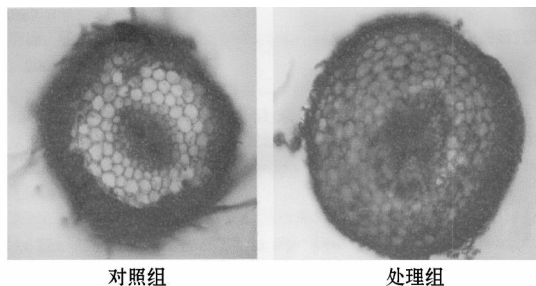


图3 秋水仙素处理后茴香胚根横切面比较

Fig 3 Comparison of transverse section of fennel radicle after treated by colchicine

3 讨论

3.1 实验表明,用不同质量浓度的秋水仙素,不同时间处理膨胀的茴香种子,产生的诱导效果不同。秋水仙素的质量浓度相同,处理的时间越长,其诱导率越高;处理时间相同,秋水仙素的质量浓度越高,其诱导率也越高。但是随着处理时间的延长和处理质量浓度的增加,种子萌发率受到的抑制也越大。因此,要想筛选出最佳的诱导方法应该把诱导时间和诱变剂量组合起来,本实验结果显示:以秋水仙素溶液质量浓度0.13%,处理时间24h的诱导效果最好。

3.2 用膨胀的种子进行秋水仙素多倍体诱导的研究,具有简单、操作方便等优点,然而有关这方面的报道却很少。本实验将为种子繁殖植物用种子进行秋水仙素诱导多倍体的研究提供依据。

3.3 染色体是遗传信息的载体,染色体数目与结构的变化对植物的表型特征、初生代谢物及次生代谢物量及成分产生很大影响,常表现巨大性,大多数多倍体的次生代谢物高于二倍体^[4~6]。本研究表明经秋水仙素处理后,茴香胚根精油的主要成分的相对质量分数明显提高,特别是药用价值较高的反式-茴香脑的相对质量分数是对照的179%,这将为培育高精油量的植物多倍体新品种提供理论依据。

3.4 常用的形态鉴定法是外部形态和染色计数法,本实验在此基础上,又对胚根的内部组织构造进行了观察比较,观察到经秋水仙素处理的胚根内部组织构造与对照明显不同,为从解剖结构上探索鉴定多倍体的依据提供了很好的依据。

3.5 经秋水仙素诱导的茴香多倍体植物的精油量和成分的变化、遗传稳定性等对提高茴香精油的量和改进茴香精油质量具有重要的实用意义,有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 何金明,肖艳辉,郭园,等. 茴香不同器官精油含量及其成分比较[J]. 园艺学报,2006,33:555-560.
- [2] 郭园,王羽梅,云兴福,等. *Foeniculum vulgare* Mill. 精油利用的研究进展[J]. 香料香精化妆品,2005(4):28-31,41.
- [3] 赵淑平,丛浦珠,权丽辉. 小茴香挥发油的质量研究[J]. 中药材,1989,12(9):31-32.
- [4] 张康健,董娟娥. 药用植物次生代谢[M]. 西安:西北大学出版社,2001.
- [5] 高山林,朱丹妮,蔡朝辉,等. 丹参多倍体性状和药材质量的关系[J]. 植物资源与环境,1996,5:1-4.
- [6] 石巍峻,刘雅琴. 四倍体和二倍体枸杞果实营养成分的比较研究[J]. 宁夏医学院学报,1998,20:17-18,24.
- [7] 王志敏,牛义,汤青林,等. 生姜染色体观察及核型分析[J]. 中国农学通报,2006,22:102-104.
- [8] 刘永安,冯海生,陈志国,等. 植物染色体核型分析常用方法概述[J]. 贵州农业科学,2006,34:98-102.
- [9] 何金明,屈向明,肖艳辉,等. 茴香根精油的含量与成分分析[J]. 时珍国医国药,2005,16(11):1061-1062.
- [10] 邓瑞宁,刘冰冰,蔡明历,等. 药用植物茴香的细胞学研究[J]. 华中农业大学学报,2005,25(6):595-597.

《中草药》杂志售过刊信息

《中草药》杂志编辑部尚存部分过刊合订本,包括:1974-1975年、1976年、1979年、1988-1993年(80元/年),1996-1997年(110元/年)、1998年(120元/年)、1999年(135元/年)、2000年(180元/年)、2001-2003年(200元/年)、2004年(220元/年)、2005年(260元/年)、2006年(280元/年)2009年(350元/年)、2007年(280元/年)、2008年(280元/年)、2009年(400元/年)。1996年增刊(50元)、1997年增刊(45元)、1998年增刊(55元)、1999年增刊(70元)、2000年增刊(70元)、2001年增刊(70元)、2002年增刊(65元)、2003年增刊(65元)、2004年增刊(65元)、2005年增刊(65元)、2006年增刊(65元)、2007年增刊(65元)、2008年增刊(55元)、2009年增刊(55元)。欢迎订购。订阅者请直接与《中草药》杂志编辑部联系。

电话:(022) 27474913 23006821

传真:(022) 23006821

E-mail: zcy@tiprpress.com