

黄芩组织培养同源四倍体的诱导

陈柏君 高山林 卞云云

(中国药科大学, 南京 210038)

摘要: 应用组织培养技术对黄芩(*Scutellaria baicalensis* Georgi)进行多倍体诱导, 结果表明: 组织培养条件下, 在培养基中添加一定浓度的秋水仙素, 或者把带有绿色芽点的黄芩愈伤组织经 0.2% 秋水仙素溶液浸泡一定时间后再进行培养, 均可诱发黄芩多倍体的产生, 但以后者效果较好, 诱导率可达 40.0%。通过试管苗根尖染色体显微观察, 鉴定出 50 多个黄芩同源四倍体, 为今后优良品种的选育打下基础。

关键词: 黄芩; 同源四倍体; 组织培养; 秋水仙素

中图分类号: R282.71; Q943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2000)01-0009-03

The inducing of autotetraploid of *Scutellaria baicalensis* Georgi by tissue culture CHEN Bai-jun, GAO Shan-lin, BIAN Yun-yun (China Pharmaceutical University, Nanjing 210038), *J. Plant Resour. & Environ.* 2000, 9(1): 9~11

Abstract: A study of inducing polyploidy of *Scutellaria baicalensis* Georgi in the process of tissue culture was made. The results indicated that autotetraploid of *S. baicalensis* Georgi can be induced by adding colchicine in medium in tissue culture, or by immersing the callus of *S. baicalensis* Georgi in 0.2% colchicine solution for a period of time prior to culture. The later method was proved to be a good way in producing autotetraploid, with an inducing ratio of 40%. More than 50 lines of autotetraploid of *S. baicalensis* Georgi were determined by observing the chromosomes of obtained plantlets under microscope, and this laid down the foundation for the selecting and breeding of good varieties of *S. baicalensis* Georgi.

Key words: *Scutellaria baicalensis* Georgi; autotetraploid; tissue culture; colchicine

黄芩(*Scutellaria baicalensis* Georgi)为唇形科植物的干燥根, 具有清热、燥湿、解毒、止血的功效, 用于发热烦渴、肺热咳嗽、泻痢热淋、湿热黄疸、胎动不安、痈肿疮毒等症^[1]。临床疗效确切, 为常用中药之一。

黄芩药材生产主要采用种子或无性扦插繁殖, 于百功等采用无性繁殖技术, 取得一定的增产效果^[2]。但药材长期人工栽培会使品种退化, 产量和质量下降, 化学成分不稳定, 因此有必要进行品种选育和提纯复壮工作。作者利用组织培养技术进行黄芩同源四倍体诱导的研究, 旨在进一步选育有效成分含量高, 根部药材粗大, 产量高的优良品种打下基础, 从而使多倍体所具有的根、茎、叶的巨大性在药材生产中得以充分利用。

1 材料和方法

1.1 组织培养材料和方法

黄芩种子由河北省承德地区药材公司提供并经

鉴定。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。切取带节茎段, 剪去两侧叶片, 接种于附加 BA 0.5 mg/L、IAA 0.5 mg/L 的 MS 培养基中, 暗培养 20 d 后可得淡黄白色愈伤组织, 将此愈伤组织转入附加 BA 0.5 mg/L、PP₃₃₃ 0.5 mg/L 的 MS 培养基中, 每日光照 16 h, 光强 1 200 lux, 培养室温度 25℃, 约 20 d 后愈伤组织表面分化出绿色芽点, 继续培养可得丛生芽。生根培养基为 1/2MS + NAA 0.1 mg/L + PP₃₃₃ 0.5 mg/L。

收稿日期: 1999-10-25

基金项目: 本研究为国家中医药管理局重点科研项目的一部分 (课题编号 97A302)

作者简介: 陈柏君, 男, 1968 年 12 月生, 硕士研究生, 专业方向为药用植物生物技术。

1.2 人工诱导多倍体的方法

当黄芩愈伤组织表面分化出绿色芽点时,将愈伤组织切成直径0.5 cm的小块,分别用两种方法进行处理:(1)将愈伤组织块接种在添加不同浓度秋水仙素的MS+BA 0.5 mg/L+PP₃₃₃ 0.5 mg/L培养基上,一个月后把培养物转到不含秋水仙素的上述培养基中,使其分化成苗,再进行继代扩大培养并编号建立株系。(2)将愈伤组织块用含有2%二甲亚砜(DMSO)的0.2%秋水仙素水溶液分别浸泡0、3、5、8、12、16和24 h,无菌水洗3次,然后接种在MS+BA 0.5 mg/L+PP₃₃₃ 0.5 mg/L培养基上,使其分化成苗,再进行继代扩大培养并编号建立株系。将上述两种方法处理得到的各株系在1/2 MS+NAA 0.1 mg/L+PP₃₃₃ 0.5 mg/L培养基上诱导生根,待根长至0.5 cm时切取根尖,进行染色体鉴定,显微摄影,经3次以上鉴定,确认为四倍体的株系予以保留并扩大繁殖。

1.3 显微鉴定方法

切取刚萌发的试管苗根0.5 cm左右,在蒸馏水中漂洗干净,放入0.1%秋水仙素溶液中20℃下处理30 min,取出后用蒸馏水洗3次,再放入卡诺氏液中冰箱固定2 h,然后依次用95%乙醇、70%乙醇、蒸馏水各洗3次,用1 M盐酸于60℃下离析5 min,蒸馏水洗3次并在蒸馏水中低渗30 min。镜检时小心切取根尖,置载玻片中央,加改良苯酚品红染液1滴,30 min后盖上盖玻片并轻轻压至根尖压成一薄层,用日本产奥林巴斯BH-2型显微镜进行观察并摄影。

2 结果与讨论

2.1 黄芩同源四倍体的诱导

为了探索组织培养条件下诱导黄芩同源四倍体的有效方法,作者采用了两种不同的诱导方法,每一方法又分成若干个处理。结果发现,把带绿色芽点的愈伤组织接种在含秋水仙素的培养基上或经秋水仙素溶液浸泡后再进行培养,组培材料的生长和分化都不同程度受到抑制,部分死亡,但存活的材料均能陆续分化成苗。将苗转代后生长恢复正常,经二次继代,各株系形成群体后诱导生根,用根尖进行染色体鉴定,结果见表1和表2。

从表2可见,培养基中添加不同浓度的秋水仙

素对黄芩四倍体的诱导均有一定的效果,其中以添加10 mg/L秋水仙素处理组诱导率最高,达16.7%;随着秋水仙素浓度的增高,组培材料的死亡率也上升,使得总诱导率下降,因而这一处理方法中以添加10~50 mg/L秋水仙素较为合适。表2显示,用秋水仙素溶液进行浸泡处理,四倍体的诱导率明显高于表1的处理方法,其中以浸泡12 h效果为最好,诱导率高达40.0%,因此从本实验的结果来看,诱导黄芩多倍体较好的方法是:将带绿色芽点的愈伤组织块在0.2%秋水仙素溶液中浸泡12~16 h,再接种于不含秋水仙素的培养基中使其分化成苗。

表1 培养基中附加秋水仙素对黄芩四倍体诱导的影响
Table 1 The effects of adding colchicine in medium on inducing tetraploid of *Scutellaria baicalensis* Georgi

接种愈伤组织数 Numbers of inoculated callus	秋水仙素浓度 Concentration of colchicine (mg/L)	存活愈伤组织数 Numbers of survived callus	获得四倍体数 Obtained tetraploids	诱导率 Inducing ratio (%)
30	0	30	0	0
30	5	24	1	3.3
30	10	19	5	16.7
30	50	10	3	10.0
30	100	5	2	6.7

表2 秋水仙素溶液浸泡愈伤组织对黄芩四倍体诱导的影响
Table 1 The effects of immersing callus in colchicine solution on inducing tetraploid of *Scutellaria baicalensis* Georgi

浸泡愈伤组织数 Numbers of immersed callus	浸泡时间 Time of immersing (h)	存活愈伤组织数 Numbers of survived callus	获得四倍体数 Obtained tetraploids	诱导率 Inducing ratio (%)
30	0	30	0	0
30	3	30	4	13.3
30	5	28	6	20.0
30	8	23	7	23.3
30	12	20	12	40.0
30	16	19	10	33.3
30	24	9	20.0	

2.2 应用组织培养技术诱导多倍体的优越性

组织培养是生物技术中较成熟的应用技术,利用组织培养进行多倍体诱导与常规植株或种子诱变方法相比,具有明显的优越性。首先,在组织培养条件下,可以反复大批量地在培养瓶中处理植物愈伤组织、丛生芽等,从而大大提高了诱导成功率,这在植株上或种子处理中是难以做到的;其次,由于组织

培养不受节气等自然条件的影响,诱导条件易于控制,可以大大缩短诱导所需的时间;另外,组织培养条件下诱变后的植株,用试管苗进行根尖染色体鉴定比在田间诱变后挖取根部逐株鉴定简便得多,可以在短期内快速鉴定大批量株系,从而筛选出多倍

体。筛选出的多倍体可以立即应用组织培养技术在短期内迅速繁殖出大量的试管苗,以进行田间鉴定、生产试验和示范推广,而且繁殖出来的种苗纯度高、质量好,没有病虫害,这对提高植物的产量和质量十分有利。



图1 黄芩二倍体染色体 $2n=2x=18(\times 1600)$

Fig. 1 The chromosomes of diploid of *Scutellaria baicalensis* Georgi

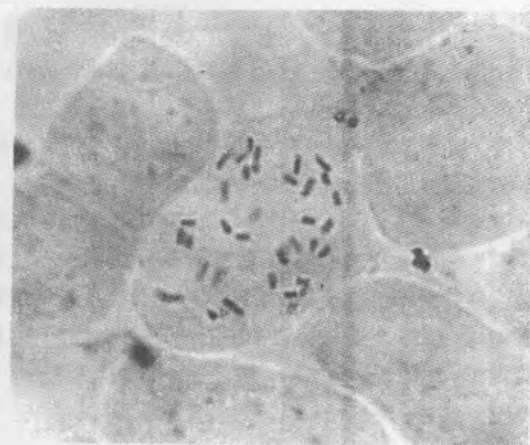


图2 黄芩四倍体染色体 $2n=4x=36(\times 1600)$

Fig. 2 The chromosomes of tetraploid of *Scutellaria baicalensis* Georgi

2.3 多倍体在药用植物育种中的特殊地位

在国内,应用组织培养技术已对宁夏枸杞 (*Lycium barbarum* L.)^[3]、百合 [*Lilium davidii* var. *willmottiae* (Wilson) Raffill]^[4]、党参 [*Codonopsis pilosula* (Franch.) Nant.]^[5]、丹参 (*Salvia miltiorrhiza* Bunge)^[6]等药用植物进行了多倍体育种,取得较好效果。药用植物大多以其根、茎、叶等器官为收获对象,而且大部分通过营养繁殖生产药材,而多倍体植株由于染色体加倍,往往具有根、茎、叶的巨大性,即根、茎、叶的产量较高,能较好地满足药材生产的要求。尽管多倍体植株往往出现育性下降,不能结实或较少产生种子,但对于以营养繁殖为主的药用植物来说影响不大。另一方面,植物染色体倍性的变化也往往会导致次生代谢产物含量的变化,这就有可能获得有效成分含量较高的药用植物新品种。本实验共获得50多个黄芩同源四倍体株

系,为进一步进行优良品种的筛选打下基础。

参考文献

- [1] 中国医学科学院药物研究所,南京药学院,江苏省植物研究所,等编. 中药志(第一册)[M]. 北京:人民卫生出版社,1959. 546.
- [2] 于百功,李统育,李训东. 黄芩无性繁殖的大田管理及有效成分[J]. 中药材,1995,18(4):167~168.
- [3] 秦金山,王莉,牛德水,等. 枸杞同源四倍体新物种类型的建立[J]. 遗传学报,1985,12(3):200~203.
- [4] 贾敬芬,谷祝平,郑田昌. 百合花丝组织培养及其细胞学观察[J]. 植物学报,1981,23(1):17~21.
- [5] 陈素萍,王莉,宋秀清. 党参多倍体育种的研究[J]. 中草药,1991,22(5):224~227.
- [6] 高山林,徐德然,蔡朝晖,等. 丹参同源四倍体新物种的培育[J]. 中国药科大学学报,1992,23(4):224~228.

(责任编辑:宗世贤)