

白术同源四倍体的诱导和鉴定 及其与二倍体过氧化物酶的比较

程心旻, 高山林, 卞云云

(中国药科大学, 江苏 南京 210038)

摘要: 以白术(*Atractylodes macrocephala* Koidz.)二倍体组培苗为材料,对其四倍体诱导方法进行研究,共获得45个白术同源四倍体株系,为优良株系的选育提供了材料。此外,还分析比较了其中8个白术四倍体株系与二倍体的过氧化物酶同工酶(POD)的酶谱差异,发现四倍体各株系过氧化物酶同工酶谱比二倍体的均多了 R_f 0.310的谱带,且总过氧化物酶比活力也发生了很大改变,对探讨白术四倍体优良株系的生理生化机理具有一定的参考价值。

关键词: 白术;同源四倍体;过氧化物酶

中图分类号: S567.21⁺1; Q554⁺.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2003)01-0016-05

Induction and identification of autotetraploid of *Atractylodes macrocephala* and comparison of its peroxidase and diploid's CHENG Xin-min, GAO Shan-lin, BIAN Yun-yun (China Pharmaceutical University, Nanjing, 210038, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2003, 12(1): 16-20

Abstract: A study on inducing autotetraploid of *Atractylodes macrocephala* Koidz. from tissue culture shoots was done. 45 autotetraploid lines of *A. macrocephala*, which are material of superior varieties, have been determined. The differences of peroxidase between 8 autotetraploid lines and diploid were compared. The results indicated that there are an extra band R_f 0.310 in electrophoresis pattern of peroxidase isozymes of autotetraploids and different activities between autotetraploid peroxidase and diploid's. It will have some reference value to study physiological and biochemical mechanism of excellent autotetraploid lines of *A. macrocephala*.

Key words: *Atractylodes macrocephala* Koidz.; autotetraploid; peroxidase

白术(*Atractylodes macrocephala* Koidz.)为苍术属(*Atractylodes* DC.)的重要药用植物之一,其药用部位为根茎,有健脾益气、利水化湿等功能,临床上广泛用于治疗脾胃虚弱、呕吐腹泻和表虚自汗等症^[1]。现代药理学研究还表明,白术挥发油对癌细胞有体外抑制作用,其多糖成分能增强人体的免疫力^[2]。由于长期以来人工栽培白术只种不选,现有品种退化严重,使药材的品质和产量都大大下降,无法满足市场需求。为了改善这种现状,提高白术药材的质量和产量,本文对白术进行了优良四倍体的诱导、鉴定和品种选育工作。

1 材料与方法

1.1 材料来源

白术(*Atractylodes macrocephala* Koidz.)原植物由安徽亳州药材基地提供,经中国药科大学生药学教

研室鉴定。

1.2 试验方法

1.2.1 无菌材料的获得 选取健壮的白术外植体幼芽,经脱病毒处理后,在MS+BA 2.0 mg/L + IAA 0.2 mg/L培养基上培养,得到白术二倍体脱病毒试管苗。试管苗在MS+BA 0.5 mg/L + 病毒唑 5.0 mg/L培养基上继代繁殖。培养条件:每天光照14 h,光照强度1 200 lx,培养温度(25±1)℃。

1.2.2 多倍体诱导 切取试管苗幼芽,用含2% DMSO的不同浓度无菌秋水仙碱溶液浸泡,以无菌水清洗后转入MS+BA 2.0 mg/L + IAA 0.2 mg/L培养基中。将处理后仍成活的试管苗编号建立株系,在MS+BA 0.5 mg/L + 病毒唑 5.0 mg/L培养基中扩

收稿日期: 2002-10-23

基金项目: 国家科技部中药现代化攻关项目(99-929-04-08)

作者简介: 程心旻(1977-),女,福建福州人,在读硕士生,主要从事中药生物技术研究。

大繁殖。

1.2.3 根尖染色体鉴定 将各株系试管苗在 MS + IAA 0.5 mg/L + 病毒唑 5.0 mg/L 培养基中诱导生根,待根长至 0.5~1.0 cm 时切取根尖,先用 0.2% 秋水仙碱浸泡 2 h,再以卡诺氏固定液固定 1 h,60℃ 0.2 mol/L HCl 中解离 8 min,蒸馏水低渗 30 min,切取根尖置于载玻片上,加改良苯酚品红染液 1 滴,30 min 后压片镜检,观察并摄影。

1.2.4 过氧化物酶同工酶电泳分离 采用聚丙烯酰胺凝胶垂直平板电泳,按文献[3]的方法进行。分离胶浓度 7%,浓缩胶浓度 2.5%,采用稳流电泳,抗坏血酸-联苯胺法显色,测量 R_f 值。

1.2.5 过氧化物酶活性测定 切取试管苗根茎,以 Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)为酶提取液,在冰浴中研磨匀浆,4 000 r/min 离心 15 min,上清液即为酶提取液。活性测定按文献[4]的方法进行,酶的比活力用 $\Delta OD_{470}/(\text{mg}\cdot\text{min})(\text{protein})$ 表示。

2 结果与分析

2.1 白术多倍体诱导

将白术幼芽浸入 0.2% 的无菌秋水仙碱溶液中,分别处理不同时间,培养 20 d 后对材料的存活率和诱导率进行了统计,结果见表 1。从表 1 可以看出,秋水仙碱对白术试管苗的毒害程度与浸泡时间密切相关,随着处理时间的延长,试管苗存活率降低,但诱导率也随之提高,用 0.2% 秋水仙碱浸泡 36 h 时诱导率较高,为 13.3%;但秋水仙碱浓度增加,存活率降低诱导率也有所下降,所以确定秋水仙碱浸泡诱导的最佳时间为 36 h。

由于诱导效果不佳,在 36 h 浸泡时间的基础上,进行了不同浓度秋水仙碱诱导多倍体的比较实验,结果见表 2。从表 2 可以看出,秋水仙碱对白术

试管苗的毒害程度与其浓度密切相关,随着秋水仙碱溶液浓度的增高,试管苗存活率降低,诱导率也呈现先升高后降低的趋势,当秋水仙碱浓度超过 0.2% 后,诱导率开始下降。所以秋水仙碱溶液浓度为 0.2% 是较为理想的条件,诱导率也达到了 13.3%。

表 1 不同诱导时间对秋水仙碱诱导白术四倍体的影响¹⁾
Table 1 The effects of different time in colchicine solution on inducing autotetraploid of *Atractylodes macrocephala* Koidz.¹⁾

编号 No.	诱导时间 Time of induction (h)	接种数 Number of inoculated buds	存活数 Number of survived buds	存活率 Rate of survived buds	四倍体 植株数 Number of tetraploid	诱导率 Rate of induction (%)
1	0	30	30	100.0	0	0
2	12	30	28	93.3	3	10.0
3	24	30	28	93.3	3	10.0
4	36	30	23	76.7	4	13.3
5	48	30	21	70	2	6.7

¹⁾ 秋水仙碱溶液浓度为 0.2%。 The concentration of colchicine solution is 0.2%.

为了更好地提高诱导效果,对诱导条件继续改进,先将白术幼芽在 0.2% 秋水仙碱溶液中浸泡 36 h,然后分别接种于添加了 20 和 40 mg/L 秋水仙碱的培养基中培养,诱导结果见表 3。从表 3 可以看出,用 0.2% 秋水仙碱浸泡,在含 40 mg/L 秋水仙碱的培养基上培养,这一组合条件虽然使白术试管苗存活率最低,但四倍体诱导率最高达到了 20%;而使用浸泡法诱导率最高只有 13.3%;不经过秋水仙碱溶液浸泡,仅仅在添加了秋水仙碱的培养基上培养,白术四倍体的诱导率更低,最高只有 6.7%。

2.2 白术四倍体和二倍体试管苗根尖染色体鉴定和植株形态比较

经过 3 次根尖染色体鉴定,确定共诱导成功 45 个白术同源四倍体株系。四倍体和二倍体试管苗的根尖染色体鉴定比较见图 1。结果表明,白术二倍

表 2 不同浓度秋水仙碱浸泡对白术四倍体诱导的影响

Table 2 The effects of different concentration of colchicine on inducing autotetraploid of *Atractylodes macrocephala* Koidz. by immersing

编号 No.	秋水仙碱的浓度 Concentration of colchicine (%)	接种数 Number of inoculated buds	存活数 Number of survived buds	存活率 Rate of survived buds (%)	四倍体植株数 Number of tetraploid	诱导率 Rate of induction (%)
1	0	30	30	100.0	0	0
2	0.1	30	30	100.0	2	6.7
3	0.2	30	26	86.7	4	13.3
4	0.3	30	22	73.3	2	6.7
5	0.4	30	23	76.7	3	10.0

表3 不同秋水仙碱处理方法对白术四倍体诱导的影响

Table 3 The effects of different treatment methods of colchicine on inducing autotetraploid of *Atractylodes macrocephala* Koidz.

编号 No.	培养基中的 秋水仙碱浓度 Colchicine concentration in medium (mg/L)	浸泡液中的 秋水仙碱浓度 Colchicine concentration in solution (%)	接种数 Number of inoculated buds	存活数 Number of survived buds	存活率 Rate of survived buds (%)	四倍体植株数 Number of tetraploid	诱导率 Rate of induction (%)
1	20	-	30	28	93.3	1	3.3
2	40	-	30	25	83.3	2	6.7
3	20	0.2	30	20	66.7	4	13.3
4	40	0.2	30	19	63.3	6	20.0

体植株根尖染色体数目为 $2n = 2x = 24$ 条(图 1-A), 与文献报道相符^[5]。四倍体植株根尖染色体数目为 $2n = 4x = 48$ 条, 染色体数增加了 1 倍(图 1-B)。

白术四倍体和二倍体试管苗的形态见图 2。二倍体试管苗正常绿色, 叶面平坦, 较光滑, 叶缘锯齿大小均一, 叶柄细长, 叶脉正常大小, 茎淡绿色; 而多倍体试管苗表现出植株高大, 叶片深绿色、叶表面粗糙增厚、叶柄叶脉粗大, 茎粗壮等外观特征, 显示了多倍体所具有的巨型性特征, 对以根茎为药用部位的白术而言, 为其高产优质药材的生产奠定了基础。

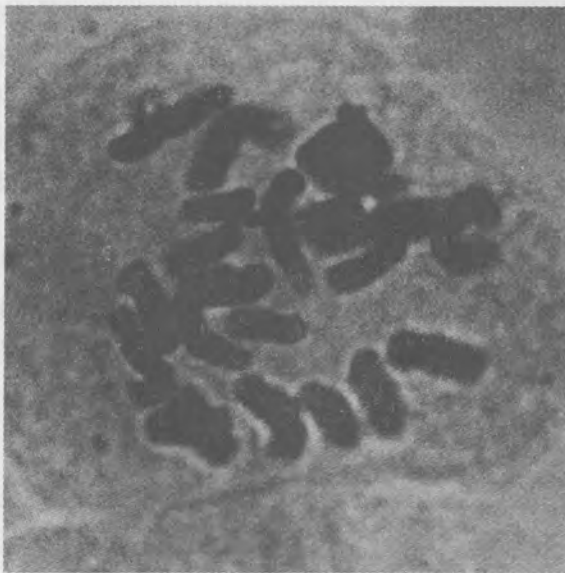
2.3 白术四倍体和二倍体株系过氧化物酶同工酶酶谱比较

白术四倍体和二倍体的 POD 同工酶酶谱图见图 3。由图 3 可见, 白术二倍体具有 8 条谱带, 与二倍

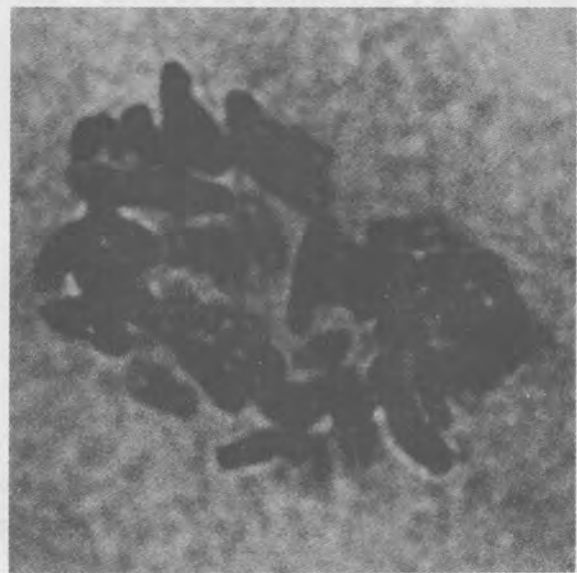
体相比, 8 个四倍体株系酶谱都出现了 R_f 0.310 的新谱带; E32、D103、G24、F16、E14 和 E91 6 个四倍体株系还增加了 R_f 0.466 的新谱带; 而 G24 和 G78 则缺失了 R_f 0.457 的谱带; D4、F16、G78 和 E91 则缺失了 R_f 0.500 的谱带; 这说明染色体加倍后, 白术四倍体 POD 同工酶的种类发生了改变。此外, 不同四倍体株系之间同工酶谱种类也不相同。

2.4 白术二倍体与四倍体过氧化物酶活性的比较

白术二倍体与 8 个四倍体株系总过氧化物酶比活力的比较结果见图 4。实验结果表明, 白术四倍体与二倍体的 POD 比活力差别很大。其中 D4、E32、D103 和 G24 株系的 POD 比活力小于二倍体, 而 F16、E14、G78 和 E91 株系的 POD 比活力大于二倍体。



A

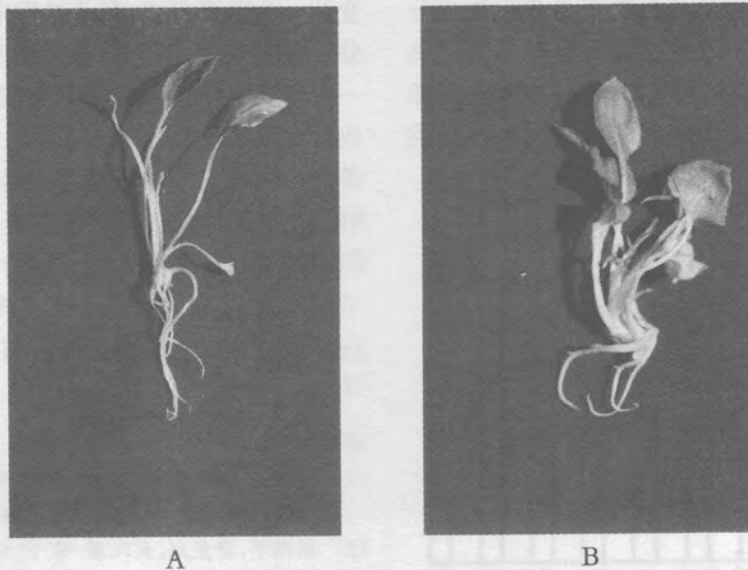


B

A: 二倍体 diploid B: 同源四倍体 autotetraploid

图 1 白术四倍体和二倍体试管苗根尖染色体鉴定比较

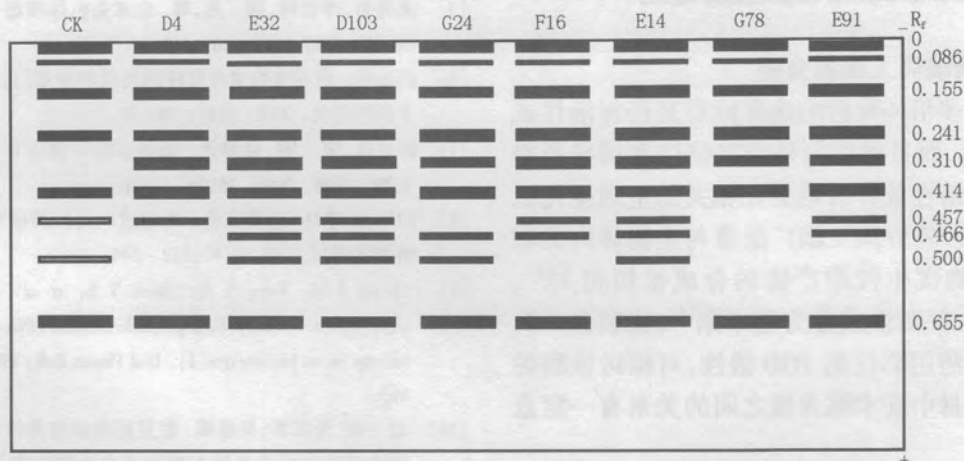
Fig. 1 Comparison of chromosome determination between autotetraploid and diploid plantlets of *Atractylodes macrocephala* Koidz.



A: 二倍体 diploid B: 同源四倍体 autotetraploid

图 2 白术四倍体和二倍体试管苗形态比较

Fig. 2 Comparison of appearance between autotetraploid and diploid plantlets of *Atractylodes macrocephala* Koidz.



CK: 二倍体株系 diploid line; D4, E32, D103, G24, F16, E14, G78, E91: 四倍体株系 autotetraploid lines

图 3 白术四倍体与二倍体试管苗过氧化物酶(POD)同工酶酶谱

Fig. 3 Patterns of POD isoenzymes of autotetraploid and diploid plantlets of *Atractylodes macrocephala* Koidz.

3 讨 论

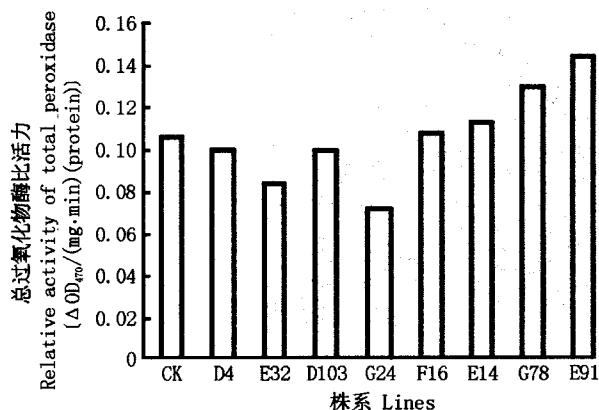
3.1 白术多倍体的诱导

优良品种的选育是提高中药材质量和产量的有效途径,近年来国内外对药用植物多倍体育种研究较多^[6],其中秋水仙碱是目前公认的最有效的多倍体诱导剂^[7]。目前,一般只单独采用秋水仙碱浸泡

或在培养基中添加秋水仙碱的方法对材料进行多倍体诱导,而本文采用这 2 种方式相结合的方法,在白术四倍体诱导中取得了较好的效果,诱导率达到了 20%,比单一方法的诱导率提高了 50%。这可能是由于当白术在较高浓度的秋水仙碱溶液中浸泡后,其中大部分没有诱导产生多倍体的丛生芽,再接种于添加了 40 mg/L 秋水仙碱的培养基中时,比直接接种于含秋水仙碱的培养基中更易诱导出多倍体,使

诱导率有了较大的提高。

由于多倍体育种对增加药材的产量和有效成分的含量都有较好的效果,因此在优良品种培育上具有极大潜力。本研究已得到的45个白术多倍体株系,为进一步选育出优质高产量的白术新品种提供了宝贵的原始材料。



CK: 二倍体株系 diploid line; D4, E32, D103, G24, F16, E14, G78, E91: 四倍体株系 autotetraploid lines

图4 白术四倍体和二倍体试管苗过氧化物酶比活力的比较
Fig. 4 Comparisons of POD relative activities between autotetraploid and diploid plantlets of *Atractylodes macrocephala* Koidz.

3.2 过氧化物酶同工酶的分析

药用植物多倍体育种的选育标准是药材活性成分含量的高低,而目前国内外对二倍体和诱导所得的多倍体间与活性成分含量变化相关的生理生化机制的研究很少。POD同工酶广泛参与生物体内的物质代谢,与植物次生代谢产物的合成密切相关^[8]。据报道,白术主要活性成分为苍术酮^[9],比较白术四倍体和二倍体药用部位的POD活性,对探讨该酶的活性与白术药材中苍术酮含量之间的关系有一定意义。

本研究发现,与二倍体相比,白术四倍体POD同工酶谱都出现了一条新谱带R₁ 0.310,而且酶谱的其他谱带也不尽相同;四倍体总过氧化物酶的比活性变

化也很大。植物多倍化过程是引发基因表达状况改变的一个重要方式,在此过程中的染色体重排、基因分化和重复基因组的表达使基因表达的直接产物——酶发生变化,最终引起不同株系的产量和有效成分含量的改变^[10,11],这为优良品种的形成创造了条件。由染色体加倍引起的四倍体POD种类和活性的变化与其生长代谢的差异及化学成分含量变化之间的相关性仍有待于进一步的论证。将白术POD同工酶的比较与有效成分测定筛选结果结合起来,为白术多倍体快速选育提供植物生理生化上的理论指导。

参考文献:

- [1] 郑虎占,董泽宏,余靖. 中药现代研究与应用(第二卷)[M]. 北京:学苑出版社,1997. 1469-1483.
- [2] 杨翠平,劳业兴,吴凤薇,等. 白术的研究进展[J]. 中药材, 2002,25(3): 206-208.
- [3] 范淑琴. 现代植物生理学实验指南[M]. 北京:科学出版社, 1999. 263-266.
- [4] 张志良. 植物生理学实验指导(第二版)[M]. 北京:高等教育出版社,1990. 154-155.
- [5] 葛传吉,李岩坤,周月,等. 白术染色体核型分析[J]. 云南植物研究,1987,9(1):116-117.
- [6] 高山林. 药用植物遗传育种的现状和展望[J]. 世界科学技术-中药现代化, 2000, 3(6): 58-62.
- [7] 郭启高,宋明,梁国鲁. 植物多倍体诱导育种研究进展[J]. 生物学通报, 2000, 35(2): 8-10.
- [8] 田国忠,李怀方,裘维蕃. 植物过氧化物酶研究进展[J]. 武汉植物学研究, 2001, 19(4): 332-344.
- [9] Hwang J M, Tseng T H, Hsieh Y S, et al. Inhibitory effect of atractylon on tert-butyl hydroperoxide induced DNA damage and hepatic toxicity in rat hepatocytes[J]. Biol Pharm Bull, 1995, 18(3): 407-410.
- [10] 赵剑,朱蔚华,吴蕴祺. 红豆杉组织培养中SINEXANS高产细胞系Ts19的几种同工酶的动态比较研究[J]. 西北植物学报, 1998, 18(3): 339-347.
- [11] Wendel J F. Genome evolution in polyploids [J]. Plant Mol Biol, 2000, 42: 225-249.