

黄芩愈伤组织培养与快速繁殖条件的优化研究

张东向, 李富雄 (齐齐哈尔大学生命科学与工程学院, 黑龙江齐齐哈尔 161006)

摘要 [目的] 培养黄芩优良品种并进行克隆化快速繁育。[方法] 用黄芩(*Scutellaria baicalensis* Georgi) 无菌根作为外植体进行愈伤组织的诱导、分化, 黄芩试管苗的继代扩大繁殖、生根等一系列优化试验。[结果] MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA 培养基进行愈伤组织的分化培养效果最好; MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA 进行试管苗的复壮效果较好; 最有效的生根培养基为 1/2 MS + 0.3 mg/L NAA, 生根率可达 96.7%。[结论] 采用单节培养的方法, 可以大幅度提高黄芩繁殖速度。

关键词 黄芩; 愈伤组织; 组织培养; 快速繁殖

中图分类号 S336 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)29-12600-02

Callus Culturing and Optimization of Rapid-propagation Technology of *Scutellaria baicalensis* Georgi

ZHANG Dong-xiang et al (College of Life Science and Technology, Qiqihar University, Qiqihar, Heilongjiang 161006)

Abstract [Objective] The research aimed to culture the fine varieties of *Scutellaria baicalensis* Georgi and carry out cloning rapid-propagation. [Method] Research by sterile root explants of *S. baicalensis* Georgi including callus inducing, differentiation, plantlet propagation and rooting were designed. [Result] The results showed that MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA was the best medium for callus differentiation and plantlet rejuvenation. The best medium was 1/2 MS + 0.3 mg/L NAA for rooting, and the rooting rate reached 96.7%. [Conclusion] The propagation rate could be improved using single node for *S. baicalensis* Georgi.

Key words *Scutellaria baicalensis* Georgi; Callus; Tissue culture; Rapid-propagation

黄芩为唇形科黄芩属植物, 其干燥根是我国的传统中药材, 最早收载于《神农本草经》, 被列为草根药的上品, 中医认为黄芩具有清热燥湿、泻火解毒、止血安胎等功效^[1]。其主要成分黄芩甙(Baicalin)具有抗菌、抗病毒、抗炎、抗氧化、清除氧自由基、抗癌、抗血栓等作用^[2]。近年来, 临床上对黄芩药材的需求量逐年上升, 有限的野生资源遭到了掠夺性采挖, 黄芩的野生资源日益匮乏, 该植物虽系多年生草本植物, 但生长期短, 且繁殖速度慢, 加之少有栽培, 市场上供不应求的矛盾日益尖锐。通过植物组织和细胞培养系统生产药物无疑为解决这一问题提供了有效途径。目前, 不少学者通过用黄芩组织培养解决黄芩的资源短缺问题, 如日本山本久之等将黄芩茎的节间接种于 LS 培养基中, 得到了淡褐色的愈伤组织^[3]; Qin 等用黄芩子叶和下胚轴为外植体, 接种在 MS 培养基上, 经培养可得到愈伤组织, 继续培养, 即可从愈伤组织直接分化出苗, 但分化率较低, 仅为 12%^[4]。黄芩试管苗生根率最高为 41.7%, 而且苗生根少而细弱, 或较短, 生长缓慢。高山林等用黄芩的节、节间容易诱导出愈伤组织, 但是在分化和生根培养时, 长出的试管苗较为瘦弱, 需要添加多效唑(PP₃₃₃)才可长出粗壮的苗^[5]。因此, 该研究以黄芩根诱导的愈伤组织为材料, 对其进行了一系列分化培养基试验, 试管苗的复壮和生根培养基试验, 获得了较好的结果, 对于保护黄芩的野生植物资源, 培养黄芩优良品种并进行克隆化快速繁育, 在尽可能短的时间内繁育出优良品种种苗, 供生产上示范推广具有重要的意义和应用价值。

1 材料与方法

1.1 材料 黄芩种子购于河北省安国市药材市场。

1.2 方法

1.2.1 愈伤组织诱导。选取籽粒饱满的黄芩种子, 用浓度 40 mg/L 赤霉素(GA₃)溶液浸泡 12 h, 打破种子休眠, 然后均匀播种于温室育苗盆中, (25 ± 1)℃ 培养。待苗长到 5 ~ 7 cm

高时, 选取根为外植体, 参照文献[6]的方法将无菌外植体接种于附加浓度 0.2 mg/L 2,4-D 和 2.0 mg/L 6-BA 的 MS 培养基培养基中, (25 ± 1)℃ 暗培养, 诱导愈伤组织。MS 培养基中含蔗糖 3%, pH 值 5.8。

1.2.2 愈伤组织分化。取出在浓度 0.2 mg/L 2,4-D 和 2.0 mg/L 6-BA 的 MS 培养基中继代保存的黄芩愈伤组织切成 0.064 cm³ 的小块, 分别接种到附加不同浓度 6-BA 及 NAA 的 MS 培养基中, 其中含蔗糖 3%, pH 值 5.8, 培养条件为每天光照 16 h, 光强 1 200 lx, 培养温度(25 ± 1)℃。

1.2.3 黄芩试管苗复壮。将在 MS + 2 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA 培养基中继代保存的黄芩试管苗切成带一个节的小段, 再接种于附加不同浓度 6-BA 及 NAA 的 MS 中, 其中蔗糖为 5%, pH 值为 5.8, 培养条件同上。

1.2.4 黄芩试管苗生根。将黄芩试管苗切成带 1 ~ 2 个节的小段, 分别接种于附加不同浓度 NAA 的 1/2 MS 培养基上, 培养条件同上。

2 结果与分析

2.1 不同激素配比对黄芩愈伤组织分化的影响 将暗培养中的黄芩愈伤组织转入分化培养基后, 8 ~ 9 d 愈伤组织开始转绿, 约 20 d 时表面出现绿色的芽点, 继续培养便陆续形成小植株。培养中的黄芩愈伤组织生长情况见图 1, 分化培养



图 1 培养中的黄芩愈伤组织

Fig. 1 Callus of *S. baicalensis* during culture

基金项目 黑龙江省骨干教师项目。

作者简介 张东向(1963-), 男, 辽宁义县人, 硕士, 教授, 从事植物生理学研究。

收稿日期 2008-07-15

的黄芩愈伤组织生长情况见图 2 与图 3,不同激素配比对愈

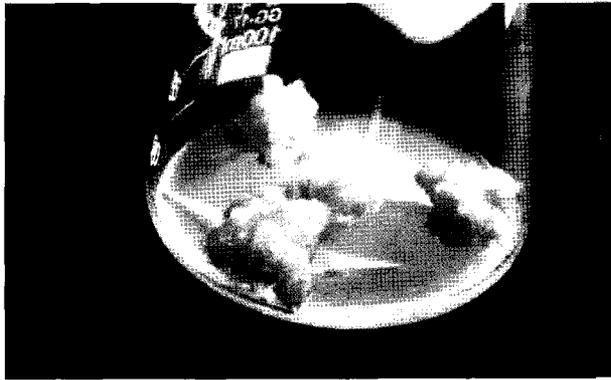


图 2 分化培养 10 d 的黄芩愈伤组织

Fig. 2 Callus of *S. baicalensis* after differentiation culture for 10 d 伤组织分化的影响见表 1。由表 1 可知,当 6-BA 和 NAA 的

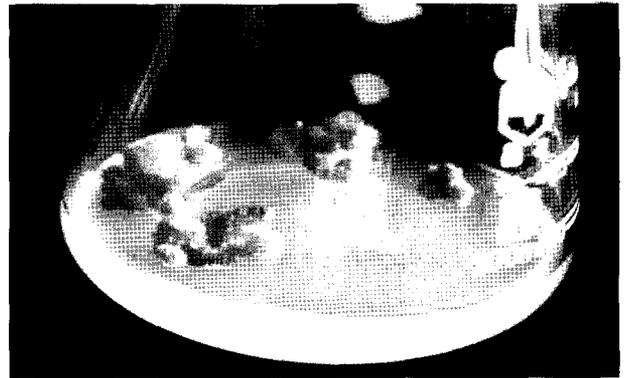


图 3 愈伤组织分化出大量丛生芽

Fig.3 Multiple shoot induced from callus

浓度分别为 2.0 和 0.2 mg/L 时,分化所需的时间短,分化率高,且叶片鲜绿,苗粗壮,因此黄芩愈伤组织分化培养的

表 1 6-BA 与 NAA 的不同配比对黄芩愈伤组织分化的影响

Table 1 Effects of different combinations of 6-BA and NAA on callus differentiation of *S. baicalensis*

培养基编号 Culture medium code	6-BA 浓度//mg/L 6-BA concentration	NAA 浓度//mg/L NAA concentration	接种数 Inoculated number	成芽时间//d Budding time	得苗数//株 Seedling number	植株形状 Plant shape
1	1.0	0.1	30	25	15	细弱 Thin and weak
2	1.0	0.2	30	25	15	细弱 Thin and weak
3	1.0	0.3	30	25	15	细弱 Thin and weak
4	1.5	0.1	30	24	18	细弱 Thin and weak
5	1.5	0.2	30	23	16	细弱 Thin and weak
6	1.5	0.3	30	24	15	细弱 Thin and weak
7	2.0	0.1	30	23	20	粗壮 Wide and strong
8	2.0	0.2	30	20	22	粗壮 Wide and strong
9	2.0	0.3	30	22	15	粗壮 Wide and strong
10	2.5	0.1	30	24	15	细弱 Thin and weak
11	2.5	0.2	30	24	14	细弱 Thin and weak
12	2.5	0.3	30	25	16	细弱 Thin and weak

最佳培养基为 MS + 2.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA。

2.2 不同激素配比对黄芩试管苗扩大繁殖的影响(表 2) 为了扩大黄芩繁殖系数,同时尽量减少黄芩试管苗在扩大繁殖过程中发生变异的可能性,在已经建立的愈伤组织培养产生丛生苗的基础上,采用单节培养(Single-node Culture)方法进行试管苗的继代及扩大繁殖试验,将从生芽诱导获得的黄芩试管苗按每个节切成段,接种在繁殖培养基上,15 d 后,节上的侧芽启动并发育成植株,这一繁殖方法,使黄芩的繁殖系数在原来的基础上提高了 4~5 倍。

表 2 6-BA 与 NAA 的不同配比对黄芩试管苗扩大繁殖的影响

Table 2 Effects of different combinations of 6-BA and NAA on *in vitro* reproduction of *S. baicalensis*

培养基编号 Culture medium code	6-BA 浓度 mg/L 6-BA concentration	NAA 浓度 mg/L NAA concentration	接种数 Inoculated number	幼芽萌发天数 d Germination days of budlet
1	2.0	0	90	11
2	2.0	0.1	90	10
3	2.0	0.2	90	8~9
4	2.0	0.3	90	12

2.3 NAA 对黄芩试管苗生根的影响 待扩大繁殖的黄芩试管苗侧芽长到 2~3 cm 时,可将此部分取出,接种于生根培养基中,生根培养基为 1/2 MS 培养基附加浓度 0.1~0.4

mg/L 的 NAA,15 d 后观察生根的情况,发现 1/2 MS + NAA 0.3 mg/L 培养基对苗生根最为有利,生根率达 90% 以上,每苗约 5~6 条根,根粗壮(图 4)。其他培养基上的生根情况均不如上述培养基生根效果好(表 3),生根率均没有超过 80.0%,生根慢,根细长。因此,采用 1/2 MS + 0.3 mg/L NAA 培养基诱导黄芩生根最佳。



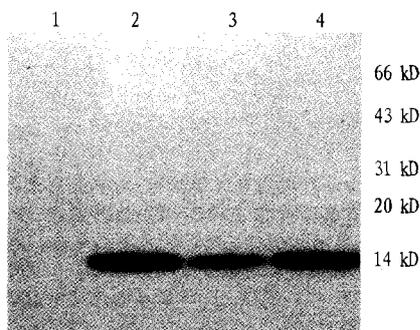
图 4 试管苗分化出的根

Fig. 4 Root differentiated from tube seedling

3 讨论

该试验优化了黄芩组织培养克隆技术,结果表明:在试 (下转第 12621 页)

中未见有反应条带,表明所制备的抗体与 REF 特异结合。



注:1 为 pDEST17/REF 未诱导表达;2 为 pDEST17/REF 诱导表达;3 为纯化的 REF 重组蛋白;4 为橡胶粒子总膜蛋白。

Note:1 means the pDEST17/REF non-induced expression; 2 means the pDEST17/REF induced expression; 3 means the purified recombination protein REF; 4 means the total membrane protein in rubber particles

图3 Western blot 检测分析鼠抗 REF 抗体的特异性

Fig. 3 Western blot hybridization of the specificity of anti-mouse REF antibody

3 结论与讨论

利用 Gateway 技术构建表达载体可以避免极为耗时的克隆和亚克隆步骤。采用比常规 Gateway 技术更省时简便的 Gateway 一管法技术,当目的片段插入 Gateway 载体后得到进入克隆(entry clone),可进一步用于原核和真核等表达载体的构建,具有稳定、快速、高效等优点^[9]。该研究采用 pDEST17 构建表达载体,以 L-阿拉伯糖作诱导剂,用 BL21-AI 作为表达宿主菌成功高效表达出 REF 重组蛋白。所得抗体与原核表达的重组蛋白和橡胶粒子膜蛋白都有特异性的结合,而与细菌成分无交叉反应,说明多克隆抗体是高效特异的。

已有证据表明,橡胶粒子表面的某些蛋白质跟橡胶生物合成直接相关。研究显示橡胶转移酶催化 IPP (isopentenyl pyrophosphate) 顺式聚合掺入到橡胶链上,并在有胶乳中的

其它非橡胶粒子蛋白的参与下合成高分子量的天然橡胶分子^[5]。而 REF 和 SRPP 在天然橡胶生物合成中可能起着协助将 IPP 添加到异戊二烯单元上,使橡胶分子延长的作用^[2-3],最近还发现橡胶延长因子(REF)可以结合 i 异戊烯基二磷酸合酶(isoprenoid diphosphates, IPPS)^[9]。Cornish K^[1]曾提出假说认为在橡胶粒子表面可能存在橡胶转移酶复合物。但是橡胶粒子表面的膜蛋白之间的相互作用以及橡胶粒子膜上是否存在蛋白复合物等问题都还有待进一步深入研究。该研究所制备的 REF 高效特异抗体以及其他橡胶粒子膜蛋白(如 HRT、SRPP)的特异抗体,为研究巴西橡胶树橡胶粒子膜上蛋白之间的相互作用提供了有效的研究工具,也将有助于阐明天然橡胶生物合成的分子机理、橡胶粒子的结构及其发生发育过程的分子机制。

参考文献

- [1] CORNISH K. Similarities and differences in rubber biochemistry among plant species[J]. *Phytochemistry*, 2001, 57(7):1123-1134.
- [2] DENNIS M S, LIGHT D R. Rubber elongation factor from *Hevea brasiliensis*. Identification, characterization, and role in rubber biosynthesis[J]. *J Biol Chem*, 1989, 264(31):18608-18617.
- [3] OH S K, KANG H, SHIN D H, et al. Isolation, characterization and functional analysis of a novel cDNA clone encoding a small rubber particle protein from *Hevea brasiliensis*[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(24):17132-17138.
- [4] 彭世清,陈守才. 巴西橡胶树 43kD 橡胶粒子膜蛋白基因的 cDNA 克隆及表达[J]. *植物生理与分子生物学学报*, 2004, 30(3):325-330.
- [5] ASAWATRERATANAKUL K, ZHANG Y W, WITTITSUWANNAKUL D, et al. Molecular cloning, expression and characterization of cDNA encoding cis-prenyltransferases from *Hevea brasiliensis*. A key factor participating in natural rubber biosynthesis [J]. *Eur J Biochem*, 2003, 270:4671-4680.
- [6] DENNIS M S, HENZEL W J, BELL J, et al. Amino acid sequence of rubber elongation factor protein associated with rubber particles in *Hevea latex* [J]. *J Biol Chem*, 1989, 264(31):18618-18626.
- [7] 黄贵修,吴坤鑫,陈守才. 一种改良的橡胶树胶乳总 RNA 提取方法[J]. *华南热带农业大学学报*, 2002(4):1-4.
- [8] NALLAMSETTY S, AUSTIN B P, PENROSE K J, et al. Gateway vectors for the production of combinatorially tagged His6-MBP fusion proteins in the cytoplasm and periplasm of *Escherichia coli*[J]. *Protein Sci*, 2005, 14(12):2964-2971.
- [9] DEGRAW A J, ZHAO Z, STRICKLAND C L, et al. A photoactive isoprenoid diphosphate analogue containing a stable phosphonate linkage: synthesis and biochemical studies with prenyltransferases [J]. *J Org Chem*, 2007, 72(13):4587-4595.

(上接第 12601 页)

表3 不同浓度的 NAA 对黄芩生根的影响

Table 3 Effects of different concentrations of NAA on the rooting of *S. baicalensis*

培养基编号 Culture medium code	NAA mg/L	接种茎芽数//个 Inoculated culm buds	生根数//棵 Rooting number	生根率//% Survival rate
1	0.1	30	21	70.0
2	0.2	30	23	77.0
3	0.3	30	29	96.7
4	0.4	30	24	80.0

管苗扩大繁殖中,采用单节培养的方法,可以大幅度提高黄芩繁殖速度,从而达到大量克隆化生产;在分化培养时,只在 MS 固体培养基中添加了较为常用的浓度 2.0 mg/L 6-BA 和浓度 0.2 mg/L NAA,不需要添加多效唑(PP₃₃₃),并且分化出的试管苗较为粗壮;只在 1/2 MS 添加浓度 0.3 mg/L NAA 就

可以使生根率达到 96.7%,且根多而壮,成活率特别高,也不用添加多效唑(PP₃₃₃),较为经济,可在以后的生产上有效地应用;分化培养 20 d 就可以分化出芽,而生根培养 15 d 就可以长出 0.5 cm 长的根,所需的时间不是很长。

参考文献

- [1] 南京药学院,江苏生物研究所. 中国医学科学院药物研究所药志(第一册)[M]. 北京:人民卫生出版社,1959:546.
- [2] 许文杰,丁启龙. 黄芩素的药理学研究进展[J]. *江苏药学与临床研究*, 2006, 15(2):25-39.
- [3] HISAKA Y, NOBUYASU C, KUME W, et al. Effect of carbon sources on the growth and flavonoid formation of *Scutellaria baicalensis* stem callus cultures [J]. *J Pharmacog*, 1986, 40(1):19.
- [4] QIN J S, WANG L, CHEN S P. Preliminary studies on organo-genesis in *Scutellaria baicalensis* [J]. *Plant Physiol*, 1985(6):38.
- [5] 高山林,陈柏君. 黄芩组织培养快速繁殖技术的优化[J]. *中草药*, 2004, 35(3):312-315.
- [6] 张东向. 培养条件对齿瓣延胡索乙酸愈伤组织生长及延胡索乙酸含量的影响[J]. *植物研究*, 2003, 23(1):86-90.