

黄芩愈伤组织培养及细胞形态学观察

李康, 张东向, 张磊, 康凤林

(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: 采用不同的植物激素、碳源、水解乳蛋白(LH)和水解酪蛋白(CH)、光暗条件对黄芩愈伤组织进行培养, 通过石蜡切片观察愈伤组织细胞形态。结果表明: 0.5 mg/L NAA 和 2.0 mg/L Kt 组合时愈伤组织生长量最多; 1.0 mg/L 2,4-D 和 0.5 mg/L Kt 组合时, 黄芩甙含量最高; 蔗糖为 2%, 葡萄糖为 3% 或 4% 时, 都不利于黄芩甙的积累; LH、CH、黑暗条件能促进愈伤组织的生长而不利于黄芩甙的积累; 光照能显著提高黄芩甙的含量; 胚性愈伤组织占优势, 已出现明显的微管组织的分化。

关键词: 黄芩; 黄芩甙; 石蜡切片; 胚性愈伤组织

中图分类号: Q 943.1

文献标识码: A

文章编号: 1007-984X(2007)01-0112-04

黄芩 (*Scutellaria Baicalensis* Georgi) 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, Bai) 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, 黄芩的药用量逐年上升, 有限的野生资源遭到了掠夺性采挖。目前, 植物组织培养技术在保护黄芩野生资源大量生产有效药用成分方面充分显示出了优势。有关黄芩的组织培养已有报道^[3], 但利用植物组织培养技术生产黄芩有效成分黄芩甙的报道很少。本研究以黄芩根诱导的愈伤组织为材料, 研究植物激素、碳源、水解乳蛋白、水解酪蛋白、光暗条件对黄芩愈伤组织生长和细胞中 Bai 含量的影响。采用石蜡切片方法对愈伤组织进行细胞形态学观察, 以期进一步研究各种条件因子对愈伤组织形态发生的胚状体途径的影响, 为悬浮培养大量生产黄芩甙和植株再生研究提供基础材料。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验材料及主要试剂

黄芩种子购于河北省安国市药材市场, 黄芩甙标准品购于昆明风山渐医药研究有限公司。

1.1.2 培养基

M_0 : 附加 0.2 mg/L 2,4-D 和 2.0 mg/L 6-BA 的 MS 培养基; M_1 : 附加 1.0 mg/L 2,4-D 和 2.0 mg/L Kt 的 MS 培养基; M_2 : 附加 1.0 mg/L 2,4-D 和 2.0 mg/L 6-BA 的 MS 培养基。 M_0 , M_1 , M_2 中蔗糖为 3%, 琼脂为 1%, pH 为 5.8。

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 40 mg/L 赤霉素 (GA_3) 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 °C 培养。待苗长到 5 ~ 7 cm 时, 选取根为外植体, 参照文献[4]的方法将无菌外植体接种于诱导培养基 M_0 中, 25 ± 1 °C 暗培养诱导愈伤组织。

1.2.2 实验设计

1.2.2.1 植物激素的作用

收稿日期: 2006-09-14

基金项目: 黑龙江省普通高等学校骨干教师创新能力资助计划项目(1054G066), 黑龙江省研究生创新科研资金项目

作者简介: 李康 (1982-), 男, 山西省忻州市人, 在读硕士研究生, 主要从事植物细胞工程和次生代谢调控方面的研究, E-mail: likang_82@163.com。

以 MS 为基本培养基, 选取 2 种生长素 (2,4-D 和 NAA) 和 2 种细胞分裂素 (6-BA 和 Kt), 研究生长素与细胞分裂素对黄芩愈伤组织生长及 Bai 含量的影响。以 M_0 中生长的愈伤组织为对照 CK, 见图 1。

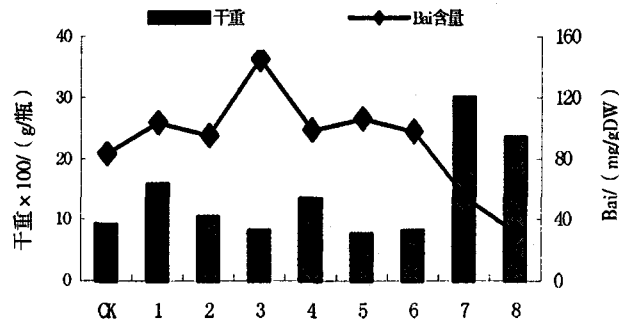


图 1 植物激素对黄芩愈伤组织生长及 Bai 含量的影响

1—2,4- $D_{0.5}$ +Kt₁; 2—2,4- $D_{0.5}$ +Kt₂; 3—2,4- D_1 +Kt_{0.5}; 4—2,4- D_1 +Kt₂
5—2,4- D_2 +Kt_{0.5}; 6—2,4- D_2 +Kt₂; 7—NAA_{0.5}+Kt₂; 8—NAA₂+6-BA_{0.5}
注: 下标表示所使用的浓度, mg/L。

1.2.2.2 碳源的作用

以 M_0 为基本培养基, 研究碳源对黄芩愈伤组织生长及 Bai 含量的影响。CK 同 1.2.2.1, 见图 2。

1.2.2.3 LH 和 CH 的作用

以 M_1 为基本培养基, 研究 LH、CH 对黄芩愈伤组织生长及 Bai 含量的影响。CK 同 1.2.2.1, 见图 3。

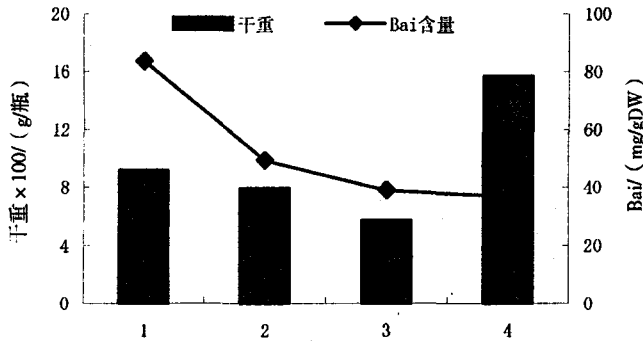


图 2 碳源对黄芩愈伤组织生长及 Bai 含量的影响

1—3%蔗糖; 2—2%蔗糖; 3—3%葡萄糖; 4—4%葡萄糖

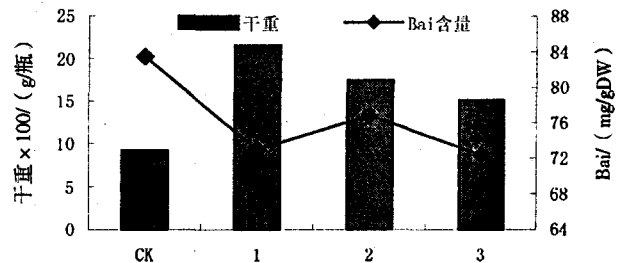


图 3 LH 和 CH 对黄芩愈伤组织生长及 Bai 含量的影响

1—LH₅₀; 2—CH₅₀; 3—LH₂₀₀+CH₅₀

注: 下标表示所使用的浓度, mg/L。

1.2.2.4 黑暗和光照的影响

将 M_2 培养基中的黄芩愈伤组织分别置于光照和黑暗条件下, 研究光照和黑暗对黄芩愈伤组织生长及 Bai 含量的影响, 见图 4。

1.2.3 石蜡切片的制作

常规石蜡切片方法, 采用席夫试剂-爱氏苏木精复染法进行染色。

1.2.4 生理生化指标测定

1.2.4.1 标准曲线绘制

参照韩会玲^[5]的方法。当黄芩甙标准品浓度在 0~60 $\mu\text{g/ml}$ 范围内时, 浓度 C ($\mu\text{g/ml}$) 与吸光值 A 呈良好的线性关系。线性回归得标准方程为 $C=20.193A-1.2387$, $R^2=0.996$ 。

1.2.4.2 鲜重和干重测定

愈伤组织鲜重直接在天平上称取。鲜培养物 60℃ 烘至恒重, 测干重。

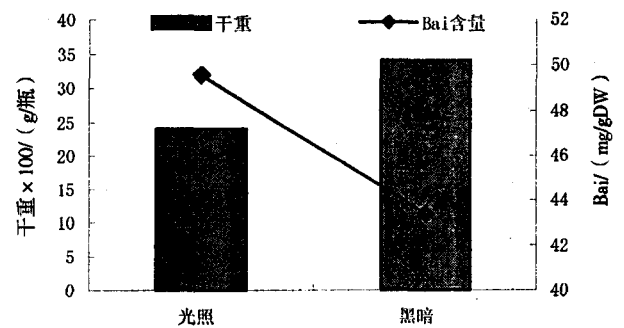


图 4 光暗条件对黄芩愈伤组织生长及 Bai 含量的影响

1.2.4.3 黄芩甙含量测定

愈伤组织 60℃烘至恒重, 研成粉末, 50 目过筛。称取适量干燥的愈伤组织, 加入 50%乙醇, 50℃温浴 5~6 h。冷却后用 50%乙醇定容。摇匀, 静置澄清后取上清液稀释适当倍数作为待检样。用 UV755B 型紫外-可见分光光度计测定 278 nm 处光吸收值 A_{278} 。取 50%乙醇稀释与待检样相同倍数后作对照。依据标准方程计算黄芩甙浓度 C 。根据 $Y = (C \times \text{稀释倍数} \times \text{提取液体积}) / \text{干重}$, 计算培养物中黄芩甙的含量。

2 结果与讨论

2.1 植物激素对黄芩愈伤组织生长及 Bai 含量的影响

植物激素在植物组织培养中起着十分重要的作用。激素种类、浓度及其配比对于协调细胞生长、分化和代谢起重要作用。如图 1, 2,4-D 和 Kt 浓度比为 0.5 时, 对愈伤组织生长有促进作用, 高于或低于此浓度比时, 对愈伤组织的生长没有太大的影响。NAA 与 Kt 或 6-BA 配合使用时, 都能显著促进愈伤组织的生长, 最高为 CK 的 3.26 倍。2,4-D 和 Kt 配合使用时能显著提高愈伤组织中 Bai 含量。当 2,4-D 为 1.0 mg/L, Kt 为 0.5 mg/L 时, Bai 含量最高为 144.50 mg/g DW, 是 CK 的 1.73 倍。NAA 与 Kt 或 6-BA 配合使用时, 不利于 Bai 在细胞内的积累, 但有利于愈伤组织根的分化 (见图 5)。



图 5 分化出根的愈伤组织

2.2 碳源对黄芩愈伤组织生长及 Bai 含量的影响

糖类在组织培养过程中, 除作为碳源为细胞提供合成新化合物的碳骨架及能源外, 还起到维持细胞渗透压的作用。如图 2, 分别以 2%蔗糖, 3%葡萄糖和 4%葡萄糖代替 3%蔗糖, 结果表明 3 种糖浓度中只有 4%葡萄糖显著地促进愈伤组织的生长。三者都不利于愈伤组织中 Bai 的积累。说明 3%蔗糖已经完全能够满足细胞生长的需要, 低的蔗糖浓度或直接提供高浓度的单糖对细胞内的 Bai 积累都是不利的。

2.3 LH 和 CH 对黄芩愈伤组织生长及 Bai 含量的影响

LH 和 CH 中含有丰富的氨基酸和细胞生长因子, 可以促进愈伤组织的生长和产物的合成与分泌, 并起到降低褐化发生的作用。但两者的成分复杂, 在不同植物中的作用也不尽相同。如图 3, 与对照相比, MS 培养基中添加一定浓度的 LH、CH 能显著促进愈伤组织的生长。450 mg/L LH 对愈伤组织生长的促进作用最大。MS 培养基中添加 LH、CH 不利于细胞中 Bai 含量的积累。LH、CH 单独作用比配合使用更有利于促进细胞生长和细胞中 Bai 含量的提高。

2.4 光暗条件对黄芩愈伤组织生长及 Bai 含量的影响

在愈伤组织生长的整个周期中, 细胞生长和代谢产物的合成竞争性地利用细胞中有限的资源。光照下细胞代谢活动增强, 代谢产物不断积累, 而细胞的生长受到了抑制。相反, 黑暗下细胞的代谢活动受到抑制, 合成的有用物质主要用于细胞的生长。如图 4, 黑暗条件下愈伤组织干重明显高于光照条件下的; 而光照条件下细胞中 Bai 含量高于黑暗条件下的。说明黑暗条件有利于愈伤组织的生长, 光照条件却有利于细胞内 Bai 的积累。所以在组织培养中, 要有意识地调节光暗周期以控制细胞的生长和代谢产物合成。

2.5 愈伤组织细胞形态学观察

2.5.1 胚性愈伤组织和非胚性愈伤组织

石蜡切片观察结果表明: 黄芩愈伤组织可以分为两种类型。一类细胞较大, 核相对较小, 细胞质不浓, 核质比低, 染色较浅, 压之成块状, 由非胚性细胞组成, 称为非胚性愈伤组织, 无法形成体胚 (见图 6); 另一类细胞较小, 核大, 细胞质浓, 核质比高, 细胞内的细胞核被爱氏苏木精染成紫黑色, 由胚性细胞组成, 称为胚性愈伤组织, 容易形成胚状体 (见图 6)。从切片中可以观察

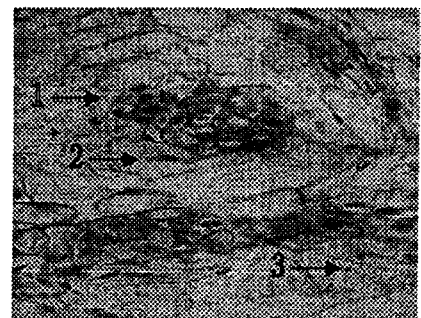


图 6 愈伤组织石蜡切片

1——胚性细胞; 2——非胚性细胞;
3——已分化出的微管组织

到,体细胞胚既可以产生于愈伤组织的内部,也可以产生于愈伤组织表面,有时表面和内部会同时产生体细胞胚。

2.5.2 愈伤组织内微管组织的分化

从石蜡切片可以看到愈伤组织已出现明显的微管组织的分化(见图6),呈螺旋状,多分布在胚性愈伤组织周围,有利于营养物质和水分的吸收和运输。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中国药典一部[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [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, 14(2): 35-39.
- [3] 吴晓玲, 胡海英, 邓光存等. 黄芩愈伤组织诱导条件的研究[J]. 生物技术, 2005, 15(2): 77-79.
- [4] 张东向. 培养条件对齿瓣延胡索愈伤组织生长及延胡索乙素含量的影响[J]. 植物研究, 2003, 23(1): 86-90.
- [5] 韩会玲, 宋小妹, 张选军. 黄芩甙提取工艺的改进[J]. 陕西中医学院学报, 1997, 20(4): 35-36.

Callus culturing and cytomorphology observation of *Scutellaria Baicalensis*

LI Kang, ZHANG Dong-xiang, ZHANG Lei, KANG Feng-lin

(College of Life Science and Technology, Qiqihar University, Heilongjiang Qiqihar 161006, China)

Abstract: Callus of *Scutellaria Baicalensis* was treated by plant hormone, carbon source, lactalbumin hydrolysate(LH), casein hydrolysate(CH), illumination and dark. Cytomorphology was observed by paraffin embedded section. The results show that 0.5mg/L NAA and 2.0mg/L Kt effectively increased yield of callus; the highest baicalin content was achieved at 1.0mg/L 2,4-D and 0.5mg/L Kt; sucrose at 2% and glucose at 3% or 4% did not favor accumulation of baicalin; LH, CH and dark increased yield of callus but had depressing effects on accumulation of baicalin; illumination could raise baicalin content; embryogenic callus was dominant; the obvious differentiation of microtubule tissue was found in callus.

Key words: *Scutellaria Baicalensis*; baicalin; paraffin embedded section; embryogenic callus