

文章编号: 1007-9831 (2007) 06-0056-04

# 黄芩的组织培养及遗传转化研究

王蕊, 张东向, 张磊

(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:** 就黄芩在细胞染色体观察、组织培养与次生代谢产物诱导条件, 多倍体诱导, 品种鉴定和遗传转化技术等方面研究进展做了综述. 对今后的主要研究方向和可能的研究热点做了预测, 旨在为中草药生物技术研究 and 开发提供基础资料.

**关键词:** 黄芩; 组织培养; 遗传转化

**中图分类号:** Q813.1<sup>+</sup>2      **文献标识码:** A

中药黄芩为唇形科植物黄芩 (*Scutellaria baicalensis* Georgi) 的干燥根, 具有清热燥湿、泻火解毒、止血安胎等功效. 近年来随着对其活性成分的研究, 发现其能够抗菌、抗病毒、抗炎、抗氧化, 清除氧自由基, 并具有抗癌、抗肿瘤、抗血栓形成和保护肝脏、心脑血管等作用<sup>[1]</sup>. 目前关于黄芩的药用价值已有很多报道, 随着遗传学的发展, 近年来人们对黄芩的遗传学研究也不断深入. 本文主要从组织培养、遗传多样性、分子水平等方面综述了近年来国内外对黄芩的遗传学研究工作进展.

## 1 黄芩组织培养方面研究

### 1.1 黄芩细胞染色体研究

染色体是遗传物质的载体, 是基因的携带者, 与形态学变异不同, 染色体变异 (畸变) 必然导致遗传变异的发生, 是生物遗传变异的重要来源. 从细胞学角度来看, 染色体是植物遗传基因的载体, 其数目和形态是植物体内比较稳定的重要特征, 把染色体分类学的方法和技术应用于中草药研究, 可为药用植物及中药材的鉴定提供比较可靠的客观指标. 唐晓清<sup>[2]</sup>等对黄芩根尖预处理方法进行优化并做了核型分析. 通过采用不同取样时间和方法对黄芩根尖进行预处理, 观察黄芩染色体收缩程度、分散度、着丝点清晰度以及染色体所处分裂时期. 确定了黄芩有丝分裂中期分裂相所在高峰期, 探讨了黄芩根尖的最佳预处理方法为用 0.002 mol/L 8-羟基喹啉对黄芩根尖进行离体处理 3 h, 所得染色体分散度较高, 收缩长度适宜. 核型公式为  $2n=2x=18=10m+6sm+2st$ , 染色体基数为 9.

### 1.2 黄芩愈伤组织诱导及类黄酮含量的研究

组织培养技术是在无菌条件下, 将离体的植物器官 (如根尖、茎尖、叶、花、未成熟的果实和种子等)、组织 (如形成层、花药组织、胚乳、皮层等)、细胞 (如体细胞、生殖细胞等)、胚胎 (如成熟和未成熟的胚)、原生质体 (如脱壁后仍具有生命活力的原生质体), 培养在人工配制的培养基上, 给予适宜的培养条件, 从而诱发产生愈伤组织或潜伏芽或形成完整的植株. 黄芩属于多年生草本植物, 生长缓慢, 远远不能满足市场对黄芩的需求, 同时也限制了黄芩的深度开发和利用. 因此, 植物细胞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.

目前已有许多关于黄芩组织培养技术的报道. 吴晓玲<sup>[3]</sup>等以黄芩的子叶、真叶和下胚轴为外植体, 对黄芩愈伤组织诱导条件进行研究. 通过利用不同激素组合的 MS 培养基分别在黑暗和光照条件下诱导愈伤组

收稿日期: 2007-07-30

作者简介: 王蕊 (1983-), 女, 黑龙江大庆人, 在读硕士, 从事植物次生代谢调控和遗传转化方面研究. E-mail: wangrui-0212@163.com

通讯作者: 张东向 (1963-), 男, 黑龙江齐齐哈尔人, 教授, 硕士生导师, 从事植物生理学与植物生物技术研究. E-mail: zhangdx1019@163.com

织,得出诱导黄芩愈伤组织的最好外植体为真叶,在黑暗条件下各激素处理的愈伤组织诱导率和愈伤组织增质量均高于光照条件下,而褐化率低于各处理,并且诱导出的愈伤组织较光照下松散,适合于细胞培养;并确定了最佳培养基成分为: M6 (MS + 2, 4-D (0.5 mg/L) + 6-BA (1 mg/L) + NAA (0.5 mg/L)), 此培养基其褐化率为0, 诱导率高达100%, 是黄芩愈伤组织诱导的最佳激素配比。

高山林<sup>[4]</sup>等在组织培养条件下对黄芩进行愈伤组织的诱导、分化,并进行了试管苗复壮和生根等一系列技术优化试验。发现黄芩试管苗的节、节间都很容易诱导出愈伤组织,诱导率均达100%。在培养基中适当添加PP333能显著改善试管苗的质量;PP333与激素的配合使用,能有效地调控黄芩愈伤组织的分化,试管苗的生长与生根,并能显著提高移栽成活率。

李康<sup>[5]</sup>等采用均匀设计法,以黄芩甙含量为主要考察指标,对黄芩愈伤组织生长的MS培养基成分进行多因素多水平考察。确定了最佳培养基为MS附加0.25 mg/L NAA, 0.5 mg/L 6-BA, 17 g/L 葡萄糖和35 g/L 蔗糖。最佳培养基黄芩甙含量为27.44 mg/g DW。实验表明,用均匀设计法优化愈伤组织培养基省时、方便,最佳培养基黄芩甙含量与预测值相近,明显高于均匀设计实验方案中的黄芩甙含量。经SAS软件分析得出的优化方程拟合度好。

王梦亮<sup>[6]</sup>等研究了不同培养基成分对黄芩愈伤组织生长和黄酮类物质积累的影响。在暗培养条件下,确定了黄芩愈伤组织生长和类黄酮物质积累的最佳培养条件为:基本培养基MS中的氮源浓度为60 mmol/L ( $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^-$ 为1:1),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 为1.5 mmol/L, 附加80 g/L蔗糖、0.3 mg/L IAA、2 mg/L 6-BA和200 mg/L 蛋白胨,培养温度为(25±1)℃。培养40 d后,愈伤组织生物量为28.7 g/L,总黄酮产量达10.2 g/L。为黄芩规模化生产黄酮类物质提供了参考。

张东向<sup>[7]</sup>等采用植物组织培养手段建立了稳定的黄芩细胞悬浮系,通过正交设计筛选出最佳的MS液体培养基为 $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^-$ 为30:40,  $\text{Ca}^{2+}$  3 mmol/L, pH 5.4, 蔗糖3%。研究了碳源、肌醇、激素、水解酪蛋白(CH)和水解乳蛋白(LH)对悬浮系中黄芩甙含量的影响。表明复合碳源、较低浓度肌醇对悬浮细胞系中黄芩甙的积累和胞外释放具有促进作用,2.0 mg/L NAA+0.5 mg/L Kt最有利于悬浮系中黄芩甙的积累。水解酪蛋白和水解乳蛋白对黄芩甙的生成没有促进作用,起到了一定的抑制效应。

### 1.3 黄芩多倍体诱导

利用组织培养进行多倍体诱导,近年来也广泛受到重视,与常规植株或种子诱变方法相比,具有明显的优越性。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。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。植物染色体倍性的变化也往往会导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。

陈柏君<sup>[8]</sup>等应用组织培养技术对黄芩进行多倍体诱导,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。

目前已建立和优化了黄芩组织培养克隆化快速繁殖技术。通过组织培养技术为建立稳定高产的黄芩次生代谢产物生产体系奠定了理论与技术基础,也为保护黄芩的野生资源,发展人工资源和探讨育种新途径提供了很大的帮助。

## 2 黄芩品种鉴定及遗传转化

### 2.1 同功酶技术及品种鉴定

在黄芩遗传多样性研究中,生化水平的分析也取得了很大的进展。生化标记主要包括贮藏蛋白、等位酶标记、蛋白质(酶)的凝胶电泳等。从电泳的技术和方法来讲,目前主要采用水平切片淀粉凝胶电泳(SGE)和聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)2种方法,而且技术手段也相当成熟。因药材中所含蛋白质的种类和数量具有很高的稳定性和专属性,近年来蛋白质电泳技术在药材种子鉴定和纯度检测方面显示了重要地位。赵

丽丽<sup>[9]</sup>采用聚丙烯酰胺凝胶电泳分别对黄芩、粘毛黄芩和沙滩黄芩种子进行了蛋白质电泳,并将其电泳图谱作为黄芩种子及混淆品鉴定的指正。实验表明,同属3种黄芩种子的蛋白质电泳图谱具有明显差异。

目前也有学者利用红外指纹图谱和聚类分析法对黄芩进行遗传多样性研究。徐永群<sup>[10]</sup>等借助于黄芩的红外指纹图谱,采用主成分分析法对来自15个产地的黄芩进行了聚类分析,将其分为6个产区,这一分区与各产地的地理位置和气候条件有一定的相关性,证明同一产区内黄芩的化学组分相似,该法可用于药材产地的分类和鉴别,作为药材质量控制的手段之一。

## 2.2 分子标记技术

遗传多样性亦称基因多样性,是生物多样性的核心,是指自然界中每一个物种同一种群内不同个体之间在分子水平上存在的差异。随着遗传多样性研究的深入发展,遗传多样性标记已从传统的以表型识别为基础的形态标记,以染色体的结构和数目为特征的细胞学标记,以及具有组织、发育和物种特异性的同工酶标记拓展到了目前广泛开展的以DNA多态性为基础的DNA分子标记<sup>[11]</sup>。目前遗传多样性研究中应用较多的分子标记技术主要有RFLP<sup>[12]</sup>, RAPD, AFLP<sup>[13]</sup>, ISSR等。

邵爱娟<sup>[14]</sup>等采用14个10碱基随机引物,利用SPSS 10.10 软件中的Within groups linkage 方法,对34个黄芩不同种源进行RAPD分析。并从多个引物中筛选出个别条带清晰、多态性明显并且重复性好的引物用于实验和统计分析。将34个黄芩种源可明显聚为A, B, C, D等4类。由此可见黄芩种内种质资源间的遗传背景较为复杂,在遗传学上的分析结果与其外观形态大体上相似,但是与地理分布却没有一定的相关性。不同种源黄芩间具有丰富的遗传多样性。

冯学锋等<sup>[15]</sup>用随机扩增的DNA多态性分析(RAPD)方法对13个居群黄芩样本进行了遗传多样性及黄芩居群遗传变异测定。总结出黄芩在物种水平上的多态性条带比率(PPB)值为95.5%,居群水平的平均PPB值为41.9%。黄芩样本RAPD聚类分析(UPGMA)没有表现出明显的分支,但显示出与地理位置有关的3个类群。分子方差分析(AMOVA)显示,黄芩居群间的遗传变异占总变异的18.83%,居群内变异占81.87%。这一结论在分子水平上证明黄芩道地性与遗传变异和地理环境有关系,并提出黄芩栽培选种的策略应该是最大限度地保持其遗传多样性。

这些分子水平上的遗传多样性研究探讨黄芩不同种源的遗传多样性和亲缘关系,为黄芩育种提供依据。研究结果表明,利用分子生物学方法研究黄芩种内的种质资源,从分子水平揭示其亲缘关系的远近,不仅可以为黄芩的系统选育和引种栽培提供理论依据,还可以为进一步研究黄芩种质资源的起源和进化问题提供参考。

## 2.3 黄芩遗传转化技术

分子遗传学是在分子水平上研究生物的遗传和变异机制。从近年国际发展的趋势来看,生物技术突飞猛进,已经达到基因和克隆水平,关于黄芩的分子遗传学方面的研究也逐渐增多。

基因转化的方法可分为2类:一类是由载体介导的转化,即利用另一种生物来实现基因的转入和整合,主要的方法就是农杆菌介导法;另一类是直接的基因转化,即将裸露的DNA直接转入植物细胞,它包括基因枪法、电击法、PEG法、脂质体转化法和花粉管通道法。近年来应用较多的是基因枪法和农杆菌介导法。

现今报道较多的为农杆菌介导法。农杆菌介导的基因转化利用的是一种能够实现DNA转移和整合的天然系统。近年来,农杆菌介导法越来越受到人们的青睐。齐香君<sup>[16]</sup>等利用发根农杆菌A4, A49615, 1.2556诱导中药黄芩外植体,实验分别采用了直接接种法、共培养法对黄芩外植体进行诱导,得到黄芩不定根。并从根的形态和其在MS培养基上的生长情况对黄芩毛状根进行了鉴别。实验表明,不同发根农杆菌对黄芩不同外植体诱导率的影响程度不同,其中野生型A4菌株的诱导率相对另2种菌株较高,可达到10%,并且茎段的诱导率明显高于叶片。同时经抗菌素氨基苄西林钠500 mg/L 除菌后,毛状根表现出分枝多,生长快,且能在MS中生长繁殖的特性。

国外对于农杆菌介导也有很多报道。Nishikawa K<sup>[17]</sup>等从黄芩克隆体根部分离到黄芩新素I和lacteoside 2种已知黄酮和一种新化合物。日本学者长岛茂幸<sup>[18]</sup>对源自黄芩毛状根的查耳酮合成酶(CHS)cDNA在大肠杆菌的表达,并对其表达蛋白质的CHS的活性进行了测定。还有学者用聚合酶链式反应(PCR)技术将T-DNA直接植入获得黄芩的转基因毛状根,从中分离到一种新的黄酮苷。随着农杆菌介导转化效率的提高及分子

生物学的发展,用农杆菌介导转化黄芩取得了长足的进步,为采用生物技术生产黄芩活性成分奠定了基础。

以遗传工程技术为基础的植物分子育种的成功与否,关键在于转基因能否在遗传转化体内稳定遗传和表达。随着各种植物遗传转化体系的建立,一些问题也相继出现:(1)人们开始逐渐认识到外源基因在受体植物内的整合,遗传和稳定性是非常复杂的,很难获得稳定遗传高效表达的转基因植株。(2)转基因的研究大部分还处在实验室阶段,能大规模地应用于生产的转基因品种还未见报道。

### 3 研究展望

近年来国内外对于黄芩的研究逐渐增加,但国内对黄芩的研究一般都局限于黄酮成分及其抗菌消炎方面。从国际发展趋势来看,利用生物技术对植物研究有重要的应用价值,它在基础理论和实际应用中有巨大的潜力。近年来,对黄芩的遗传学研究也取得了很多可喜的成就,在基因和克隆水平上都取得了很多成果,这些对植物生物工程的研究与应用具有重要价值。随着现代生物技术的发展,黄芩的遗传学研究和应用前景会更加广阔。

#### 参考文献:

- [1] 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.
- [2] 唐晓清,陈暄,温元元,等. 黄芩根尖预处理方法的优化及其核型分析[J]. 江苏农业科学, 2006(5): 123-124.
- [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, 2006, 15(2): 77-79.
- [4] 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.
- [5] 李康,张东向,张磊,等. 均匀设计法优化黄芩愈伤组织培养基[J]. 生物技术, 2006, 16(6): 62-64.
- [6] 王梦亮,任振兴,刘滇生. 黄芩的愈伤组织培养和黄酮类物质的积累[J]. 植物生理学通讯, 2006, 42(4): 648-650.
- [7] 张东向,李康,张磊,等. 不同理化因子对黄芩悬浮细胞系的影响[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(5): 1266-1268.
- [8] 陈柏君,高山林,卞云云. 黄芩组织培养同源四倍体的诱导[J]. 植物资源与环境学报, 2000, 9(1): 9-11.
- [9] 赵丽丽,聂凤褪,李连怀. 黄芩、粘毛黄芩及沙滩黄芩种子的蛋白质电泳鉴别[J]. 传统医药, 2006, 15(15): 60.
- [10] 徐永群,孙素琴,冯学峰,等. 黄芩产区红外指纹图谱和聚类分析法的快速鉴别研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2003, 23(3): 502-504.
- [11] 解新明,云锦凤. 植物遗传多样性及其检测方法[J]. 中国草地, 2000, 22(6): 51-59.
- [12] BRADSHAW H D Jr, VILLAR M, WATSON B D, et al. Molecular genetics of growth and development in *Populus* (III). A genetic linkage map of a hybrid poplar composed of RFLP, STS and RAPD markers[J]. Theor Appl Genet, 1994, 89(2/3): 167-178.
- [13] GARCIALS, MARTINEZL, BURBAJL. Genetic diversity among selected Argentinean garlic clones (*Allium sativum* L) using AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) [J]. Euphytica, 2003, 132(1): 115-119.
- [14] 邵爱娟,李欣,黄璐琦,等. 不同种源黄芩的RAPD分析[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(6): 452-455.
- [15] 冯学锋,胡世林. 黄芩种群遗传多样性初步研究[J]. 世界科学技术——中药现代化, 2002, 4(4): 38-44.
- [16] 齐香君,陈秀清,何恩铭. 发根农杆菌诱导黄芩毛状根的研究[J]. 西北农业学报, 2006, 15(5): 244-247.
- [17] Nishikawa Kazutaka, Furukawa Hiroko, Fujioka Toshihiro, et al. Flavone production in transformed root cultures of *Scutellaria baicalensis* Georgi[J]. Phytochemistry, 1999; 52(5): 885-890.
- [18] 长岛茂幸. 黄芩毛状根的查耳酮合成酶基因的分析[J]. 国外医学中医中药分册, 1999, 21(5): 56.

## Studies on tissue culture and genetic transformation of *scutellaria baicalensis*

WANG Rui, ZHANG Dong-xiang, ZHANG Lei

(School of Life Science and Engineering, Qiqihar University, Qiqihar 161006, China)

**Abstract:** In recent years, as the advancement of medical value of *Scutellaria baicalensis*, the tissue culture and genetic transformation of *Scutellaria baicalensis* had been paid more attention and got encouraging achievement. The recent progresses of studies of *Scutellaria baicalensis* in the domestic and overseas has been summed up, which from tissue culture, variety identification and genetic transformation level. Moreover, future prospect in research direction and meaning are also briefly prospected.

**Key words:** *Scutellaria baicalensis* Georgi; tissue culture; genetic transformation