

广藿香毛状根多倍体诱导及其植株再生

施和平¹, 余武¹, 张国鹏¹, 曾宝强², 周卓辉²

1 华南师范大学生命科学学院 广东省植物发育生物工程重点实验室, 广东 广州 510631

2 香港教育学院科学与环境学系, 香港 新界

施和平, 余武, 张国鹏, 等. 广藿香毛状根多倍体诱导及其植株再生. 生物工程学报, 2014, 30(8): 1235-1246.

Shi HP, Yu W, Zhang GP, et al. Induction of polyploid hairy roots and its plant regeneration in *Pogostemon cablin*. Chin J Biotech, 2014, 30(8): 1235-1246.

摘要: 为了提高药用植物广藿香的次生物质广藿香醇含量, 采用秋水仙素人工诱导染色体加倍技术, 进行了广藿香毛状根多倍体诱导及其植株再生、倍性鉴定和挥发油组分广藿香醇含量的测定。结果表明, 广藿香毛状根多倍体诱导的最佳条件为 0.05% 秋水仙素处理 36 h, 其多倍体诱导率可达 40% 以上; 经秋水仙素加倍的广藿香毛状根在 MS+6-BA 0.2 mg/L+NAA 0.1 mg/L 培养基中培养 60 d 后可获得毛状根多倍体再生植株。与对照 (二倍体植株) 相比, 广藿香毛状根多倍体再生植株根系更发达、茎更粗、节间变短、叶片的长度、宽度和厚度均较二倍体明显增大。根尖细胞染色体压片观察证实, 所获得的广藿香毛状根多倍体再生植株为四倍体, 其根尖细胞染色体数约为 128; 同时, 其叶片的气孔保卫细胞体积及其叶绿体数目均约为对照的两倍; 但其气孔密度则随着倍性增加而下降, 二倍体植株叶片的气孔密度约为四倍体植株叶片的 1.67 倍。GC-MS 测定结果表明, 广藿香毛状根多倍体再生植株的广藿香挥发油组分广藿香醇的含量为 4.25 mg/g 干重, 约为二倍体植株的 2.30 倍。该结果证实毛状根多倍体化可提高药用植物广藿香的广藿香醇含量。

关键词: 广藿香, 秋水仙素, 多倍体, 再生植株

Received: October 22, 2013; **Accepted:** December 23, 2013

Supported by: Committee of Science and Technology in Guangdong Province (No. 2008B020200005).

Corresponding author: Heping Shi. Tel: +86-20-85214793; E-mail: shihp@sclu.edu.cn

广东省科技计划项目 (No. 2008B020200005) 资助。

Induction of polyploid hairy roots and its plant regeneration in *Pogostemon cablin*

Heping Shi¹, Wu Yu¹, Guopeng Zhang¹, Pokeung Eric Tsang², and Cheuk Fai Stephen Chow²

¹ Guangdong Key Laboratory of Biotechnology for Plant Development, College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, Guangdong, China

² Department of Science and Environmental Studies, The Hong Kong Institute of Education, New Territories, Hong Kong, China

Abstract: In order to enhance the content of secondary metabolites patchouli alcohol in *Pogostemon cablin*, we induced polyploid hairy roots and their plant regeneration, and determined the content of patchouli alcohol through artificial chromosome doubling with colchicine. The highest rate of polyploidy induction was more than 40% when hairy roots were treated with 0.05% colchicine for 36 h. The obtained polyploid hairy roots formed adventitious shoots when cultured in an MS medium with 6-BA 0.2 mg/L and NAA 0.1 mg/L for 60 d. Compared with the control diploid plants, the polyploid hairy root-regenerated plants of *P. cablin* had more developed root systems, thicker stems, shorter internodes and longer, wider and thicker leaves. Observation of the chromosome number in their root tip cells reveals that the obtained polyploid regenerated plants were tetraploidy, with 128 ($4n=128$) chromosomes. The leaves contained around twice as many stomatal guard cells and chloroplasts as the controls, but the stomatal density declined with increasing ploidy. The stomatal density in diploid plants was around 1.67 times of that in polyploid plants. GC-MS analysis shows that the content of patchouli alcohol in the hairy root-derived polyploid plants was about 4.25 mg/g dry weight, which was 2.3 times of that in diploid plants. The present study demonstrates that polyploidization of hairy roots can stimulate the content of patchouli alcohol in medicinal plant of *P. cablin*.

Keywords: *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth, colchicines, polyploidy, plant regeneration

多倍体 (Polyploids) 在植物中广泛存在, 也是植物进化的途径之一^[1]; 但由于自然界产生多倍体的过程相当漫长, 因而许多国家的育种工作者大都通过人工诱导的方法来获得多倍体植株。最常见的人工诱导方法是用化学诱变剂——秋水仙素 (碱) (Colchicine) 处理植物的种子和生长点^[2]、叶片^[3]或愈伤组织^[4]来进行多倍体诱导, 并已在百合 *Hemerocallis flava* L.^[5]、莨菪 *Hyoscyamus niger*^[6]、丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge.^[7]、可乐豆木 *Colophospermum mopane*^[8]等多种药用和花卉植物中获得成功。已有的研究表明, 与原二倍体植株相比, 由于染色体加倍, 多倍体植株不仅表现在根、茎、叶和花等器官上具

有“巨型性”, 而产生出较大的营养器官和繁殖器官^[5,9-10]; 而且通过物种的染色体数目加倍, 大都能增强植物的次生代谢, 而具有更高的次生物质含量^[6,11-12]。因而, 对大多数以收获营养器官为对象且大多通过营养繁殖的药用植物而言, 运用秋水仙素诱导产生多倍体药用植物一直以来被用作大幅度提高以相应部位入药的药材产量和质量的有效育种措施。

广藿香 *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. 是一种经济价值很高的热带药用和香料作物, 原产于菲律宾、印度尼西亚等国, 宋朝时引种至广东栽培。其挥发油组分广藿香醇和广藿香酮具有芳香化浊、开胃止呕、发表解暑及抗菌和

抗肿瘤等功效^[13-16]。然而,广藿香在我国是无性繁殖植物,不开花或罕见开花但不结果,很难采用传统的有性生殖方法进行育种;同时,由于在其药材生产中长期只能采用扦插繁殖,引起植株生长缓慢、抗逆性弱;导致品种退化,药材的产量和质量下降,难以满足医疗及制药工业的巨大需求^[17];因而迫切需要引入新的技术和方法才能进行种质资源的创新和新品种的选育,培育出广藿香挥发油含量更高而稳定的广藿香新品种,以满足药材生产的种植需要和医疗制药工业不断增长的需求。但目前未见有关利用广藿香多倍体培育来提高其药用成分含量的系统研究报道。

由发根农杆菌遗传转化植物细胞产生的毛状根不仅能在无外源生长调节物质的培养基上快速自主生长,而且具有次生代谢产物量高且稳定,并易通过组织培养途径获得再生植株等优点^[18-19];而且同源四倍体青蒿 *Artemisia annua* 毛状根具有比二倍体毛状根更高的青蒿素含量^[20];表明可自主生长的毛状根应该非常适合作秋水仙素人工诱导多倍体的实验体系。然而,到目前为止,未见更多利用毛状根作为倍性诱导起始材料来进行药用植物多倍体诱导的研究报道;也未见利用毛状根多倍体化来获得广藿香多倍体植株的研究报道。

我们曾用含野生农杆菌碱型Ri质粒的发根农杆菌对药用植物广藿香的遗传转化,获得了可在无激素培养基上快速自主生长的毛状根^[21];但能否利用该毛状根的多倍体化来创新广藿香种质和进一步提高其挥发油含量和产量,目前国内外未见相关报道。为此,本文利用业已获得的发根农杆菌遗传转化产生的可自主生长的广藿香毛状根作为倍性诱变的起始材料,进行

了广藿香毛状根多倍体的诱导、植株再生和倍性鉴定及其挥发油组分广藿香醇含量测定,旨在为今后利用广藿香毛状根多倍体再生植株来提高广藿香挥发油的产量以及生产出挥发油含量更高的广藿香新种质(种苗)奠定实验技术基础和提供可能性。

1 材料与方法

1.1 植物材料

采用由含农杆菌型野生 Ri 质粒的发根农杆菌 ATCC15834 遗传转化石牌广藿香(即牌香)叶片外植体所产生的、能在无外源激素培养基上自主快速生长的毛状根作为人工倍性诱变的起始材料;其诱导和继代培养见 Shi 等的方法^[21]。

1.2 广藿香毛状根多倍体的诱导及其植株再生

采用根尖浸泡法来进行广藿香毛状根多倍体的诱导。首先将生长旺盛的广藿香毛状根根尖段置于 6,7-V 液体培养基^[22]中振荡培养 15 d,使毛状根进入快速生长期,并获得足够多的生长同步化根尖段;然后切取约 3-4 cm 长的毛状根根尖段分别置于添加 0、0.05%、0.1%和 0.2% 秋水仙素的 MS 液体培养基^[23]中,于 100 r/min 转速、25℃下振荡培养,并分别在处理 12、24、36 和 48 h 后观察并统计根尖膨大的情况。每个处理约 20 个带根尖根段。将经秋水仙素处理后膨大的根尖段用无菌水冲洗 2-3 次后,转接入无激素的 MS 固体培养基中培养 7 d 后,再将毛状根根尖段转接至 MS+6-BA 0.2 mg/L+NAA 0.05 mg/L 的固体培养基上进行愈伤组织诱导和植株再生;约 60 d 后将愈伤组织产生的幼芽切下并转接到无外源激素的 MS

固体培养基中进行生根诱导,发育成完整的再生植株,并进行其倍性鉴定。

1.3 毛状根多倍体再生植株的倍性检测

1.3.1 采用根尖细胞染色体数观察法进行鉴定

根尖细胞染色体数观察基本按 Martinez-Gomez 等的方法进行^[24]。首先,取待鉴定的毛状根多倍体再生植株 3–4 cm 长的根尖段,用卡诺氏固定液(95%乙醇:冰醋酸体积比=3:1)室温固定 20 h,1 mol/L 盐酸室温解离 5 min、蒸馏水中低渗 20 min 后,用醋酸洋红溶液染色 20 min 后,进行常规制片和用 Olympus 显微镜观察并拍照;随机统计 200 个分裂相细胞,统计其中的多倍体细胞染色体条数并计算其诱导率。

1.3.2 毛状根多倍体再生植株叶片的气孔形态观察

毛状根多倍体再生植株叶片的气孔大小和密度按陈佰鸿等的透明胶带法进行测量^[25]。取同一位置的不同倍性的毛状根再生植株叶片进行制片,并置于高倍显微镜下观察。随机统计测量 10 个植株,每个倍性株系取第 3 片真叶 10 片,每片真叶观察 10 个视野,共测 100 个视野;每个株系随机测量 10 个保卫细胞的大小和气孔密度,取其平均值。利用目镜测微尺,测量其保卫细胞叶绿体数目和保卫细胞的长、宽;同时用目镜测微尺测出视野直径和视野内气孔数,并计算出气孔密度。

1.4 广藿香毛状根多倍体再生植株广藿香醇含量的测定

1.4.1 挥发油的提取

分别取盆栽约 2 个月的广藿香毛状根及其多倍体再生植株地上部和 2 年生对照野生植株地上

部 60 °C 恒温烘干后,用粉碎机粉碎,过 60 目筛后,基本按《中华人民共和国药典(一部)》(2010 版)附录 XD 的挥发油测定方法(甲法)^[15]进行挥发油提取。首先,准确称取各植株干粉 2 g,置于 100 mL 具塞三角瓶中,加 50 mL 甲醇,超声处理浸提 3 次,每次 20 min,过滤,合并滤液,提取液低温挥干,残渣加乙醚溶解后,再经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后,即制得各倍性植株的广藿香挥发油测定样品液。

1.4.2 GC-MS 分析条件

采用岛津 GC-16A 气相色谱仪进行样品的广藿香挥发油组分广藿香醇含量的 GC-MS 测定。色谱条件为:色谱柱:DB-5 石英毛细管色谱柱(30 m×250 μm×0.25 μm);载气为高纯度氦气,流速为 1.3 mL/min;进样口温度 250 °C,联接口温度 280 °C;升温程序:柱温 50 °C,保持 5 min,15 °C/min 升温至 210 °C;再以 20 °C/min 升温至 280 °C,保持 10 min;柱前压为 80 kPa,分流比 60:1,进样量为 1.0 μL。质谱条件:电离电压 1 500 V,电子能量 70 eV,电离方式 EI(电子轰击),全波段扫描。以百秋里醇(即广藿香醇)标准品(购自南方标准物质网深圳市时得佳科技有限公司,产品标准编号: vq10284;有效含量 ≥ 98%)制作标准曲线: $y=82.44x+2052.32$, $r^2=0.99998$;并依据标准曲线计算各样品的广藿香醇含量。

2 结果与分析

2.1 广藿香毛状根多倍体诱导及其植株再生

表 1 和图 1 A 分别为秋水仙素浓度及其处理时间对广藿香毛状根多倍体诱导效率的影响。从表 1 可见,在供试的各浓度秋水仙素溶液中,广藿香毛状根根尖存活率之间没有明显差异,但秋水仙素溶液处理时间长短则对毛状根根尖成活率有明显影响,其中以秋水仙素诱导处理

12 h 的毛状根根尖成活率较高, 如秋水仙素浓度为 0.05% 时, 处理 12 h 后毛状根根尖成活率最高, 可达 42% (图 1A); 但处理 48 h 后根尖成活率则明显降低, 这说明秋水仙素浸泡时间太长可能不利于其多倍体诱导, 甚至还会造成毛状根根段坏死。然而, 对毛状根多倍体诱导率而言, 则以秋水仙素诱导处理毛状根根尖 36 h 的多倍体诱导率最高; 其中以 0.05% 秋水仙素的诱导率最高, 其多倍体诱导率达 40%, 其次是 0.1%, 最低是 0.2%, 表明秋水仙素诱导广藿香毛状根根尖多倍体的最佳诱导处理条件是 0.05% 秋水仙素处理 36 h; 而随着秋水仙素浓度升高, 会加重其对根尖的毒害, 反而不利于毛状根多倍体的诱导。

将不同浓度秋水仙素处理后根尖膨大部位 (图 1A) 切下, 并转接至 MS+NAA 0.1 mg/L+6-BA

0.2 mg/L 的培养基中进行愈伤组织诱导, 10 d 后大部分膨大的广藿香毛状根根尖段逐渐由白色发育成淡绿色的愈伤组织 (图 1B 和 C); 30 d 后将所产生的浅绿色愈伤组织转移到 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L 的不定芽诱导培养基中进行不定芽分化, 约 15 d 后可见从浅黄绿色的愈伤组织上不断分化出绿色的芽点, 并逐渐形成不定芽 (图 1D)。60 d 后统计发现, 经秋水仙素加倍的不同毛状根根尖产生的愈伤组织的不定芽分化频率 (平均每个毛状根根尖形成的愈伤组织产生的不定芽数目) 最高为 22, 最低为 5.2。当愈伤组织产生的不定芽生长至 3-4 cm 时, 将不定芽转接至无外源激素的 MS 培养基中进行生根诱导, 约 4-5 d 后从不定芽基部不断产生出白色的不定根, 发育成完整植株 (图 1E)。

表 1 秋水仙素浓度和处理时间对广藿香毛状根多倍体诱导率的影响

Table 1 Effect of colchicine concentration and treatment time on induction rate of polyploid hairy roots in *P. cablin*

Concentration of colchicine (%)	Treatment time (h)	No. of root tips	No. of survival root tips	No. of adventitious shoots per root tips	Induction rate of polyploidy (%)
0	12	40	40	22.0	0
	24	40	40	21.3	0
	36	40	40	19.8	0
	48	40	40	20.6	0
0.05	12	40	36	20.0	5
	24	40	40	17.0	10
	36	40	36	17.3	40
	48	40	40	13.5	10
0.1	12	40	36	16.5	0
	24	40	36	15.4	10
	36	40	28	17.3	20
	48	40	24	16.7	5
0.2	12	40	24	13.4	0
	24	40	20	11.6	10
	36	40	20	13.0	15
	48	40	16	13.0	0

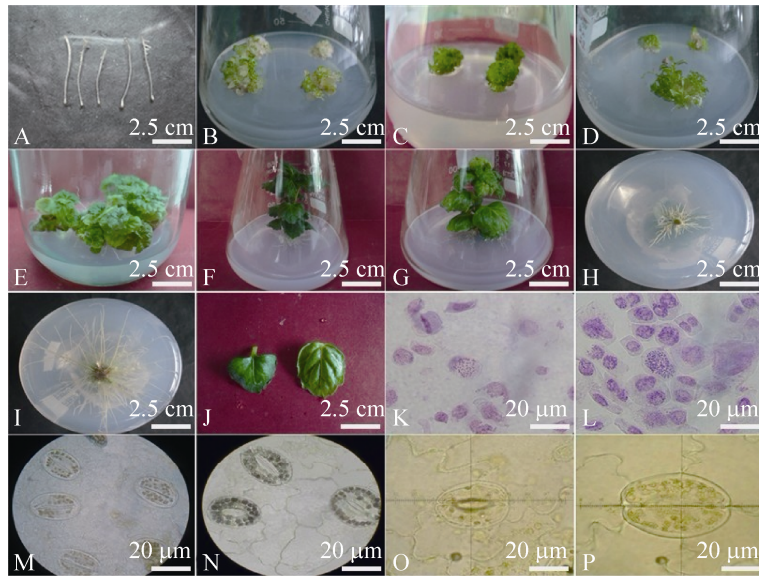


图 1 广藿香毛状根多倍体诱导、植株再生及其倍性鉴定

Fig. 1 Induction of polyploid hairy roots, its plant regeneration and ploidy identification in *P. cablin*. (A) Swollen hairy roots after treated with colchicine for 36 hours. (B) Callus formation from colchicine-induced swollen root tips of hairy roots after cultured for 15 days. (C) The adventitious buds from callus after 30 days. (D) Adventitious buds from callus after 45 days. (E) Regenerated plants from calli of polyploid hairy roots after cultured for 60 days. (F) Wild-type diploid plants. (G) Regenerated plants from polyploid hairy roots. (H) Roots of wild-type diploid. (I) Roots of regenerated plants from polyploid hairy roots. (J) Leaves of diploid plants (left) and polyploid plants (right). (K) Diploid chromosomes ($2n=64$). (L) Polyploid chromosomes ($4n=128$). (M) Stomata of diploid plants (10×100). (N) Stomata of polyploid plants (10×100). (O) Morphology of stomata guard cells in diploid plants. (P) Morphology of stomata guard cells in polyploid plants. Bars in A–J of Fig. 1=2.5 cm, bars in K–P of Fig. 1=20 μm .

2.2 广藿香毛状根多倍体植株形态观察及其倍性鉴定

图 1 的 F、G、H、I 和 J 为广藿香毛状根多倍体再生植株与二倍体植株的生长形态。从图 1 可见，与二倍体植株 (图 1F 和 H) 相比，所产生的广藿香毛状根多倍体再生植株 (图 1G) 的根系更发达 (图 1I)、茎更粗、节间略短、叶圆、叶脉明显加粗、且叶背面较皱，叶片的长度、宽度、厚度也较二倍体明显增大 (图 1J)。而图 1 的 K 和 L 为采用根尖细胞染色体数目观察法对广藿香毛状根多倍体再生植株倍性鉴定的结果。从图 1 的 K 和 L 可见，对照 (野生型二倍

体) 植株的根尖细胞染色体数目为 64 ($2n=64$)，而毛状根多倍体再生植株根尖的染色体数目大都为 128 ($4n=128$)。这表明所获得的广藿香毛状根多倍体再生植株是同源四倍体。

此外，还对广藿香毛状根多倍体再生植株叶片气孔及其保卫细胞形态以及其叶绿体数目和分布范围进行了比较观察，结果如图 1 的 M、N、O 和 P 及表 2 所示。从表 2 可见，两种倍性不同植株间的气孔保卫细胞叶绿体数目的变化幅度都较大，且其差异达到极显著 ($P<0.01$)；其中二倍体植株的气孔保卫细胞叶绿体数目最少的只有 18 个叶绿体，最多则可达 26 个，但

其大部分细胞 (约 85%) 的气孔保卫细胞叶绿体数目介于 21-25 之间, 平均为 22.43 个, 表明二倍体广藿香植株的气孔保卫细胞叶绿体数目约为 22 个。而大部分 (约 87%) 的广藿香毛状根多倍体再生植株的气孔保卫细胞叶绿体数目介于 41-45 和 46-50 之间, 平均值为 45.01 个, 表明毛状根多倍体再生植株的气孔保卫细胞叶绿体数目约为 45 个。可见, 由于多倍体的染色体倍性增加, 其叶片气孔保卫细胞的叶绿体数也相应成倍增加。

图 1O、1P 和表 3 为广藿香毛状根多倍体再生植株的气孔形态以及其保卫细胞长度和密度的测量结果。虽然广藿香毛状根多倍体再生植株的气孔形态较二倍体没有太大的变化, 但其大小和密度则差异极显著(表 3)。对照 (二倍体野生植株) 的气孔长 33.10 μm , 宽 21.82 μm , 而二倍体毛状根再生植株则与对照相似; 但广藿香毛状根多倍体再生植株的气孔长度约为

66.92 μm , 宽度约 43.12 μm , 均约为二倍体植株气孔的 2 倍; 但从叶片气孔密度测量而言, 广藿香毛状根多倍体再生植株的气孔密度平均为 23.89 个/ mm^2 , 而对照和二倍体毛状根再生的广藿香植株的气孔密度为 38.93 个/ mm^2 和 39.81 个/ mm^2 。可见, 与二倍体植株相比, 多倍体植株的气孔大小随着倍性增加而成倍增加, 但其气孔密度则随着倍性的增加而相应降低(图 1O 和 P)。

2.3 广藿香毛状根多倍体再生植株挥发油广藿香醇含量的测定

图 2 和表 4 为广藿香毛状根多倍体再生植株挥发油广藿香醇含量的 GC-MS 测定图谱及其分析结果。结果表明, 广藿香毛状根多倍体再生植株的广藿香挥发油广藿香醇含量达到 4.25 mg/g 干重; 与对照 (两年生野生型的二倍体植株) 和二倍体毛状根再生植株相比, 其广藿香醇含量分别约为对照和二倍体毛状根再生植株的

表 2 广藿香毛状根多倍体再生植株的气孔保卫细胞叶绿体数目及其分布范围

Table 2 Number and its range of chloroplasts in stomata guard cells of polyploid hairy roots-regenerated plants of *P. cablin*

Plant type	No. of chloroplast per stomatal guard cell								Mean No.	No. range
	<20	21-25	26-30	31-35	36-40	41-45	46-50	>50		
Control	9	90	1	0	0	0	0	0	22.03±1.90	18-27
Diploid from hairy roots	10	85	3	2	0	0	0	0	21.69±1.86	18-26
Polyloid from hairy roots	0	0	0	2	19	49	28	2	43.68±3.63	34-54

表 3 广藿香多倍体毛状根再生植株与二倍体植株叶片气孔保卫细胞大小及其密度比较

Table 3 Comparison of morphology of stomata guard cells and the stomata density between polyploid and diploid plants of *P. cablin*

Plant type	Stomata guard cell		Density of stomata per mm^2
	Length (μm)	Width (μm)	
Control	34.35±2.52	22.27±1.49	38.93±4.49
Diploidy from hairy roots	33.10±2.98	21.82±1.46	39.81±4.57
Polyploidy from hairy roots	66.92±6.04	43.12±4.75	23.89±4.90

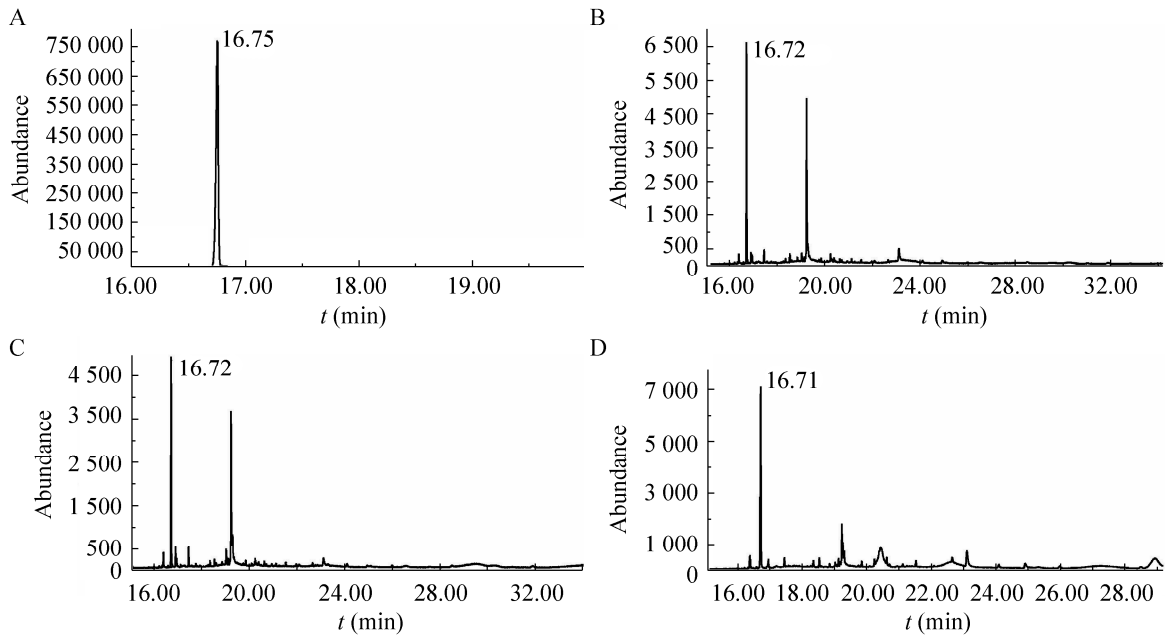


图 2 广藿香毛状根多倍体再生植株广藿香挥发油广藿香醇含量测定的 GC-MS 图谱

Fig. 2 GC-MS analysis of patchouli alcohol in *P. cablin*. (A) Authentic patchouli alcohol. (B) Two-year-old wild plants. (C) Plants regenerated from diploid hairy roots. (D) Plants regenerated from polyploid hairy roots.

表 4 广藿香毛状根多倍体再生植株的广藿香醇含量的 GC-MS 测定

Table 4 GC-MS determination of patchouli alcohol content in polyploid hairy roots-regenerated plants of *P. cablin*

Plant type	Patchouli alcohol content (mg/g dry weight), mean of three measurements
2 year-old wild diploid plants	1.84±0.08
Diploid plants from hairy roots	1.98±0.13
Polyploid plants from hairy roots	4.25±0.24

2.3 倍和 2.14 倍。这表明,运用广藿香毛状根多倍体化可提高药用植物广藿香的药用成分广藿香醇的含量。

3 讨论

至今为止,应用秋水仙素人工诱导染色体加倍技术来获得药用植物多倍体新种质已在莨菪^[6]、丹参^[7]、可乐豆木^[8]等多种药用植物以及花卉植物如百合^[5]、仙客来 *Cyclamen persicum*^[26]

等获得成功。然而,在人工诱导植物多倍体时,大都用化学诱变剂-秋水仙素处理植物的叶片^[3]或愈伤组织^[4]、根段^[27]或种子和生长点^[2]来进行多倍体诱导,少见利用可自主生长、单细胞起源的毛状根作为倍性诱导起始材料的研究报道。至今也未见利用毛状根多倍体化来获得药用植物广藿香毛状根多倍体及其再生植株的研究报道。在本实验中,用秋水仙素处理广藿香毛状根不仅可获得其多倍体毛状根及其再生植

株,而且所产生的多倍体易筛选,且多倍体诱导率也较高;而这表明可自主生长的毛状根完全可用作人工多倍体诱变的良好起始材料;同时,与对照(二倍体植株)相比,通过组织培养所获得的广藿香毛状根多倍体再生植株的挥发油组分广藿香醇含量高达4.25 mg/g干重,约为对照的2.30倍。然而,De Jesus-Gonzalez和Weathers曾用秋水仙素人工诱导技术获得了青蒿素含量比其二倍体毛状根高6倍的同源四倍体青蒿毛状根^[20];而这与本实验的结果不一致。而这种差异的产生可能与植物及其毛状根类型以及其次生物质的种类等有关。

有研究报道,在秋水仙素人工诱导多倍体时,其多倍体的诱导率高低与植物类型、组织或器官特性以及秋水仙素的作用浓度和处理时间长短等有关^[28-30]。如张海风等发现,以0.1%秋水仙素处理杜仲*Eucommia ulmoides* Oliv. 籽苗生长点时,处理12 h后达到最佳诱变效果,其多倍体诱导率36.7%^[29];但同样浓度的秋水仙素处理非洲菊*Gerbera jamesonii* 丛生芽时,则以秋水仙素处理48 h的诱导效果最佳^[30]。然而,在比较秋水仙素浓度和作用时间对3种紫薇幼苗染色体加倍的效果时,0.5%和0.8%的秋水仙素处理紫薇*Lagerstroemia indica*和银薇*Lagerstroemia indica* Linn. f. *alba* (Nichols.) Rehd. 48-96 h后,其植株多倍体诱导率均较高,其中以0.5%秋水仙素处理紫薇72 h的多倍体最高,达54.17%^[31]。而这与本实验利用秋水仙素处理广藿香毛状根来进行毛状根多倍体诱导的结果不一致。在本实验中,当不同浓度秋水仙素浓度溶液进行多倍体诱变处理时,以0.05%秋水仙素溶液处理36 h时,广藿香毛状根的多倍体诱导率最高,其多倍体诱导率达40%以上;

但当秋水仙素浓度过高(如0.1%和0.2%),或浸泡时间过长(如超过48 h)时,其毛状根多倍体诱导率反而下降。然而,用秋水仙素人工加倍处理获得四倍体青蒿毛状根时,则以0.25%或者0.5%的秋水仙素处理7 d的诱变效果最好,多倍体诱导率可达1%^[20]。而这也与本实验的结果不一致。这种差异的产生可能表明,秋水仙素人工诱导多倍体的效率高低可能与植物种类、外植体类型及其毛状根的生长特性等有关。

目前对植物多倍体的倍性鉴定最常用的方法是根尖细胞染色体倍性观察和气孔大小和形态等方法进行鉴定^[20,31];但一些研究表明,以保卫细胞叶绿体数为基础的倍性鉴定也可作为一种快速、简便的倍性鉴定方法^[32]。而在本实验中,通过毛状根根尖压片观察,发现广藿香二倍体植株的细胞染色体数为 $2n=64$,而产生的毛状根多倍体再生植株为4倍体,其细胞染色体数为 $4n=128$;同时发现,广藿香二倍体和四倍体植株叶片的保卫细胞叶绿体数目比值与其染色体数目比值一致,均为1:2;这也表明,以保卫细胞叶绿体数目多少也可作为鉴定广藿香多倍体植株染色体倍性的快速而可靠的辅助方法。

广藿香的药用挥发油组分主要为广藿香酮和广藿香醇。一些研究表明,根据不同产地广藿香挥发油成分差异的结果,可将产自广州石牌和广东高要的、挥发油组分以广藿香酮为主的品种归类为广藿香酮型广藿香;而将产自包括广东吴川、雷州和海南省万宁等地、其挥发油组分以广藿香醇为主的广藿香归类为广藿香醇型广藿香^[33]。虽然,组培广藿香和扦插广藿香药材中百秋里醇和广藿香酮的含量不存在显著性差异^[34];但不少研究表明,广藿香总挥发

油的产量及其主要成分含量不仅与广藿香类型和产地有关外,还与植株部位和采收季节等影响因素有关^[33,35-37]。如牌香(广州石牌广藿香)类的挥发油中均含有较多量的广藿香酮,而琼香(产自海南)类的挥发油组分中不含或含较少量的广藿香酮,但含有较多量的广藿香醇;且牌香的有效成分广藿香酮含量在每年12月份时达到最高值^[35]。而GC-MS分析测定表明,国产广藿香精油中百秋里醇浓度可达337.04 mg/mL,约比印尼产广藿香高8.59%^[36]。而罗集鹏等^[37]报道,牌香药材中叶片的挥发油含量远大于茎,约为茎的4倍;且在不同采收期内石牌广藿香全株挥发油含量约为0.17%–0.26%;其茎部含油率约为0.05%–0.15%;但叶片含油率则为0.36%–0.96%。而这与我们的结果不完全一致。在我们的实验中,对照(2年生的二倍体野生植株)的植株含油率为0.18%;而与对照相比,盆栽2个月的二倍体广藿香毛状根再生植株的广藿香醇含量还略高于对照;其植株广藿香醇含量为0.198%;而栽培2个月的广藿香毛状根多倍体再生植株的广藿香醇含量则比对照和二倍体毛状根再生植株分别高2.3倍和2.14倍,约为0.425%。而这种差异的产生可能与样品的采收期和生长期、毛状根特性以及植株的倍性水平等因素的影响有关;但同时表明,通过毛状根多倍体化获得的牌香类广藿香多倍体植株,不仅具有多倍体的生长性状,而且还具有比原植株更高的广藿香挥发油组分广藿香醇含量;但至于毛状根多倍体化是否也会提高其挥发油组分广藿香酮含量以及是否会引起广藿香毛状根多倍体再生植株的药用成分指纹图谱的变化以及毛状根多倍体化提高广藿香多倍体植株挥发油组分广藿香醇

含量的分子机理则待进一步研究。而本文所建立的广藿香毛状根多倍体再生植株系为今后利用该多倍体再生植株系来提高药用植物广藿香挥发油的含量和产量以及生产出挥发油含量更高的广藿香新种质(种苗)提供了可能性。

REFERENCES

- [1] Paterson AH. Polyploidy, evolutionary opportunity, and crop adaptation. *Genetica*, 2005, 123(1/2): 191–196.
- [2] Qian CZ, Wu MS, Dai FB, et al. Studies on polyploid breeding of *Isatis indigotica* Fort. *Acta Bot Sin*, 1989, 31(9): 678–683 (in Chinese). 乔传卓, 吴美枢, 戴富宝, 等. 菘蓝多倍体育种的研究. *植物学报*, 1989, 31(9): 678–683.
- [3] Gu XF, Luo ZR. Regeneration of dodecaploid plants from *in vitro* leave of 'Luotian Tianshi' Persimmon treated with colchicine. *Acta Horticult Sin*, 2003, 30(3): 325–327 (in Chinese). 谷晓峰, 罗正荣. 秋水仙素处理罗田甜柿获得12倍体再生植株. *园艺学报*, 2003, 30(3): 325–327.
- [4] Chen BJ, Gao SL, Bian YY. The induction of autotetraploid of *Scutellaria baicalensis* Georgi by tissue culture. *J Plant Resour Environ*, 2000, 9(1): 9–11 (in Chinese). 陈柏君, 高山林, 卞云云. 黄芩组织培养同源四倍体的诱导. *植物资源与环境学报*, 2000, 9(1): 9–11.
- [5] Chen CH, Goeden-Kallemeyn YC. *In vitro* induction of tetraploid plants from colchicines-treated diploid daylily callus. *Euphytica*, 1979, 28: 705–709.
- [6] Lavania UC, Srivastava S. Enhanced productivity of tropane alkaloids and fertility in artificial autotetraploids of *Hyoscyamus niger*. *Euphytica*, 1991, 52(2): 73–77.
- [7] Gao SL, Zhu DN, Cai ZH, et al. Autotetraploid plants from colchicines-treated bud culture of *Salvia miltiorrhiza* Bge. *Plant Cell Tiss Org Cult*,

- 1996, 47(1): 73–77.
- [8] Rubuluza T, Nikolova RV, Smith MT, et al. *In vitro* induction of tetraploids in *Colophospermum mopane* by colchicine. *South Afric J Bot*, 2007, 73(2): 259–261.
- [9] Watrous SB, Wimber DE. Artificial induction of polyploidy in *Paphiopedilum*. *Lindleyana*, 1988, 3(4): 177–183.
- [10] Adaniya S, Shira D. *In vitro* induction of tetraploid ginger (*Zingiber officinalis* Roscoe) and its pollen fertility and germinability. *Sci Horti*, 2001, 88(4): 277–287.
- [11] Griesbach RJ, Kamo KK. The effect of induced polyploidy on the flavonoids of *Petunia mitchell*. *Phytochemistry*, 1996, 42(2): 361–363.
- [12] Dhawan OP, Lavania UC. Enhancing the productivity of secondary metabolites via induced polyploidy: a review. *Euphytica*, 1996, 87(2): 81–89.
- [13] Liu HH, Luo JP, Lai PL. Studies on the anti-enteropathogenic bacteria action of herba *Pogostemonis* extracts. *J Chin Med Mater*, 1999, 22(8): 408–411 (in Chinese).
刘琥琥, 罗集鹏, 赖沛炼. 广东高要与吴川产广藿香提取物对肠道致病菌抗菌作用的比较研究. *中草药*, 1999, 22(8): 408–411.
- [14] Zhang Y, Zhang JC, Chen Y, et al. Current progresses in pharmacognosy, chemistry, and pharmacology of *Pogostemon cablin*. *Chin Tradit Herbal Drugs*, 2006, 37(5): 786–790 (in Chinese).
张英, 张金超, 陈瑶, 等. 广藿香生药、化学及药理学研究进展. *中草药*, 2006, 37(5): 786–790.
- [15] Pharmacopeia Commission of P.R. China. *Pharmacopoeia of The People's Republic of China* (English edition). Beijing: Chemical Industry Press, 2000.
- [16] Jeong JB, Choi J, Lou ZY, et al. Patchouli alcohol, an essential oil of *Pogostemon cablin*, exhibits anti-tumorigenic activity in human colorectal cancer cells. *Int Immunopharmacol*, 2013, 16(2): 184–190.
- [17] Lin XH, He H. Problem and investigation status on germplasm resources in patchouli (*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth). *Chin Med J Res Prac*, 2005, 19(4): 60–62 (in Chinese).
林小桦, 贺红. 广藿香种质资源的研究现状及存在问题. *现代中药研究与实践*, 2005, 19(4): 60–62.
- [18] Inoue F, Sugiura H, Tabuchi A, et al. Alteration of essential oil composition in transgenic Peppermint (*Mentha piperita*) carrying T-DNA from *Agrobacterium rhizogenes*. *Breed Sci*, 2003, 53(2): 163–167.
- [19] Santos PAG, Figueiredo AC, Oliveira MM, et al. Growth and essential oil composition of hairy root cultures of *Levisticum officinale* W.D.J. Koch (lovage). *Plant Sci*, 2005, 168(4): 1089–1096.
- [20] De Jesus-Gonzalez L, Weathers PJ. Tetraploid *Artemisa annua* hairy roots produce more artemisinin than diploids. *Plant Cell Rep*, 2003, 21(8): 809–813.
- [21] Shi HP, Long YY, Sun TS, et al. Induction of hairy roots and plant regeneration from the medicinal plant *Pogostemon cablin*. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 2011, 107(2): 251–260.
- [22] Veliky IA, Martin SM. A fermenter for plant cell suspension cultures. *Can J Microbiol*, 1970, 16(4): 223–226.
- [23] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant*, 1962, 15: 473–497.
- [24] Martinez-Gomez P, Sanchez-Perez R, Vaknin Y, et al. Improved technique for counting chromosomes in almond. *Sci Horticult*, 2005, 105(1): 139–143.
- [25] Chen BH, Li XS, Cao ZY, et al. A method for observing stoma by transparent gummed tape to tear epidermis from leaf. *Plant Physiol Comm*, 2004, 40(2): 215–218 (in Chinese).
陈佰鸿, 李新生, 曹孜义, 等. 一种用透明胶带粘取叶片表皮观察气孔的方法. *植物生理学通讯*, 2004, 40(2): 215–218.
- [26] Takamura T, Miyajima I. Colchicine induced tetraploids in yellow-flower cyclamens and their

- characteristics. *Sci Horti*, 1996, 65(4): 305–312.
- [27] Wang XH, Tan XF. Study of *Gerbera jamesonii* inducing polyploid plants with colchicine. *J Central South Forest Univ*, 2005, 25 (4): 57–61 (in Chinese).
王晓红, 谭晓凤. 用秋水仙碱诱导非洲菊多倍体的研究. *中南林学院学报*, 2005, 25(4): 57–61.
- [28] Zhang ZS, Li YH, Jiang L, et al. *In vitro* tetraploid induction and its identification in *Anthurium andraeanum*. *Acta Horticult Sin*, 2007, 34(3): 729–734 (in Chinese).
张志胜, 黎扬辉, 姜蕾, 等. 红掌四倍体的离体诱导及其鉴定. *园艺学报*, 2007, 34(3): 729–734.
- [29] Zhang HF, Guo BL, Zhang CH, et al. Induction and identification of tetraploids in *Eucommia ulmoides* Oliv. *Acta Horticult Sin*, 2008, 35(7): 1047–1052 (in Chinese).
张海凤, 郭宝林, 张成合, 等. 杜仲四倍体的诱导与鉴定. *园艺学报*, 2008, 35(7): 1047–1052.
- [30] Li H, Yan B, Zhang T, et al. Preliminary studies on polyploidy mutation of cut flower *Gerbera jamesonii* Bolus. *Acta Horticult Sin*, 2009, 36(4): 605–610 (in Chinese).
李涵, 鄢波, 张婷, 等. 切花非洲菊多倍体诱变初报. *园艺学报*, 2009, 36(4): 605–610.
- [31] Tong J, Ye YM, Feng B, et al. Colchicines induced polyploid plants and their identification in three species of *Lagerstroemia indica*. *Acta Horticult Sin*, 2009, 36(1): 127–132 (in Chinese).
童俊, 叶要妹, 冯彪, 等. 秋水仙素诱导三种紫薇多倍体的研究. *园艺学报*, 2009, 36(1): 127–132.
- [32] Liu RX, Huang Y, Lu YX, et al. Quick identification of tobacco pollen plants' chromosomes ploidy in seeding stage. *J Hunan Agri Univ: Nat Sci Ed*, 2008, 34(5): 541–544 (in Chinese).
刘仁祥, 黄莺, 陆永旭, 等. 烟草花粉植株染色体倍性苗期快速鉴定. *湖南农业大学学报: 自然科学版*, 2008, 34(5): 541–544.
- [33] Luo JP, Liu YP, Feng YF, et al. Two chemotypes of *Pogostemon cablin* and influence of region of cultivation and harvesting time on volatile oil composition. *Acta Pharma Sin*, 2003, 38(4): 307–310 (in Chinese).
罗集鹏, 刘玉萍, 冯毅凡, 等. 广藿香的两个化学型及产地与采收期对挥发油成分的影响. *药学学报*, 2003, 38(4): 307–310.
- [34] Wang XG, Mo XL, Cai YW, et al. Content comparison of patchouli alcohol and pogostone in *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth produced by tissue culture and cutting propagation. *Chin J Pharm Anal*, 2009, 29(1): 96–99 (in Chinese).
汪小根, 莫小路, 蔡岳文, 等. 组培广藿香与扦插广藿香中百秋里醇和广藿香酮的含量对比分析. *药物分析杂志*, 2009, 29(1): 96–99.
- [35] Li W, Wei G, Pan CM, et al. Investigation on the influential factors of the volatile oil and main constituent content in *Pogostemon cablin*. *Chin J Chin Mater Med*, 2004, 29(1): 28–31 (in Chinese).
李薇, 魏刚, 潘超美, 等. 广藿香药材挥发油及主要成分含量影响因素的考察. *中国中药杂志*, 2004, 29(1): 28–31.
- [36] Jiao HY, Wang YS, Mo XL, et al. Analysis of volatile components of *Pogostemon cablin* from Indonesia and China. *Pharm Today*, 2013, 23(1): 1–4 (in Chinese).
焦豪妍, 王玉生, 莫小路, 等. 印尼和中国产广藿香挥发油成分的比较研究. *今日药学*, 2013, 23(1): 1–4.
- [37] Luo JP, Feng YF, Guo XL. Influence of different collection time on yield and constituents of essential oil of herba *Pogostemonis* from Gaoyao county. *J Chin Med Mater*, 2001, 24(5): 316–317 (in Chinese).
罗集鹏, 冯毅凡, 郭晓玲. 不同采收期对广藿香产量及挥发油成分的影响. *中药材*, 2001, 24(5): 316–317.

(本文责编 陈宏宇)