



· 资源与鉴定 ·

离体条件下药用菊花不同品种羟脯氨酸 耐受性比较研究

朱艳芳, 郭朝阳, 薛建平*, 张爱民, 盛玮, 宋运贤

(淮北师范大学 生命科学学院 资源植物生物学安徽省重点实验室, 安徽 淮北 235000)

[摘要] 目的:比较5种药用菊花试管苗在离体条件下对羟脯氨酸的耐受性,为药用菊花引种栽培和育种提供依据。方法:以5种药用菊花试管苗为材料,接种于添加不同浓度羟脯氨酸的培养基中培养,测定植株叶片内游离脯氨酸的含量,并统计植株的受害指数和存活率。结果和结论:在高浓度羟脯氨酸胁迫下,亳菊和怀菊试管苗受害指数较低,成活率相对较高,叶片内游离脯氨酸含量高,具有较强的HYP耐受性。滁菊和贡菊植株存活率低于亳菊和怀菊,表现为中等的HYP耐受性。杭菊试管苗存活率最低,HYP耐受性最差。

[关键词] 药用菊花;离体培养;胁迫筛选;羟脯氨酸

菊花 *Chrysanthemum morifolium* Ramat. 属菊科植物多年生宿根草本植物,是传统大宗常用中药,具清热解毒、止血消肿、疏肝明目等功能^[1]。现代药理研究表明,菊花有显著扩张冠状动脉、舒张血管、增加冠脉血流量、降低血压、改善心脏活力、强心和抗心律不齐的作用。因此,以菊花等组成的复方,用于高血压、动脉硬化症,不但能改善症状,而且能降低血清胆固醇,对防治脑动脉硬化症和冠心病有良好功效^[2]。

近年来,土壤的日益盐碱化,以及干旱缺水等不利环境因素严重制约了药用菊花的生产。因此,选育抗盐碱和干旱等逆境的菊花品种,具有重要的现实意义。本试验在已建立的药用菊花离体培养和植株再生技术体系上,利用羟脯氨酸(HYP)进行离体胁迫处理,以植株存活率、脯氨酸含量作为耐羟脯氨酸性指标,旨在比较《中国药典》收载的亳菊、滁菊、杭菊和贡菊,以及常用的怀菊等5种白菊花品种之间的抗逆性差异,为药用菊花引种栽培和品种选育提供依据。

1 材料与方

1.1 脱毒幼苗 药菊脱毒幼苗由资源植物生物学

安徽省重点实验室药用植物生物技术研究室提供,经薛建平教授鉴定为菊科植物药用菊花 *Ch. morifolium* 中的亳菊(特种亳菊)、滁菊、杭菊(大洋菊)、贡菊(早贡菊)和怀菊(怀大白菊)。

1.2 培养基和培养条件 选用MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹+蔗糖3.0%为基本培养基^[3],培养温度(25±1)℃;光强2 000~3 000 lx;光照时间12 h·d⁻¹。

1.3 羟脯氨酸胁迫对药用菊花试管苗生长的影响

取靠近试管苗茎尖部位长约2 cm的带芽茎段,转入含有羟脯氨酸浓度为2,4,6,8,10 mmol·L⁻¹的培养基中进行胁迫处理,以未添加HYP为对照。每个浓度5瓶,每瓶4~6株,每次实验重复3次,羟脯氨酸胁迫20 d后统计存活率(存活率=存活数/总接种苗数×100%)和受害指数。受害指数分级标准^[4]主要从受害苗叶片、茎的颜色观察,分为4个等级:0级,生长正常;1级,少量叶片边缘或茎段有褐化斑点;2级,50%左右叶片及少量茎褐化,叶片褐化面积占总面积的1/2左右;3级,80%以上叶片褐化或畸形,50%以上茎褐化;4级,完全死亡。

$$\text{受害指数} = \frac{\sum(\text{代表级数} \times \text{株数})}{\sum(\text{最高级数} \times \text{总株数})}$$

1.4 游离脯氨酸含量的测定 根据张志良的方法^[5]测定植株体内积累的脯氨酸。分别称取0.4 g对照组和20 d胁迫处理组的菊花叶片,加5 mL 3%磺基水杨酸研磨,沸水浴提取10 min。冷却后,

[稿件编号] 20110422001

[基金项目] 安徽省自然科学基金项目(090413252);安徽高校省级自然科学研究重点项目(KJ2009A160)

[通信作者] *薛建平, Tel: (0561) 3802025, E-mail: xuejp2000@yahoo.com.cn



3 000 r · min⁻¹离心 10 min。取 2 mL 上清液,加入 2 mL 3% 磺基水杨酸、2 mL 冰乙酸和 4 mL 2.5% 茚三酮溶液,置沸水浴中显色 60 min,冷却,加入 4 mL 甲苯萃取红色物质。静置后,取甲苯相,在 755B 分光光度计上测定其 A₅₂₀,然后根据标准曲线的回归方程,计算出脯氨酸的浓度。

$$\text{脯氨酸}(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}) = \frac{C \times V \times 100}{W \times 10^6}$$

C 脯氨酸的质量浓度(μg · L⁻¹),V 提取液总体积(mL),W 样品鲜重(g)。

1.5 数据分析 使用 SPSS 软件对实验数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 羟脯氨酸胁迫对菊花试管苗存活率的影响

将 5 种药菊的带芽茎段接于含不同浓度 HYP 的培养基上,5 d 左右出现伤害现象。7 d 后,在含 HYP 4 mmol · L⁻¹ 以上的培养基上,几乎所有的苗从基部开始褐化。在 HYP 浓度高于 6 mmol · L⁻¹ 的培养基上部分幼苗已倒伏,甚至死亡;其中杭菊表现最为明显,48.9% 都已褐化死亡。15 d 后,死亡苗数随 HYP 浓度增高而增加,而部分具有耐性的幼芽逐渐长高并继续增殖。羟脯氨酸胁迫 20 d 后,试管苗的受害程度逐渐增加,存活的植株也越来越少(图 1)。此时,对照组试管苗仍为鲜绿色。

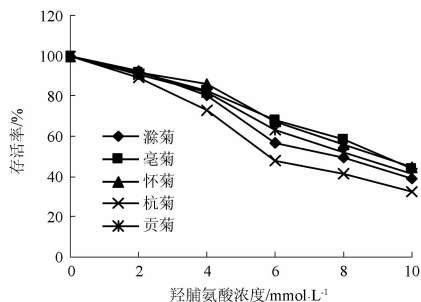


图 1 HYP 胁迫对药用菊花存活率的影响

由图 1 可以看出,当羟脯氨酸浓度为 0 时,试管苗的存活率均为 100%。当浓度增加到 2 mmol · L⁻¹ 时,5 种菊花的存活率均有一定程度的下降,HYP 浓度继续增加,在 4~6 mmol · L⁻¹ 时杭菊的存活率达到其半致死浓度,而滁菊和贡菊的半致死浓度在 6~8 mmol · L⁻¹,进一步增加 HYP 时,杭菊和滁菊的存活率均急剧下降,生存的植株只有原来的 1/3 左右,而此阶段毫菊和怀菊刚达到其半致死浓

度;在含 10 mmol · L⁻¹ 高浓度 HYP 的培养基中以怀菊和毫菊成活率最高分别为 44.3%,43.8%,滁菊相对次之为 39.1%,杭菊最差为 32.4%。因此,怀菊和毫菊对羟脯氨酸具有较强的耐受性。

2.2 羟脯氨酸胁迫对菊花试管苗受害指数的影响

生长在未加 HYP 的培养基上的药菊茎段,长势均良好,叶尖、叶缘都无暗化或枯萎现象发生;而生长在含有 HYP 的培养基上的药菊茎段,首先出现叶尖、叶缘暗化或枯萎,然后基部变黄发黑,叶片脱落直至整个植株死亡。在 20 d 的胁迫处理过程中,随着胁迫时间的延长,5 个品种药菊试管苗的受害指数均呈逐渐上升的趋势,其中,怀菊和毫菊受害指数较低(图 2)。

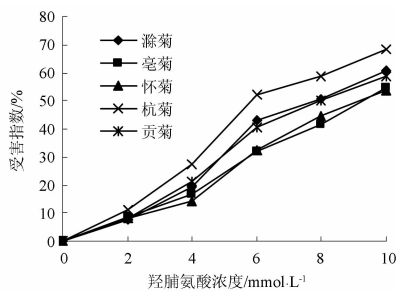


图 2 HYP 胁迫对药用菊花受害指数的影响

2.3 HYP 胁迫对菊花试管苗叶片脯氨酸含量的影响

无 HYP 胁迫下毫菊和怀菊试管苗叶片内的游离脯氨酸含量相对较高,杭菊最低(图 3)。在 HYP 胁迫下,不同品种脯氨酸含量都逐渐升高,但表现出不同的变化趋势,增殖的幅度也不同。其中杭菊在 6 mmol · L⁻¹ HYP 条件下脯氨酸含量达到最高,再提高 HYP 浓度则急剧下降;毫菊和怀菊随 HYP 浓度的增加脯氨酸含量近似线性增高,波动幅度平缓且稳定;滁菊和贡菊脯氨酸含量呈现波动性变化。因此,4 种药用菊花品种中,毫菊和怀菊的耐羟脯氨酸程度最强,滁菊和贡菊耐受性中等,而杭菊的耐受性则是最差。方差分析结果表明(表 1),同一品种不同浓度间的差异极显著水平(P < 0.01);同一浓度不同品种间的差异也达到了显著水平(P < 0.05),说明不同品种的药用菊花对 HYP 耐受性不同。

3 讨论

在正常情况下,植物体内游离脯氨酸含量并不多。当受到盐碱、干旱等外部逆境胁迫时,可引起其

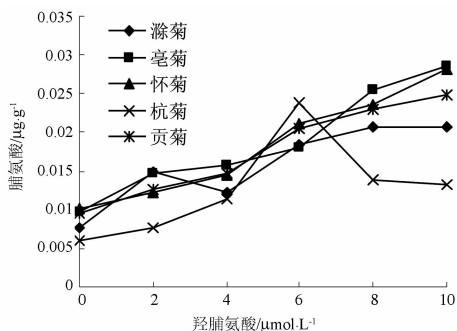


图 3 HYP 胁迫对药用菊花叶片中脯氨酸含量的影响

表 1 HYP 胁迫下药用菊花叶片中脯氨酸含量的方差分析

来源	<i>f</i>	SS	MS	<i>F</i>	<i>P</i>
浓度间	5	0.000 662 3	0.000 132 5	11.50	<0.001
品种间	3	0.000 139 9	0.000 046 6	4.05	0.027
误差	15	0.000 172 7	0.000 011 5		
合计	23	0.000 975 0			

含量的增加,从而增加细胞的原生质浓度,维持机体在逆境下的正常功能^[6]。因此,植物体内游离脯氨酸含量从一定程度上可反映植物的抗逆性。以脯氨酸类似物羟脯氨酸为选择压力,进行植物离体胁迫筛选,突变体往往表现出脯氨酸含量增加,抗逆性增强^[7-8]。

黄璐琦等认为道地药材的形成应是基因型与环境之间相互作用的产物,遗传基因是形成道地药材的内在因素,而特定的生态环境条件是构成道地药材最重要的外在因素^[9]。5 种药用菊花对羟脯氨酸耐受性依次为亳菊 > 怀菊 > 贡菊 > 滁菊 > 杭菊,与存活率和受害指数的结果相一致。从外部生态环境方面分析可知,羟脯氨酸耐受性与它们在地理位置上的分布有一定相关性,即亳菊和怀菊分别位于我国的黄淮地区,生长的土壤环境中的盐渍化相对较高;而杭菊生长在南方的偏酸性土壤中,盐渍化程度较轻;贡菊和滁菊则介于这 2 种地理环境之间丘陵和山区。

决定药材疗效的物质基础是有效成分,有些有效成分只有当受到外界刺激才会产生,往往这种对药用植物残酷的逆境生境是处于这一物种分

布区的边缘,即道地药材形成的“边缘效应”提示建立道地药材生产基地不能仅考虑适合药材生长的区域^[10-11]。因此,在道地药用菊花的引种栽培上,杭菊宜向北方地区引种栽培,亳菊和怀菊则不宜向南方引种栽培。郭巧生等^[12]的研究表明,将生长在道地产区河南温县的怀菊花,引种栽培到江苏南京和浙江桐乡等南方地区,怀菊花中绿原酸、总黄酮等有效成分显著降低;杭菊在苏北和晋南等地均引种成功,并已在商品市场大规模流通,但是关于有效成分的变化还未见报道,值得深入研究。另外,当培养组织或细胞在受到逆境胁迫时会合成新的蛋白质即盐胁迫蛋白^[13],那么药用菊花离体植株在羟脯氨酸胁迫下是否也启动了盐胁迫蛋白基因的表达,值得进一步研究,从而为药用菊花分子育种提供研究基础。

【参考文献】

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2010: 292.
- [2] 顾瑶华,秦民坚. 我国药用菊花的化学及药理学研究新进展[J]. 中国野生植物资源,2004,23(6):7.
- [3] 薛建平,张爱民,高翔,等. 安徽药菊耐盐突变体的筛选[J]. 中国中药杂志,2004,29(9):834.
- [4] 王海英,孙建设,马宝琨,等. 苹果砧木组培苗耐盐筛选技术研究[J]. 果树学报,2000,17(3):164.
- [5] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社,2000:258.
- [6] 汤章诚. 逆境条件下植物脯氨酸的累积及其可能意义[J]. 植物生理学通讯,1984(1):15.
- [7] 贺道耀,余叔文. 水稻高脯氨酸愈伤组织变异体的选择及其耐盐性[J]. 植物生理学报,1995,21(1):65.
- [8] 高玉红,李云. 植物离体培养筛选耐盐突变体的研究[J]. 核农学报,2004,18(6):448.
- [9] 黄璐琦,张瑞贤. 道地药材的生物学探讨[J]. 中国药杂志,1997,32(9):563.
- [10] 黄璐琦,陈美兰,肖培根. 中药材道地性研究的现代生物学基础及模式假说[J]. 中国中药杂志,2004,29(6):494.
- [11] 黄璐琦,彭华胜,肖培根. 中药资源发展的趋势探讨[J]. 中国中药杂志,2011,36(1):1.
- [12] 郭巧生,梁迎暖,张重义,等. 土壤因子对怀菊质量影响研究[J]. 中国中药杂志,2008,33(2):123.
- [13] 王仑山,王鸣刚,王亚馥. 利用组织和细胞培养筛选作物耐逆突变体的研究[J]. 植物学通报,1996,13(2):7.



Study on hydroxyproline tolerance of different cultivars of *Chrysanthemum morifolium in vitro*

ZHU Yanfang, GUO Zhaoyang, XUE Jianping*, ZHANG Aimin, SHENG Wei, SONG Yunxian
(Anhui Key Laboratory of Plant Resources and Biology, School of Life Science,
Huaibei Normal University, Huaibei 235000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate hydroxyproline tolerance of *Chrysanthemum morifolium* plantlets included "Boju", "Huaiju", "Chuju", "Gongju" and "Hangju", and provide references basis for excellent cultivar and breeding of *Ch. morifolium*. **Method:** Plantlets *in vitro* from five kinds of *Ch. morifolium* were inoculated on medium added with different concentrations of hydroxyproline. Free proline in leaves from plantlets was determined, then the damage index and survival rate were compared. **Result and Conclusion:** The results showed that hydroxyproline tolerance of "Boju" and "Huaiju" were superior, the survival rates and free proline of them were higher, but the damage index was inferior. The hydroxyproline tolerance of "Hangju" was the worst, and the survival rate was minimum. The survival rate of "Chuju" and "Gongju" was between "Boju" and "Hangju", and the hydroxyproline tolerance of them was also medium.

[Key words] *Chrysanthemum morifolium*; culture *in vitro*; stress and selection; hydroxyproline

doi:10.4268/cjmm20111905

[责任编辑 吕冬梅]