

盾叶薯蓣四倍体及辐射株系薯蓣皂苷元含量分析

谢彩侠¹, 祝侠丽¹, 高山林², 白雨³, 白雁^{1*} (1. 河南中医学院, 郑州 450008; 2. 中国药科大学, 南京 210038; 3. 天津天士力集团研究院, 天津 300410)

摘要: 目的 提高盾叶薯蓣药材的品质。方法 通过组织培养, 分别用秋水仙素和 Co60 射线处理盾叶薯蓣愈伤组织和丛生芽, 获得盾叶薯蓣四倍体和辐射株系, 并分别对其试管苗和部分株系一年生田间苗根茎中的薯蓣皂苷元含量进行分析。结果 经诱导获得的大部分四倍体和辐射株系试管苗根茎中薯蓣皂苷元含量都超过了二倍体株系; 四倍体株系试管苗与一年生苗根茎中薯蓣皂苷元含量有较强的相关性, 而辐射株系试管苗与一年生苗根茎中薯蓣皂苷元含量相关性不明显。但整体看, 根茎中薯蓣皂苷元含量高的试管苗在田间生长 1 年后, 薯蓣皂苷元含量一般也较高。结论 在组织培养的基础上, 利用多倍体和辐射诱变育种来改善盾叶薯蓣的品质是可行的。

关键词: 盾叶薯蓣; 四倍体; 辐射; 薯蓣皂苷元

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2010)08-0708-04

Determination of the Diosgenin Content in Tetraploid Lines and Radiation Lines of *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright

XIE Caixia¹, ZHU Xiali¹, GAO Shanlin², BAI Yu³, BAI Yan^{1*} (1. Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China; 2. China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China; 3. Research Institution of Tianjin Tasy Group, Tianjin 300410, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To improve the quality of *Dioscorea zingiberensis* C.H.Wright. **METHODS** By tissue culture, callus and clump buds of *D. zingiberensis* were treated with colchicine and 60Co γ ray to induce autotetraploid lines and radiation lines which were selected according to the diosgenin content in rhizoma of the plantlets and some one-year growth plants. **RESULTS** The diosgenin content in rhizoma of the most autotetraploid and radiation plantlets were higher than that of contral. The diosgenin content in rhizoma of autotetraploid plantlets and one-year growth plants had strong relation. On the contrary, it had no evident relation in radiation lines. On the whole, the lines with high content diosgenin in rhizoma of the plantlets might have high content of diosgenin in seedling. **CONCLUSION** On the basis of tissue culture, the research project of polyploidy and radiation breeding was reasonable for improving the quality of *D. zingiberensis*.

KEY WORDS: *Dioscorea zingiberensis* C.H.Wright.; autotetraploid; radiation; diosgenin

盾叶薯蓣(*Dioscorea zingiberensis* C.H.Wright.) 属薯蓣科薯蓣属, 又名黄姜、火头根, 其根茎内薯蓣皂素的含量一般为 2% 左右, 是目前世界上最好的激素类药源植物。同时具有清肺止咳、利湿痛淋、通络止痛、解毒消肿的功能, 可治肺热咳嗽、湿热淋痛、风湿腰痛、痈肿恶疮、跌打扭伤、蜂螫虫咬; 其水溶性甾体皂苷成分对心肌缺血、胸痹、高脂血

症等有明显治疗作用。

盾叶薯蓣是我国特有资源植物, 是世界上薯蓣皂素含量最高的种类, 最高单株含量达到 16.5%, 超过了世界王牌——墨西哥小穗花薯蓣 15 % 的纪录。据调查, 我国 10 个省市都有盾叶薯蓣分布, 其中湖北、湖南、陕西、四川分布最为集中, 目前在陕西安康地区、湖北郧西地区、湖南安化地区、

基金项目: 河南省重大公益项目基金(081100912500)

作者简介: 谢彩侠, 女, 博士, 副教授 Tel: 13673651577
(0371)65962967 E-mail: white-yan@hotmail.com.cn

E-mail: nanyang.xcx@163.com

*通信作者: 白雁, 女, 教授 Tel:

河南南阳地区都有一定规模的种植面积。实现人工栽培后,虽然解决了皂素供应问题,但是黄姜原料依旧短缺,主要原因是人工栽培产量低、皂素含量变化较大,质量难以控制。因此有必要进行品种选育和提纯复壮的工作。鉴于此,笔者利用组织培养技术,对盾叶薯蓣进行了多倍体诱导和辐射诱变育种技术研究,并对诱导和辐射获得的株系进行了薯蓣皂苷元含量分析,以期最终选育出有效成分含量高的优良品种。

1 材料和方法

1.1 材料来源

盾叶薯蓣原植物采自江苏省中科院植物所植物园,经秦惠贞、丁志遵研究员鉴定为薯蓣科植物 *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright。选取幼嫩的盾叶薯蓣叶片和茎段,肥皂水清洗 15 min,用流水冲洗 1 h 左右,在超净工作台上,先在 75%酒精中浸泡 30 s,再放入 0.1%升汞溶液中(加 3~5 滴吐温 20)消毒 15 min,无菌水冲洗 5 次。接种在含 BA0.1 mg·L⁻¹+病毒唑 5.0 mg·L⁻¹ 的 MS 培养基上,得到无菌试管苗作为试验材料。

薯蓣皂苷元对照品(中国药品生物制品检定所,批号:07039813,纯度>98.8%)。

1.2 四倍体及辐射诱变株系的获得

前期实验^[1-4]表明:0.2%秋水仙碱浸泡 36 h,转接在添加 40×10^{-6} 秋水仙碱的 MS+BA0.1 mg·L⁻¹+病毒唑 5.0 mg·L⁻¹+PP₃₃₃0.5 mg·L⁻¹ 的培养基上是诱导盾叶薯蓣多倍体的最佳方法,其死亡率为 62.0%,诱导率为 15.0%。经过 3 次重复根尖染色体的鉴定,最后获得了 32 个同源四倍体株系。同时在试管苗扩繁期间根据生长情况,淘汰掉长势差,生长率低的四倍体株系,最终确定了 19 个盾叶薯蓣同源四倍体株系进行进一步的选育工作。

用不同剂量的 Co60 辐照盾叶薯蓣的丛生芽,30 d 后统计存活率,对存活芽进行扩大繁殖,并淘汰长势较弱,生长畸形的植株。

1.3 盾叶薯蓣四倍体和辐射诱变株系试管苗根茎中薯蓣皂苷元含量的测定^[5-6]

1.3.1 色谱条件 仪器:Agilent 1100 Series; Microsorb-MV100 C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm)色谱柱;流动相:无水甲醇;进样量 10 μL,流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 203 nm,柱温为室温。

1.3.2 线性关系考察 精密称取薯蓣皂苷元对照品 0.002 g,用无水乙醇配成浓度为 1.0 mg·mL⁻¹ 的

对照品溶液。精密吸取对照品溶液 1, 2, 4, 6, 8, 10 μL,按上述 HPLC 色谱条件测定峰面积,以峰面积为纵坐标,进样量为横坐标进行回归处理,得回归方程为 $Y=3.5241+64.87X$, $r=0.9978$ 。

1.3.3 样品制备及含量测定 盾叶薯蓣试管苗在 MS/2+IAA0.2 mg·L⁻¹+NAA0.2 mg·L⁻¹ 培养基上诱导生根,待苗长至 30~35 d,洗净根上的培养基,将根剪掉,在 60 °C 下烘干,粉碎,过 60 目筛,供含量分析用。精密称取已烘干的盾叶薯蓣根茎粉末 1.5~2.0 g,置于三角瓶中,加 2.0 mol·L⁻¹ 的硫酸 50 mL,在 100 °C 水浴锅中水解 4 h,放冷过滤,药渣用蒸馏水洗至中性,60 °C 干燥后,用石油醚(60~90 °C)50 mL 在 90 °C 水浴中索氏提取 5 h,提取液回收至干后用无水乙醇溶解,过滤至 5 mL 的量瓶中,用无水乙醇定容。得供试品溶液,按“1.3.1”项下方法分析,以外标一点法计算各样品中薯蓣皂苷元的含量。样品中薯蓣皂苷元与其他成分达到良好分离,结果见图 1。

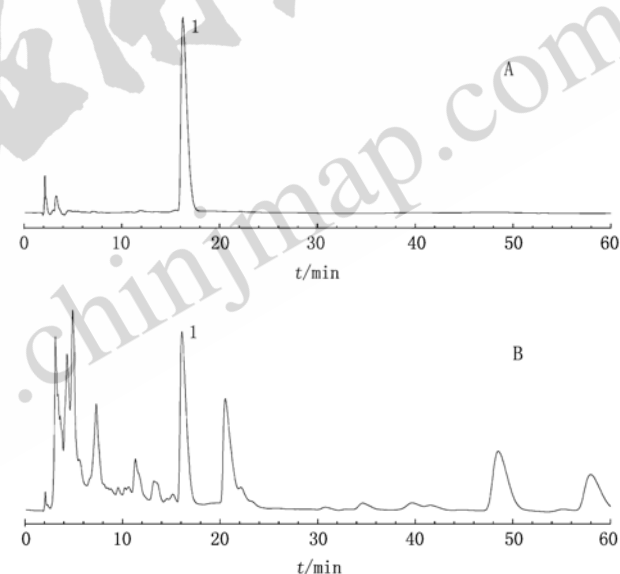


图 1 盾叶薯蓣皂苷元的高效液相色谱图

A—对照品; B—样品; 1—薯蓣皂苷元

Fig 1 HPLC chromatogram of diosgenin

A—control; B—sample; 1—diosgenin

1.4 盾叶薯蓣部分一年生四倍体及辐射诱变株系根茎中薯蓣皂苷元含量

1.4.1 材料 将四倍体和辐射诱变株系试管苗在 MS/2+IAA0.2 mg·L⁻¹+NAA0.2 mg·L⁻¹ 培养基上诱导生根,待根长至 3~4 cm 将试管苗移出培养室。在室温下开瓶加入少量水保湿,炼苗 1~2 d。将试管苗取出,小心洗去苗上的培养基。傍晚时分,将

苗栽入以蛭石和复合肥为基质的苗床中，每日中午喷雾 2 h 保湿，30 d 后移栽到大田中，使其在自然条件下生长 1 年，挖取地下根茎，去除泥沙、切片、在 60 ℃干燥至恒重，粉碎过 60 目筛，供含量分析用。由于盾叶薯蓣试管苗移栽成活率较低，导致一年生四倍体和辐射诱变各株系材料有限，因此笔者仅对 6 个四倍体和 5 个辐射株系根茎中的薯蓣皂苷元含量进行了分析。

1.4.2 薯蓣皂苷元含量测定 精密称取已烘干的盾叶薯蓣根茎粉末 0.2~0.3 g，其他样品处理和测定同“1.3”项下方法。

2 结果与分析

2.1 不同辐射剂量丛生芽的存活率

剂量为 200，100 Gray 时存活率几乎为零，而剂量为 50 Gray 时基本为半数致死量，辐照效果最佳，见表 1。对存活幼苗进行编号，建立株系，并进行扩大繁殖。繁殖过程中淘汰长势较差、生长畸形的株系，经淘汰，最终保留 Co72、Co27、Co6、Co25、Co86、Co61、Co24、Co68、Co32、Co12、Co76 等 11 个生长健壮的株系作为进一步选育的材料。

表 1 不同辐射剂量丛生芽的存活率

Tab 1 The effect of the different radiate dose on the survived rate of the buds

辐照剂量/Gray	辐照数/棵	存活数/棵	存活率/%
200	100	0	0
100	100	2	2
50	100	46	46

2.2 盾叶薯蓣四倍体和辐射诱变株系试管苗薯蓣皂苷元含量

对诱导获得的 19 个四倍体株系和 11 个辐射诱变株系试管苗根茎中的薯蓣皂苷元含量进行了初步分析，结果见表 2、表 3。部分株系测定图谱见图 2。

表 2 盾叶薯蓣四倍体株系试管苗薯蓣皂苷元含量

Tab2 The content of diosgenin in autotetraploid lines of *D. zingibiernsis*

株系	皂苷元含量/%	相对含量	株系	皂苷元含量/%	相对含量
C12	0.09	0.75	Y15	0.09	0.75
13-16	0.05	0.42	12-2	0.07	0.58
10-1	0.21	1.75	Y24	0.15	1.25
13-3	0.14	1.17	G11	0.08	0.67
Y23	0.13	1.08	Y3	0.07	0.58
3-5	0.09	0.75	G2	0.14	1.17
3-13	0.12	1.00	12-4	0.18	1.50
16-8	0.06	0.50	10-10	0.13	1.08
11-10	0.15	1.25	3-1	0.16	1.33
Y9	0.18	1.50	CK	0.12	1.00

表 3 盾叶薯蓣辐射诱变株系薯蓣皂苷元含量

Tab 3 The content of diosgenin in radiation lines of *D. zingibiernsis*

株系	皂苷元含量/%	相对含量	株系	皂苷元含量/%	相对含量
Co72	0.09	0.75	Co24	0.16	1.33
Co27	0.20	1.67	Co68	0.15	1.25
Co6	0.07	0.58	Co32	0.12	1.08
Co25	0.14	1.17	Co12	0.14	1.17
Co86	0.15	1.25	Co76	0.13	1.08
Co61	0.12	1.00	CK	0.12	1.00

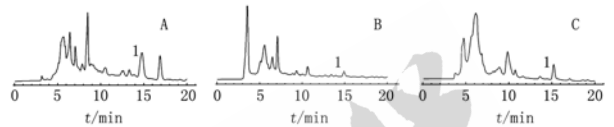


图 2 不同株系薯蓣皂苷的高效液相色谱图

A-10-1 株系；B-Co27 株系；C-对照株系；1-薯蓣皂苷元

Fig 2 HPLC chromatogram of the diosgenin of different lines

A-10-1line; B-Co27 line; C-control line; 1-diosgenin

测定结果显示：19 个盾叶薯蓣四倍体株系中，有 10 个株系的薯蓣皂苷元含量高于二倍体，平均比对照株系高出 30.8%。其中 10-1、12-4、y9、3-1、y24、11-10 分别比对照株系高出 75%，50%，50%，33%，25%，25%。11 个辐射诱变株系中，有 6 个株系的薯蓣皂苷元含量高于对照，平均比对照株系高出 25%。其中 Co27、Co24、Co86、Co68、Co25、Co12 分别比对照株系高出 67%，33%，25%，25%，17%，17%。

2.3 盾叶薯蓣部分一年生四倍体株系及辐射诱变株系薯蓣皂苷元含量

对 6 个四倍体株系及 5 个辐射株系在田间生长一年后的薯蓣皂苷元含量进行了分析，结果见表 4 和表 5。

表 4 部分四倍体株系试管苗与一年生苗薯蓣皂苷元百分含量

Tab 4 The percentage composition of diosgenin of plantlet and that of one year growth plant

株系	10-1	G11	Y3	Y24	12-4	13-16	CK
试管苗	0.21	0.08	0.07	0.15	0.18	0.05	0.12
一年生苗	1.52	0.95	0.89	1.29	1.43	0.75	1.19

结果表明，试管苗阶段薯蓣皂苷元含量高的株系在生长 1 年后，薯蓣皂苷元含量也相应较高，相关系数为 0.992 2，因此试管苗阶段测定薯蓣皂苷元含量可以对优良株系进行初步选育。

表5 部分辐射株系试管苗与一年生苗薯蓣皂苷元百分含量
Tab 5 The percentage composition of diosgenin of plantlet and that of one year growth plant

株系	Co72	Co32	Co25	Co6	Co27	CK
试管苗	0.09	0.13	0.14	0.07	0.20	0.12
一年生苗	1.06	1.20	1.30	0.60	1.29	1.19

表5结果表明,在试管苗阶段薯蓣皂苷元含量差异明显的株系在田间生长一年后,含量差异并不明显,但整体来讲,在试管苗阶段薯蓣皂苷元含量高的辐射株系在苗床生长一年后,薯蓣皂苷元含量一般也较高。

3 讨论

传统上盾叶薯蓣采用根茎繁殖,而要获得薯蓣皂苷元含量较高的盾叶薯蓣,要保证其生长3年才能采收,这样就造成了盾叶薯蓣种质资源的短缺,而组织培养技术具有不受地区、季节和气候条件限制等优势,可以大规模地进行培养,提供大量健壮、纯度高的培养材料。这不仅可以解决盾叶薯蓣种质短缺的问题,而且可缩短育种年限,使所培育的优良品种可以在短时间内大量繁殖推广应用。本试验在组织培养的基础上,利用秋水仙素诱导和辐射诱变获得了一系列株系,并对其根茎中的薯蓣皂苷元含量进行了分析,结果表明,在试管苗阶段薯蓣皂苷元含量高的株系在苗床生长一年后,薯蓣皂苷元含量一般也较高。说明在组织培养的基础上,利用多倍体和辐射诱变育种可以改善盾叶薯蓣的品质,

而且在试管苗阶段,通过测定薯蓣皂苷元含量对株系进行前期筛选是可行的。

本试验为盾叶薯蓣多倍体育种和辐射诱变育种研究的一部分,此后还将继续进行盾叶薯蓣优良品种的选育,经过3~5年盾叶薯蓣质量和化学指标的评价和考察,最终培育出高产优质的盾叶薯蓣新品种。

REFERENCES

- [1] XIE C X, GAO S L, QIN H Z, et al. The inducement and identification of the polyploid of *Dioscorea zingiberensis* [J]. Pharm Biotechnol(药物生物技术), 2005, 12(1): 15-18.
- [2] XIE C X, SHI H Q, GAO S L, et al. The identification and analysis of the diosgenin content in autoteraploid of *Dioscorea zingiberensis* [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2009, 40(8): 1314-1316.
- [3] QU J P, GAO S L. Comparison of physiological activity in tetraploid lines and radiation lines of *Dioscorea zingiberensis* C.H.Wright [J]. Pharm Biotechnol(药物生物技术), 2007, 14(3): 196-200.
- [4] XIE C X, DONG C M, GAO S L, et al. Analysis of biochemical indices and efficient ingredients in autoteraploid of *Dioscorea Zingiberensis* [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2009, 32(6): 840-843.
- [5] WANG J, YANG K D, CHEN J. Study on hydrolysis conditions of *Dioscorea nipponica* with uniform design method [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2002, 25(9): 659-660.
- [6] XIE C X, GAO S L, ZHU D N, et al. Comparison of different methods of diosgenin extraction from *Dioscorea zingiberensis* [J]. J Plant Resources Environment(植物资源与环境学报), 2005, 14(1): 23-25.