

白英豪, 张晓丽, 李明军. 秋水仙素诱导丹参多倍体研究进展[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(5): 18–20.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.05.004

秋水仙素诱导丹参多倍体研究进展

白英豪¹, 张晓丽^{1,2}, 李明军^{1,2}

(1. 河南师范大学生命科学学院, 河南新乡 453007;

2. 河南省高校道地中药材保育及利用工程技术研究中心/河南省绿色药材生物技术工程实验室, 河南新乡 453007)

摘要:对丹参进行多倍体育种可提高其产量和品质, 秋水仙素诱导法是育种方法之一。笔者对秋水仙素诱导丹参多倍体的主要方法、影响诱导效果的主要因素以及主要的多倍体鉴定方法进行了综述。

关键词:丹参; 多倍体; 秋水仙素; 诱导方法; 影响因素; 多倍体鉴定方法

中图分类号: S567.5⁺30.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)05-0018-03

丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bunge.) 是唇形科鼠尾草属多年生草本植物, 根部色红可入药, 具有活血化瘀、清心止痛等功效^[1], 主要分布于我国辽宁省、河北省、河南省、甘肃省、四川省等地区, 根据产地、性状不同有白花丹参、紫花丹参、南丹参、川丹参、甘肃丹参、山东丹参、裕丹参等许多品种。随着丹参在临床上越来越广泛的应用, 其药用价值日渐被人们重视, 而生产中丹参良种短缺、种性退化, 产量和品质下降, 因而培育高产优质的新品种势在必行。

多倍体现象普遍存在于植物界中, 许多重要的经济作物和粮食作物都是多倍体, 而许多物种在进化过程中都经历了多倍化与“多倍体二倍化”过程^[2]。多倍体植物具有营养器官的巨大性^[3]、抗逆性增强、生长率提高、有效成分含量增加

等特点, 而这些特点完全符合优质药材的要求, 因而染色体多倍化成为药用植物育种的重要方向之一。自然界多倍体虽然分布广泛, 但数量有限^[4], 因此, 需要人工诱导, 利用秋水仙素是诱导植物多倍体最常用的方法之一。秋水仙素可阻碍细胞分裂中期纺锤丝的形成, 使有丝分裂被迫中断^[5], 但细胞和细胞质并不分离, 从而使染色体加倍。

丹参的染色体组基数较小($x=8$), 诱导多倍体易于成功, 且染色体计数较为容易; 为异花授粉植物, 有很高的遗传多样性, 易于筛选优良株系; 并可行无性繁殖, 规避了多倍化后的不育问题; 以块根为药用部位, 可以充分利用多倍化所造成的营养器官的巨大性而提高产量, 这些特征使丹参成为多倍体育种的典型材料, 近年来, 有学者对丹参进行多倍化遗传改良, 高山林等获得了丹参同源四倍体^[6], 并选育出四倍体优良品系 61-2-22^[7]; 段英姿获得了南丹参的不同多倍体株系^[8]; 陈力等对白花丹参进行了同源四倍体诱导^[9]; 刘竟飞等通过杂交后诱导获得了丹参异源四倍体^[10]; 吴顺等对紫花丹参进行多倍体诱导等^[11]。众多研究中, 秋水仙素是最常用的多倍体诱变剂, 笔者对秋水仙素诱导不同品种丹参多倍

收稿日期: 2016-10-26

基金项目: 国家中医药局中医药行业科研专项子课题(编号: 201407005)。

作者简介: 白英豪(1991—), 男, 河南信阳人, 硕士研究生, 研究方向为药用植物生物技术。E-mail: baiyinghaobt@sina.com。

通信作者: 李明军, 博士, 教授。E-mail: limingjun2002@263.net。

[14] 胡志超, 王海鸥, 胡良龙. 我国花生生产机械化技术[J]. 农机化研究, 2010, 32(4): 240–243.

[15] 胡志超, 王海鸥, 彭宝良, 等. 国内外花生收获机械化现状与发展[J]. 中国农机化, 2006(5): 40–43.

[16] 王伯凯, 吴 努, 胡志超, 等. 国内外花生收获机械发展历程与发展思路[J]. 中国农机化, 2011(4): 6–9.

[17] 尚书旗, 刘曙光, 王方艳, 等. 花生生产机械的应用现状与进展分析[J]. 花生学报, 2003, 32(增刊1): 509–517.

[18] 尚书旗, 刘曙光, 王方艳, 等. 花生生产机械的研究现状与进展分析[J]. 农业机械学报, 2005, 36(3): 143–147.

[19] 尚书旗, 王方艳, 刘曙光, 等. 花生收获机械的研究现状与发展趋势[J]. 农业工程学报, 2004, 20(1): 20–25.

[20] 杨然兵, 尚书旗, 王方艳, 等. 花生收获机械的应用现状与进展[J]. 农业机械, 2008(2): 26–28.

[21] 尚书旗, 王延耀, 周亚龙. 花生收获机的应用现状与推广[J]. 农机科技推广, 2004(8): 10–11.

[22] 尚书旗, 周亚龙, 王晓燕, 等. 三种花生收获机的作业性能对比试验研究[J]. 农业工程学报, 2008, 24(6): 150–153.

[23] 杨然兵, 徐玉凤, 尚书旗, 等. 花生联合收获机去土装置的设计与对比试验[J]. 农机化研究, 2009(6): 106–109.

[24] 沈庆彬, 唐洪杰, 陈香艳, 等. 花生收获机械的应用与发展[J]. 农业科技通讯, 2013(5): 214–215.

[25] 余泳昌, 刘文艺, 冯春丽. 花生收获机械发展与应用现状[J]. 山东农机, 2005(6): 10–11.

[26] 胡志超, 王海鸥, 王建楠, 等. 4HLB-2 型半喂入花生联合收获机试验[J]. 农业机械学报, 2010, 41(4): 79–84.

[27] 胡志超, 彭宝良, 尹文庆, 等. 多功能根茎类作物联合收获机设计与试验[J]. 农业机械学报, 2008, 39(8): 58–61.

[28] 胡志超, 彭宝良, 尹文庆, 等. 4LH2 型半喂入自走式花生联合收获机的研制[J]. 农业工程学报, 2008, 24(3): 148–153.

[29] 王方艳, 尚书旗. 常用花生收获机性能对比试验[J]. 农业机械, 2009(1): 80–81.

[30] 杨然兵, 尚书旗. 花生联合收获机柔性夹持装置设计与试验[J]. 农业机械学报, 2010, 41(8): 67–71.

[31] 彭宝良, 胡志超, 张会娟, 等. 江苏省花生收获机械化概况与发展对策[J]. 农业机械, 2008(5): 54–55.

体的方法及多倍体鉴定进行综述,以期对丹参多倍体的诱导流程提供理论指导。

1 秋水仙素诱导方法

秋水仙素诱导法分为活体诱导、离体诱导 2 种^[12],活体诱导包括浸种法、生长点滴定法、涂抹法;离体诱导包括浸泡法、培养基中添加秋水仙素的方法。相对来说,活体诱导易于实施,多用于基层生产实践中,但各种方法都有一定的不足,如浸种法直接接触秋水仙素,毒害作用过强;涂抹法不易充分接触作用部位等,总体表现为诱导率较低、嵌合体现象较严重,且诱导后不易筛选多倍体,很难大量获得多倍体材料,即使获得多倍体稳定性也较差,易受环境影响而发生回复突变,所以一般选用离体诱导法。离体诱导中,吴顺等将浸泡法与培养基添加法相结合进行多倍体诱导,操作流程较复杂^[11],众多研究者采用培养基中添加秋水仙素的方法诱导丹参多倍体^[6,8-10,13],诱导流程如下:首先确定诱导对象,即外植体,可以是试管苗在无菌条件下切成的带芽茎段或叶片,可以是诱导获得的愈伤组织,也可以是经过次氯酸钠灭菌的种子,也可以是株高为 1.5~2.0 cm 的幼苗;然后确定秋水仙素浓度梯度及处理时间梯度,一般各为 3~4 个水平,进行全面试验,根据设置的浓度梯度配制诱导培养基,即快繁(或继代)培养基+不同浓度秋水仙素;将外植体转入诱导培养基,根据设置的时间梯度,在处理不同时间后转入正常快繁(或继代)培养基,继代 3 次后进行倍性鉴定,并确定最佳秋水仙素处理组合。

2 影响秋水仙素诱导丹参多倍体效果的因素

2.1 选择材料

由于秋水仙素是作用于正在分裂的细胞,因此,应选择分

裂旺盛的组织作为诱变材料,如茎尖、根尖、幼叶、顶芽等^[14],外植体可选择种子、幼苗、愈伤组织、胚状体、悬浮细胞系、小孢子、原生质体或单细胞等^[15],不同植物诱导多倍体的最适宜外植体不同,同一种植物也可选用多种外植体。处理材料对诱导效果有很大影响,并且还影响处理时间和浓度。段英姿利用培养基中添加秋水仙碱的方法对幼苗、叶片、愈伤组织 3 种外植体进行染色体诱导加倍,结果表明,幼苗在秋水仙碱浓度为 40 mg/L、处理时间为 5 d 时加倍效果最好,达到 11%,而叶片(预培养 7 d)和愈伤组织用 15 mg/L 秋水仙碱处理 7 d 时加倍效果最好,达到 33.33%^[8],表明早期外植体的加倍效果比成苗后要好,其中叶片的培养时间较短,是最好的外植体。

2.2 处理时间及浓度

一般来说,秋水仙素浓度越高,处理时间就要相应越短一些,反之亦然。处理时间较短、浓度较低,诱导率会较低;随着时间延长、浓度升高,诱导率会上升;时间和浓度增加到一定程度后,死亡率会越来越高,因此诱导率会急剧下降,这就涉及到秋水仙素的毒害作用。毒害作用不仅会降低诱导率,还会抑制根的生长和不定芽的分化,甚至使外植体在继代时褐化死亡,因此,要严格控制秋水仙素浓度和处理时间,选择最佳的处理组合。对于大多数植物,浓度一般设置在 0.01%~0.40%,处理时间多为 2~6 d^[16]。丹参最佳处理组合见表 1。

由此可见,秋水仙素处理时间及浓度受诱变材料影响很大,若为幼芽则选择低浓度长时间;若为叶片则选择低浓度相对短的时间;若为种子,由于有种皮保护,应选择高浓度,而时间就相应更短。总的来说,诱导丹参的秋水仙素浓度要低,一般水平为 0.01%,这与丹参本身的试管苗生长特点有关,如茎相对菊花、地黄等植物较细弱。

表 1 秋水仙素诱导丹参多倍体实例

| 年份 | 处理材料 | 最佳处理组合 | | 诱导率 (%) | 结果 |
|------|------|----------|--------------------|------------|--------------------------------------|
| | | 浓度(mg/L) | 时间 | | |
| 1996 | 丛生芽 | 10 | 30 d | 6.00 | 5 株同源四倍体 ^[6] |
| 2009 | 种子 | 100 | 72~96 h | 60.70 | 16 株四倍体整倍体,1 株四倍体非整倍体 ^[9] |
| 2009 | 愈伤组织 | 15 | 25~35 d | 8.90 | 7 株异源四倍体 ^[10] |
| 2011 | 幼叶 | 12 | 6 d | 36.60 | 17 株多倍体 ^[13] |
| 2016 | 叶片 | 15 | 浸泡 12 h 培养基预培养 7 d | 31.67 | 86 株多倍体 ^[11] |

2.3 其他因素

温度对诱导效果也有一定的影响,一般设置温度为 18~25℃,在此温度下细胞分裂旺盛,有利于多倍体诱导^[3],而高温对处理不利,处理后会影响植株生长。光照也会影响诱导率,因为秋水仙素见光易分解,因此,采用浸泡法,一般在暗处进行。由于二甲基亚砷能减轻秋水仙素的毒害作用,降低嵌合体的发生率^[17],并可以促进秋水仙素渗透到植物组织中,常与秋水仙素混合使用以提高诱导率。

3 丹参多倍体的鉴定方法

对丹参进行多倍体诱导后必须进行鉴定,以筛选出多倍体株系。常用的鉴定方法有形态学鉴定、细胞学鉴定、染色体计数法鉴定、同工酶鉴定。

3.1 形态学鉴定

多倍体植物通常表现出营养器官的巨大性,以及某些外

部形态的改变。高山林等比较丹参四倍体与二倍体农艺性状发现,四倍体植株叶型改变,叶片增大、增厚、浓绿,茎秆粗壮,根部药材粗大,植株更高,花序缩短等,这些特征都可以作为鉴定多倍体的依据^[6];陈力等观察发现,四倍体白花丹参在株高、冠幅、叶片大小、叶片厚度、叶柄绒毛、花、花药大小等方面都明显大或高于原二倍体^[9];吴顺等发现,多倍体丹参叶片更为肥大,出现皱缩现象,根粗色深^[11]。该方法简便直观,但外部形态可能受环境的影响,所以需要结合其他鉴定方法。

3.2 细胞学鉴定

多倍体植物的气孔密度、保卫细胞大小、花粉粒大小等细胞学特征与二倍体有显著差异。房翠萍等研究发现,多倍体丹参的气孔密度显著小于二倍体,气孔平均长宽比二倍体大,保卫细胞明显大于二倍体^[13];陈力等研究发现,四倍体与二倍体白花丹参的花粉粒大小有显著差异^[9]。该方法可以作为多倍体鉴定的辅助指标。

3.3 染色体计数法鉴定

该方法直观准确,是应用最广泛的多倍体鉴定方法。鉴定时取根尖、茎尖等分裂旺盛的组织,经过预处理、固定、解离、染液染色、压片等步骤制成细胞压片,然后在光学显微镜下观察计数。陈力等用该方法对诱导后丹参株系进行染色体核型分析,确定获得了 16 株同源四倍体^[9];吴顺等利用根尖压片确定变异植株的染色体已加倍,并发现部分植株为嵌合体^[11]。

3.4 同工酶鉴定

染色体加倍后同工酶谱会发生变化,段英姿比较了南丹参多倍体与二倍体的过氧化物酶谱与酯酶谱,发现谱带数目与酶活性强弱都发生了变化,总体表现为多倍体酶活性更高且多出若干特征性谱带^[8]。

4 展望

迄今为止,人工诱导多倍体在植物特别是药用植物育种方面已得到越来越广泛的应用,三七、决明、柴胡、太子参、何首乌、白术、黄芪、桔梗、川贝母、菊花脑、怀牛膝、枸杞、当归等都进行了多倍化尝试^[18]。对丹参进行多倍体育种已有许多学者进行了研究,但诱导方法还是局限于秋水仙素,且试验有一定的重复性,而秋水仙素对植物材料和试验者有很强的毒害作用,因此,寻找新型、廉价、低毒、诱导率高的化学试剂或其他诱导方法是我们研究的目标。目前,某些新的微管抑制剂,如戊炔草胺、安磺灵、氟乐灵等在多倍体诱导中开始使用^[19],黄群策等还利用氮离子注入来促进秋水仙素的诱导效果^[20],这些都是有意义的探索。同时,在多倍体鉴定方法上,也需要力求简便、快速、准确,比如流式细胞仪鉴定法以及利用分子标记技术、原位杂交技术^[21]等分子水平的鉴定方法已得到越来越多的应用。相关研究者利用远红外成像系统来测定叶片温度,以此来迅速而准确地鉴别多倍体^[22];韩毅科等利用染色中心直径和异染色质数目不同来鉴定黄瓜多倍体^[23];郭启高等利用高温、低温胁迫来判断西瓜倍性^[24];还有学者以待鉴定诱导植株为母本,以二倍体植株为父本进行杂交,以子代的育性来判断母本倍性,我们需要更多类似的尝试。

目前,主要获得的是丹参四倍体,四倍体可以作为母本和二倍体父本进行杂交来获得三倍体丹参,从而同时发挥杂种优势和多倍体优势;国外有报道,利用多倍体植物减数分裂时的联会紊乱,来获得只有 1 条或数条染色体加倍的花粉,然后利用花粉培养和秋水仙素诱导染色体加倍获得只有 1 对或几对染色体加倍的非整倍体,这样就获得了大量遗传基础不同的表型,通过筛选就可能获得产量品质等性状优于原四倍体的株系。综上所述,秋水仙素诱导丹参多倍体并不是终点,而可以作为遗传育种的起点,具有更深层次的意义。

参考文献:

- [1] Su C Y, Ming Q L, Khalid R, et al. *Salvia miltiorrhiza*: traditional medicinal uses, chemistry, and pharmacology [J]. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2015, 13(3): 163–182.
- [2] Blanc G, Wolfe K H. Widespread paleopolyploidy in model plant species inferred from age distributions of duplicate genes [J]. *Plant Cell*, 2004, 16(7): 1667–1678.
- [3] Abel S, Becker H C. The effect of autopolyploidy on biomass production in homozygous lines of *Brassica rapa* and *Brassica oleracea* [J]. *Plant Breeding*, 2007, 126(6): 642–643.
- [4] 韦荣昌, 吴庆华, 马小军, 等. 植物多倍体的研究进展 [J]. *种子*, 2013, 32(7): 50–53.
- [5] Elisabeth N, Jean – Michel S. Colchicine today [J]. *Joint Bone Spine Revue Du Rhumatisme*, 2006, 73(6): 672–678.
- [6] Gao S L, Zhu D N, Cai Z H, et al. Autotetraploid plants from colchicine – treated bud culture of *Salvia miltiorrhiza* Bge [J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1996, 47(1): 73–77.
- [7] 高山林, 朱丹妮, 蔡朝晖, 等. 丹参四倍体优良新品系 61–2–22 的选育和鉴定 [J]. *中国中药杂志*, 1995, 20(6): 75–76.
- [8] 段英姿. 南丹参的快速繁殖与多倍体诱导的研究 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2003.
- [9] 陈力, 李秀兰. 白花丹参同源四倍体的诱导与鉴定 [J]. *中草药*, 2009, 40(12): 1995–1997.
- [10] 刘竟飞, 高山林, 黄和平, 等. 丹参杂交育种及其异源四倍体的诱导与鉴定 [J]. *药物生物技术*, 2009, 16(3): 260–264.
- [11] 吴顺, 葛倩雯, 刘肖珂, 等. 紫花丹参多倍体的初步诱导 [J]. *中药材*, 2016, 39(3): 479–481.
- [12] 刘露颖, 赵喜亭, 李明军. 秋水仙碱诱导药用植物多倍体的研究进展 [J]. *江苏农业科学*, 2014, 42(4): 178–181.
- [13] Fang C P, Shan C G, Wang W T, et al. Preliminary study on induction and identification of polyploidy of Shandong *Salvia miltiorrhiza* buds treated by colchicine [J]. *Agricultural Science & Technology*, 2011, 12(9): 1338–1341.
- [14] 周慧文, 冯斗, 严华兵. 秋水仙素离子诱导多倍体研究进展 [J]. *核农学报*, 2015, 29(7): 1307–1315.
- [15] 陆柳英, 谢向誉, 严华兵. 秋水仙素诱导木薯多倍体研究进展 [J]. *农学学报*, 2014, 4(1): 44–47.
- [16] 张晓艳, 刘剑锋, 王丽品. 药用植物多倍体诱导与鉴定研究进展 [J]. *吉林师范大学学报 (自然科学版)*, 2009, 30(4): 128–131.
- [17] Novak J F. Production of garlic (*Allium sativum* L.) tetraploids in shoot – tip *in vitro* culture [J]. *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung*, 1983, 91(4): 329–333.
- [18] 李铁军, 王丽珍, 杜雪. 药用植物多倍体的研究概况 [J]. *中药材*, 2009, 32(9): 1481–1485.
- [19] 黄权军, 张志毅, 康向阳. 四种抗微管物质诱导毛新杨 2n 花粉粒的研究 [J]. *北京林业大学学报*, 2002, 24(1): 12–15.
- [20] 黄群策, 李玉峰, 余增亮. 离子注入后诱导水稻多倍体的效果 [J]. *激光生物学报*, 2006, 15(2): 118–122.
- [21] Han Y H, Li D Y, Li Y C, et al. Cytogenetic identification of a new hexaploid *Coix aquatica* cyto – type [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2004, 46(6): 724–729.
- [22] 代西梅, 黄群策. 植物多倍体研究进展 [J]. *河南农业科学*, 2005, 34(1): 9–12.
- [23] 韩毅科, 杜胜利, 王鸣. 黄瓜染色体制片及倍性研究 [J]. *华北农学报*, 2003, 18(1): 72–74.
- [24] 郭启高, 宋明, 杨天秀, 等. 西瓜试管苗中四倍体鉴定方法研究 [J]. *西南农业大学学报*, 2000, 22(3): 261–263.