

丹参同源四倍体新物种的培育

高山林 徐德然 蔡朝晖 朱丹妮¹

(遗传育种研究室;¹中药理论研究室)

摘要 应用组织培养技术进行人工诱导丹参多倍体的研究。结果表明:在组织培养条件下添加 10~50 ppm 秋水仙碱,是诱发丹参多倍体的行之有效的方法。通过试管苗根尖染色体显微鉴定,确证所获得的多倍体为同源四倍体。对经 3 次以上镜检确认为四倍体的试管苗进行了移栽及田间农艺性状初步鉴定和主要化学成分测定。结果表明,所获的四倍体植株均不同程度地表现出多倍体植株的典型特征,主要化学成分含量亦大多高于原植株,可望进一步选育成新品种。

关键词 丹参;组织培养;多倍体

丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bunge)是唇形科鼠尾草属植物,根入药,是治疗冠心病的重要药物,具有祛瘀止痛、活血通经、清心除烦的功效,是面广量大的常用中药材^[1]。

丹参药材生产主要采用种子和分株切段繁殖,种子繁殖年限长,一般二年后才能采收,因此生产上多采用分株切段繁殖。由于长期以来,很少进行品种选育和提纯复壮工作,致使丹参品种种性退化,药材产量和质量下降,化学成分不稳定。为了提高丹参药材的产量和质量,我室从 1987 年开始,进行了丹参组织培养多倍体育种技术的研究,旨在应用组织培养技术进行丹参多倍体新品种或新品系的诱导和选育,从而使多倍体具有的根茎叶巨大性在药材生产中得以充分利用,并结合有效成分的测定,进一步选育出有效成分含量高,根部药材粗大,产量高的优良品种。

应用组织培养技术进行多倍体育种在我国刚刚起步,分别在枸杞^[2]、百合^[3]、党参^[4]等植物上取得成功,获得了新物种类型,实践证明不失为一种育种新技术。

1 材料和方法

1.1 组织培养材料和方法

丹参组织培养材料取自本校植物园资源圃。取丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bunge)种子放在 75% 乙醇中消毒 1 min,转入 2% 次氯酸钠中消毒 15 min,然后用无菌水冲洗 5 次,接种在 1/2MS 培养基上无菌萌发,15 d 后获得无菌苗。在 MS 培养基上继代并繁殖丛生芽,作诱导多倍体试验材料。继代培养、诱导多倍体培养均每天光照 12 h,光强 1200 Lux,日光灯光源。培养室温度 25±1℃。继代时间 30 d 左右。

1.2 人工诱导多倍体的方法

取无菌丹参试管苗的丛生芽(0.5 cm 直径大小)接种在添加不同浓度秋水仙碱的 MS 培养基上一个月,诱导多倍体组织,一个月后,将培养物接种在不加秋水仙碱的 MS+BA 1 mg/L,IAA 0.5 mg/L 培养基上,促进分化成苗,并按三角瓶号编号建立株系,经过两代继代扩大培养后将各株系试管苗转接在生根培养基上诱导生根,待根长 0.5 cm 以上时切取根尖,进行染色体鉴定,并进行显微摄影。经 3 次以上鉴定确认为四倍体的株系予以保留并扩大繁殖,同时将获得的四倍体试管苗移栽到田间,供进一步进行根部药材化学成分含量测定。

1.3 显微鉴定方法

切取刚萌发试管苗根 0.5 cm 左右, 在蒸馏水中冲洗 3 次, 放入 0.1% 秋水仙碱溶液中处理 1.5 h, 取出后用蒸馏水洗 3 次, 再放入卡诺固定液中固定 2 h, 然后依次用 95% 与 70% 乙醇、蒸馏水各洗 3 次, 再用混和酸 (45% 醋酸, 1 mol 盐酸、1% 硫酸按 100 : 10 : 1 混和) 于室温下离析 80 min, 最后水洗 3 次, 放入 70% 乙醇中保存供镜检。镜检时取根尖 2—3 条, 置于载玻片中央, 小心切取根尖 0.1 cm, 加改良苯酚品红染液一滴, 0.5 h 后盖上盖玻片并轻压轻敲至根尖压成一薄层, 用日本产奥林巴斯 BH-2 型显微镜进行观察并摄影。

1.4 四倍体株系农艺性状的初步鉴定

将经过三次以上根尖显微镜鉴定确认为四倍体 ($4n=28$) 的株系试管苗移栽到田间, 和原诱导植株栽在同一块地里进行农艺

性状的比较鉴定, 观察记载株型、长势、叶型、整齐度、叶片长宽、气孔大小、叶面粗糙程度、茎部色译、粗细、分蘖性、开花期、育性株高等 14 个农艺性状, 作为进一步田间选育的依据。

2 结果分析

2.1 丹参四倍体诱导试验

为了探索组织培养条件下诱导丹参多倍体的有效方法, 我们采用不同浓度的秋水仙碱添加到 MS 培养基中, 再分别接种丹参试管苗幼嫩丛芽诱导多倍体芽或组织。丛芽接种一周后产生组织增殖, 但是其生长速度不同程度地受到秋水仙碱的抑制, 一个月后将各处理芽或组织转代到不含秋水仙碱的培养基上, 促使其产生正常芽, 并诱导成植株。经二次继代, 各株系形成群体后对各株系诱导生根, 用根尖进行染色体鉴定, 结果见表 1。

Tab 1. Experiments of inducing polyploid *in vitro*

Treatments	Concentration of colchicine, ppm	Inoculated buds	Growth habit	Obtained tetraploid	Inducing ratio, %
61-0	0	20	normal	0	0
61-1	5	50	light inhibited	0	0
61-2	10	50	medial inhibited some buds died	3	6
61-3	50	50	serious inhibited 50% buds died	1	2
61-4	100	50	80% buds died	1	2

从表 1 结果可见, 培养基中添加 10 ppm 以上秋水仙碱时有诱导多倍体的效果, 其中添加 10 ppm 秋水仙碱处理中诱导率最高, 达 6%, 试管苗生长被抑制, 部分死亡; 添加 50 ppm 秋水仙碱时丛生芽被明显抑制, 一半死亡, 导致相对诱导率较低, 因此从本实验结果来看, 诱导丹参多倍体的秋水仙碱适宜剂量范围为 10—50 ppm。

2.2 根尖染色体鉴定

为了获得较佳染色体鉴定效果, 我们进行了适宜取材时间、离析方法、时间等筛选试验。经试验筛选摸索条件, 找出了较佳的丹参

试管苗根尖染色体鉴定方法, 并摄成显微照片(见图 1, 2)。同时, 切取根尖在超净工作台上进行, 以确保被鉴定的植株保持无菌状态, 以便进一步对已鉴定植株扩大繁殖, 供参加田间农艺性状鉴定。

2.3 四倍体植株农艺性状的初步鉴定

对经 3 次以上显微鉴定确认是四倍体的株系, 进行了加速繁殖, 生根后移栽到田间(每个株系 10—20 株)。定期对各株系生长情况、农艺性状进行初步观察记载, 作为性状鉴定和品种选育的依据(见表 2)。从表 2 可见: 四倍体植株和原丹参植株相比, 各种农艺性

状均发生明显的变化。

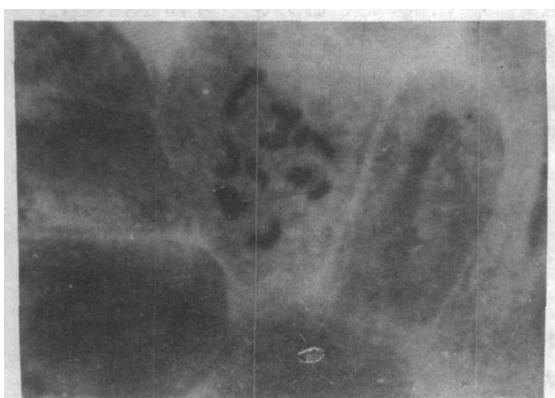


Fig. 1. Diploid of *S. miltorrhiza* $2n=2x=14$ ($\times 9000$)

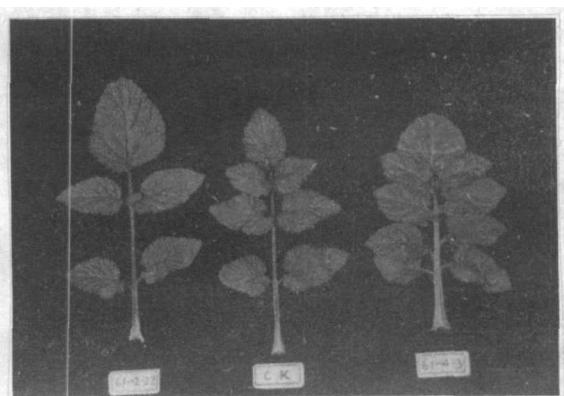


Fig. 3. The change of leaflet in polyploidys

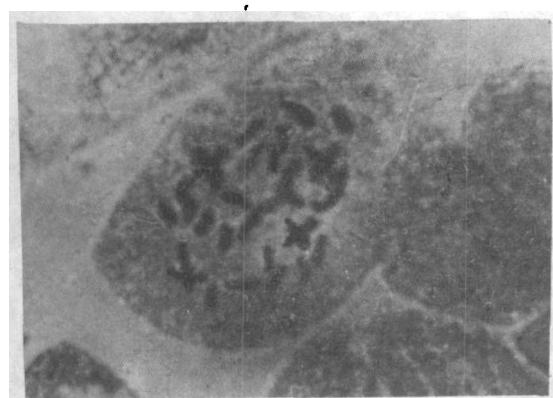


Fig. 2. Tetraploid of *S. miltorrhiza* $2n=4x=28$ ($\times 9000$)

2.3.1 叶部形状变化 四倍体植株叶型出现五出复叶和九出复叶两种变异,复叶面积(以顶小叶面积为代表)也比原植株大,是其1.7—2.5倍,同时叶子普遍比原植株厚,叶面粗糙(见图3),气孔略大。

2.3.2 株型和生长势 四倍体植株普遍比原植株生长势旺而浓绿,茎杆粗壮,植株高(见图4,5),根部药材比原植株粗大。

2.3.3 育性变化 四倍体植株花序明显缩短,育性普遍下降或不育。

以上三个方面的农艺性状变化完全符合一般多倍体植株所表现的典型性状——巨型性^[5],因此,田间农艺性状的观察鉴定结果进一步证明了所获得的五个株系确实是多倍体。



Fig. 4. Original plant (diploid)



Fig. 5. Obtained tetraploid plant

此外,从表2中可见,尽管所获得的四个株系经显微鉴定都是四倍体,但是从农艺性状、育性等方面株系间存在差异的现象表明,在组织培养条件下,除了人工诱导发生的染色体倍数变化外,还存在着其他方面的体

细胞遗传变异,其原因和培养基中添加的激素、生长素以及继代过程中多次脱分化、分化过程有关,这种较多的遗传变异将给育种者带来更多选择育种的机会。

Tab 2. Identification of agronomic characters for tetraploidy

Characters	CK (2x=14)	61-2-22 (4x=28)	61-2-30 (4x=28)	61-3-6 (4x=28)	61-4-3 (4x=28)
No. of leaflet	7	5	5	7 or 9	9
Leaf stalk	normal	short	short	normal	short
Top leaflet width×length (cm, n=12)	4.2×4.6	5.1×6.4	6.2×6.5	5.9×5.4	7.2×6.7
Leaf characters	normal	thicker rougher	thicker rougher	thicker rougher	thickest roughest
Air pore	normal	normal	normal	biger	biger
Stem	normal	thicker bright purple	normal bright purple	thicker purple	thickest purple
Fertility	normal	lower	sterility	sterility	sterility
Root	normal	thicker	thicker	thicker	thickest
Height of plant (cm)	54	83	63	70	75

3 讨论

3.1 多倍体在药用植物育种中的特殊地位

药用植物是一类具有特殊用途的经济植物,一般以其根、茎、叶等器官为收获对象供药用,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,即根茎叶产量较高,这样较好地满足了药材生产的要求。尽管多倍体植株往往带来育性下降,不能结实或较少产生种子,但对于以营养繁殖为主的药用植物来说则影响不大。另一方面,由于多倍体染色体加倍,由染色体上基因调控的有效化学成分含量往往较正常二倍体高。据我们所获得的四个四倍体丹参株系根部药材所做的有效成分初步测定表明,大部分四倍体株系隐丹参酮和丹参酮Ⅱ-A的含量比原植株有不同程度的提高。再结合田间农艺性状的测定,可望从中选出优良品种。

3.2 应用组织培养技术诱导多倍体的优越性

组织培养是生物技术中较成熟的应用技

术,用其人工诱导多倍体与常规植株或种子诱变方法相比,具有明显的优越性。首先,在组织培养条件下,可以反复地大批量地在培养瓶中诱导处理植物愈伤组织、丛芽等,从而大大提高了诱变成功率,这在植株上或种子处理中无法办到。

组织培养中把秋水仙碱加入培养基,对丛芽或愈伤组织进行诱变,可以做到剂量稳定可靠,方法简便可行,诱变处理时间长,因此诱变效果好,诱导变异类型多,选择余地大。同时,组织培养条件下诱变后的植株,用试管苗进行根尖染色体鉴定比在田间诱变后挖取根部逐株鉴定简便得多,可以在短期内快速鉴定大批量株系,从而筛选出多倍体。最后,经显微鉴定确认的多倍体植株,可以立即应用组织培养技术在短期内迅速繁殖出数以十万株以上试管苗,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,这对提高药材产量和质量十分有利。

参考文献

1 徐任生. 丹参生物学及其应用. 北京:科学出版社,

- 1990;1
 2 秦金山,王莉,牛德水等. 枸杞同源四倍体新物种类型的建立. 遗传学报, 1985;12(3):200
 3 贾敬芬,谷祝平,郑田昌. 百合花丝组织培养及其细胞学观察. 植物学报, 1981;23(1):17
 4 陈素萍,王莉,宋秀清. 党参多倍体育种的研究. 中草药, 1991;22:224
 5 侯新澍编著. 多倍体诱导与育种. 上海科学技术出版社, 1985;95

Studies on the Breeding of Autotetraploid of *Salvia miltiorrhiza* Bunge

Gao Shanlin, Xu Deran, Cai Zhaohui, Zhu Danni

Department of Genetics and Breeding

A study of inducing polyploidy of *Salvia miltiorrhiza* Bunge in the process of tissue culture was made. The results indicated that it was an effective way to add 10—50 ppm colchicine in MS medium in tissue culture for inducing polyploidy. The chromosome of obtained plantlets was determined by microscopic observation. Four lines were autotetraploid plants. After repeated chromosomal determinations for three times, the four lines were transplanted in the fields for identification and observation in agro-nomic characteristics. The obtained information demonstrated that these lines showed the typical characters of tetraploid plant. The main chemical constituent in root of tetraploidy was significantly higher than that in original plant. It is hopeful to develop new varieties of *S. miltiorrhiza*.

Key words *Salvia miltiorrhiza* Bunge; Tissue culture; Polyploidy

【文摘 039】大鼠结扎左冠脉后全心性去甲肾上腺素和腺苷三磷酸的耗竭 荣沛, 戴德哉, 张姣娥. 中国药理学报, 1992;13(4):333

结扎大鼠左冠脉的心梗模型, 观变心肌内 NE 和 ATP 的排空, 梗死区中二者的排空均呈双相性。NE 的排空速率常数为 $K_1 = 0.71 \text{ h}^{-1}$ 和 $K_2 = 0.015 \text{ h}^{-1}$; ATP 排空速率常数为 $K'_1 = 0.52 \text{ h}^{-1}$ 和 $K'_2 = 0.016 \text{ h}^{-1}$ 。非梗死区 NE 的排空呈单相而持久, 速率常数为 $K_3 = 0.018 \text{ h}^{-1}$; ATP 的排空呈一过性。普萘洛尔及维拉帕米均可改善 NE 和 ATP 的耗竭。

【文摘 040】尼群地平合成的化学动力学 翁元凯, 黄山, 盛以虞, 马继革. 中国医药工业杂志, 1992;

23(8):344

以无水乙醇或甲苯为反应介质, 用 β -氨基巴豆酸甲酯和间硝基苯亚甲基乙酰乙酸乙酯合成尼群地平为二级反应, 速度常数分别为 2.76×10^{-1} 和 $3.90 \times 10^{-2} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

【文摘 041】沙参类的研究 II. 多糖的含量测定 屠鹏飞, 徐国钧, 徐珞珊, 金蓉莺. 中草药, 1992;23(7):355

应用分光光度法测定 28 种(亚种、变种)沙参类药材的多糖含量。展枝沙参等 10 种沙参中多糖含量高达 50% 以上, 为沙参类药材的品质评价提供了依据。