

• 综述 •

药用植物多倍体的诱导及生物学意义

何韩军, 杨跃生, 吴 鸿

(华南农业大学 药用植物研究中心, 广东 广州 510642)

摘 要: 药用植物是指含有能防治疾病的特殊化学成分(生物活性化合物), 具有一定医疗用途的植物。而药用植物多倍体诱导是一种人为使植物加倍形成多倍体以获得良性状的方法。药用植物加倍后, 会出现植株巨大化、抗性增加和药用活性成分增加等优良性状, 但也伴随着生长缓慢、优良性状在有性繁殖中逐渐丢失等不利因素, 而造成这些现象的原因是药用植物加倍所形成的杂种优势、基因重复以及加倍后的二倍化过程。从药用植物多倍化诱导方法入手, 着重讨论药用植物加倍后的性状变化及其原因, 并结合一些新的诱导方式对未来的药用植物多倍化研究进行了展望。

关键词: 药用植物; 多倍体; 双单倍体; 二倍化过程

中图分类号: R282.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)06-1000-07

Induction and biological significance of polyploidy in medicinal plants

HE Han-jun, YANG Yue-sheng, WU Hong

(Research Center of Medicinal Plants, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Key words: medicinal plant; polyploid; double haploid; diploidization

药用植物是指含有防治疾病的特殊化学成分(生物活性化合物), 具有一定医疗用途的植物。人类早在旧石器时代中期就开始将植物作为药品, 距今已有6千年历史^[1]。随着人类的进步和历史的发展, 药用植物的利用也越来越广泛, 但归纳起来, 药用植物的利用主要分为4个方面: (1) 分离出药用活性成分并用于制药; (2) 对已分离出的天然活性成分进行结构分析, 并根据已知活性成分的结构人工合成出新的活性更强或毒性更小的活性成分; (3) 作为药理学研究工具; (4) 将植物的全株或部分作为药物进行治疗——外敷或内服^[2]。而由于药用植物的特殊性, 无论何种用途, 对其成分稳定性的要求都比粮食、香料等植物要高。近年来, 一方面, 由于生活水平的显著提高, 人们在医疗保健方面有了更高的需求, 另一方面, 由于人口数量的不断增加以及生态环境的恶化所造成的可用耕地面积的减少, 使得开发更高产优势、更适合工业化生产的药用植物新品种越发必要和迫切。

多倍体植物具有特殊的农艺性状, 突出表现在根、茎、叶等器官上的巨型性, 而由此则可大幅度提高植株的产量。虽然多倍体植物在某些特定的自然条件下能够自发产生, 但属于偶然现象, 在不少植物中至今还没有发现多倍体植株的存在, 因此人们通常需要通过人工诱导的方法来获得多倍体植物作为基础理论或应用研究的实验材料。随着相关研究的不断深入, 人为调控染色体倍性已经成为了比较有效的育种方法。人们通过培育多倍体以提高药用植物的产量和品质, 或

通过人工降倍(胚珠、花药、花粉等的离体培养)从二倍体植物中得到的相应的单倍体, 再通过加倍技术(秋水仙素等诱导)培养出双单倍体及基因纯合的多倍体, 使原本杂合的基因型纯合和各种性状的遗传性稳定, 以此满足工业化大规模生产中严格控制产品差异性的要求。

1 药用植物多倍体诱导的方法

多倍体植物自发产生主要是通过未减数配子融合, 体细胞染色体加倍以及多精子受精3种方式^[3]。由于自发加倍的天然多倍体植株数量有限, 难以提供满足多倍体育种所需要的具有丰富遗传背景的大量群体^[4], 因此, 育种工作者一般会选择合适的材料, 通过人工诱导的方法获得较多可供选择的多倍体植株。目前, 人工诱导多倍体的方法可分为3种方式: 物理学、化学以及生物学的方式。

1.1 物理学方式诱导多倍体: 发生的方式包括温度激变、机械创伤、电离辐射、非电离辐射、高速离心力、高压等。在药用植物方面, 1985年就成功将枸杞 *Lycium barbarum* L. 的未授粉的子房置于低温条件下培养, 得到了四倍体植株和非整倍体植株^[5]。不过, 通过物理方式诱导多倍体发生的效率一直很低, 目前这种方式已经基本上不采用。

1.2 化学方式诱导多倍体: 所采用的化学药剂有秋水仙素、有机汞制剂(富民农)、异生长素、萘乙烷和萘嵌戊烷等。其中秋水仙素成本不高, 而且效果确切, 是迄今为止诱导多倍体应用最为广泛的化学药剂。秋水仙素诱导染色体加倍的

①收稿日期: 2009-11-20

基金项目: 广东省教育部产学研合作专项资金项目(2008B090500250)

作者简介: 何韩军(1984—), 男, 华南农业大学硕士研究生, 研究方向为资源植物学。 Tel: (020) 85288393 E-mail: hhjmnxy@163.com

* 通讯作者 吴 鸿 Tel: (020) 85281870 E-mail: wh@scau.edu.cn

机制是秋水仙素可结合于微管蛋白二聚体上。这种结合有秋水仙素的微管蛋白可以装配到微管末端以阻止其他微管蛋白的加入,进而防止纺锤体的形成。这样一来,处于细胞分裂中期的染色体在加倍后不能分向两极,使得细胞内的染色体数量加倍^[6]。在利用秋水仙素诱导多倍体时,常常将二甲亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO)以一定浓度加入到秋水仙素水溶液中以促进秋水仙素对植物组织的渗透作用,提高秋水仙素的加倍效果。实验结果表明,4 g/L秋水仙素+20 g/L DMSO比单独使用秋水仙素处理烟草单倍体的加倍效率高2倍以上,而适宜的处理时间为48~72 h^[7]。这一结果与Sanders等^[8]诱导悬钩子染色体加倍的研究结果相符。

秋水仙素诱导染色体加倍的方法包括活体处理加倍法和离体处理加倍法^[9]。活体加倍法包括滴液法、浸泡法、琼脂法、喷雾法、注射法等,而处理的对象则包括种子、子房、腋芽、幼苗生长点等。王莉等^[10]应用浸泡法获得库拉索芦荟*Aloe barbadensis* Mill.多倍体试管苗;吴玉香等^[11]采用改良的琼脂涂抹法和直接滴渗法处理刺果甘草*Glycyrrhiza pallidiflora* Maxim.的幼苗顶芽获得多倍体植株;李彬等^[12]用秋水仙素溶液处理菘蓝*Isatis indigotica* Fort.的种子或茎端生长点获得四倍体植株。然而,在活体人工诱导染色体加倍中,要使生长点的全体细胞都加倍的几率很小,在多数情况下仅能够获得染色体加倍不完全的个体,即嵌合体。嵌合体由于存在相当数量的没有加倍的细胞,在个体的生长发育过程中不同倍性的细胞的比例会发生改变,因此,受环境干扰大,往往不能稳定遗传,极易回复为原来的染色体倍数^[13]。所以,活体处理加倍法的效果往往不能够令人满意。

离体诱导法即组织培养诱变法,是对植株某一离体部分,如顶芽、腋芽、茎等外植体进行秋水仙素处理,再进行组织培养,或在组织培养过程中进行染色体加倍处理的方法。离体培养诱导法是在近20年才发展起来的。虽然历史不长,但组织培养诱变法应用于药用植物已经有很多成功的例子。如采用秋水仙素处理丹参*Salvia miltiorrhiza* Bunge^[14]、黄芩*Scutellaria baicalensis* Georgi^[15]、盾叶薯蓣*Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright^[16]和决明*Cassia obtusifolia* L.^[17]的愈伤组织获得了同源四倍体;处理混倍体黄芪*Astragalus membranaceus* (Fisch) Bunge获得同源四倍体黄芪^[18];陈素萍等^[19]在诱导党参*Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf.多倍体时,将一定浓度的秋水仙素加入培养基中,使种子在发芽中逐渐诱变加倍然后通过组织培养的方法获得大批量的再生植株。此外,本实验室也通过离体培养的方法,在诱导具有显著免疫抗灾功效的紫锥菊*Echinacea purpurea* L.染色体加倍上取得成功^[20]。离体诱导染色体加倍方法容易对试验条件进行控制,如可以很方便地延长处理时间,由此可以有效地减少加倍不完全的嵌合体的产生,获得更多的遗传稳定的多倍体,提高了工作效率。因此,和活体诱导染色体加倍的方法比较,离体处理加倍具有明显的优越性。

1.3 生物学方法诱导多倍体:主要有多倍体花粉授粉法、有性杂交性和原生质体融合法。多倍体花粉授粉法是利用花粉粒直径大小与染色体倍性之间存在着极显著的相关性,通过显微镜下挑选出未减数分裂的花粉,并用此花粉给正常二倍体植株授粉,从而得到三倍体。如将杨树花粉用40 μm的筛子过筛后,大花粉粒的比例从4%~9%提高到40%~50%以上,用大花粉授粉得到三倍体^[21]。该技术是人工培育奇数多倍体时常用的手段,在培育农作物和园林作物中较为常见,而在药用植物中则刚刚起步,如高鹏等^[22]曾参照杨树三倍体获得的方法已获得杜仲*Eucommia ulmoides* Oliv.的三倍体,并参照田兰馨^[23]早期对杜仲小孢子母细胞减数分裂异常现象的研究成功获得大量的杜仲二倍体雌雄配子,杂交后也有结实,但是否为三倍体则未予确认。有性杂交法是利用二倍体和四倍体、多倍体杂交、多倍体之间杂交的方法获得多倍体。实践证明,多倍体与二倍体、多倍体之间进行杂交,可最大程度地获得多倍体^[24]。如枸杞育种目标之一的无籽枸杞,就是通过利用枸杞四倍体与二倍体杂交而产生的^[25]。原生质体融合法则以组织培养和原生质体为基础,用纤维素酶和果胶酶处理植物细胞,得到大量无壁的细胞(原生质体)后,再通过化学或物理学方法诱导同种或异种植物原生质体相互融合成为异核体,异核体内的细胞核进一步融合为共核体,经再生细胞壁成为杂种细胞。杂种细胞经分裂增殖形成愈伤组织,最后诱导愈伤组织再生成为同源或异源多倍体的杂种植株。原生质体融合法的最主要优点是可以克服远缘杂交遇到的生殖障碍,以此获得通常有性杂交所不能够得到的包含有其他种属基因的多倍体植株。如霍丽云等^[26]利用原生质融合方法成功获得药用植物石防风*Peucedanum terebinthaceum* Fisch.和柴胡*Bupleurum scorzonifer* Willd.远源杂交的再生植株。

2 药用植物多倍体的生物学特性变化

在成功诱导形成多倍体后,药用植物会发生各种各样的生物学特性的变化,如形态结构方面的变化(根、茎、叶、花、果、种子等器官大小的变化,内部细胞细微结构的变化)和植物生理学方面的变化(抗性的变化,糖、蛋白、脂肪酸等初生代谢的变化,萜类等次生代谢的变化)。这些变化可以看作植物为了应对大规模的染色体层面上的变化而对自身的结构和一些功能代谢进行一定的适应性调整。这些变化有些对人类在药用植物的利用上具有相当大的潜在价值,但有些则并不利于人类对植物的利用。人们把有应用价值的生物学特性称为优良性状,把没有价值或不利于应用的性状称为不良性状。

2.1 药用植物多倍体植株优良性状的形成:药用植物多倍体由于染色体加倍,细胞核内核酸物质的增加导致细胞核变大,随之而来的是细胞变大和组织器官的增大,直观表现为根、茎、叶等器官的巨大性。器官的增大不仅能提高以相应部位入药的药材的产量,而且植株的巨型性能降低采收和加工上的难度,较好地满足了药材生产的要求。另外,药用植物的倍性变化往往能导致其次生代谢产物量的变化。虽然

量的变化有可能是增加也有可能是减少,但人们可以通过适当的检测筛选获得所希望的药用成分量增加的个体培育成为新的品种。另外,药用植物加倍后往往还具有抗性提高的特点。

2.1.1 形态变化:多数植物在多倍化后都会发生一定的形态变化,如人工诱导产生的药用植物多倍体怀牛膝 *Achyranthes bidentata* Bl.^[27]、紫锥菊^[30]、库叶薄荷 *Mentha achalinensis* L.^[28]、盾叶薯蓣^[16]、丹参^[14]、黄芩^[15]、菘蓝^[12]等均不同程度地出现叶片变大变厚、茎加粗、根变粗或根系改变、果实变大、植株变高等现象。这些形态变化也在一定程度上提高了该药材收获部位的质量,提高了产量。

2.1.2 抗性变化:多数植物在多倍化后,对某些逆境胁迫的抗性会得到加强。刺果甘草^[11]、库叶薄荷^[28]、菘蓝^[12]的多倍体(主要是四倍体)均具有比未加倍的物种更强的抗虫、抗寒、抗旱、抗病性。这些优势对药用植物的产量和质量提高也均有帮助。

2.1.3 生物活性成分变化:药用植物在诱导加倍后,往往能提高体内所含药用活性成分的量,一些药用植物甚至会在加倍后产生新的更具药用价值的活性成分。曼陀罗 *Datura stramonium* L.^[29]、石菖蒲 *Acorus tatarinowii* Schott^[30]、怀牛膝^[27]、盾叶薯蓣^[16]、丹参^[14]、黄芩^[15]、菘蓝^[13]等植物的同源或异源多倍体的药用活性成分的量均比其未加倍前有明显的提高,其中菘蓝、石菖蒲等的多倍体均有新的活性成分出现。不过从目前报道的文献来看,药用植物染色体的多倍化虽然在不少情况下可以提高成分的量,但不一定呈正比关系。Trease等^[31]曾提到过在罂粟 *Papaver somniferum* L. 的各种倍性水平中三倍体含吗啡因的量最高。也有资料表明曼陀罗的三倍体杂种平均生物碱的得率超过二倍体的4倍和四倍体的3倍^[32]。Yankoulov等^[33]对胡椒薄荷 *Mentha piperita* L. 诱导的同源五倍体与二倍体、四倍体、六倍体的精油量和产量加以比较发现,二倍体优于四倍体,而五倍体和六倍体都比二倍体和四倍体低。到目前为止,有不少研究者通过对基因组和蛋白质组学的研究指出造成多倍体变化的原因是因为倍性变化后基因组的表达发生变化,进而影响蛋白代谢,从而改变了植物许多代谢的产物^[34,35]。因为药用植物的生物活性成分一般为次生代谢产物,加倍后所有的影响也与该理论相关。但是,植物倍性变化和某一种具体物质的增减关系尚不清楚,还有待进一步的研究^[28,36]。

2.2 药用多倍体植物不良性状的形成:药用植物多倍体的优点虽然很多,但并非尽善尽美,也有一些药用植物成为多倍体后出现一系列二倍体所没有的缺点,比如生长缓慢、个体间以及代间差异过大、不育、败育、难育等,有的甚至会产生回复突变,导致前功尽弃。所以在诱导产生多倍体后,必须注意这些问题,避免这些缺点影响药用植物多倍体的应用价值。

2.2.1 生长缓慢:虽然药用植物在加倍后会出现器官变大的情况,但是并不意味着栽种多倍体就一定可以提高产量。多倍体在所有的生长发育阶段都表现迟缓,如种子发芽迟,生长慢,开花晚,分枝能力减弱等,致使生育期延长。生长发

育缓慢不只与细胞分裂缓慢有关,生长素量少也是一个重要原因^[28,37]。此外,因细胞体积增大,细胞的表面积与体积之比相对减少,从而引起一系列的代谢过程如呼吸强度、蒸腾作用降低等,也会使发育延缓。这意味着多倍体单株产量虽然比二倍体高,而由于生长速度慢,一定时期内的单位面积产量很可能还低于二倍体。现阶段要解决这一问题,只能靠筛选加倍后生长较快植株的方法^[28]。

2.2.2 育性变化以及代间差异:许多学者认为,并且大多数实验也证实同源四倍体的结实率比相应的二倍体低。其原因主要是同源四倍体在减数分裂过程中会遇到困难,难以配对形成二价体,不能准确地实现染色体刚好减半,因此形成的配子由于染色体数目异常,往往活力不高甚至没有活力。而异常配子中缺少某一条或几条染色体,缺少某些必要的基因,或数量不均的染色体所造成的不平衡则是其活力不高的主要原因。吴云江等^[38]在对苦荞 *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn. 的二倍体和四倍体进行细胞学比较时发现,四倍体的花粉母细胞在减数分裂末期I和II中异常细胞频率分别为19.1%和38.7%,远高于其二倍体的2.2%和1.9%。四倍体的花粉败育率为10.79%,也比二倍体的4.25%要高。这样一来,虽然种子的粒重会增加,整株乃至单位产量却可能下降。这种情况对以种子为目的收获物的此类药用植物来说是致命的缺点。

另外,由于四倍体染色体组比二倍体多了整整一倍,因此在减数分裂中会出现很多二倍体不会出现的现象,而这些现象可能导致代间差异变大。有研究发现,四倍体苦荞麦的染色体的配对在减数分裂中期I可出现以下几种情况:(1)形成1个四价体(IV);(2)形成1个三价体和1个单价体(III+I);(3)形成2个二价体(II+II);(4)形成1个二价体和2个单价体(II+I+I)等多种形式^[38]。这种现象会导致代与代之间的差异比较明显,而且有可能发生后代变成二倍体的现象。不少文献报道的结果也与此相吻合。一般多倍体因其结实率低,需要采用无性繁殖的方式以避免代间差异过大的现象出现。而异源多倍体因其能够正常配对形成二价体,所以结实率一般不低,但某些情况下也还存在代间差异比较大的问题,这与异源多倍体通常基因杂合性较高有明显的关系。

2.2.3 部分多倍体环境适应能力下降:虽说许多多倍体形成后抗性和环境适应能力会增加,但也有些多倍体抗性变弱,对环境变化适应能力较差的情况出现,而这种多倍体很容易因环境因素的影响而导致灭绝,被自然界所淘汰。异源多倍体植物约克千里光 *Senecio elboracensis* Lowe & Abbott 是由一个本地种和外来种大概在1970年左右杂交形成的生长在工业荒地上的杂草,但近年来的开荒破坏了它的栖息地,除非能传播到环境相似的地区,否则它将难逃灭绝的命运^[39]。这个物种从诞生到接近灭绝还不到50年,可见并不是所有多倍体都具有优势性状。

3 造成多倍体与二倍体差异的生物学基础

3.1 杂种优势:杂种优势是指杂种通过继承其父本母本的

不同的优势所获得的一种更好的生物特性,与近交衰退相对。有文献报道,多倍体会出现很多二倍体没有的特点是因为其拥有比二倍体更高的杂种优势,也有文献证明杂种优势的确在多倍体药用植物中起作用^[25,37]。药用植物多倍化后杂种优势明显增强,因为多倍体比二倍体更有利于避免近交衰退,从而能更有效地将杂种优势传递给后代。首先,二倍体杂种每代都会有近一半的可能性丢失某个杂种性状,如二倍体(AA)和二倍体(BB)在杂交而成的F1代杂合体(AB),其自交产生的每一代都有近50%的可能恢复到亲代的基因型(AA或BB),只有一半的可能性保持杂种的性状(AB)。因此,随着植物有性世代的增加,杂交产生的优势性状会逐渐变弱甚至消失。而其对应的多倍体(AABB)就不会出现上述情况,其自交产生的后代基本都保持(AABB)的基因型,杂种优势能有效地传递给后代^[40]。其次,二倍体杂种最多可以继承2套亲本基因(AB);而四倍体杂种可以继承4套亲本基因(AABB),从而可以比二倍体继承更多父本母本的优势,获得更好的生物遗传特性。另外,虽然多倍体杂交所产生的杂种优势要比二倍体之间杂交产生的杂种优势要强,但同源多倍体自交却比二倍体表现出更为明显的自交衰退现象^[41,42]。不过,该理论只是基于一些有限数量的实验和研究所得。是否具有普遍意义还有待更多的相关研究的展开加以确认。再者,以往所认为的多倍体一定要比对应的二倍体在株型上更大的观点是值得商榷的。事实上,同源多倍体自交种(AAAA)往往在形态上与其对应的二倍体自交种(AA)相似,有时甚至会小于二倍体^[43]。但植株小并不代表其药用效果差,反之,由于植物的药用成分基本上都是次生代谢物,而次生代谢物的大量积累并不利于植物的生长,所以往往很多株型小,生长速度慢的药用植物种反而比生长快的植物种拥有更好的药效。卡西亚茄 *Solanum khasianum* C B Clarke 诱导育成的四倍体,其果实比二倍体要小得多,但果实中生物碱配糖体的量却是二倍体的数倍^[44]。

3.2 基因重复:众所周知,染色体加倍会导致整个植物核基因翻倍,从而使基因重复。这一情况有可能导致多倍体基因翻译时的阅读框阅读的密码子与对应二倍体不一致,从而造成表达蛋白的量不一致,甚至表达出新的蛋白,进一步造成了多倍体和二倍体在代谢层面上的差异。南丹参 *Salvia bowleyana* Dunn 加倍后的四倍体过氧化物酶类比二倍体多两种,醌类比二倍体多一种^[45]。Zhang 等用基因芯片技术对水稻二倍体和所对应的单倍体进行比对,发现降倍后,共有1475条基因序列发生表达变化,占水稻探针序列的2.47%,其中包括激活、上升、沉默和下降共4种类型。这1475条单倍性特征序列在水稻染色体上明确定位的共有1358条,其中有575条已经预测了功能,占总变化序列的38.98%。该575条序列的功能分类主要涉及生物过程(biological process)、细胞成分(cell component)和分子功能(molecular function)3个方面。由于有的序列能表现出多种功能,所以功能的数量要多于575种。575条序列中与生物过程相关的有472条,其中变化最多的是新陈代谢过程,所占的比例

高达65.04%^[46]。由此可见,调控代谢的基因在加倍后变化较大^[34,35]。药用植物的药用成分一般是次生代谢产物,但由于次生代谢的前体一般为初生代谢的中间产物,所以很容易受到初生代谢的影响。因此,药用植物加倍后药用成分发生变化也就不足为奇了。

3.3 加倍后的二倍化过程:多倍化在自然界中是十分常见的。对真核生物的染色体基因组研究显示,许多相关染色体基因组都含有古代多倍体的标记,这意味着包括人类在内的所有真核生物都曾受多倍化过程的影响^[47]。另有研究表明,超过90%现存的被子植物保留了一个至多个的基因组加倍的证据^[48]。但是,多数生物(包括多倍体)仍保持二倍体的特性,且还有相当多的生物就算曾发生过多倍化事件但仍为二倍体。其原因多倍体在成为其二倍体亲缘物种在自然进化淘汰中的有力竞争者之前,需要突破加倍后不稳定的瓶颈^[49]。适应性强的多倍体能成功地在广泛、迅速的二倍化过程中存活下来。

二倍体过程指的是通过对多倍体基因组进行改组或重建,在改变二倍体祖先基因组中基因连锁关系、遗传或外遗传修饰式样和染色体结构的同时,赋予多倍体基因组新的细胞遗传学特性,使之在核型特征及基因表达水平和式样等方面表现出与二倍体相似的特点^[50]。在此过程中,重复基因可能会面临几种命运:丢失、保留原有功能,同时具备不同来源基因的原来功能或获得新的功能。与此同时基因组也可能经历染色体重排、基因入侵、核质相互作用等过程,并最终导致基因的重复杂度被降低^[50]。不过,随着世代的递增,二倍化的效果会越来越弱,直至消失,但成功经过二倍化而不灭绝的多倍体却表现出了比二倍体更强的进化优势。

表面上二倍化过程似乎只和植物进化学说和自然加倍有关,与人工诱导加倍方面的关系不大,但是其对药用植物加倍方面有相当的指引作用,且二倍化如果能合理加以利用,也具有不可忽视的潜力。首先,在重复基因方面,有部分研究表明,保持原有功能与加倍后植株巨型、药用植物活性物质的量增加有一定联系;基因沉默与植物加倍后某些成分的减少和部分植株加倍后生长缓慢有一定联系;分化表达新的功能则很可能是药用植物加倍后的新的生物活性成分出现的原因^[51,52]。其次,在重复基因组方面染色体重排和入侵无疑会加大植物的杂合性,这对提高植物对环境的适应能力有积极的作用。而其中最有意思的是核质相互作用方面。

众所周知,植物的生长发育主要受核基因的调控,但在一定程度上也受到细胞质里的线粒体和叶绿体基因的影响。然而植物染色体的加倍即是核基因组的加倍,而线粒体和叶绿体的基因却没有加倍,因此核质之间DNA量的比例发生了改变,这种状况有可能引起调控作用的紊乱或失调,这在异源多倍化过程中尤为明显。因此,在加倍后的二倍化过程中,核基因组与细胞质之间会通过一定的形式相互作用来调整核质比例,在新的基础上重建核质之间和谐、平衡的相互关系,提高相容性水平。这就是二倍化中的核质相互作用的过程,是多倍体稳定和进化的一个重要基础^[52]。

尽管目前对细胞核与细胞质之间相互作用的机制还不十分了解,但在研究多倍体基因组进化过程中所发现的一些现象确实显示与细胞质有一定联系。Song等^[53]以芸苔属的芜菁 *Brassica rapa* L. (A基因组)、黑芥 *B. nigra* (L.) Koch (B基因组) 和蔬食芥 *B. oleracea* L. (C基因组) 为材料,按不同组合(A×B, B×A, A×C, C×A)合成了一系列异源四倍体,然后通过RFLP分析,对不同组合F2和F5个体的基因组特点进行比较,发现在AB组合中F2代与F5代个体的限制性内切酶片段差异性水平为9.6%,BA组合为8.2%,AC组合为4.1%,CA组合为3.7%;此外,通过将四倍体基因组中不同基因组组分与各自的二倍体祖先基因组进行比较,发现在AB和BA组合中,作为父本供体的基因组比作为母本供体的基因组显示更大的变异,但在AC和CA组合中不存在类似的现象。这些结果说明:(1)亲本基因组之间遗传差异程度越大,多倍化后在多倍体基因组中经历的进化改变也越多。因为从系统演化关系看,A与C的关系比A与B的关系更近;(2)在AB和BA组合中,父本基因组之所以比母本基因组变异程度更大,是受细胞质的影响。因为对父本基因组来说,它面临一个全新的细胞质环境,因而需要做更大程度的调整才能保证与细胞质之间的相容性。在AC和CA组合中,两个基因组亲缘关系较近,本来就具有较高的核-质相容性水平,因而对父本基因组而言不需要做太多额外的调整。

4 多倍体育种的策略和方法

随着研究的深入,人们愈发注重多倍体所蕴含的潜力,对其产生种种变化的原因的研究也逐渐展开。虽然暂时还无法清楚了解具体的二倍化的调控机制(如具体哪个基因会沉默,哪些基因组和哪个基因组会重排等),但是已经可以针对加倍后的种种不稳定情况和缺点,对药用植物多倍体育种的方法进行一定的改良了。其主要方法有双单倍体育种技术、多代筛选、组织培养技术等。

4.1 双单倍体育种:双单倍体育种是一种由单倍体育种延伸而来的育种技术,是在性细胞培养再生出单倍体细胞或植株的基础上,通过秋水仙素等一系列人工加倍过程产生该植物种的纯合基因型的方法。自1962年Guha等成功通过花药培养获得曼陀罗单倍体植株以来,人们便发现该方向蕴含着无限潜力。随着单倍体育种技术的发展,现已形成孤雄培养(花药培养、小孢子培养)、孤雌培养(未受精卵、子房、胚珠培养)等成熟或基本成熟的育种技术。在培育双单倍体的过程中,最困难的是通过孤雄或孤雌培养获得相应的单倍体。

一个物种的双单倍体诞生具有许多潜在好处,开发药用植物双单倍体时,这种情况更为明显^[54]。因为粮食作物个体间的差异所造成的对品质的影响后果并不严重,而药用植物由于其用于医药,对其成分有很高的要求,如果随着种间杂交而导致成分的量发生变化,之前的研究将前功尽弃^[54]。双单倍体育种无疑是解决植物多倍化所带来的不稳定的有效方法,值得深入研究。目前已有不少学者在此领域对许多植物进行了双单倍体诱导,但难度较大,大部分物种在小孢子或花

药培养阶段就失去对离体培养条件的反应或只形成愈伤组织,究其原因主要是不同的物种往往需要不同的培养技术或培养基配方。到目前为止,开发药用植物双单倍体只有少数的成功案例,如白芷 *Ammi majus* L.、小茴香 *Anethum graveolens* L.、白曼陀罗 *Datura metal* L.、补骨脂 *Psoralea corylifolia* L.等^[55-57]。本实验室则在2006年通过花药培养成功获得了紫锥菊的单倍体植株^[58],并通过秋水仙素处理离体培养的小苗叶柄外植体获得了双单倍体和纯合的四倍体植株^[59]以及杂合的四倍体植株^[20]。此外,本实验室还通过四倍体材料进行继续加倍得到了八倍体。八倍体雌锥菊尽管根系粗壮,但地上部分生长很缓慢,估计应用价值不大,但四倍体则有可能成为生产上可以推广应用的新品种。

4.2 多代人工培养和筛选:多倍体形成后,在其后代遗传中有可能出现不稳定的现象,除了严重不育外,还存在回复成二倍体的可能性。为了保证获得稳定的多倍化优良品种,一般有必要采用多代筛选的方法对多倍体群体进行筛选。其基本方式是在多倍化后的第一代(C1)淘汰非所需倍性的植株(单倍体和二倍体),然后在所需倍性的植株中选择长势较好,药用部位较大或颜色较深的植株在人工调节的最适环境中进行培养,保证其可以进行下一代的繁殖,并在随后的几代中继续进行这种筛选。前文已经提到过,造成多倍化后不稳定的二倍化过程会逐渐减弱,植株也会变得越来越稳定,这样便可以逐渐消除多倍化后的不稳定因素,获得高产稳定的多倍体植株。再以卡西亚茄诱导育成的四倍体为例,育成之初果实比二倍体小而生物碱配糖体的量较高。虽然药用成分增加,但是却因为不稳定而不能高产,第一代平均每株只结了40~50g果实,远低于二倍体的700~750g,不具备应用价值。但随着人工多代筛选的进行,到第3代时,每株的平均产量已达到760g左右,表现出比二倍体显著优异的生产性能^[44]。

4.3 加倍后杂交:对于加倍后的多倍体可以对其进行进一步的杂交,以增加杂种优势。大部分三倍体和奇数倍的多倍体都是这样形成的。事实上,关于多倍化杂交的报道已经非常普遍,而且该方法也的确能提高杂种优势。杂交过后的多倍体产生的变化将比之前的多倍体要大,特别是三倍体、五倍体等奇数倍的多倍体。一些研究发现,二倍体在变成三倍体后基因激发的数量要比二倍体变成四倍体所激发的基因多,基因沉默的现象比相应的四倍体少^[46,60]。因此,三倍体植物更有可能产生新的具有药用价值的代谢产物,相关研究值得重视。

4.4 通过组培保持多倍体性状和种质:对于多倍体植物不育以及后代变异大的情况,现阶段可以通过无性繁殖性质的组培方法加以解决。对刚诱导形成的药用植物多倍体在进行筛选时,除了需要对其进行一定的分析外,对其进行组培备份也是相当必要的。因为即使该多倍体植物能获得较高的产量或较好的性状,也不能保证其能正常地繁殖后代或其后代也能保留这种优良的性状。当出现这种情况时,如果没有对新诱导的植株进行备份,万一植株意外死亡,之前的诱导

和筛选工作将付诸东流。如果发现该植物不育的话,可以直接用备份的组培苗进行繁殖,继续栽种,确保难得的种质资源得以存续。

5 展望

药用植物多倍体有优点也有缺点,但随着科学技术的进步和研究的深入,已经逐渐了解了其缺点产生的原因,并发出了相应的扬长避短的药用植物多倍体育种方法。以现有的技术科学地开展药用植物多倍体物种开发有很好的前景,但多倍体育种理论和策略问题仍旧不少,有待进一步深入研究加以解决。

首先,在理论方面,加倍后二倍化对基因的影响乃至性状的影响一直被认为是随机的,然而随着研究的深入却发现实际上并非如此:植物加倍后二倍化中对基因的影响并不是随机的,尤其对控制代谢有关的基因而言,具体是哪些调控代谢的基因尚不明了。对于此类问题的探索,现阶段主要是通过培养模式植物(如拟南芥、玉米等)的单倍体和双单倍体,比较其基因激发和沉默的数量,并对这些基因进行功能分析以确定被影响的基因具有哪些功能,进而摸清多倍化影响基因的规律^[47]。相对于分子生物学研究的模式植物,药用植物的研究资料很是匮乏,相关研究的推进还需依赖于分子生物学基础资料的积累。

其次,在育种方面,药用植物双单倍体育种具有相当大的发展潜力,因为双单倍体能培养出一系列纯系品系,从而保证植株与植株之间差异处于可控范围之内,对工业应用上的大规模生产用药植物和提取药用成分以及医疗应用上的控制药物使用量上很有帮助。而且通过对已育成的药用植物双单倍体进一步诱导加倍,使之成为纯系的多倍本,这样在品系理论上会具有多倍体独特的优势,也能保证其稳定性,虽然还没有突破性的成果出现,但许多科学家已经在进行这一方面的研究^[35-59]。

再者,在自然生产中还存在着介乎二倍体和多倍体之间的细胞——内多倍体细胞(如绒毡层细胞),其主要特征为基因组量翻了一倍,而染色体数量不变^[61]。如果利用这种细胞进行组培再生植株,其结果会是如何?又会与二倍体和四倍体有何差异?这是一个很有趣和意义深远的研究课题。

随着原位杂交技术、基因克隆技术、荧光标记技术、基因组学、蛋白质组学和代谢组学等的飞速发展和它们在多倍体研究中的广泛应用^[62],人们对药用植物多倍体的理论研究将越来越深入,对多倍体的性状的人为控制将越来越有效。随着越来越多药用植物优良多倍体新品种的成功开发,药用植物栽培的土地利用效率将得到大幅度的提高,人口增长和经济发展对药物的更大需求也将得到进一步满足。

参考文献:

- [1] Solecki R, Shanidar I V. A neanderthal flower burial in northern Iraq [J]. *Science*, 1975, 190: 880-881.
- [2] Daniel S F, Norman R F. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery [J]. *Environ Health Perspect*, 2001, 109: 69-75.
- [3] Ramsey J, Schemske D W. Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants [J]. *Annu Rev Ecol Syst*, 1998, 29: 467-501.

- [4] 张汉明, 许铁峰, 郭美丽, 等. 药用植物的多倍体育种 [J]. *中草药*, 2002, 33(7): 1-2.
- [5] 秦金山. 枸杞同源四倍体新物种的建立 [J]. *遗传学报*, 1985, 12(3): 200.
- [6] Borisy G G, Taylor E, W. The mechanism of action of colchicine: binding of colchicine-³H to cellular protein [J]. *J Cell Biol*, 1967, 34: 525-533.
- [7] 朱慧琴. 二甲基亚砜(DMSO)对烟草单倍体植株的染色体加倍效应 [J]. *青海师范大学学报:自然科学版*, 2004(2): 54-56.
- [8] Sanders H, Hull J W. Dimethyl sulfoxide as an adjuvant of colchicine in the treatment of *Rubus* seeds and shoot apices [J]. *Hort Science*, 1970, 5: 111-112.
- [9] 李云, 冯大领. 木本植物多倍体育种研究进展 [J]. *植物学通报*, 2005, 22(3): 375-382.
- [10] 王莉, 郑思乡, 李枝林, 等. 库索拉芦荟的多倍体诱导及其变异初报 [J]. *云南植物学研究*, 2001, 23(4): 93.
- [11] 吴玉香, 贺润丽, 高建平, 等. 刺果甘草多倍体诱变育种的研究 [J]. *山西农业大学学报:自然科学版*, 2004(2): 116-117.
- [12] 李彬, 陈万生, 赵阳, 等. 四倍体板蓝根中的苯丙素类成分 [J]. *中草药*, 2005, 36(3): 326-328.
- [13] 郭启高, 宋明, 梁国鲁. 植物多倍体诱导育种研究进展 [J]. *生物学报*, 2001, 35(2): 8-10.
- [14] 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 Tiss Org Cult*, 1996, 47: 73-77.
- [15] Gao S L, Chen B J, Zhu D N. *In vitro* production and identification of autotetraploids of *Scutellaria baicalensis* [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 2002, 70: 289-293.
- [16] Huang H P, Gao S L, Chen L L, et al. *In vitro* induction and identification of autotetraploids of *Dioscorea zingiberensis* [J]. *In Vitro Cell Deve Biol Plant*, 2008, 44: 448-455.
- [17] 丁如贤, 郑水庆, 邢爱婷, 等. 决明子多倍体的诱导与鉴定 [J]. *中草药*, 2007, 38(7): 1090-1092.
- [18] Chen L L, Gao S L. *In vitro* tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploids in *Astragalus membranaceus* [J]. *Sci Horticult*, 2007, 112: 339-344.
- [19] 陈素萍, 王莉, 宋秀清. 党参多倍体育种的研究 [J]. *中草药*, 1991, 22(5): 224-227.
- [20] Nilanthi D, Chen X L, Zhao F C, et al. Induction of tetraploids from petiole explants through colchicine treatments in *Echinacea purpurea* L. [J/OL]. *J Biomed Biotechnol*, 2009, Article ID 343485 7 pages doi: 10.1155/2009/343485.
- [21] 张焕玲, 贾小明, 汪爱兰, 等. 杨树三倍体育种的研究现状 [J]. *西北林学院学报*, 2004, 19(3): 63-66.
- [22] 高鹏. 杜仲配子与合子染色体加倍技术研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2008.
- [23] 田兰馨. 杜仲小孢子母细胞的减数分裂及其异常现象的研究 [J]. *西北植物学报*, 1988, 8(5): 11-17.
- [24] Kesara A J, Thorsteinn T. High frequency of triploid birth hybrid by *Betula nana* seed parent [J]. *Hereditas*, 1999, 130: 191-193.
- [25] 胡博然, 徐文彪, 赵吉强, 等. 枸杞生物技术研究进展 [J]. *西北植物学报*, 2001, 21(4): 811-817.
- [26] 霍丽云, 向凤宁, 夏光敏. 药用植物石防风与柴胡不对称体细胞杂交的初步研究 [J]. *山东大学学报:自然科学版*, 2000, 35(4): 464-468.
- [27] 李世民, 梁可钧, 葛传吉, 等. 怀牛膝多倍体育种的研究 [J]. *中药通报*, 1998, 13(7): 395.
- [28] 乔传卓, 崔熙. 药用植物多倍体的应用 [J]. *中药材科技*, 1981, 4(4): 40.
- [29] Rowson J M. Increase alkaloidal contents of induced polyploids of *Datura* [J]. *Nature*, 1994, 389: 81-82.
- [30] 朱英, 来平凡. 石菖蒲的研究近况 [J]. *浙江中医学院学报*, 2001, 25(3): 80.
- [31] Trease G E. *Pharmacognosy* [M]. London: Bailliere Tindall, 1985.
- [32] Berkov S, Philipov S. Alkaloid production in diploid and autotetraploid plants of *Dature stramonium* [J]. *Pharm Biol*, 2002, 40(8): 617-621.
- [33] Yankoulov Y, Alipur H. Determining the ploidy of *Mentha piperita* L. by the frequency of essential-oil glands [J]. *CR Acad Agric Georgi Dimitrov*, 1974, 7(2): 55-58.
- [34] Leitch A R, Leitch I J. Genomic plasticity and the diversity of polyploid plants [J]. *Science*, 2008, 320(25): 481-483.
- [35] Chen J. Genetic and epigenetic mechanisms for gene expres-

- sion and phenotypic variation in plant polyploids [J]. *Annual Rev Plant Biol*, 2007, 58: 377-406
- [36] Buggs R J A, Doust A N, Tate J A, *et al*. Gene loss and silencing in *Tragopogon miscellus* (Asteraceae): comparison of natural and synthetic allotetraploids [J]. *Heredity*, 2009, 103(1): 73-81.
- [37] Luca C. The advantages and disadvantages of being polyploid [J]. *Nat Rev Genet*, 2005, 6: 835-846
- [38] 吴云江, 陈庆富. 二倍体和四倍体栽培苦苣的细胞学比较研究 [J]. *广西植物*, 2001, 21(4): 344-346
- [39] Abbott R J, Lowe A J. Origins, establishment and evolution of new polyploid species: *Senecio cambrensis* and *S. eboracensis* in the British Isles [J]. *Bot J Linnean Society*, 2004, 82: 467.
- [40] Auger D L, Gray A D, Ream T S, *et al*. Nonadditive gene expression in diploid and triploid hybrids of maize [J]. *Genetics*, 2005, 169: 389-397.
- [41] Yadegari R, Drews G N. Female gametophyte development [J]. *Plant Cell*, 2004, 16: 133-141.
- [42] McCormick S. Control of male gametophyte development [J]. *Plant Cell*, 2004, 16: 142-153.
- [43] Singh R J. *Plant Cytogenetics* [M]. Boca Raton: CRC Press, 2003.
- [44] Bhatt P N, Bhatt D P, Sussex I M. Organ regeneration from leaf disks of *Solanum nigrum*, *S. dulcamara* and *S. khasianum* [J]. *Plant Genet Breed*, 1979, 95(4): 355-362.
- [45] 段英姿, 客绍英, 曹静, 等. 秋水仙碱诱导南丹参多倍体的研究 [J]. *中国中药杂志*, 2006, 31(6): 445-448
- [46] Zhang G H, Peng H, Li P C, *et al*. The microarray analysis for gene expression in haploids and diploids derived from twin-seedling rice [J]. *Sci China Series C: Life Sci*, 2008, 51(6): 503-512.
- [47] Blanc G, Wolfe K H. Widespread paleopolyploidy in model plant species inferred from age distributions of duplicate genes [J]. *Plant Cell*, 2004, 16: 1667-1678.
- [48] Cui L, Wall P K, Leebens-Mack J H, *et al*. Widespread genome duplications throughout the history of flowering plants [J]. *Genome Res*, 2006, 16: 738-749.
- [49] Ramsey J, Schemske D W. Neopolyploidy in flowering plants [J]. *Ann Rev Ecol Syst*, 2002, 33: 589-639.
- [50] 杨继. 植物多倍体基因组的形成与进化 [J]. *植物分类学报*, 2001, 39(4): 357-371.
- [51] Comai L. Genetic and epigenetic interactions in allopolyploid plants [J]. *Plant Mol Biol*, 2000, 43: 387-399.
- [52] Wendel J F. Genome evolution in polyploids [J]. *Plant Mol Biol*, 2000, 42: 225-249.
- [53] Song K, Lu P, Tang K, *et al*. Rapid genome change in synthetic polyploids of *Brassica* and its implications for polyploid evolution [J]. *Proceed Nat Acad Sci USA*, 1995, 92: 7719-7723.
- [54] Ferrie A M R. Current status of doubled haploids in medicinal plants [A]. *Advances in Haploid Production Higher Plants* [M]. Dordrecht: Springer, 2008.
- [55] Ferrie A M R, Bethune T, Kernan Z. An overview of preliminary studies on the development of doubled haploid protocols for nutraceutical species [J]. *Acta Physiol Plant*, 2005, 27: 735-741.
- [56] Iqbal M C M, Wijesekera K B. A brief temperature pulse enhances the competency of microspores for androgenesis in *Datura metel* [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 2007, 89: 141-149.
- [57] Chand S, Sahrawat A K. Embryogenesis and plant regeneration from unpollinated ovary culture of *Psoralea corylifolia* [J]. *Biol Plant*, 2007, 51: 223-228.
- [58] Zhao F C, Nilanthi D, Yang Y H, *et al*. Another culture and haploid plant regeneration in purple coneflower (*Echinacea purpurea* L.) [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 2006, 86: 55-62.
- [59] Nilanthi D, Chen X L, Zhao F C, *et al*. Influence of gene dose on *in vitro* culture responses of purple coneflower (*Echinacea purpurea* L.) [A]. *Proceedings of The 3rd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering* [C]. Beijing: The Institute of Electrical and Electronics Engineers, 2009.
- [60] Kashkush K, Feldman M, Levy A A. Transcriptional activation of retrotransposons alters the expression of adjacent genes in wheat [J]. *Nat Genet*, 2003, 33(1): 102-106.
- [61] Fransz P, De Jong J H, Lysak M, *et al*. Interphase chromosomes in *Arabidopsis* are organized as well defined chromocenters from which euchromatin loops emanate [J]. *Proceed Nat Acad Sci USA*, 2002, 99: 14584-14589.
- [62] Hegarty M J, Hiscock S J. Genomic clues to the evolutionary success of review polyploid plants [J]. *Curr Biol*, 2008, 18: 435-444.

生物碱类化合物抗菌活性研究进展

李 杨^{1,2}, 左国营¹

(1 昆明总医院 天然药物研究中心, 云南 昆明 650032; 2 昆明医学院, 云南 昆明 650031)

摘要: 生物碱作为一类重要的天然产物, 其数量众多, 结构类型复杂。大多数生物碱具有各种显著的生理活性, 其中一些生物碱的抗菌活性也逐渐被发现。在抗生素被广泛使用, 耐药菌日趋增加的今天, 生物碱在抗菌方面的作用受到了广泛关注。国内外学者不但对天然生物碱产物进行了抗菌研究, 而且在此基础上对天然生物碱进行了构效关系研究以及结构修饰, 旨在增强生物碱类化合物的抗菌活性。以生物碱类化合物的化学结构为基础, 对近10年来国内外报道的生物碱类化合物抗菌活性进行简要综述, 以期为从多样性的生物资源中分离和筛选具有抗菌活性的生物碱先导化合物, 并根据抗菌机制和构效关系的研究, 对其进行结构修饰和优化以及为抗菌新药尤其是抗耐药菌新药的研发提供参考。

关键词: 生物碱; 抗菌活性; 构效关系

中图分类号: R284.11

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)06-1006-09

①收稿日期: 2009-12-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (NSFC30472147); 云南省后备人才基金资助项目 (2008PY001)

作者简介: 李 杨 (1983—), 女 (纳西族), 云南省昆明市人, 在读硕士, 主要从事天然产物抗菌活性研究工作。

E-mail: liyang1227@126.com

* 通讯作者 左国营 Tel: (0871) 4774941 Fax: (0871) 5414186 E-mail: zuoguoqing@263.net