

灯盏花三倍体培育及生物性状的观察研究

吴红芝², 梅琳², 郑思乡^{1*}, 杨生超², 李晓波²

1. 贵州省园艺研究所, 贵州 贵阳 550006

2. 云南农业大学, 云南 昆明 650201

摘要:目的 培育三倍体灯盏花, 并对其重要经济性状进行评估。方法 利用秋水仙素诱导获得的灯盏花四倍体植株, 与二倍体栽培种杂交获得三倍体灯盏花。用染色体法鉴定灯盏花倍性, 大田观察评估三倍体灯盏花形态学特征, HPLC法测定灯盏乙素量。结果 四倍体与二倍体杂交成功获得三倍体灯盏花 ($2n=3x=27$); 与双亲相比, 三倍体灯盏花植株在株高、叶片长、叶片宽、花瓣数、气孔大小上大于二倍体, 低于四倍体, 但其叶片数和花朵直径均大于双亲; 三倍体植株生长旺盛, 灯盏乙素质量分数 1.38%, 介于四倍体 (1.51%) 和二倍体 (1.22%) 之间, 但其产量显著高出四倍体, 为二倍体的 2.14 倍和四倍体的 1.84 倍。结论 四倍体与二倍体杂交培育的三倍体灯盏花, 灯盏乙素量虽然低于四倍体, 但显著高于二倍体, 综合其产量远远高于二倍体和四倍体的特征, 三倍体灯盏花具有重要的生产利用价值。

关键词: 灯盏花; 三倍体; 杂交育种; 灯盏乙素; 生物性状

中图分类号: R282.21

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2011)05-0991-05

Breeding of *Erigeron breviscapus* triploid and observation of biological properties

WU Hong-zhi², MEI Lin², ZHENG Si-xiang¹, YANG Sheng-chao², LI Xiao-bo²

1. Guizhou Horticultural Institute, Guiyang 550006, China

2. Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China

Abstract: **Objective** To breed *Erigeron breviscapus* triploid and evaluate the important biological properties of triploid *Erigeron breviscapus*. **Methods** Tetraploid doubled by colchicine was hybridized with diploid cultivar to get the *E. breviscapus* triploid; The ploidy of *E. breviscapus* was identified by the chromosome number. The morphological characteristics of *E. breviscapus* triploid in the field were observed and scutellarin was tested by HPLC. **Results** Through hybridization of diploid cultivar and tetraploid, *E. breviscapus* triploid ($2n=3x=27$) was obtained successfully. Compared with its parents, the plant height, leaf length and width, number of petals, stoma size of *E. breviscapus* triploids are larger than those of *E. breviscapus* diploids, but less than those of *E. breviscapus* tetraploids. However, leaf number and flower diameter of *E. breviscapus* triploids are better than those of the parents. The plant of *E. breviscapus* triploids grew vigorously, and the content of scutellarin (1.38%) is lower than that of *E. breviscapus* tetraploids (1.51%) and higher than that of *E. breviscapus* diploids (1.22%). However, the yield of *E. breviscapus* triploid is obvious higher than that of *E. breviscapus* diploid with 2.14 times and *E. breviscapus* tetraploid with 1.84 times. **Conclusion** The content of scutellarin in *E. breviscapus* triploid bred by hybridizing *E. breviscapus* diploid and *E. breviscapus* tetraploid is lower than that of *E. breviscapus* tetraploid, while is much higher than that of *E. breviscapus* diploid. *E. breviscapus* triploid is an ideal and important one with the development and utilization value based on the characteristics mentioned above.

Key words: *Erigeron breviscapus* (Vant.) Hand.-Mazz.; triploid; polyploidization breeding; scutellarin; biological properties

灯盏花为短葶飞蓬 *Erigeron breviscapus* (Vant.) Hand.-Mazz. 的干燥全草, 又称灯盏细辛, 菊科飞蓬属野生草本植物, 主要分布于我国西部及西南部的云南、湖南、广西、四川、贵州和西藏等地^[1]。其

具有散寒解表、祛风除湿、活血舒筋、消积止痛功效, 是民间常用中药。目前灯盏花被广泛用作制药原料, 用于治疗高血压、心脑血管病等多种疾病^[2-5]。灯盏花药用有效成分为黄酮类和咖啡酸脂类次生代

收稿日期: 2010-12-06

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30960238); 贵州省体改项目 (20094006)

作者简介: 吴红芝 (1971—), 女, 云南元江人, 副教授, 主要从事花卉遗传育种研究。Tel: (0871)5220399 E-mail: hwu1128@163.com

*通讯作者 郑思乡 Tel: (0851)3760252 E-mail: zhengqianlian@163.com

谢物。黄酮类化合物主要以野黄芩苷(灯盏花乙素, 简称灯盏乙素)为主, 是治疗闭塞性脑血管疾病所致瘫痪及脑出血后遗症瘫痪的特效药^[6-8]。

灯盏花属于全草类药材, 采收时连根采挖, 研究表明, 灯盏花地上部分黄酮类成分的量高于地下部分; 在不同器官中叶片最高, 花和茎次之, 黄酮类成分根最低, 根中的灯盏乙素量较叶片大幅度降低^[9-10]。由于灯盏花的自然分布有限, 加之近几年对灯盏花的大规模开发, 野生灯盏花已非常稀少^[11], 人工种植灯盏花发展迅速。但现有灯盏花栽培种产量低、有效成分量少, 难以满足制药的需求, 限制了产业发展, 启动灯盏花育种工作迫在眉睫。在灯盏花野生居群中发现的三倍体个体具有明显的生长优势, 表明开展灯盏花三倍体育种研究具有巨大的潜质^[12]。本研究利用灯盏花二倍体和四倍体杂交授粉培育出灯盏花三倍体, 为选育高产、高效的灯盏花新品系, 解决市场的大量需求奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

二倍体植株由采自云南省红河州大面积栽培的灯盏花种子无菌萌发培育得到, 四倍体植株由此二倍体经过秋水仙素处理、染色体加倍后得到, 经贵州省园艺研究所郑思乡鉴定。

1.2 方法

1.2.1 四倍体与二倍体杂交 将经过鉴定的四倍体植株与二倍体同时栽种到实验基地中, 待开花时进行人工授粉杂交。灯盏花属于异花授粉植物^[13], 且去雄处理费工费时, 而人工授粉时母本不需要去雄处理, 于开花前将灯盏花四倍体和二倍体植株花蕾套袋进行隔离, 待其开花时, 采集新鲜的花粉, 用毛笔尖涂到其柱头上对其授粉, 每天 1 次, 重复 3 次。设计四倍体×二倍体、二倍体×四倍体的正反杂交组合, 每一组合授粉 30 朵花。

1.2.2 杂交后代倍性鉴定 收获杂交授粉植株的种子, 连同亲本二倍体、四倍体种子, 在超净工作台上, 用灭菌的纱布包裹种子, 浸入 75%乙醇中处理 30 s, 然后用 0.1%的升汞消毒 1 min, 无菌水冲洗 4~5 次后接种在 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA 培养基上, 在 20 ℃、2 500 lx 光照 12~16 h 条件下进行无菌培养, 获得无菌幼苗。

当上述幼苗的真叶长至 2 片以上时, 将幼苗在超净工作台上取出, 于 0.1%的秋水仙碱溶液中浸泡 12 h 后, 用无菌水漂洗 4 次, 接种于 MS+1.0 mg/L

6-BA+0.2 mg/L NAA 培养基上, 在 20 ℃、2 500 lx 光照 12~16 h 的条件下进行无菌培养。

上午 9:00 取秋水仙素处理幼苗长出的根尖, 用 0.1%秋水仙素和 2 mmol/L 8-羟基喹啉(1:1)预处理 2 h→卡诺氏固定液固定 1 h→1 mol/L HCl 酸解 30 min→改良苯酚卡宝品红染色→压片^[14], 然后用光学显微镜观察染色体, 计数并拍照。

1.2.3 田间试验设计及形态学、产量的观察 将二倍体、三倍体、四倍体灯盏花一起播种于贵州省园艺研究所种植基地, 采用单因子随机区组设计, 重复 3 次, 种植密度为 25 cm×35 cm, 每小区 30 株, 共 9 个小区。植株盛花期测量株高、基生叶片的长宽、花朵的直径, 统计植株叶片数目和花瓣数目。选取植株中部叶片的下表皮制片, 在显微镜(16×40)下观察记录叶片气孔的长度和宽度。上述指标测量后统一采样, 取其地上部分阴干或者低温烘干, 测其产量。

1.2.4 灯盏乙素的测定 采用高效液相色谱法^[15-16]测定灯盏乙素(Agilent 1200 液相色谱仪)。以野黄芩苷(质量分数≥98%)为对照品, 产品由上海广赞化工科技有限公司生产。不同倍性灯盏花重复测 3 次, 求其平均值。

色谱条件: 色谱柱 C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相: 乙腈(A)-0.5%磷酸溶液(B), 梯度洗脱: 0~5 min, 10%A; 5~7 min, 10%~15%A; 7~20 min, 20%A, 体积流量为 1 mL/min, 进样量 20 μL, 检测波长 335 nm。

2 结果与分析

2.1 四倍体灯盏花诱导

对经过秋水仙碱浸泡处理的幼苗进行观察, 发现灯盏花苗形态上表现出一些变异特征, 如叶片畸形、肥厚、皱缩、叶色加深等, 变异率超过 30%。通过对诱导处理植株根尖进行染色体制片观察, 鉴定出四倍体变异植株染色体数目为 $2n=4x=36$, 其二倍体植株染色体数目为 $2n=2x=18$ (图 1), 染色体鉴定表明秋水仙素处理成功诱导出四倍体灯盏花。

2.2 不同倍性灯盏花杂交授粉的结实率

二倍体与四倍体正反交结实率分别为 16.26% 和 14.23%, 二倍体为母本的杂交结实率稍高于四倍体, 可能是经过长期栽培的二倍体植株对环境条件更为适应的原因。

2.3 灯盏花杂交后代的染色体鉴定及稳定性

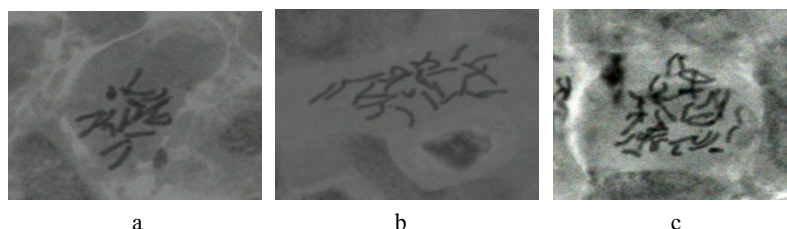


图 1 二倍体 (a)、三倍体 (b)、四倍体 (c) 灯盏花的染色体数

Fig. 1 Chromosome numbers of diploid (a), triploid (b), and tetraploid (c) *E. breviscapus*

对四倍体与二倍体正反杂交后代植株进行染色体制片,观察发现其染色体数目为 $2n=3x=27$ (图 1),由此鉴定其杂交授粉后得到灯盏花是三倍体植株。细胞学鉴定表明,四倍体灯盏花与二倍体灯盏花杂交获得三倍体后代。

鉴定后的三倍体植株组培继代培养后,再次用生根培养基诱导生根,取根尖进行染色体制片鉴定其倍性。结果表明,灯盏花四倍体与二倍体杂交获得的三倍体是稳定的。

2.4 不同倍性灯盏花生物及形态学观察

与二倍体杂交的四倍体是该二倍体细胞染色体加倍获得的,因此正反交获得的三倍体后代的核质基因完全一致,田间试验的三倍体植株不区分正反交获得的材料。

将相同大小的二倍体、三倍体、四倍体灯盏花组培苗移栽到大田中,三倍体植株苗从移栽到现蕾约 90 d,现蕾到开花约 20 d,从移栽到开花整个周期约 110 d;二倍体植株苗从移栽到现蕾约 95 d,现蕾到开花约 20 d,整个周期约 115 d;四倍体植株苗移栽到抽薹约 103 d,抽薹到开花约 24 d,整个生长周期约 127 d,且三倍体植株长势壮、生长整齐。

在植株盛花期,随机抽取不同倍性植株各 30 株,观察测量其形态学特征。三倍体植株的叶片长、叶片宽、株高、花瓣数、气孔大小高于二倍体,低于四倍体;但三倍体植株的叶片数及花朵直径均显著高于二倍体与四倍体,对测量数据进行方差分析结果见表 1,可以看出除叶片宽度以外,株高、叶片数、叶片长、花直径、花瓣数、气孔长和宽三者

表 1 不同倍性灯盏花形态学观测及差异显著性比较

Table 1 Observation of morphology in different ploidy of *E. breviscapus* and comparison of its significant differences

材 料	株高/cm	叶片数/个	叶片长/mm	叶片宽/mm	花直径/cm	花瓣数/个	气孔长/ μm	气孔宽/ μm
三倍体	44 B	49 A	153.46 B	26.06 B	39.23 A	144 B	10.0 B	3.83 B
二倍体	30 C	27 B	123.90 C	25.06 B	27.24 C	126 C	6.2 C	2.16 C
四倍体	52 A	29 B	192.75 A	34.62 A	33.78 B	165 A	13.5 A	4.83 A
F 值	12.97**	74.00**	20.38**	6.65	22.26**	15.27**	73.00**	65.33**

**表示 $F_{0.01}=10.9$ 水平下差异极显著, 同列不同字母表示差异显著 ($P<0.05$)

** means extreme difference at $F_{0.01}=10.9$ level, different letters in same colum mean significant difference at $P<0.05$ level

之间都存在极显著差异。

2.5 不同倍性灯盏花的产量及灯盏乙素分析

2.5.1 产量结果分析 灯盏花二倍体、三倍体和四倍体植株产量见表 2。结果表明,三倍体的产量远远高于二倍体和四倍体,是二倍体的 2.14 倍,四倍体的 1.82 倍。

2.5.2 灯盏乙素分析 灯盏乙素量对照品及样品 HPLC 色谱图见图 2。以灯盏乙素对照品质量浓度 ($X, \mu\text{g/mL}$) 为横坐标,峰面积 (Y) 为纵坐标,绘制标准曲线并进行回归计算,得灯盏乙素的标准曲线回归方程为 $Y=3\,234.4X+41.920$, $r=0.999\,98$,

表 2 不同倍性灯盏花的产量结果分析

Table 2 Yield of different ploidy of *E. breviscapus*

材 料	产量/g				
	I	II	III	总和	平均
二倍体	669.6	718.2	706.8	2 094.6	698.2
三倍体	1 486.8	1 626.0	1 378.6	4 491.4	1497.1
四倍体	809.2	858.4	795.0	2 462.6	820.9

线性范围为 $19.375\sim310.0 \mu\text{g/mL}$,测定的灯盏乙素线性关系良好。

不同倍性灯盏花植株灯盏乙素测定结果为四倍

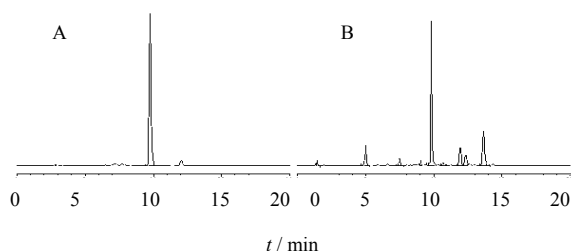


图 2 灯盏乙素对照品 (A) 及灯盏花样品 (B) HPLC 图
Fig. 2 HPLC chromatograms of scutellarin reference substance (A) and sample (B)

体植株灯盏乙素质量分数 1.513 4%，为最高；其次是三倍体植株，为 1.382 2%；二倍体植株最低，为 1.215 7%。不同倍性差异显著性分析结果显示，灯盏乙素的量随倍性增加而增加，变化差异显著。

3 讨论

3.1 三倍体灯盏花显著的多倍体优势

多倍化是植物进化变异的自然现象，也是促进植物发生进化改变的重要力量^[17-18]。多倍体植物由于染色体加倍，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。三倍体植物由于其杂合性高、重复冗余基因少等特点，通常表现出最好的器官巨大性和最大的杂种优势^[17,19]。

本研究通过二倍体加倍获得四倍体再与二倍体杂交的方法，首次成功培育出灯盏花三倍体。对该三倍体灯盏花田间生物学特性的观察表明，三倍体植株生长势强，植株叶片数和头状花序直径均明显优于双亲二倍体和四倍体。对于全草入药，灯盏花主要药用成分黄酮类的量地上部分高于地下部分，在不同器官中叶片最高，花和茎次之的灯盏花^[20]，三倍体灯盏花的生物学变异非常有利于药材产量及提高有效成分的需求，如果结合组培育苗技术克服三倍体植物育性降低的缺点^[21]，将极大地促进灯盏花及其制药产业的发展。

3.2 灯盏花有效成分在多倍体中的变化

灯盏乙素是灯盏花的主要药用有效成分，能扩张微细动脉，改善微循环和心脑血管缺血状态，清除氧自由基，是治疗闭塞性脑血管疾病所致瘫痪及脑出血后遗症瘫痪的特效药^[5-7]。

药用植物在诱导成多倍体后，体内所含药用成分一般会提高^[22]。本实验的测定结果表明，灯盏花二倍体、三倍体、四倍体植株灯盏乙素的量分别为 1.22%、1.38%、1.51%，灯盏乙素量随倍性的增加

而增加，四倍体量明显高于二倍体，与黄芩四倍体中黄芩苷量明显增加^[23]的情况一致。

药材有效成分的高低，一方面由本身遗传因素决定，另一方面是环境因素作用的结果。本实验中，3 个倍性灯盏花栽培于同一实验基地中，生长环境及管理措施相同，同时采用了随机区组设计，且为随机取样，避免了环境差异和人为因素造成的影响，3 个倍性灯盏乙素量的差异应来自遗传或遗传表达的差异^[24]。

灯盏花中灯盏乙素的量随倍性的增加而增加，暗示控制灯盏乙素合成的相关基因的表达属于 DNA 剂量依赖型^[25]，在多倍体新的染色体组合中兼容性好，不受多倍化诱发的遗传、表观遗传或转录调控等变化的影响。灯盏花可能为研究灯盏乙素等黄酮类物质合成的有效植物载体。

3.3 灯盏花多倍体育种前景

通过对 3 个倍性植株田间生长情况的观察比较，四倍体植株和三倍体植株在田间都具有很好的适应性及倍性稳定性，生物学产量以及主要有效成分灯盏乙素量都远远高于二倍体植株。尤其是三倍体灯盏花，表现出显著的多倍体优势，虽然一些形态学特征介于二倍体和四倍体之间，但经济最为重要的叶片数和花朵直径性状明显优于二倍体和四倍体，三倍体植株产量显著高于二倍体和四倍体，为二倍体的 2.14 倍、四倍体的 1.82 倍，是进一步培育高产优质灯盏花新品种的重要资源。

此外，虽然三倍体灯盏花高度不育，但个别仍有结籽现象，对其种子进行染色体鉴定发现绝大多数是非整倍体，这些非整倍体是否在灯盏花进一步育种中具有利用价值，有待进一步研究。

参考文献

- [1] 黎光南. 云南中药志 [M]. 云南: 科技出版社, 1990.
- [2] 郑慧君. 灯盏细辛注射液治疗冠心病心绞痛 31 例 [J]. 新药与临床, 1991, 10(3): 155-157.
- [3] 李卫东, 李江桃, 龙建新. 灯盏花注射液治疗脑梗塞临床与实验研究 [J]. 实用医学杂志, 1998, 11(2): 10.
- [4] 张杰, 王兰琼, 李水平. 灯盏细辛及其相关产品应用近况 [J]. 中国民族民间医药杂志, 2001(51): 197.
- [5] 邱璐, 瞿礼嘉, 虞泓, 等. 灯盏花的研究进展 [J]. 中草药, 2005, 36(1): 141-144.
- [6] 王荪. 灯盏花素注射液治疗中风后瘫痪 469 例报告 [J]. 中草药, 1983, 14(1): 33-34.
- [7] 顾选文, 王云霞, 范华昌, 等. 灯盏花治疗脑血栓形成 132

- 例临床疗效观察 [J]. 云南中医中药杂志, 1983(6): 15-19.
- [8] 徐鸿婕. 灯盏花素配合奥利达治疗腔隙性脑梗塞疗效观察 [J]. 湖北中医杂志, 2006, 28(8): 10-11.
- [9] 苏文华, 陆洁, 张光飞, 等. 短葶飞蓬总黄酮含量的生态生物学分析 [J]. 中草药, 2001, 32(12): 1119-1121.
- [10] 张人伟, 张元玲, 王杰生, 等. 灯盏花黄酮类成分的分离鉴定 [J]. 中草药, 1985, 16(5): 7-9.
- [11] 林春, 刘鸿高, 余选礼, 等. 药用植物灯盏花的研究进展 [J]. 中国野生植物资源, 2003, 22(1): 8-11.
- [12] 李鹏, 党承林, 黄瑞复. 三倍体短葶飞蓬的发现及其在育种上的意义 [J]. 云南植物研究, 2007, 29(1): 38-42.
- [13] 李鹏, 党承林. 短葶飞蓬的花部综合特征与繁育系统 [J]. 生态学报, 2007, 27(2): 571-678.
- [14] 朱澂. 植物染色体及染色体技术 [M]. 北京: 科学出版社, 1982.
- [15] 杨文字, 张艺, 段俊国. 高效液相色谱法测定灯盏细辛中灯盏乙素的含量 [J]. 成都中医药大学学报, 2001, 22(3): 37-41.
- [16] 王跃飞, 潘桂湘, 高秀梅, 等. HPLC 法同时测定不同地区灯盏细辛中 4 种有效成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2009, 29(3): 416-419.
- [17] Hegarty M J, Hiscock S J. Genomic clues to the evolutionary success of review polyploid plants [J]. *Curr Biol*, 2008, 18: 4352-4441.
- [18] Liu B, Xu C, Zhao N, *et al.* 2009. Rapid genomic changes in polyploid wheat and related species: implications for genome evolution and genetic improvement [J]. *J Genet Genom*, 36(9): 519-528.
- [19] 蔡旭. 植物遗传育种学 [M]. 第 2 版. 北京: 科技出版社, 1998.
- [20] 苏文华, 陆洁, 张光飞, 等. 短葶飞蓬总黄酮含量的生态生物学分析 [J]. 中草药, 2001, 32(12): 1119-1121.
- [21] 张人伟, 张元玲, 王杰生, 等. 灯盏花黄酮类成分的分离鉴定 [J]. 中草药, 1985, 19(5): 7-9.
- [22] Luca C. The advantages and disadvantages of being polyploid [J]. *Nat Rev Genet*, 2005, 6: 8352-8461.
- [23] 何韩军, 杨跃生, 吴鸿. 药用植物多倍体的诱导及生物学意义 [J]. 中草药, 2010, 46(6): 1000-1006.
- [24] Gao S L, Chen B J, Zhu D N. *In vitro* induction and identification of autotetraploids of *Scutellaria baicalensis* [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 2002, 70: 289-293.
- [25] Chen J. Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids [J]. *Annual Rev Plant Biol*, 2007, 58: 3772-4061.