

高山红景天同源四倍体诱导与鉴定研究

刘剑锋¹, 程云清¹, 刘建华², 钟雪¹, 陈智文¹

1. 吉林师范大学 生态环境研究所, 吉林 四平 136000

2. 武汉科技大学附属天佑医院, 湖北 武汉 430081

摘要: **目的** 获得高山红景天同源四倍体无性体系。**方法** 秋水仙素诱导种子加倍, 通过多次组培再生进行嵌合体分离, 采用气孔大小与密度测量、染色体计数和流式细胞学分析进行倍性鉴定。**结果** 秋水仙素质量分数与处理时间对种子萌发率、幼苗死亡率及诱变率均有十分明显的影响, 0.2%秋水仙素处理露白种子 72 h 的萌发率、幼苗死亡率及诱变率分别为 18.2%、73.6%、68.7%; 倍性变异植株气孔明显增大, 气孔密度变小; 正常二倍体染色体数目为 $2n=2x=26$, 四倍体染色体数为 $2n=4x=52$, 发现非整倍体的存在; 倍性变异植株经 3 次再生纯化后获得纯合四倍体无性系, 流式细胞学检测无嵌合体存在。**结论** 秋水仙素处理高山红景天种子获得同源四倍体具有可行性。

关键词: 高山红景天; 秋水仙素; 二倍体; 四倍体; 染色体

中图分类号: R282.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2011)06-1201-05

Autotetraploid induction and identification of *Rhodiola sachalinensis*

LIU Jian-feng¹, CHENG Yun-qing¹, LIU Jian-hua², ZHONG Xue¹, CHEN Zhi-wen¹

1. Institute of Eco-environmental Sciences, Jilin Normal University, Siping 136000, China

2. Affiliated Tianyou Hospital, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430081, China

Abstract: **Objective** To obtain autotetraploid clones of *Rhodiola sachalinensis*. **Methods** Germplasm with doubled chromosomes was acquired according to colchicine soaking seeds, and ploidy was identified according to stomata size and density measurements, chromosome counting and flow cytometry analysis. Chimera was purified after several times of regenerations. **Results** Colchicine concentration and treatment duration had significant effect on seed germination rate, seedling death rate and ploidy mutation rates, and they were 18.2%, 73.6%, and 68.7%, respectively after the seeds were soaked in 0.2% colchicine solution for 72 h. Stomata diameter was promoted and density was declined significantly in morphological variation plantlets; normal diploid chromosome number was $2n=2x=26$, and tetraploid chromosome number was $2n=4x=52$. Meanwhile, aneuploidy was found in the population of plantlets after colchicine soaking, leaves of ploidy mutation plantlets were used as explants to regenerate to tube plants, and homozygous clones were obtained after three regeneration and purification cycles. There was no chimera in the homozygous clones according to flow cytometry analysis. **Conclusion** It is feasible to obtain autotetraploid according to colchicine treatment on seeds of *R. sachalinensis*.

Key words: *Rhodiola sachalinensis* A. Bor.; colchicine; diploid; tetraploid; chromosome

高山红景天 *Rhodiola sachalinensis* A. Bor. 具有抗疲劳、抗缺氧、抗寒冷等显著功能, 是颇具发展前景的一种保健药用植物。由于高山红景天资源的大量开发利用, 野生种质日趋枯竭^[1-3], 近年来人工栽培面积有较大的增长, 但是低海拔地区栽培病害严重, 此外, 还受栽培周期长(5年)、产量不高、药用活性成分的量偏低等问题的困扰^[1, 4-6]。多倍体

药用植物具有生长速度快、抗逆性强、药用成分高等优点^[7-8]。开发高山红景天多倍体新种质对于缩短人工栽培年限、减少根腐病发生、提高药用成分等均具有潜在应用价值, 也是推动其可持续利用的重要手段之一, 然而目前尚未见到高山红景天多倍体诱导方面的研究。本研究通过秋水仙素处理高山红景天种子, 诱导染色体加倍, 通过气孔直径、密

收稿日期: 2010-09-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(30801516); 吉林省科技发展计划项目(20090165); 吉林师范大学科研创新团队资助项目(JSDCXTD200807); 吉林师范大学研究生科研创新计划项目(S09010102)

作者简介: 刘剑锋(1976—), 男, 湖北黄石人, 吉林师范大学生命科学学院副教授, 硕士生导师, 从事细胞生物学的教学研究工作, 已发表论文 40 余篇。Tel: (0434)3292019 E-mail: jianfengliu1976@163.com

度测量进行多倍体的初步鉴定,进而采用染色体计数进行再鉴定。在此基础上,对倍性变异植株进行多次再生,通过流式细胞学检测判断嵌合体的分离效果,为高山红景天多倍体种质创新研究提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料为长白山野生高山红景天 *Rhodiola sachalinensis* A. Bor. 种子,由通化师范学院制药与食品科学系于俊林教授鉴定。

1.2 种子处理

取种子 10.0 g, 500 mg/L GA_3 中浸泡 30 min, 转入双层灭菌滤纸的培养皿中,加入 2~3 mL 无菌水润湿滤纸,盖上培养皿,置 25 °C 培养箱中进行暗培养,3 d 后约 10% 种子露白。干燥滤纸吸除种子附着水分,转入质量分数分别为 0.05%、0.1%、0.2% 和 0.3% 的秋水仙素溶液中进行处理,处理时间分别为 24、48、72 h。以不加秋水仙素的处理作为对照。共计 13 个处理,每个处理重复 3 次,每次重复 1 000 粒种子。

1.3 萌发率、死亡率、诱变率、气孔密度及染色体计数

播种前用自来水反复浸洗种子多次以去除残余秋水仙素。种子播于盛 7.0 kg 过筛细土的塑料桶中,用透光塑料薄膜扎紧塑料桶上口保湿,置光照强度为 1 000~2 000 lx,每天光照约 10 h 的温室中进行培养。播种 2 周后计算萌发率(萌发率=幼苗数/播种种子数)。计算死亡率(死亡率=播种 2 个月后存活幼苗数/播种 2 周时存活幼苗数)。播种第 3 周后去除塑料膜,2 个月后,诱变再生苗长至 2~4 片叶,测定气孔大小和密度(气孔密度=气孔个数/面积);计算诱变率(诱变率=气孔变异植株数/气孔检测植株数)。染色体计数参照文献方法进行^[9]。

1.4 四倍体无性系建立与流式细胞仪检测

以多倍体植株叶片为外植体,通过组织培养获得再生植株,循环 3 次,纯化为纯合多倍体,组织培养程序参照刘剑锋等^[10]的方法,建立起源于单个叶片的四倍体无性系。参照刘剑锋等^[11]的方法抽提叶片细胞核,用 EPICS XL 流式细胞仪检测细胞核中 DNA 量。

1.5 统计分析

应用 SAS 8.2 统计软件中的 GLM 模块进行邓肯氏新复极差显著性分析,如统计结果为百分数,

经过反正弦转化后进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 秋水仙素对高山红景天种子萌发率、死亡率、气孔及密度、诱变率的影响

未经秋水仙素浸泡的高山红景天种子播种后萌发率为 63.4%。秋水仙素不同质量分数与处理时间对高山红景天倍性诱变效应见表 1。经不同质量分数的秋水仙素处理后,萌发率出现不同程度的下降,差异显著性分析结果表明,经秋水仙素处理后种子萌发率均显著低于对照($P<0.05$)。在相同秋水仙素质量分数下,随着处理时间的延长,种子萌发率下降,不同处理时间比较差异也均达到显著水平($P<0.05$)。

秋水仙素处理提高了高山红景天幼苗的死亡率,主要表现为,秋水仙素处理过的种子常能萌发,但生根数目少,根系不发达,随着培养时间的延长,植株易黄化死亡。在相同质量分数条件下,随前处理时间的延长,死亡率显著上升($P<0.05$);在相同处理时间条件下,随着秋水仙素质量分数的增加,死亡率也显著上升($P<0.05$)。萌发率与死亡率的相关性分析结果表明,两者呈显著负相关($P<0.05$), $r=-0.89$ 。

气孔大小与密度被认为是鉴定多倍体的一个较为可靠的指标^[11-12]。因此,萌发的高山红景天经 2 个月培养后,进行了气孔特征的比较,结果见图 1-A 和 1-B。高山红景天对照叶片气孔最小值为 22.60 μm ,最大值为 27.10 μm ,平均值为 25.43 μm ,平均气孔密度为 26.8 个/ mm^2 ;经加倍后植株气孔特征发生了明显的变化,叶片气孔最小值为 27.59 μm ,最大值为 38.54 μm ,平均值为 33.65 μm ,平均气孔密度为 19.7 个/ mm^2 。秋水仙素处理高山红景天种子后,萌发幼芽存在较多形态变异,表现为叶片宽大,根茎粗壮(图 1-C)。将气孔显著增大,气孔密度变小的植株定义为倍性变异植株,统计诱变率(表 1)。结果表明在相同的秋水仙素质量分数下,随着处理时间的延长,诱变率明显上升,不同处理时间差异达到显著水平($P<0.05$);对 12 个秋水仙素浸泡处理的种子萌发率与诱变率进行了相关性分析,萌发率与诱变率呈显著负相关($P<0.05$), $r=-0.88$,死亡率与诱变率呈显著正相关($P<0.05$), $r=0.73$ 。

2.2 倍性变异植株、对照植株染色体计数分析

通过气孔大小与密度检测初步判定植株的倍性后,进行了染色体计数,结果见图 2。对照二倍体

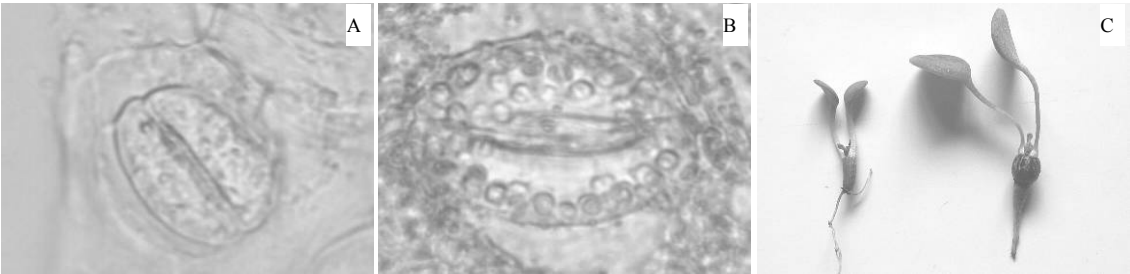
表 1 秋水仙素不同质量分数与处理时间对高山红景天倍性诱变效应

Table 1 Effects of colchicine at different concentration and treatment times on ploidy mutagenic ratio of *R. sachalinensis*

秋水仙素/%	处理时间/h	种子数量/粒	萌发率/%	死亡率/%	诱变率/%
0	0	1 000	63.4 a	12.0 h	0.0 j
0.05	24	1 000	53.2 b	16.0 h	24.7 i
	48	1 000	44.7 c	23.9 g	33.6 gh
	72	1 000	28.3 f	33.9 f	57.3 bc
	72	1 000	28.3 f	33.9 f	57.3 bc
0.1	24	1 000	42.5	24.0	32.4
	48	1 000	32.6	37.7	49.6
	72	1 000	24.9	45.8	51.8
	72	1 000	24.9	45.8	51.8
0.2	24	1 000	39.3	57.0	36.6
	48	1 000	27.5	66.9	54.9
	72	1 000	18.2	73.6	68.7
	72	1 000	18.2	73.6	68.7
0.3	24	1 000	24.9	64.7	38.5
	48	1 000	12.7	75.6	55.2
	72	1 000	2.9	82.8	58.3
	72	1 000	2.9	82.8	58.3

同列相同字母表示差异不显著

Different letters within same column indicate significant difference at 0.05 levels.



A-二倍体叶片气孔特征 B-倍性变异植株叶片气孔特征 C-二倍体（左）、倍性变异植株（右）外观特征
A-stomatal characteristics of diploid B-stomatal characteristics of ploidy variation plantlets
C-appearance features of diploid (left), ploidy variation plantlet (right)

图 1 秋水仙素处理后高山红景天幼苗气孔与植株特征变化

Fig. 1 Changes of stoma and plantlet characteristics of *R. sachalinensis* after colchicine treatments

植株的染色体数目为 $2n=2x=26$ (图 2-A), 秋水仙素处理的植株中检测到非整倍体的存在 (图 2-B), 图中所示的非整倍体染色体数目为 $2n=48$, 四倍体染色体数为 $2n=4x=52$ (图 2-C)。因此, 在秋水仙素处理种子获得的幼苗中, 有普通的二倍体植株, 有非整倍体, 也有同源四倍体, 进行四倍体材料的纯化是很有必要的。

2.3 倍性变异材料的分离纯化与纯合四倍体无性系的获得

取四倍体植株 63 个, 普通二倍体植株 3 个, 通过愈伤分化、芽诱导、生根等组织培养程序获得再生植株, 最终获得四倍体无性系 37 个, 普通二倍体无性系 3 个, 并对再生植株的倍性进行了流式分析。

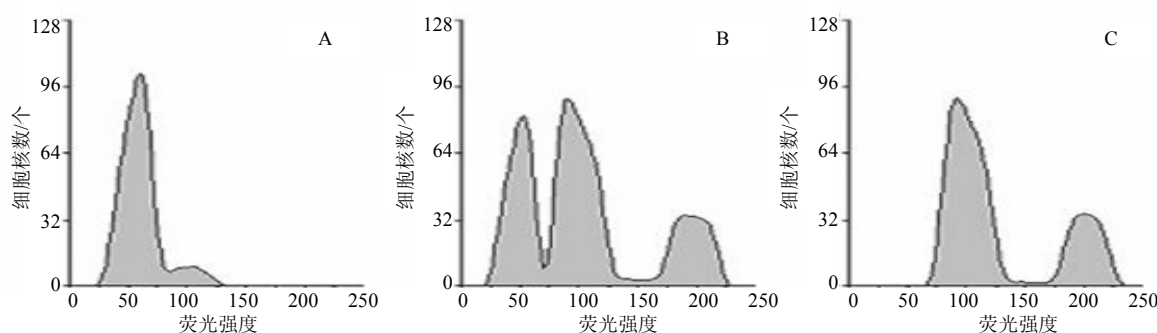
结果表明, 3 个普通的二倍体无性系没有出现倍性变异 (图 3-A), 其荧光强度高峰分别出现在 50 与 100 的位置, 这分别与没有进行 DNA 复制和完成 DNA 复制的二倍体细胞核 DNA 相对应; 纯合四倍体材料 16 份, 其荧光强度高峰分别出现在 100 与 200 的位置, 这分别与没有进行 DNA 复制和完成 DNA 复制的四倍体细胞核 DNA 相对应 (图 3-C); 嵌合多倍体材料 21 份, 其荧光强度高峰分别出现在 50、100 和 200 的位置, 这与二倍体与四倍体的结果均有明显不同, 这表明其中还存在嵌合体。经过 3 次循环再生培养后, 最终获得起源于单个叶片的四倍体无性系 16 个, 经染色体计数和流式细胞检测, 以上材料均为纯合四倍体。



A-二倍体 ($2n=2x=26$) B-非整倍体($2n=4x=48$) C-四倍体 ($2n=4x=52$)
A- diploid ($2n=2x=26$) B-aneuploid ($2n=4x=48$) C-tetraploid chromosomes ($2n=4x=52$)

图 2 高山红景天植株染色体计数

Fig. 2 Chromosome counts of *R. sachalinensis* plantlet



A-二倍体 B-嵌合体 C-四倍体

A, B, and C were flow cytometry analysis results of diploid, chimera, and tetraploid

图 3 对照与秋水仙素处理植株流式细胞学分析

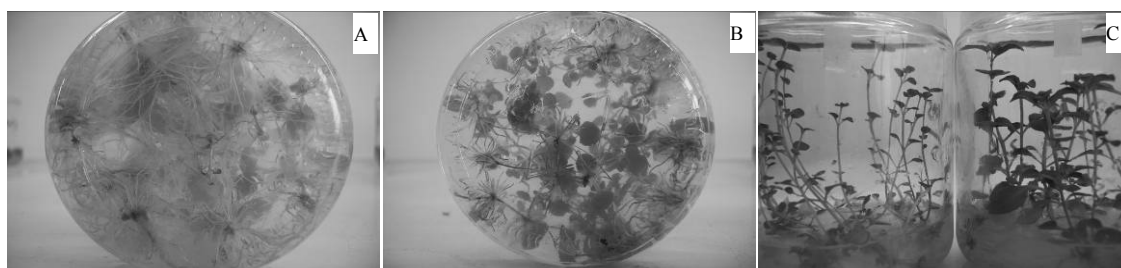
Fig. 3 Flow cytometry analysis of control and colchicine treatment plantlet

值得注意的是,二倍体与四倍体在组培瓶中的生根特征有很大的区别,在 1/2 MS 培养基上进行根诱导 20 d,二倍体生根 15~20 条,全部为白色须根,平均长度 5~7 cm;四倍体茎上可以产生须根,也可产生较粗壮的主根,从主根上也可萌发产生须根,须根数量与二倍体相当,但根平均长度仅 3~4 cm,在根尖处色泽较暗,两者生根特征上区别明显(图 4-A、4-B)。再生植株叶片外观上两者也存在明显区别,二倍体叶片鲜绿,叶片小且薄,四倍体叶片暗绿,叶片大而厚(图 4-C)。以上形态特征也为多倍体材料的鉴定提供了依据。

3 讨论

在细胞有丝分裂过程中,秋水仙素处理过的细胞染色体能完成复制,但纺锤体形成受到抑制,染色体不能正常分配到两个子细胞中去,因而完成复制的染色体留在同一细胞内从而使染色体发生加倍。利用秋水仙素诱导产生多倍体已有较多成功的研究^[12-16]。在诱导加倍的过程中,如果被处理的细

胞周期不同步,就会导致材料出现不同倍性细胞的混杂,因此,秋水仙素诱导材料进行加倍的过程中出现嵌合体是一种常见的现象^[17]。在本研究中,从诱变率来看,0.2%秋水仙素处理 72 h 诱变率最高,但萌发率较低,死亡率较高,考虑到高山红景天种子微小,1 g 种子有近 7 000 余粒这一自身优势来看,1 000 粒种子(约 0.14 g)获得诱变植株 33 株,这对于降低后续鉴定工作的复杂性颇为有利,因此,采用 0.2%秋水仙素处理种子 72 h 对于倍性变异植株的获得较为适宜。从鉴定方法来看,高山红景天叶片呈肉质,下表皮撕取容易,测定气孔直径与密度对材料进行初步鉴定也是可行的,且技术程序远较染色体计数容易。在本研究中,倍性变异植株气孔直径明显增大,气孔密度变小,这与报道相一致^[11-12]。诱导植株中有较多嵌合体的存在,嵌合体的分离纯化也四倍体种质实用化的必需程序。以初步鉴定为四倍体的植株叶片用作外植体,经过 3 次再生最终获得 16 个四倍体无性系,并通过流式细胞



A-二倍体生根特征 B-四倍体生根特征 C-二倍体(左)、四倍体(右)组培苗形态比较
A-rooting characteristics of diploid B-rooting characteristics of tetraploid
C-plantlets morphological comparison of diploid (left) and tetraploid (right)

图 4 二倍体、四倍体无性系生根与形态特征比较

Fig. 4 Clones rooting and morphology characteristics of diploid and tetraploid

检测证实为纯合体, 这些纯合四倍体材料在组培瓶中的生根特征与普通二倍体区别明显, 这表明连续的筛选和再生可有效筛选获得纯合四倍体。高山红景天同源四倍体材料对低海拔地区的适应性、对根腐病的抗性、生长特征还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 刘剑锋, 程云清, 陈智文. 高山红景天叶肉原生质体分离培养与植株再生 [J]. 中草药, 2009, 40(7): 1127-1131.
- [2] 许建峰, 应佩青. 高山红景天资源应用与开发研究进展 [J]. 中草药, 1998, 29(3): 202-205.
- [3] 刘剑锋, 阎秀峰, 程云清, 等. 高山红景天 (*Rhodiola sachalinensis* A. Bor) 茎尖包埋-玻璃化法超低温保存与植株再生 [J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2007, 33(3): 265-270.
- [4] 刘剑锋, 阎秀峰, 程云清, 等. 高山红景天愈伤组织的玻璃化法保存及植株再生 [J]. 北京林业大学学报, 2007, 29(2): 147-151.
- [5] 石铁源, 郑明焕, 李熙英, 等. 高山红景天育苗技术 [J]. 林业科技, 2006, 31(2): 60-62.
- [6] 阎秀峰, 王 洋, 于 涛, 等. 红景天的栽培采收方法 [P]. 中国专利: CN1312978C, 2007-5-2.
- [7] 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.
- [8] 王朝梁, 陈中坚, 孙玉琴, 等. 秋水仙碱诱导三七多倍体的初步研究 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(12): 1222-1224.
- [9] 陈瑞阳, 宋文芹, 李秀兰. 植物有丝分裂染色体标本制作的新方法 [J]. 植物学报, 1979, 21(3): 297-298.
- [10] 刘剑锋, 阎秀峰, 程云清, 等. 高山红景天叶片愈伤组织诱导与植株再生 [J]. 东北林业大学学报, 2007, 35(2): 33-34.
- [11] 刘剑锋, 阎秀峰, 程云清, 等. 高山红景天 (*Rhodiola sachalinensis*) 试管苗缓慢生长法保存及试管苗 DNA 含量分析 [J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2007, 33(4): 373-378.
- [12] 任安祥, 潘春香, 何金明, 等. 秋水仙素诱导茴香多倍体的研究 [J]. 中草药, 2010, 41(2): 288-291.
- [13] 郑宝强, 张 莹, 王 雁, 等. 春石斛的多倍体诱导 [J]. 园艺学报, 2009, 36(9): 1381-1384.
- [14] 谢彩侠, 史会齐, 高山林, 等. 盾叶薯蓣四倍体的鉴定和薯蓣皂苷元的定量分析 [J]. 中草药, 2009, 40(8): 1314-1316.
- [15] 周堂英, 李惠波, 向素琼, 等. 粉葛组织培养及同源四倍体诱导 [J]. 中草药, 2005, 36(8): 1230-1233.
- [16] 李秀兰, 安 东. 秋石斛同源四倍体诱导与鉴定 [J]. 园艺学报, 2009, 36(8): 1239-1242.
- [17] 李 涵, 郑思乡, 龙春林. 齿瓣石斛多倍体的诱导初报 [J]. 云南植物研究, 2005, 27(5): 552-556.