

三倍体丹参的培育及其可持续利用研究

李秀兰, 陈 力*

南开大学生命科学学院, 天津 300071

摘要: 目的 建立三倍体丹参培育及其可持续利用的方法。方法 应用“基因组多倍化与杂交相结合”的方法, 将二倍体白花丹参人工诱变成同源四倍体 ($4x=32$), 然后与栽培或野生二倍体 ($2x=16$) 丹参进行杂交, 转育成三倍体 ($3x=24$) 丹参。结果 $4x♀ \times 2x♂$ 或 $2x♀ \times 4x♂$ 均能获得三倍体丹参, 三倍体丹参具有多倍体和杂交种双重优势, 根条数增加 94.23%, 根部鲜质量增加 215.33%, 主要药物成分隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II_A、丹酚酸 B 均达到或超过《中国药典》2010 年版规定的水平。三倍体丹参杂交一代通过无性繁殖成为永久杂种, 长期保持不变。结论 三倍体丹参的培育是我国丹参种质资源遗传改良、新品种选育和杂种优势可持续利用的重要途径。

关键词: 丹参; 三倍体; 多倍体; 杂种优势; 无性繁殖

中图分类号: R282.21 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)02-0375-05

Breeding for triploids of *Salvia miltiorrhiza* and its sustainable utilization

LI Xiu-lan, CHEN Li

College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China

Key words: *Salvia miltiorrhiza* Bunge; triploid; polyploid; heterosis; clone

丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 是我国传统医药中应用最早、最广泛的中药之一, 是著名的活血化瘀药, 在临床上被广泛用于治疗冠心病、心绞痛、缺血性中风等疾病^[1]。目前我国以丹参为原料生产的复方中药有 100 多种, 对优质丹参药材的需求量巨大^[2]。20 世纪六七十年代, 各地野生丹参转变家种成功后, 丹参生产有了较大发展, 已成为一种重要的栽培药用植物^[3-7], 目前已有一些关于丹参品种培育的研究报道^[8-13]。但是, 随着栽培丹参的发展, 我国丹参遗传改良与新品种培育还存在许多问题^[14], 因此寻找一条有效的丹参新品种培育方法势在必行。

多倍化是高等植物进化的普遍规律, 是促进植物进化的重要力量。Otto 等^[15]提出, 多倍化有可能是植物同域物种形成最普遍的机制。多倍体在自然界很普遍^[16], 其中三倍体 ($3x$) 是多倍体中倍数最低的多倍体, 由四倍体 ($4x$) 与二倍体 ($2x$) 杂交产生, 自然界中多数三倍体是由加倍的 $2n$ 配子杂交形成的。同时, 三倍体形成后在“空间上”与其他物种产生了生殖隔离, 不能进行有性杂交, 没有有性

后代分离, 其杂交第一代是“永久 F1”, 可使杂种优势固定下来, 通过无性繁殖成为“永久杂种”, 使杂种优势得到长期保持。因此, 基因组三倍化有多倍体和杂交种双重优势, 并且可固定杂种优势。三倍体杂种优势利用引起了广泛的关注。在药用植物中约有 70% 的药材是以根、茎、叶入药, 所以, 三倍体营养器官的巨大性可以得到充分利用。另外, 有 50% 以上的药用植物能够进行无性繁殖^[17], 三倍体优势利用在药用植物中具有很大的潜力, 但现在少有研究。关于三倍体丹参的研究尚未见报道, 本实验首次建立了一套完整的三倍体丹参培育及其优势利用方法, 为丹参的三倍体培育奠定了科学基础。

1 材料

丹参药材采自我国 12 个省市 36 个居群, 由四川电子科技大学生命科学与技术学院张勇博士鉴定为丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge, 来源见表 1。

2 方法

2.1 四倍体白花丹参的人工诱变

收稿日期: 2011-05-16

作者简介: 李秀兰 (1957—), 女, 高级工程师, 研究方向为中国主要植物染色体及其应用研究。

Tel: (022)23508933 Fax: (022)23508800 E-mail: lixl401@nankai.edu.cn

*通讯作者 陈 力 Tel: (022)23500208 E-mail: lichen16@eyou.com

表 1 丹参的来源

Table 1 Sources of *S. miltiorrhiza* in China

编 号	采集地	编 号	采集地	编 号	采集地
1	陕西运城 (中条山 1 号)	13	山东西营 野生	25	江苏射阳 野生 (D 居群)
2	山西运城 半栽培	14	山东烟台 野生 (A 居群)	26	江苏射阳 野生 (E 居群)
3	山西运城 栽培	15	山东烟台 野生 (B 居群)	27	江苏射阳 野生 (F 居群)
4	陕西洛南 野生	16	浙江嵊州 野生 (A 居群)	28	安徽亳州 野生
5	陕西洛南 栽培	17	浙江王坛 野生	29	湖北蕪春 野生
6	陕西商洛 野生	18	浙江嵊州 野生 (B 居群)	30	湖北随州 野生
7	陕西天士力基地 栽培	19	浙江嵊州 野生 (C 居群)	31	四川中江 栽培
8	陕西山阳 野生	20	上海崇明岛 野生 (A 居群)	32	四川金堂 栽培
9	河南内乡 野生 (A 居群)	21	上海崇明岛 野生 (B 居群)	33	山东莱芜 野生
10	河南内乡 野生 (B 居群)	22	江苏射阳 野生 (A 居群)	34	天津蓟县 野生
11	河南方城 野生	23	江苏射阳 野生 (B 居群)	35	河北安国 栽培
12	河北迁西 野生	24	江苏射阳 野生 (C 居群)	36	河北行唐 栽培

采用未成熟的白花丹参种子, 在 $1/2$ MS+100mg/L 秋水仙碱的培养基中, 处理 92~96 h, 然后转入不含秋水仙碱的 $1/2$ MS 培养基中, 待生根成苗后移栽于土壤中, 并在移栽时按单株鉴定染色体倍性。具体方法参照参考文献^[18]。

2.2 染色体倍性鉴定

将根尖放在饱和对二氯苯水溶液中处理 3~4 h, 采用去壁低渗法制备染色体标本^[19]。丹参染色体基数 x 为 8, 在植株定植前进行染色体倍性鉴定, 二倍体 ($2x$)、三倍体 ($3x$)、四倍体 ($4x$) 见图 1。

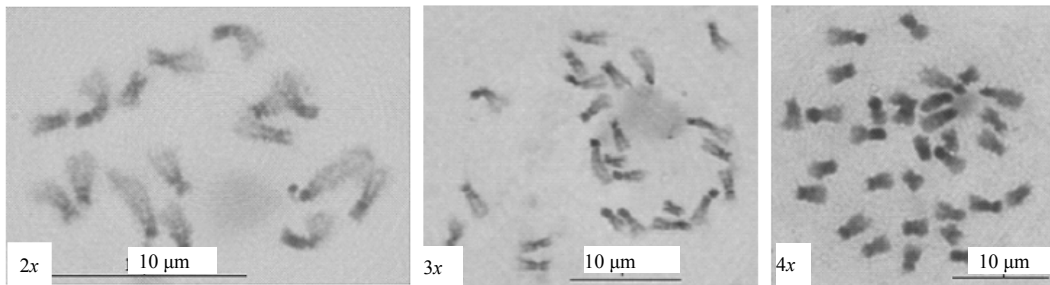


图 1 丹参染色体

Fig. 1 Chromosomes of *S. miltiorrhiza*

3 结果与分析

3.1 三倍体丹参的培育

在 6~7 月丹参盛花期进行人工杂交授粉, 母本提前 1~2 d 去雄套袋。杂交结果表明, 四倍体丹参与二倍体丹参正、反交 ($4x \times 2x$ 或 $2x \times 4x$) 结实率都很高, 正交共有 13 个杂交组合, 授粉花数 878 朵, 收获 732 粒种子; 反交共计 42 个杂交组合, 授粉花数 1 521 朵, 收获种子 1 196 粒, 播种后均能获得三倍体, 但三倍体种子成苗率较低, 正交获得

147 株, 反交得到 253 株, 正、反交出苗率分别只有 20.0% 和 21.1%。

3.2 三倍体丹参性状分析

三倍体丹参主要形态性状介于二倍体与四倍体丹参之间, 具体见表 2。三倍体丹参的叶片、花、花粉与二倍体和四倍体的外观比较见图 2~4。

3.3 三倍体丹参杂种优势分析

3.3.1 三倍体丹参杂种优势表现 田间观察发现, 三倍体丹参地上部分 (茎、叶) 均比二倍体丹参对

表 2 二倍体、三倍体、四倍体丹参主要形态性状比较

Table 2 Morphological comparison on main character of *S. miltiorrhiza* for diploids, triploids, and tetraploids

倍 性	株 高 / cm	冠 幅 / cm	茎 粗 / mm	叶面积 / cm ²	花序长 / mm	花序数	花数	花色	花大小 / mm ²
二倍体	40	65	5	30	65	18	35	白	759
三倍体(正交)	40	70	6	72	50	20	30	白	962
三倍体(反交)	40	60	6	56	40	15	33	紫	962
四倍体	45	70	7	72	60	20	35	白	1073

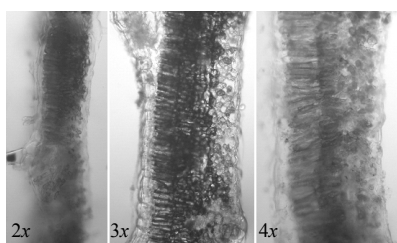


图 2 2x、3x、4x 丹参叶片横切比较
Fig. 2 Comparison on cross-section of *S. miltiorrhiza* leaves for diploids, triploids, and tetraploids

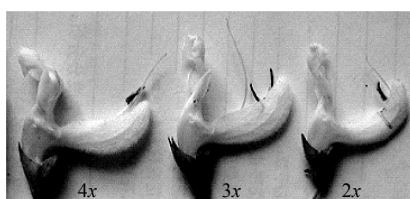


图 3 2x、3x、4x 丹参花的比较
Fig. 3 Comparison on flowers of *S. miltiorrhiza* for diploids, triploids, and tetraploids

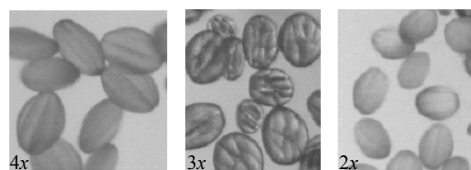


图 4 2x、3x、4x 丹参花粉比较
Fig. 4 Comparison on pollen of *S. miltiorrhiza* for diploids, triploids, and tetraploids

照增加 1~1.5 倍，地下部分（芦头、根）比二倍体丹参增加 2 倍以上。进一步分析结果显示，三倍体丹参在侧根数目、根长、根粗、根质量，增加量不一致，根长与根粗变化不明显，三倍体丹参主要表现在侧根数目的增加上。从表 3 可以看出，侧根数目三倍体比二倍体增加 94.23%，比四倍体增加 24.44%；根鲜质量三倍体比二倍体增加 215.33%，比四倍体增加 65.89%。

3.3.2 三倍体丹参杂种优势影响因素 结果分析表明，三倍体丹参杂种优势与杂交亲本选配有密切关系，应尽量选择地理远缘的丹参作为三倍体丹参杂交亲本（表 4）。以下 3 条途径与三倍体丹参杂种

表 3 二倍体、三倍体、四倍体丹参根系的性状分析

Table 3 Characteristic analysis on roots for diploids, triploids, and tetraploids of *S. miltiorrhiza*

倍 性	统计株数	侧根数目	根长 / cm	根粗 / mm	根鲜质量 / (g·株 ⁻¹)
二倍体	23	12.66	36.66	12.33	169.00
三倍体	130	24.59	39.72	8.18	532.92
四倍体	79	19.76	36.17	10.14	321.23

表 4 四倍体与二倍体正、反交所得三倍体丹参杂种优势差异

Table 4 Difference of *S. miltiorrhiza* heterosis in triploids by direct-reciprocal cross of diploids and tetraploids

组 合	根条数	根长 / cm	根粗 / mm	根鲜质量 / g
白花 2x♀ × 白花 4x♂	27.5	27.5	7.50	390
白花 4x♀ × 白花 2x♂	27.5	37.8	7.85	474
紫花 2x♀ × 白花 4x♂	25.2	34.2	10.80	455
白花 4x♀ × 紫花 2x♂	27.0	44.0	8.75	937

优势形成密切相关：①以四倍体为母本，二倍体为父本三倍体杂种优势高于其反交，即 $4x♀ \times 2x♂ \geq 2x♀ \times 4x♂$ ；②白花 × 紫花或紫花 × 白花高于白花 × 白花；③双交种 $\geq$ 三交种 $\geq$ 单交种。

3.3.3 三倍体丹参主要活性成分测定 本试验中，丹参主要活性成分测定均按照《中国药典》方法^[1]测定。共检测了 53 份丹参样品中的丹参酮 II_A、丹酚酸 B、丹参酮 I、隐丹参酮的量。其中二倍体丹参 9 份，四倍体丹参 9 份，三倍体丹参 43 份。检测结果显示，有 30 份三倍体中丹参酮 II_A 超过《中国药

典》2010 年版规定的水平，其中有 9 份超过 0.20%，为 0.30%~0.40%；43 份三倍体中丹酚酸 B 全部超过 3.0%的规定，其中超过 6%的有 28 份（表 5）。结果表明，三倍体丹参根部产量与活性成分量不存在负相关，即主要活性成分量并没有因为三倍体丹参根部产量提高而降低。

3.3.4 三倍体丹参新品系的选育 经过三代选育，从 55 个杂交组合、154 个株系的后代中选出了 12 个根部产量与主要活性成分量都较高的三倍体丹参新品系（表 6）。从 3 年田间长势和药材产量、有效

表 5 二倍体、三倍体、四倍体丹参中主要活性成分的量

Table 5 Contents of primary active components for diploids, triploids, and tetraploids of *S. miltiorrhiza*

倍 性	丹酚酸 B / (mg·g ⁻¹)	隐丹参酮 / (mg·g ⁻¹)	丹参酮 I / (mg·g ⁻¹)	丹参酮 II _A / (mg·g ⁻¹)
二倍体	61.796	0.540	0.447	1.288
三倍体	66.741	0.962	0.481	2.457
四倍体	98.201	0.363	0.508	1.899

表 6 三倍体丹参新品系

Table 6 New triploid lines of *S. miltiorrhiza*

品 种	亲本组合	花 色	根条数	根长 / cm	根粗 / mm	根鲜质量 / (kg·株 ⁻¹)	质量分数 / (mg·g ⁻¹)		样本数
							丹参酮 II _A	丹酚酸 B	
1	23×白花 4x	紫花	37.75	51.25	21.25	2.004	3.925	89.604	4
2	4×白花 4x	紫花	34.67	47.17	16.33	1.505	4.202	73.157	6
3	9×白花 4x	紫花	50.25	57.50	13.50	1.812	6.389	62.992	4
4	白花 4x×33	白花	65.25	50.25	11.25	1.337	2.406	72.247	4
5	7×白花 4x	紫花	39.00	52.00	19.33	1.367	4.266	48.264	3
6	21×白花 4x	紫花	35.00	58.50	16.00	1.450	2.746	62.183	2
7	12×白花 4x	紫花	66.50	53.00	12.50	2.050	1.983	57.495	2
8	10×白花 4x	紫花	78.00	44.33	14.33	1.942	2.644	74.653	3
9	5×白花 4x	紫花	48.60	58.80	15.80	1.933	3.787	64.171	5
10	白花 4x×紫花 2x	紫花	68.00	46.60	13.80	1.892	2.885	63.272	5
11	白花 4x×紫花 2x	紫花	52.40	53.00	18.20	2.420	2.476	73.415	5
12	白花 4x×紫花 2x	紫花	42.50	48.50	16.50	1.826	2.574	59.272	4

成分分析来看, 来源于自然杂交选育的 10、11、12 号 3 个三倍体丹参新品系都优于人工杂交组合后代。依据丹参的生物学特点, 推测可选择自然杂交方法作为三倍体丹参杂交转育方法。

4 讨论

洪德元院士 1990 年提出, “基因组多倍化与杂交相结合对高等植物的进化起了重要影响”^[20]。本实验以丹参为材料, 对其中基因组三倍化的进化意义和应用价值进行了探讨。基因组三倍化在进化上虽然是个“死胡同”, 但它保持了种的稳定性, 使种性长期保持不变, 在进化上起了重要作用。形成三倍体后与其他物种在“空间”上形成了生殖隔离, 没有正常有性生殖过程, 不产生后代分离, 其杂交一代是“永久 F1”, 通过无性繁殖成为永久杂种, 使杂种优势“永久”地固定下来, 是当今杂种优势利用的最佳途径之一。因此, 有人提出“通过同源三倍体固定水稻杂种优势”的设想^[21]。同时, 因为基因组三倍化是杂交起源的, 由 4x♀×2x♂或 2x♀×4x♂→3x, 在自然界多数 3x 是由 2n 配子杂交产生的, 所以, 三倍体具有由杂交产生的杂种优势, 同时, 三倍体虽然是多倍体中倍数最低的多倍体, 但它具有多倍体所有属性, 因此, 基因组三倍化具有

自然界目前唯一知道的两大优势, 即杂种优势和多倍体优势, 其优势表现出巨大性和不可替代性, 在非粮食作物生产上具有重要应用价值。据估计, 约有 70% 的中药是以植物的根、茎、叶为药材的, 其中一部分具有兼性繁殖特性, 因此, 基因组三倍化优势在药用植物上可以得到充分利用。

基因组三倍化是进化成高级阶元六倍体的桥梁, 特别是涉及一些异源双二倍体的种属, 三倍化是不可缺少的, 这已在很多具有 2x、4x、6x 倍性的科、属中得到证实。在自然界中, 六倍体常常是一个更具生命力的种群, 占居着更多的新生领地。如普通小麦 (2n=6x=42), 毛竹 (2n=6x=48), 芦苇 (2n=6x=48), 荷花玉兰 (2n=6x=114), 三脉紫菀 (2n=6x=54), 多数栽培菊 (2n=6x=54) 都是六倍体, 它们在大自然中都具有极强的生活力, 分布很广泛。六倍体之所以具有更强的优势和生命力, 是因为它起源于具有多倍体和杂交种双重优势的三倍体。因此, 基因组三倍化优势利用, 不仅仅限于基因组三倍化本身, 还应当看到它的深层意义, 它是进化成更具生命力的六倍体的唯一桥梁。因此, 从这种理念出发, 不要把基因组三倍化视为最终目的, 而应当把基因组三倍化作为一种手段, 一种育

种途径,会有更大的应用空间。现在多数栽培作物,如水稻、大豆、玉米、谷子、高粱等都是二倍体,通过基因组三倍化,在固定杂种优势的基础上,探讨六倍体育种,可能更具发展空间。

致谢:药材鉴定、药物成分分析得到了四川电子科技大学生命科学与技术学院张勇博士的大力帮助。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 宋经元. 丹参 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2001.
- [3] 刘德茂, 史德胜. 双丹口服液丹酚酸 B 和丹参素稳定性研究 [J]. 现代药物与临床, 2009, 24(2): 102-104.
- [4] 杨新杰, 万德光, 林贵兵, 等. 丹参脂溶性成分的地域分布特点分析 [J]. 中草药, 2010, 41(5): 809-812.
- [5] 蓝天凤, 于宗渊, 王岱杰, 等. 硅胶柱色谱结合高速逆流色谱法分离纯化丹参中丹参酮 [J]. 中草药, 2011, 42(3): 466-469.
- [6] 王庆浩, 陈爱华, 张伯礼. 丹参: 一种中药研究的模式生物 [J]. 中医药学报, 2009, 37(4): 1-3.
- [7] 韦辉, 刘素香, 李 毅, 等. 丹参药材的综合质量评价研究 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(5): 343-347.
- [8] 高山林. 提高中药材质量和产量的思路和实践 [J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2006, 8(1): 80-83.
- [9] 孙玉新, 郭亚勤, 吴慧贞, 等. 植物外源激素对丹参生长和丹参酮类物质积累的影响 [J]. 中草药, 2010, 41(5): 813-818.
- [10] 唐晓清, 王康才, 杨 杰, 等. 江苏优质栽培丹参新品种的选育 [J]. 江西农业学报, 2007, 19(4): 65-68.
- [11] 张红瑞, 李志敏, 高致明, 等. 丹参变异类型分析 [J]. 河南农业大学学报, 2007, 41(4): 421-424.
- [12] 宋振巧, 王建华, 王洪刚, 等. 丹参开花与繁育特性研究 [J]. 园艺学报, 2009, 36(6): 905-910.
- [13] 舒志明, 梁宗锁, 孙 群, 等. 丹参雄性不育系 Sh-B 的鉴定与花粉发育过程的解剖学研究 [J]. 西北植物学报, 2006, 26(11): 2202-2207.
- [14] 张兴国, 王义明, 罗国安, 等. 丹参品种资源特性的研究 [J]. 中草药, 2002, 33(8): 742-747.
- [15] Otto S P, Whitton J. Polyploid incidence and evolution [J]. *Ann Rev Genet*, 2000, 34: 401-437.
- [16] Adams K L, Wendel J F. Polyploidy and genome evolution in plants [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2005, 8: 135-141.
- [17] 肖培根. 新编中药志 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2002.
- [18] 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.
- [19] 陈瑞阳, 宋文芹, 李秀兰. 植物染色体标本制备的去壁、低渗法及其在细胞遗传学中的意义 [J]. 遗传学报, 1982, 9(2): 151-159.
- [20] 洪德元. 植物细胞分类学 [M]. 北京: 科学出版社, 1990.
- [21] 黄群策, 刘 峰, 向茂成, 等. 通过同源三倍体固定水稻杂种优势的新设想 [J]. 湘潭师范学院学报, 1995, 16(6): 61-63.