

四倍体平贝母的诱导及鉴定

隋博¹, 许媛¹, 马玉滨², 韩永忠², 孙春玉¹, 张美萍¹, 王义^{1*}

1. 吉林农业大学, 吉林 长春 130118

2. 吉林省参茸办公室, 吉林 长春 130021

摘要: 目的 运用组织培养技术诱导平贝母四倍体。方法 采用不同质量浓度(200、500、1 000、2 000 mg/L)秋水仙素和不同的诱导时间(12~72 h)处理平贝母愈伤组织。结果 离体培养条件下, 平贝母激素自养型培养材料在秋水仙素诱导下得到四倍体, 四倍体染色体 $4n=44$, 四倍体植株出现明显的多倍体特征。结论 500 mg/L 秋水仙素处理 24 h 为最佳组合, 可以诱导四倍体平贝母以平贝母子球做鉴定材料, 获得较好的结果。

关键词: 平贝母; 四倍体; 秋水仙素; 组织培养; 愈伤组织

中图分类号: R282.21 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2012)06-1178-04

Induction and identification of *Fritillaria ussuriensis* tetraploid

SUI Bo¹, XU Yuan¹, MA Yu-bin², HAN Yong-zhong², SUN Chun-yu¹, ZHANG Mei-ping¹, WANG Yi¹

1. Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

2. Ginseng and Velvet Office in Jilin Province, Changchun 130021, China

Abstract: Objective To induce the tetraploid of *Fritillaria ussuriensis* via tissue culture. **Methods** *F. ussuriensis* calli were treated with colchicine at different concentration and time periods. **Results** Tetraploid was obtained by *F. ussuriensis* hormone autotrophic cultural material induced by colchicine *in vitro*. The chromosome number of tetraploid was $4n = 44$. **Conclusion** The best combination is 500 mg/L colchicine treated for 24 h and better result is obtained by using the bulb of *F. ussuriensis* as testing materials.

Key words: *Fritillaria ussuriensis* Maxim.; tetraploid; colchicine; tissue culture; callus

平贝母 *Fritillaria ussuriensis* Maxim. 为百合科植物, 以其干燥鳞茎入药, 药材名平贝母, 又名平贝, 为《中国药典》2010年版收载品种, 具有清热润肺、化痰止咳的功效。但由于平贝母分布范围较狭窄、加之不断采挖, 野生植株逐渐减少, 在栽培平贝母的过程中种子繁殖育种年限较长, 品种退化严重, 染病率高, 品质及产量急剧下降。同时贝母属植物又多生高寒地带, 生长期短, 产量低, 鳞茎繁殖系数又低, 保藏不易, 田间管理费时, 造成高成本低效益^[1-2]。

近些年有学者对一些植物的组织培养进行了研究^[3-5], 并取得了相应的成果, 但针对品种退化、染病率高等方面研究甚少。据报道多倍体植物由于染色体加倍, 根、茎、叶的产量较高, 能较好地满足

药材生产的要求; 另一方面, 植物染色体倍性的变化也会导致次生代谢产物量的变化, 从而获得有效成分量高的药用植物^[6-7], 形成具有较强生态适应性和抗逆性品种。因此研究多倍体育种是解决植物育种和提高抗病率的一种有效手段^[8]。本研究旨在寻找稳定合理诱导多倍体平贝母的方法和条件, 为进一步研究平贝母种质资源和平贝母有效成分提供一定的科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试无菌平贝母激素自养型愈伤组织由吉林农业大学生命科学学院细胞工程实验室培养, 材料取自吉林农业大学生命科学学院标本园, 经吉林农业大学王义教授鉴定为 2~4 年生平贝母 *Fritillaria*

收稿日期: 2012-01-16

基金项目: 吉林省财政厅项目; 长春净月开发区项目 (2009c005)

作者简介: 隋博 (1986—), 男, 在读硕士, 研究方向为重要农艺性状基因的分离、功能鉴定及品种改良。

Tel: 13844865413 E-mail: suibo134@126.com

*通讯作者 王义 Tel: (0431)84533184 E-mail: wanglaoshi2007@tom.com

ussuriensis Maxim. 的顶芽、茎和叶。

1.2 方法

1.2.1 多倍体诱导 采用浸泡法将秋水仙素配成 200、500、1 000、2 000 mg/L 的溶液,将激素自养型愈伤组织切成小块,在上述溶液中浸泡 12、24、36、48、60、72 h 后取出,无菌水冲洗 3 次,转入不含秋水仙碱的 MS 培养基进行培养,3 次平行试验,统计存活率、诱导率及变异率,取平均值。

1.2.2 染色体观察 染色体观察参照陈瑞阳等^[9]的方法,将材料放置在饱和对二氯苯水溶液中,常温避光浸泡 5~7 h 预处理;把处理过的平贝母类子球转入 0.075 mol/L KCl 中,前低渗 1~1.5 h;再将平贝母类子球用蒸馏水经卡诺固定液(乙醇-冰醋酸 3:1)固定 4~24 h,再依次用 95%、85%乙醇固定 10~30 min 后转入 70%乙醇备用;取平贝母类子球放在 0.25%纤维素酶+0.25%果胶酶中,25~28 ℃ 酶解 12~15 h;吸去酶液,用双蒸水低渗 0.5~1 h;吸去双蒸水,注入卡诺固定液再固定 0.5~1 h,取平贝母类子球均匀涂布在载玻片上,然后在酒精灯火焰上烘干加 Giemsa 染液染色 1~2 h;用蒸馏水把染液反复冲洗干净,室温晾干后进行镜检。利用

Nikon Eclipse TS100 倒置显微镜镜检、拍照。采用 Photoshop 7.0 进行照片处理,随机统计 200 个以上分裂相细胞,统计其中的二倍体与四倍体细胞染色体数目。

1.2.3 叶片气孔特征观察 将出芽的平贝母对照二倍体与四倍体,培养 20 d,选取茎长 1.5 cm 的再生植株叶片尖部 0.5 cm,各 5~10 片。清洗后撕取表皮置于载玻片上,加盖玻片,随机选取 20 个视野,进行气孔的密度、大小,细胞长度和宽度的测定。

1.2.4 形态学鉴定 取平贝母对照二倍体和四倍体再生植株出芽 20 d,叶长 1.5 cm 的对照和诱变处理材料进行形态学鉴定,考察鳞茎大小、茎粗、根粗。

2 结果与分析

2.1 多倍体诱导

不同质量浓度激素和不同浸泡时间处理后平贝母进行系统统计,500 mg/L 秋水仙素浸泡 24 h 对四倍体平贝母的诱导率最高,达到 18.18%,各处理结果见表 1。

秋水仙素溶液浸泡处理法得到一定比率的平贝母多倍体和四倍体,多倍体出现的频率随处理浓度的升高和处理时间的延长先增加后降低。经 SPSS17.0

表 1 不同质量浓度秋水仙素浸泡法处理结果

Table 1 Results of samples soaked by colchicine at different concentration

秋水仙素/(mg·L ⁻¹)	时间/h	处理愈伤组织/个	存活数/个	存活率/%	变异数/个	变异率/%	4n/个	4n 诱导率/%
200	12	43	19	44.18	11	25.58	4	9.30
	24	42	26	61.90	12	28.57	3	7.14
	36	46	19	41.30	10	21.73	2	4.34
	48	46	25	54.34	15	32.60	1	2.17
	60	43	34	79.07	17	39.53	2	4.65
	72	46	39	84.78	15	32.60	3	6.52
500	12	44	36	81.81	20	45.45	2	4.54
	24	44	29	65.91	13	29.54	8	18.18
	36	46	34	73.91	17	36.95	5	10.86
	48	45	38	84.44	11	24.44	3	6.67
	60	41	28	68.29	11	26.82	5	12.19
	72	39	34	87.18	13	33.33	1	2.56
1 000	12	46	38	82.60	10	21.73	1	2.17
	24	42	31	73.80	8	19.04	2	4.76
	36	46	33	71.74	13	28.26	4	8.69
	48	40	30	75.00	9	22.50	3	7.50
	60	41	32	78.04	7	17.07	1	2.43
	72	47	31	65.95	9	19.14	0	0.00
2 000	12	46	28	60.86	7	15.21	1	2.17
	24	47	26	55.31	5	10.63	1	2.12
	36	50	43	86.00	9	18.00	2	0.00
	48	38	19	50.00	3	7.90	1	2.63
	60	42	28	66.66	2	4.76	0	0.00
	72	41	26	63.41	2	4.80	0	0.00

分析数据得出, 质量浓度与存活率、变异率和诱导率均有极显著的相关性, 浓度对诱导率有极显著作用, 当达到 500 mg/L 时诱导率表现为极显著。但时间的显著性不是很明显, 根据结果, 确定 24 h 为最适诱导时间。

2.2 染色体鉴定

经染色体鉴定结果表明, 用秋水仙素处理后的平贝母愈伤组织均能得到一定量的多倍体。统计了 300 个可准确计数二倍体染色体的有丝分裂中期细胞, 染色体数目为 22 的细胞为 265 个, 占观察细胞的 88.3%。平贝母二倍体细胞的染色体数为 $2n=2x=22$ (图 1), 平贝母四倍体细胞染色体数为 $2n=4x=44$ 。经加倍诱导后形成的变异植株染色体数目为原二倍体的 2 倍, 即为同源四倍体。

2.3 叶片气孔特征

取平贝母对照二倍体和四倍体再生植株出芽 20 d, 叶长 1.5 cm 的叶片尖部 0.5 cm 观察叶片中的气孔保卫细胞发现, 四倍体的气孔密度明显小于二倍体, 但是保卫细胞的面积有显著的增加 (图 2、3), 四倍体的叶绿素明显增多。

分析显示, 经过秋水仙素诱导的四倍体材料, 气孔保卫细胞的面积有显著增加 (图 3), 二倍体平均为 $1\ 036.8\ \mu\text{m}^2$, 四倍体平均 $1\ 670.4\ \mu\text{m}^2$, 四倍体保卫细胞的面积是 1.61 倍。气孔密度也有显著不同, 二倍体每个视野中平均有 8 个气孔, 但是四倍体平

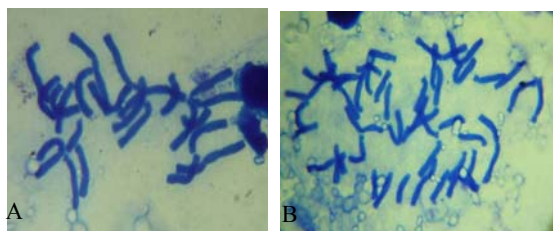


图 1 平贝母二倍体 (A) 和四倍体 (B) 染色体
Fig. 1 Chromosome in diploid (A) and tetraploid (B) of *F. ussuriensis*

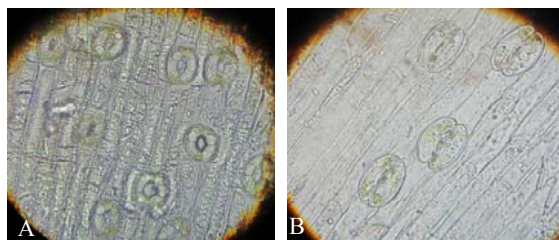


图 2 二倍体 (A) 与四倍体 (B) 气孔密度比较
Fig. 2 Comparison on stomatal density of diploid (A) and tetraploid (B)

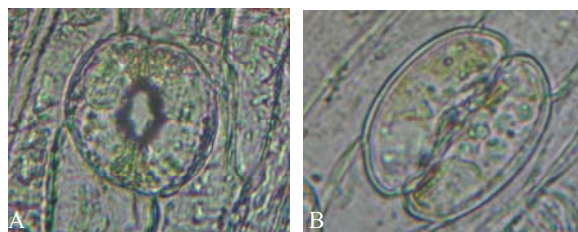


图 3 二倍体 (A) 与四倍体 (B) 气孔大小比较
Fig. 3 Comparison on stomatal size of diploid (A) and tetraploid (B)

均仅仅有 4.3 个气孔, 显示多倍体特性。

2.4 形态学比较

选取继代两年以上, 出芽 20 d, 茎长 1.5 cm 的经诱导的平贝母二倍体与四倍体再生植株进行形态学比较。平贝母四倍体出现明显的多倍体特征, 见图 4, 较二倍体对照, 叶片变大变厚、茎粗加粗、根系加粗。

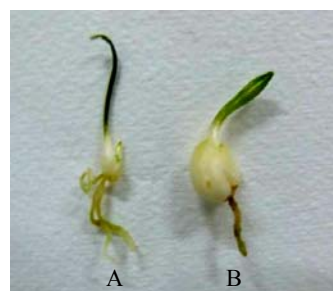


图 4 二倍体 (A) 与四倍体 (B) 植株比较
Fig. 4 Comparison on plantlets of diploid (A) and tetraploid (B)

3 讨论

随着多倍体的发展, 近年来在许多药用植物的诱导获得多倍体的研究中, 多采用种子^[10-12]、丛生芽^[13]、不定芽^[14]、试管苗^[15]或者其部分组织^[16]作为处理材料, 诱导率普遍为 30% 左右, 且死亡率较大。本实验使用激素自养型培养材料通过不同质量浓度秋水仙素和处理时间诱导得到了一定数量多倍体材料, 存活率和诱导率较高, 经过离体培养诱导的多倍体, 能大规模快速地培养出多倍体培养材料和植株, 可用于生药材使用或者直接栽培的研究。同时植物在多倍化后一般都会呈现出植株的巨大型, 其内在的有效成分可能会跟着染色体的增加产生变化, 为研究多倍体平贝母的内在有效成分提供了一定的基础。分化出来的鳞茎通过染色体筛选、鉴定, 得到了四倍体植株。这在平贝母研究中为首次报道, 具有一定的理论和现实意义。

在本实验中, 用浸泡法处理平贝母的同时也并

行的进行了混培法诱导四倍体。但混培法诱导的四倍体嵌合体较多,诱导效果不是很理想,分析可能与接触和吸收秋水仙素的部位和时间有关。多倍体出现的频率随处理质量浓度的升高和处理时间的延长先增加后降低。以质量浓度 200 mg/L、处理 60 h 组合诱导产生的多倍体效果最好,但是嵌合体较多,四倍体诱导率较低;500 mg/L、处理时间 24 h 的效果最好,存活率、变异率较高,而且四倍体诱导率达到最高 18.18%。继续升高质量浓度和延长处理时间,加倍效果呈下降趋势,畸形材料增多。综上所述,除外植体生理状态等内在因素外,秋水仙素等外在因素作用更加显著,这与郑永强等^[17]报道相一致。秋水仙素的质量浓度和处理时间是影响染色体加倍的最重要的外在条件。培养基中添加不同质量浓度的秋水仙素和处理不同的时间对平贝母四倍体的诱导均有一定的效果,但其效果不如浸泡法处理的效果好。一般只有生长点的细胞受到秋水仙素的作用之后才能导致器官或植株加倍。浸泡过程中对于在不同处理条件下,多倍体的存活率、变异率均有不同程度的改变。过量的秋水仙素对平贝母有很强的毒害作用,在使用过程中要注意使用质量浓度和时间,才能较好地使秋水仙素作用于愈伤组织的胚性细胞分化出四倍体植株。

同时为准确鉴定平贝母的多倍体诱导率和四倍体材料,本实验对平贝母的细胞学技术进行了探讨与改进。相关报道中,染色体的观察一般使用根尖作为材料,本实验多倍体的诱导使用激素自养型培养材料,此材料根尖甚少,把培养材料表面的类子球作为压片材料,获得了分散度与染色较好的染色体图片。分析可能是因为平贝母子球为白色,没有多余的色素干扰,且生长旺盛,具有和根尖相似的性质,可作为供试材料,为以后培养材料的细胞学鉴定选材提供了一定参考。

参考文献

- [1] 朱四易. 中国贝母属植物研究 [M]. 西安: 西北大学出版社, 1995.
- [2] 王文杰. 贝母 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1990.
- [3] 张芳芳, 王 鹏, 姬丹丹, 等. 南方红豆杉愈伤组织培养条件的优化及紫杉醇积累的基因表达效应分析 [J]. 中草药, 2010, 41(12): 2058-2062.
- [4] 洪森荣, 尹明华. 知母组织培养的初步研究 [J]. 中草药, 2010, 41(11): 1886-1889.
- [5] 栗孟飞, 李 唯, 桃儿七组织培养体系的建立及鬼臼毒素的检测 [J]. 中草药, 2010, 41(8): 1366-1370.
- [6] 陈柏君, 高山林, 卞云云. 黄芩组织培养同源四倍体的诱导 [J]. 植物资源与环境学报, 2000, 9(1): 9-11.
- [7] 彭 锐, 张 明. 多倍体及其在中药材生产上的应用 [J]. 重庆中草药研究, 2000, 41(6): 14-15.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 王志安, 许复华. 诱导浙贝母多倍体的研究初报 [J]. 浙江农业大学学报, 1991, 17(1): 89-92.
- [12] 陈发棣, 蒋甲福, 房伟民. 秋水仙素诱导菊花脑多倍体的研究 [J]. 上海农业学报, 2002, 18(1): 46-50.
- [13] 程心旻, 高山林, 卞云云. 白术同源四倍体的诱导和鉴定及其与二倍体过氧化物酶的比较 [J]. 植物资源与环境学报, 2003, 12(1): 16-20.
- [14] 杜令阁, 候艳华, 常维春, 等. 平贝母花粉植株的诱导及无性系的建立 [J]. 遗传学报, 1986, 13(4): 262-265.
- [15] 吴 清, 向素琼, 闫 勇, 等. 金荞麦的离体快繁及同源四倍体的诱导 [J]. 西南农业大学学报, 2001, 23(2): 108-110.
- [16] Gmitter F G, Ling X B, Deng X X. Induction of triploid citrus plants from endosperm calli *in vitro* [J]. *Theor Appl Genet*, 1990, 80(6): 785.
- [17] 郑永强, 徐 坤. 秋水仙素在植物体细胞染色体加倍中的应用研究进展 [J]. 中国农学通报, 2003, 19(5): 89-91.