

秋水仙素诱导新疆一枝蒿多倍体

唐晓义^{1,2}, 王晓军^{1,*}, 郝秀英³, 刘敏¹, 康喜亮¹, 波拉提¹, 徐琴¹

¹中国科学院新疆理化技术研究所, 乌鲁木齐 830011; ²中国科学院研究生院, 北京 100049; ³新疆农业科学院微生物应用研究所, 乌鲁木齐 830091

摘要: 以茎段浸泡法和培养基培养法诱导新疆一枝蒿多倍体的结果表明, 茎段浸泡法的诱导效果比较好, 其中以0.2%秋水仙素浸泡茎段1 d的处理效果最好, 多倍体诱导率达27.3%。

关键词: 秋水仙素; 新疆一枝蒿; 多倍体

Polyploid Induction of *Artemisia rupestris* L. by Colchicine

TANG Xiao-Yi^{1,2}, WANG Xiao-Jun^{1,*}, HAO Xiu-Ying³, LIU Min¹, KANG Xi-Liang¹, BO La-Ti¹, XU Qin¹

¹Xinjiang Technical Institute of Physics & Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Urumqi 830011, China; ²Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; ³Institute of Microbiology, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830091, China

Abstract: Polyploids were induced from *Artemisia rupestris* L. by two methods, soaking shoot segments in colchicine solution and adding colchicine in the culture medium, respectively. The results showed that the soaking-treatment increased the efficiency of polyploids induction than the other methods. As to method of soaking-treatment, the optimal condition of treatment was 0.2% colchicine for 1 d and the induction rate of polyploid reached 27.3%.

Key words: colchicine; *Artemisia rupestris* L.; polyploid

药用植物多倍体植株由于染色体的加倍, 通常具有较高含量的药用成分和器官增大等特点, 同时多倍体植株的生态适应性及对逆境的抗耐性增强。虽然多倍体植株普遍具有育性下降的特点, 这对于以收获籽粒为目的的农作物来说是个致命的缺点, 但对于全草类、根茎类、叶类和花类的中药植物来说影响不大。因此, 药用植物多倍体育种有广阔的应用前景(彭卫欣和谢晓良 2002)。新疆一枝蒿属菊科蒿属, 新疆维吾尔族人民常用药材, 多年生, 高20~50 cm, 气味芳香, 味微苦。药用全草, 具有活血、抗过敏、清热解毒、消食健胃、镇静镇吐等功能, 主要用于治疗各种感冒、急慢性扁桃体炎、荨麻疹、消化不良、胃疼胃胀、跌打红肿、慢性肾炎和钩端螺旋体病等, 对感冒和肝炎的疗效更为显著(尹林克 2006)。为适应生产的需要, 我们在离体条件下进行新疆一枝蒿的多倍体诱导, 以期提高新疆一枝蒿的品质。

材料与方法

新疆一枝蒿(*Artemisia rupestris* L.)由新疆西域

药业有限公司新疆一枝蒿生产基地提供, 为当地大面积栽培的优质品种之一。

切除新疆一枝蒿无菌苗的叶片和根, 剩下的茎段切成约1.5 cm长度, 接种到新疆一枝蒿的芽增殖培养基(MS+6-BA 1 mg·L⁻¹+NAA 0.05 mg·L⁻¹)上启动侧芽的萌发(唐晓义等 2008)。培养温度为23~25 ℃, 光照强度为40 μmol·m⁻²·s⁻¹, 光照时间为16 h·d⁻¹, 3~5 d后接种的茎段外植体侧芽部位可见绿色的点状突起。

多倍体诱导采用茎段浸泡法和培养基培养法两种方法(表1)。前者是将已培养的3~5 d的茎段分别浸泡在经高压灭菌的浓度分别是0、0.05%、0.1%、0.2%秋水仙素水溶液中, 分别在转速为50 r·min⁻¹的摇床上震荡0.5、1、2、3 d; 后者是将已培养的3~5 d的茎段分别接种到含0、0.01%、0.02%、0.05%的经高压灭菌的秋水仙素的MS+6-

收稿 2008-10-13 修定 2008-10-28

资助 中国科学院西部行动项目。

* 通讯作者(E-mail: wangxj@ms.xjb.ac.cn; Tel: 0991-3838213)。

BA 1 mg·L⁻¹+NAA 0.05 mg·L⁻¹ 培养基中, 处理时间为 10、20、30 d。以上秋水仙素溶液均含 2% 二甲基亚砜(DMSO)。处理后, 茎段再用无菌水冲洗 3 次, 用于茎段浸泡法中的茎段接种在 MS+6-BA 1 mg·L⁻¹+NAA 0.05 mg·L⁻¹ 培养基上, 而用于培养基培养法中的茎段接种在 MS 培养基上, 分别培养 60 d 后将长大的侧芽切下, 转接到 MS 培养基中诱导生根。最初以叶片的大小、颜色与厚度作出多倍体的初步判断, 芽伸长至 2~3 cm 时, 切取茎尖检测染色体倍性, 生根后取根尖复检。

多倍体鉴定分以下 3 个方面。(1) 植株形态学观察。主要根据叶色、叶厚、茎粗壮、根粗等进行比较。(2) 染色体数目观察。切取再生植株幼嫩的根尖 4~6 mm 或茎尖; 于 4 条件下用 0.002 mol·L⁻¹ 的 8-羟基喹啉溶液预处理 4 h; 于 4 条件下用卡诺固定液(95%乙醇:冰醋酸体积比=3:1)固定 24 h; 弃去固定液, 根尖置于 60 ℃ 水浴锅中用 1 mol·L⁻¹ 的盐酸水解 9 min; 冲洗干净解离液, 用改良苯酚品红溶液染色 20 min; 压片, 以 Olympus 显微镜观察并拍照。(3) 观察叶片气孔。气孔大小和密

表 1 茎段浸泡法和培养基培养法中不同秋水仙素浓度和处理时间对外植体存活率、芽增殖率和多倍体诱导率的影响
Table 1 Effects of different concentrations of colchicine and different treatment duration on the survival rate of explants, multiplication rate of shoots and polyploids induction rate by soaking shoot segments in the methods of colchicine solution and adding colchicine in the culture medium

诱导方法	秋水仙素浓度 /%	处理时间 /d	外植体数 / 个	外植体存活数 / 个	增殖的芽数 / 个	多倍体数 ^a / 个	多倍体诱导率 ^b /%	
茎段浸泡法	0	0.5	11	8 (72.7) ^c	48 (4.4) ^d	0	0	
		1	10	9 (90.0)	43 (4.3)	0	0	
		2	10	10 (100.0)	42 (4.2)	0	0	
	0.05	3	11	8 (72.7)	46 (4.2)	0	0	
		0.5	10	8 (80.0)	25 (2.5)	0	0	
		1	12	7 (58.3)	21 (1.8)	1	4.8	
		2	10	4 (40.0)	17 (1.7)	1	5.9	
		3	10	3 (30.0)	1 (0.1)	0	0	
		0.1	10	6 (60.0)	22 (2.2)	2	9.1	
	0.2	1	13	7 (53.8)	18 (1.4)	1	5.6	
		2	10	5 (50.0)	13 (1.3)	1	7.7	
		3	10	3 (30.0)	9 (0.9)	0	0	
		0.5	11	5 (45.5)	15 (1.4)	3	20.0	
		1	10	4 (40.0)	11 (1.1)	3	27.3	
		2	10	4 (40.0)	6 (0.6)	1	16.7	
总数			169	93 (55.0)	345 (2.0)	13	3.8	
	培养基培养法	0	10	10	8 (80.0)	43 (4.3)	0	0
			20	10	8 (80.0)	33 (3.3)	0	0
30			10	10 (100.0)	28 (2.8)	0	0	
0.01		10	10	8 (80.0)	40 (4.0)	0	0	
		20	10	7 (70.0)	20 (2.0)	0	0	
		30	13	12 (92.3)	20 (1.5)	0	0	
0.02		10	10	10 (100.0)	30 (3.0)	0	0	
		20	10	7 (70.0)	19 (1.9)	1	5.3	
		30	12	12 (100.0)	19 (1.2)	0	0	
0.05	10	10	10 (100.0)	25 (2.5)	2	8.0		
	20	10	9 (90.0)	14 (1.4)	0	0		
	30	15	14 (93.3)	22 (1.5)	1	4.5		
总数			130	115 (88.5)	313 (2.4)	4	3.1	

^a 参照匡全等(2004)文中的方法, 凡检测的诱导苗根尖或茎尖分裂细胞中 1/2 或以上细胞为多倍体就认为该植株是多倍体; ^b 诱导率 = 多倍体数 / 增殖的芽数; ^c 括弧中的数据是外植体存活率(外植体存活数 / 外植体数); ^d 括弧中的数据是芽增殖率(增殖的芽数 / 外植体数)。

度的测量采用透明胶带法(陈佰鸿等 2004)。具体操作是:取同一位置和大小相近的二倍体和四倍体试管苗叶片,将叶片正面粘在胶带上,再将胶带对折过来平整地粘贴在叶片的背面。然后用手指对捏胶带,使胶带与叶片的两面充分粘着。将对折的胶带撕开,叶片的下表皮便粘贴在胶带上,再将带叶片下表皮的胶带沿表皮轮廓剪成3~5 mm×3~5 mm的矩形片,在载玻片上滴2滴蒸馏水,盖上盖玻片,压平后置于高倍显微镜下,用标定好的目镜测微尺测量气孔的长度和宽度。共测量100个气孔并随机统计20个视野里的气孔数量,数据用SPSS软件分析,结果以“平均数±标准误(SE)”表示。

结果与讨论

1 不同浓度秋水仙素和不同处理时间对新疆一枝蒿的诱导效应

从表1可以看出,秋水仙素浓度和处理时间对新疆一枝蒿茎段的存活率、芽增殖数和诱导率的影响有一定的差异。总的来说,在茎段浸泡法中,高浓度秋水仙素和长时间处理的外植体存活率下降,尤其是0.2%的秋水仙素浸3 d的处理在接种后60 d的外植体存活率仅为18.2%。在培养基培养法中,秋水仙素对外植体的毒害作用没有茎段浸泡法的剧烈,外植体的存活率在70%~100%。在茎段浸泡法和培养基培养法中,秋水仙素处理的芽增殖率都低于未用秋水仙素处理的,而且在相同浓度水平上,秋水仙素处理的芽增殖率基本上都随着处理时间的增加而呈降低趋势。显然外植体存活率和芽增殖率的下降均是由于秋水仙素的渗透作用影响到分生组织细胞的正常分裂而引起的。此外,茎段浸泡法的最高诱导率是在0.2%的秋水仙素处理茎段1 d,诱导率可达27.3%。在培养基培养法中,0.05%的秋水仙素处理茎段10 d可达最高诱导率,诱导率为8.0%。表明茎段浸泡法比培养基培养法诱导新疆一枝蒿多倍体效果更好,这可能是高浓度的秋水仙素溶液在摇床中与茎段接触更充分,进而更容易渗入到生长点的各层细胞,从而提高多倍体诱导率。

我们观察诱导得到的多倍体植株染色体的结果表明,一部分为四倍体($2n=4x=36$) (图1-b),多数为二倍体($2n=2x=18$) (图1-a) (Kawatani 和 Ohno

1964)和四倍体组成的混倍体。与二倍体植株(图2-a、c、e)相比,多倍体植株的叶片大而厚,叶色深绿,叶片上偶有皱缩,茎粗壮、节间距短和根粗

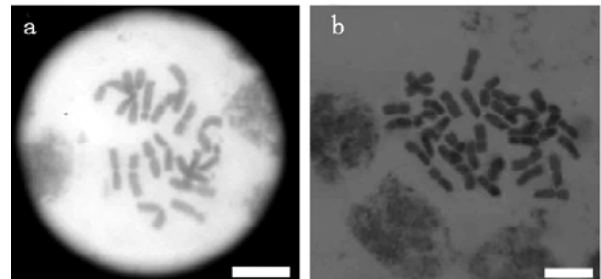


图1 新疆一枝蒿二倍体与四倍体的染色体数目(10×100)

Fig.1 The chromosome numbers in diploid and tetraploid *Artemisia rupestris* L. (10×100)

a: 二倍体染色体数目($2n=2x=18$); b: 四倍体染色体数目($2n=4x=36$)。图中的标尺长度均为5 μm。

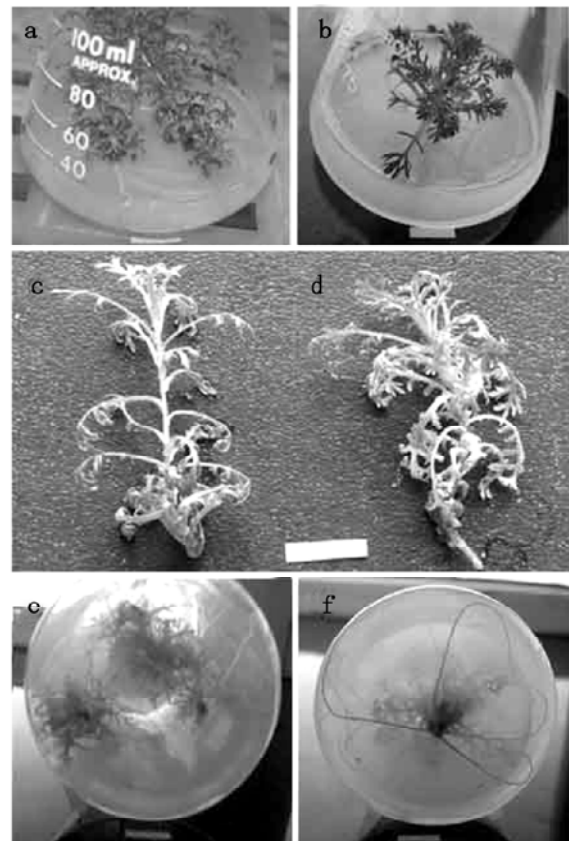


图2 二倍体与四倍体新疆一枝蒿的形态学比较

Fig.2 The morphology comparison between diploid and tetraploid *Artemisia rupestris* L.

a: 二倍体植株; b: 四倍体植株; c: 二倍体植株茎; d: 四倍体植株茎; e: 二倍体植株根; f: 四倍体植株根。图中的标尺长度均为1 cm。

(图2-b、d、f)。这与胡秀等(2004)在金鱼草、郑思乡等(2004)在东方百合和张志胜等(2007)在红掌上的研究结果一致。

2 二倍体与四倍体新疆一枝蒿叶片气孔特征比较

由茎段再生出的二倍体和四倍体植株的叶片气孔参数有显著差异性。总的来说,四倍体的叶片上气孔的长轴和短轴均显著大于二倍体的(表2、图3),四倍体的叶片气孔密度显著低于二倍体的(表2)。此外,分析气孔大小、气孔密度和倍性间的相关性的结果表明,气孔大小的增大可能直接和倍性水平的增加相关,二者间呈极显著的正相关,长轴和倍性间以及短轴和倍性间的相关系数分别为0.938和0.909。而气孔密度和倍性水平呈极显著的负相关,相关系数为-0.607,这显示气孔密度的下降可能是倍性水平的增加引起的。这与张志胜等(2007)在红掌、Yang等(2006)在葡萄(*Vitis vinifera* L.)、Carvalho等(2005)在胭脂树(*Bixa orellana* L.)、Thao等(2003)在海芋(*Alocasia*)、Kadota和

Niimi (2002)在日本梨栽培品种(*Pyrus pyrifolia* N. cv. Hosui)上的研究结果一致。在这些文献中气孔大小经常作为一个指标用于鉴定植物的倍性水平。Masterson (1994)曾指出如果倍性和气孔参数间的极显著相关性得到证实,这些气孔参数信息可作为倍性水平改变的一个强而有力的指标,说明通过检测气孔的大小和密度鉴定新疆一枝蒿多倍体是可行的。

参考文献

- 陈佰鸿, 李新生, 曹孜义, 姚庆荣(2004). 一种用透明胶带粘取叶片表皮观察气孔的方法. 植物生理学通讯, 40 (2): 215~218
- 胡秀, 郑思乡, 龚洵(2004). 离体培养条件下金鱼草四倍体切花的诱导及培育. 云南农业大学学报, 19 (5): 524~527, 561
- 匡全, 梁国鲁, 郭启高, 李晓林(2004). 秋水仙素诱导牛蒡多倍体. 植物生理学通讯, 40 (2): 157~158
- 彭卫欣, 谢晓亮(2002). 药用植物多倍体育种研究进展. 河北农业科学, 6 (3): 47~50
- 唐晓义, 王晓军, 康喜亮, 郝秀英, 刘敏(2008). 新疆一枝蒿的组织培养与快速繁殖. 植物生理学通讯, 44 (3): 523
- 尹林克(2006). 温带荒漠区药用植物资源及产业化栽培实践. 乌鲁木齐: 新疆科学技术出版社, 27
- 张志胜, 黎扬辉, 姜雷(2007). 红掌四倍体的离体诱导及其鉴定. 园艺学报, 34 (3): 729~734
- 郑思乡, 章海龙, 董志渊, 雷小云, 胡秀, 周丽娟(2004). 东方百合多倍体诱导及种球繁育的研究. 西南农业大学学报, 26 (3): 260~263
- Carvalho JFRP, Carvalho CR, Otoni WC (2005). *In vitro* induction of polyploidy in annatto (*Bixa orellana*). Plant Cell Tiss Org Cult, 80: 69~75
- Kadota M, Niimi Y (2002). *In vitro* induction of tetraploid plants from a diploid Japanese pear cultivar (*Pyrus pyrifolia* N. cv. Hosui). Plant Cell Rep, 21: 282~286
- Kawatani T, Ohno T (1964). Chromosome numbers in *Artemisia*. Bull Natl Inst Hygienic Sci, 82: 183~193
- Masterson J (1994). Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms. Science, 264: 421~423
- Thao NTP, Ureshino K, Miyajima I, Ozaki Y, Okubo H (2003). Induction of tetraploid in ornamental *Alocasia* through colchicine and oryzalin treatments. Plant Cell Tiss Org Cult, 72: 19~25
- Yang XM, Cao ZY, An LZ, Wang YM, Fang XW (2006). *In vitro* tetraploid induction via colchicine treatment from diploid somatic embryos in grapevine (*Vitis vinifera* L.). Euphytica, 152: 217~224

表2 由离体培养茎段再生的二倍体和四倍体植株的气孔特征

Table 2 Stomata characteristics of diploid and tetraploid plantlets regenerated from shoot segments *in vitro* culture

倍性	气孔长度/ μm	气孔宽度/ μm	气孔密度/个 $\cdot\text{mm}^{-2}$
二倍体	22.8 \pm 0.2 ^a	19.4 \pm 0.2 ^a	120.5 \pm 5.7 ^a
四倍体	34.7 \pm 0.2 ^b	29.6 \pm 0.2 ^b	84.3 \pm 4.8 ^b

a、b表示用Fisher检测的结果呈显著性差异;气孔密度(个 $\cdot\text{mm}^{-2}$)=各视野中气孔个数(个)/视野的真实面积(mm^2)。

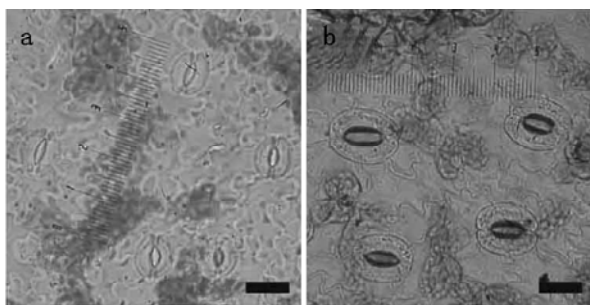


图3 新疆一枝蒿二倍体与四倍体的气孔比较(10 \times 40)

Fig.3 The comparison of stomata morphology between diploid and tetraploid *Artemisia rupestris* L. (10 \times 40)

a: 二倍体气孔; b: 四倍体气孔。图中的标尺长度均为25 μm 。