

# 丹参杂交育种及其异源四倍体的诱导与鉴定\*

刘竟飞, 高山林<sup>\*</sup>, 黄和平, 刘 利, 李晓瑜

(中国药科大学, 南京 210038)

**摘 要** 通过杂交育种技术对丹参的两个不同品种进行杂交, 得到的子一代试管苗经同工酶电泳分析, 根据亲本与子代之间农艺性状的差异, 鉴定得 h-1 等几个杂交种株系。并进行了杂交株系田间农艺性状观察比较及根部药材主要有效化学成分的 HPLC 测定。对杂交种 F1 代大量扩繁后, 采用秋水仙碱进行化学诱导异源多倍体, 并鉴定所得诱导株系。试验结果表明秋水仙素浓度为  $(10 \sim 15) \mu\text{g/g}$  是诱导多倍体的最适宜浓度, 并鉴定得到 hz4-3、hz4-11 等 7 个异源四倍体株系。为进一步选育异源多倍体优良品种奠定了基础。

**关键词** 丹参; 杂交; 同工酶电泳; 异源四倍体; 多倍体

中图分类号: Q567<sup>3+</sup>; Q7

文献标识码: A

文章编号: 1005-8915(2009)03-0260-05

丹参 (*Salvia Miltiorrhiza Bunge*) 又名紫丹参、赤参, 为唇型科鼠尾草属多年生草本植物, 药用其根及根茎。丹参性味苦, 微寒, 归心肝经, 具有祛瘀挛、止痛、活血通络与清心除烦之功效。临床上用于胸腹刺痛, 热痹疼痛, 疮疡肿痛, 心烦不眠, 月经不调, 经闭痛经; 肝脾肿大, 心绞痛<sup>[1]</sup>。临床疗效确切, 为常用重要中药材之一。许多治疗心血管疾病的中药配方和中成药, 丹参都是主要成分之一, 因此丹参的临床需求量巨大。

丹参的多倍体育种研究早有报道<sup>[2]</sup>。目前丹参药材的供应仍以人工种植为主, 主产区有山东、陕西、河南等省。市场上一般将山东丹参称为红丹参, 山东丹参是人工种植的丹参里最接近于野丹参的一个品种, 其有效化学成分含量也明显比紫丹参高, 但其农艺学外观性状、产量却不及人工种植的陕西等地的紫丹参品种, 陕西等地的紫丹参具有根茎粗大、生长快速等优势, 但其化学成分含量相对较低。有鉴于此, 作者实验室对这两种特点鲜明的丹参品种进行了杂交育种及其异源四倍体的诱导研究工作。以期研究和利用丹参不同类型品种的杂交优势, 同时探讨培育产量高, 化学成分高的异源四倍体新品种途径。

## 1 材料

丹参原材料分别取自陕西商洛孝义西北药材种苗站与山东沂蒙丹参基地, 经中国药科大学遗传

育种教研室鉴定为唇型科鼠尾草属草本植物丹参 (*Salvia Miltiorrhiza Bunge*)。

## 2 方法

### 2.1 丹参 F1 代杂交种的获得

2.1.1 亲本田间苗的建立 取原材料直径在 0.7 ~ 1 cm 粗、颜色紫红、无病虫害的丹参根作种根, 湿沙于温室 (16 ~ 20) °C 藏至翌春。早春 3 月左右, 将种根切成 5 ~ 8 cm 小段, 按行距株距深度 35 cm × 25 cm × 6 cm 的规格, 将切好的种根竖着放入穴中, 一穴一段, 尖端朝下, 覆土 2 cm。

2.1.2 丹参杂交 采用单交育种法, 以父本或母本的选择不同从而进行不同组合的正反杂交。在 6 ~ 7 月两者花期相遇时, 在母本花蕾未展开前即开花前 1 d, 用镊子轻轻地把母本的雄蕊去掉, 套上塑料薄膜隔离袋做好标记, 在开花的当天上午 8 ~ 11 时进行授粉, 并于第二天进行 2 次授粉。授粉后 8 d 左右揭除隔离袋; 待果实成熟期采摘小坚果, 洗净晾干。

2.1.3 子一代无菌材料的建立及扩繁 将得到的子一代种子以 1% 的升汞溶液消毒 15 ~ 20 min, 无菌水浸洗 3 次以上, 接入到 MS 培养基上, 于 (25 ± 1) °C, 光强 1 000 ~ 1 500 lx 条件下光照培养 1 个月获得无菌苗。繁殖试管苗的培养基为 MS + 0.4 mg/L 6-BA, 0.1 mg/L IAA, 30 g/L 蔗糖, pH 值为 5.8 ~ 6.0, 在恒温, 光照 16 h/d 条件下, 新继代繁殖的无菌苗在 10 ~ 15 d 后即长出丛生芽。

\* 收稿日期: 2008-09-24 修回日期: 2008-12-08

作者简介: 刘竟飞, 男, 1983 年生, 江西泰和人, 中国药科大学中药学院硕士研究生。

\* 通讯作者: 高山林, 教授, 主要从事药用植物的遗传育种研究, Tel: 025-85391288, E-mail: shlingao@163.com.

### 2.1.4 杂交子一代的过氧化物同工酶谱分析

2.1.4.1 仪器与试剂 北京一六仪器厂生产的 DDY III 型电泳仪, 台式高速离心机、微量进样器、芬兰可调移液器、染色液、Tris-甘氨酸缓冲液等。

2.1.4.2 方法 采用 2 个缓冲系统的双垂直板不连续 PAGE 凝胶电泳。取新鲜的 F1 代试管苗嫩叶作为材料。染色液成分为: 抗坏血酸 70.4 mg, 联苯胺溶液 (2 g 联苯胺溶液 18 ml 温热冰醋酸中, 再加入蒸馏水 72 ml) 20 ml, 0.6% (或 1.2%) 过氧化氢 20 ml, 蒸馏水 60 ml。分离胶浓度 7.5% (pH8.9) 浓缩胶浓度 3.0% (pH6.7), 分离胶缓冲液为 Tris-HCl (pH8.9), 浓缩胶缓冲液为 Tris-HCl (pH6.7), 电极缓冲液为 Tris-甘氨酸缓冲液 (pH8.3)。每孔点样量为 20  $\mu$ l 供试酶溶液。在 4 $^{\circ}$ C 冰箱内电泳 3~5 h; 电流 I 为浓缩胶 10~15 mA, 分离胶为 20~30 mA。

### 2.2 丹参异源多倍体的诱导与鉴定

2.2.1 化学诱导异源多倍体 将已鉴定为杂交种的 F1 代株系作为材料, 诱导多倍体的培养基为 MS, 添加 5, 15, 30, 45, 60  $\mu$ g/g 5 种不同浓度的秋水仙碱 25~35 d 后获得的愈伤组织切成 0.5 cm 直径团块接种到 MS+0.4 mg/L 6-BA, 0.1 mg/L IAA 的繁殖培养基上, 置于 (25 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C 下光照培养 1 个月。

2.2.2 生根培养 将试管苗从繁殖培养基上取出, 分成单株或单芽接种到生根培养基 (1/2MS+0.2 mg/L IBA+0.1 mg/L BA) 上 15 d 后即陆续长出幼根形成植株。

2.2.3 多倍体的鉴定 于 8:00~11:00 AM 切取丹参试管苗的嫩根尖<sup>[3]</sup>, 蒸馏水洗净, 用 0.2% 的秋水仙碱溶液在 25 $^{\circ}$ C 下浸泡 5 h 后, 在无水乙醇-冰醋酸 (3:1) 中冰箱固定过夜, 用蒸馏水洗 3 次, 60 $^{\circ}$ C 下以 0.2 mol/L 盐酸处理 25 min, 蒸馏水洗净并于其中低渗 60 min, 小心切取根尖, 置载玻片中央, 加改良苯酚品红染液一滴, 染色 60 min 后, 压片, 镜检采用奥林巴斯 BH-2 显微镜进行观察并采集图象, 并保存。

2.2.4 亲本与杂交株系间的农艺性状及主要化学成分含量的比较

2.2.4.1 仪器与试剂 超声波清洗器 (上海产 CQ-250), 安捷伦 1100 高效液相色谱仪, SPD-10A 紫外检测器; 甲醇为色谱纯 (江苏汉邦科技有限公司), 双重蒸馏水自制, 其他试剂均为分析纯, 对照

品丹参酮 II-A 购自中国药品生物制品检定所。

2.2.4.2 方法 化学成分的测定采用外标工作曲线法, 丹参酮 II-A 分离条件为: ODS (4.6 mm $\times$ 250 mm) 5  $\mu$ m 柱, 流动相为甲醇:水=75:25; 流速 1 ml/min, 检测波长为 270 nm; 以微量进样器精密吸取上述对照品溶液 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0  $\mu$ l, 分别进样测定, 经回归处理得浓度和峰面积的回归方程; 农艺性状主要考察植株高度, 茎粗, 根长, 根粗, 根干重等指标。

## 3 结果

### 3.1 杂交 F1 代和亲本的过氧化物同工酶谱分析结果

亲本陕西丹参 (dh) $\times$  山东丹参 (dz) 及其 F1 代在过氧化物同工酶图谱上共出现了 12 条酶带 (图 1), 标记为 10 个位段, 其中亲本 dh 与 dz 在酶带出现的位置上有明显差异, 表明两者间在遗传上存在的不同, 这也印证了这两丹参品种在品种特征上的差异。图谱显示在 H-1 酶带中我们可以清晰的见到在其父本中出现过的第 9 位置 2 条带, 而此 2 条带在母本 dz 中是不存在的, 很显然 h-1 得到了来自父本的基因, 由此可以判断 h-1 是由杂交所得到的 F1 代杂交种。同样可以看到的是 z-13、h-7、z-19 带型综合了双亲本 dh、dz 的谱带特征, 兼有两者的酶带, 这是典型的互补型杂交后代, 体现了同工酶共显性遗传特征。而 z-12、z-22 酶带所出现的位置与母本 dz 则几乎一致, 可以判断这两株系很可能是因为在杂交时去雄不净所产生的自交伪杂种。

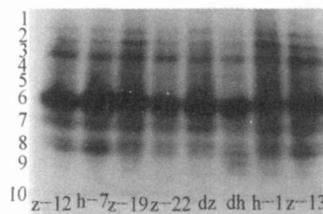


Fig 1 Detection of hybridization *Salvia Miltiorrhiza* Bunge by peroxydase isozyme electrophoresis

### 3.2 丹参异源四倍体诱导

不同浓度秋水仙碱对 F1 代杂交种丹参组织的诱导试验结果表明, 诱导丹参四倍体的适宜浓度为 (10~15)  $\mu$ g/g<sup>[4]</sup>, 在诱导得到的四倍体中, 有 57.1% 的四倍体 (株系 hz4-3、hz4-6、hz4-11、hz4-

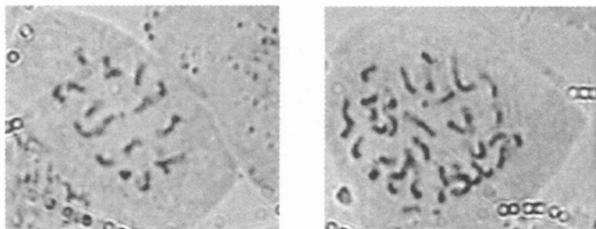
17)是在 15  $\mu\text{g/g}$  秋水仙碱的处理中获得的,因此将 15  $\mu\text{g/g}$  的秋水仙碱浓度确认为诱导丹参多倍体的最佳浓度。结果见表 1。

Tab 1 Experiments of inducing allotetraploid *in vitro*

No.	Colchicine concentration In medium ( $\times 10^6$ )	Number of Inoculated callus	Number of survived callus	Rate of Survived Callus (%)	Number of tetraploid	Inducing Ratio (%)
1	0	45	42	93.3	0	0
2	5	45	41	91.1	0	0
3	15	45	36	80	4	8.9
4	30	45	32	71.1	2	4.4
5	45	45	25	55.5	1	2.2
6	60	45	13	28.9	0	0

### 3.3 丹参异源四倍体的试管苗根尖染色体鉴定

将诱导所得各株系接于 1/2MS+0.2mg/L IBA+0.1mg/L BA 培养基上,在 25~35 d 后根长 0.3~0.6 cm 时切取根尖进行染色体鉴定,经 3 个继代次数<sup>[5]</sup>以上观察染色体均加倍的株系确认为四倍体株系(图 2),予以保留并接种于 MS+0.4 mg/L 6-BA, 0.1 mg/L IAA 基质上扩繁。鉴定得 hz4-20、hz4-27、hz4-31 等 7 个诱导株系连续 3 次以上观察染色体数均为  $2n=2x=28$ ,因此确定为四倍体。



Diploid plant;  $2n=2x=14(\times 1600)$  Tetraploid plant;  $2n=2x=28(\times 1600)$

Fig 2 Comparison of chromosome determination between diploid and tetraploid plantlet from *salvia miltiorrhiza* Bunge

Tab 2 The agronomic characteristics of control and hybridization plants of *Salvia miltiorrhiza*

Lines	Plant height	Growth potential	Stem diameter	Root branch	Root diameter	Root length
Control	43.6 $\pm$ 1.2	Normal	0.47 $\pm$ 0.03	4-10	1.3 $\pm$ 0.09	21.5 $\pm$ 1.2
dz	46.3 $\pm$ 3.2	Normal	0.43 $\pm$ 0.01	6-12	1.2 $\pm$ 1.10	22.8 $\pm$ 1.3
dh	43.9 $\pm$ 2.3	Strong	0.49 $\pm$ 0.02	5-9	1.3 $\pm$ 1.08	20.6 $\pm$ 1.5
h-1	51.0 $\pm$ 1.3	Strong	0.52 $\pm$ 0.03	8-12	1.4 $\pm$ 0.08	26.5 $\pm$ 2.2
h-7	45.7 $\pm$ 1.3	Normal	0.50 $\pm$ 0.01	7-11	1.3 $\pm$ 1.13	25.5 $\pm$ 1.2
z-13	53.7 $\pm$ 1.1	Strong	0.56 $\pm$ 0.03	9-15	1.5 $\pm$ 1.21	30.4 $\pm$ 2.1
z-19	50.5 $\pm$ 2.1	Strong	0.52 $\pm$ 0.01	8-14	1.5 $\pm$ 0.07	29.8 $\pm$ 1.1

The data of floral height(cm), root diameter(cm) and root length(cm) of per root was average of 20 random plot samples X SE

### 3.4 异源四倍体各株系试管苗初步考察

由统计结果转换成的直方图可以很直观的看出(图 3),诱导株系的生长率、芽繁殖倍数等指标大部分都高于对照二倍体 ck,与同源四倍体 d-94 相比则有较接近的数据浮动范围,体现了多倍体的特征。其中 hz4-17 在 3 个因素上均表现优异,在生长率、芽繁殖倍数方面甚至高于 d-94,这也预示着异源四倍体将会有着与同源四倍体同样优良的潜在品质,存在进一步选育的价值。

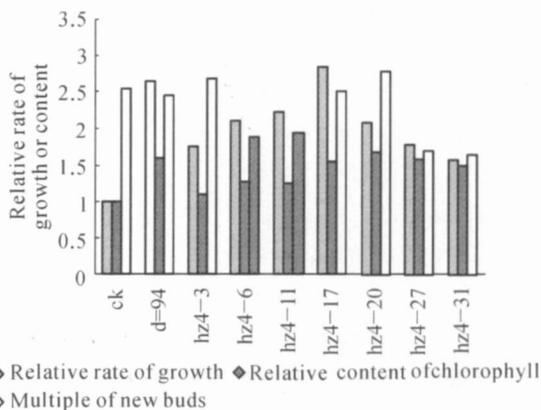


Fig 3 Comparison of the physiological index between the induced lines and the control of *Salvia miltiorrhiza* Bunge

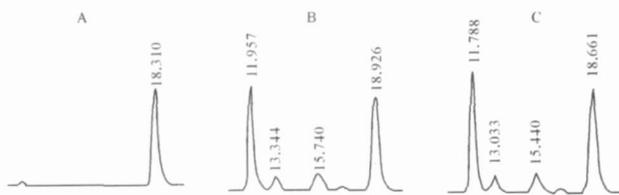
### 3.5 亲本与杂交株系间的农艺性状及主要化学成分含量的比较

农艺性状的考察为每株系随机选取 20 个样本,取其平均值;分别测定该株系的高度、茎粗、根长根重等指标,得到的结果与对照株系相比较(表 2),以判断杂交子一代的生物量及生长趋势。丹参主要有效成分的测定选择中国药典所规定的丹参酮 II-A 作为指标,以一年生的 F1 代干燥根作为材料进行分析,由高效测定的结果如表 3 及图 4 所示。

Tab 3 The content of tanshinoneII-A in hybridization lines and the control

Lines	Dry weight (g plant <sup>-1</sup> )	Content of TanshinoneII-A (%)	Yield of TanshinoneII-A (g plant <sup>-1</sup> )	Yield of TanshinoneII-A (%)
Control	95.56	0.1766	0.1599	100
dz	96.08	0.1589	0.1526	95.43
dh	87.80	0.2018	0.1771	110.75
h-1	110.50	0.1960	0.2156	134.83
h-7	99.48	0.2350	0.2327	146.96
z-13	127.51	0.1802	0.2216	138.58
z-19	85.42	0.1924	0.1635	102.25

The contents of tanshinoneII-A were based on the weight of dry root



(A) HPLC trace of TanshinoneII-A standards (retention time 18.31 min); (B) HPLC trace of control plant; (C) HPLC trace of TanshinoneII-A in hybridization line Z-13; the retention time 11.7 min or so in B and C is unknown compound

Fig 4 Detection of Tashinone II-A by HPLC

从上测定的结果可以看出,几个杂交株系在农艺性状及长势方面总体上与亲本间较接近,这主要是因为其继承了亲本的遗传且两者都同为二倍体植物,但同时可以看到的是杂交株系 z-13 各个指标表现都明显优异;表 3 同样显示出几个杂交株系所具有的特点,即特定株系的有效成分含量要明显高于对照,这也说明了通过杂交育种能产生杂交优势,从而选育出我们所需要的品种。综合生物量及有效成分含量的表现,杂交株系 z-13、h-1、z-19 存在进一步选育及实验室诱变的价值,为选育多倍体优良品种奠定了基础。

## 4 讨论

由于植物的生长需有一定的周期,尤其药用植物的生长期比较长,因此目前诱导得到的异源四倍体仅仅是在试管苗阶段的一些初步考察。虽然在这阶段初步可以看出诱导的 hz4-17 有较优异的表现和其他株系也相较于二倍体 ck 有普遍的优势,但仍然需要进一步在有效化学成分含量方面进行鉴定,同时对于诱导出的异源四倍体稳定性也需进一步的考察。

丹参异源四倍体的诱导是以已鉴定为杂交种的 F1 代作为材料,使来源不同的杂交种两条染色体得到加倍,从而达到试验预期的目的。另外两种得到异源四倍体的方法是细胞融合技术<sup>[6]</sup>与不同种同源四倍体之间的杂交,前者对试验条件要求苛刻,操作要求较微细;后者因为四倍体植物本身结实率很低,且需先将两者诱导成同源四倍体并移栽,因此这种方法工作量较大,而且成功率也较低。因此将丹参的异源杂交种进行秋水仙碱诱导是获得丹参异源四倍体的较优方法。

## 参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000: 57.
- [2] Gao S L, Zhu D N, Cai Z H, *et al.* Autotetraploid plants from colchicine-treated bud culture of *Salvia Miltiorrhiza* Bge[ J]. *Plant cell, Tissue and Organ culture*, 1996, 47: 73.
- [3] 艾建国, 高山林. 丹参同源四倍体的诱导、鉴定及有效成分的含量测定[ J]. *药物生物技术*, 2003, 10(6): 372.
- [4] 高山林, 徐德然, 蔡朝晖, 等. 丹参同源四倍体新物种的培育[ J]. *中国药科大学学报*, 1993, 23(4): 224.
- [5] Chen L L, Gao S L. In vitro tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploids in *Astragalus membranaceus* [ J]. *Scientia Horticulturae*, 2007, 112: 339.
- [6] 王国平. 原生质体融合技术在枣育种中的应用展望[ J]. *分子植物育种*, 2008, 6(3): 555.

# Allotetraploid Induction and Identification of *Salvia Miltiorrhiza* Bunge and Its Hybridization Breeding

LIU Jing-fei, GAO Shan-lin, HUANG He-ping, LIU Li, LI Xiao-yu

(China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China)

**Abstract** Two lines *Salvia Miltiorrhiza* Bunge which came from different provinces of China were hybridized by the hybridization breeding technique. The first generation was detected by peroxidase

isozyme electrophoresis and the difference agronomic character between the line parents and the first generation was analyzed. As a result, besides h-7, there are several lines which are real Hybridizations. Hybridization lines were selected according to agronomic characteristics and roots yields in fields of experimental plots. The dried roots of effective lines were used for the determination of effective chemical components by HPLC to evaluate the quality of crude drug. The first generation is treated which has been bred a great deal with colchicine to induce allotetraploid plant and then its induced lines were detected. The results indicated that the best content of colchicine to induce polyploidy plant is 10~15  $\mu\text{g/g}$ , and attained 7 allotetraploids which contain hz4-3, hz4-11. It laid the foundation for developing an excellent allopolyploidy plant.

**Key words** *Salvia Miltiorrhiza Bunge*, Hybridization, Isozyme electrophoresis, Allotetraploid, Polyploidy

## · 信 息 ·

**2009-062 重组菌产碱性果胶酯裂解酶学性质研究** 利用盐析-透析-色谱流程建立快速高效纯化工程菌 *E. coli* JM109(pH shPL) 所产碱性果胶酯裂解酶(PL)的方法, 纯化后酶达到电泳纯, 比酶活为 1079 U/mg。重组菌所产 PL 酶促反应适宜的 pH 为 9-10, 适宜温度为 50-66  $^{\circ}\text{C}$ , 与酶基因来源野生菌生产 PL 相比, 重组菌所产 PL 适宜 pH 范围有所扩大, 并保持了野生菌 PL 的热稳定性。

通过金属离子种类、浓度及存在时间对 PL 酶活力影响考察发现: 在考察的离子中除  $\text{Mg}^{2+}$  对酶活有较好的促进作用外, 其余对重组菌 PL 均有抑制作用, 其中  $\text{Fe}^{2+}$  对酶活力抑制作用最强。该酶的  $K_m$  值为 20.93 mg/L,  $V_{\text{max}}$  为 105-31  $\mu\text{mol/min}$ , 反应活化能  $E_a$  为 21.74 kJ/mol。

对重组菌所产 PL 热稳定动力学进行分析, 发现有底物情况下的失活常数( $0.02\text{min}^{-1}$ )小于无底物情况下的失活常数( $0.0342\text{min}^{-1}$ ), 说明当酶与底物结合形成复合物时对酶活具有保护作用。利用 HPLC-ESI-MS 对重组菌所产 PL 酶解产物进行测定发现, 产物含有不饱和二聚半乳糖醛酸(m/z350.82)和不饱和三聚半乳糖醛酸(m/z527.04), 同时测定结果中没有发现不饱和半乳糖醛酸单体(m/z175), 可以初步推测重组菌 PL 不能以不饱和二聚半乳糖醛酸和不饱和三聚半乳糖醛酸为底物进一步裂解。

**2009-063 龟裂链霉菌 *zwf2* 基因阻断提高土霉素生物合成** 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)是链霉菌磷酸戊糖途径中第一个酶(“看家”酶), 也是形成 NADPH 的关键酶, 由 *zwf1* 和 *zwf2* 基因编码。以温敏型质粒 pKC1139 为基础构建了用于阻断龟裂链霉菌 *zwf2* 的重组质粒 pKC1139-*zwf2'*, 通过大肠杆菌 GM 2929 去甲基化 pKC1139-*zwf2'* 后电转至原始龟裂链霉菌 M4018 感受态细胞, 筛选得到转化子。

转化子进一步通过 PCR 鉴定和点杂交印迹分析鉴定, 证明是 *zwf2* 基因阻断的阳性突变子命名为 M4018- $\Delta_{zwf2}$ 。以原始菌株为对照, 突变子摇瓶发酵结果表明: 突变子的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶酶活是原始菌的 50%左右, 但土霉素生物合成水平则提高了 27%; 在细胞生长方面, 二者均在第 4d 进入生长稳定期而开始大量合成土霉素, 发酵结束时细胞菌体浓度基本相同, 但突变子的单位菌丝体土霉素生物合成能力则提高了 31%。因此, *zwf2* 的阻断有利于土霉素的生物合成, 而对细胞生长没有明显影响。

**2009-064 应用 DNA 芯片技术研究体外表达禽致病性大肠杆菌可能致病基因** 应用 DNA 芯片研究禽致病性大肠杆菌可能致病基因的表达。构建禽致病性大肠杆菌毒力基因、潜在毒力基因的 DNA 芯片, 应用基因芯片技术对同属 O2 血清型的禽高致病性大肠杆菌 E058 株和低致病性大肠杆菌 E526 株在体外 LB 培养基和鸡血清培养状态下进行差异表达分析。

结果: 在体外 LB 静置培养状态下, 低致病株 E526 与高致病株 E058 相比共有 16 个差异基因, 均为下调基因。在鸡血清静置培养中, E526 与 E058 相比共有 15 个差异基因, 均为下调基因。应用基因芯片成功筛选了禽致病性大肠杆菌在体外不同条件下的毒力基因及可能毒力基因中差异表达基因, 表明一些铁摄取系统相关基因对 APEC 的毒力较重要, 同时也筛选出了一些新的可能致病基因 *aes-1*, *aes-2*, *aes-3*, *aes-4*, *aes-6*, *aes-8*, *aes-10*, *aes-13*, *aes-15*, *aes-31* 等。