

DOI:10.11937/bfyy.201520015

# 秋水仙素对七叶一枝花种子 多倍体诱导的影响

杨亚利, 刘佳, 张鹏, 宋发军, 余晓东, 王春台

(中南民族大学 生命科学学院, 生物技术国家民委重点实验室, 武陵山区特色资源植物种质保护与利用湖北省重点实验室,  
湖北 武汉 430074)

**摘要:**以七叶一枝花种子为试材,分别用浓度为0.025%、0.050%、0.100%、0.150%、0.200%的秋水仙素处理七叶一枝花种子12、24、48、60 h,研究不同浓度的秋水仙素及不同处理时间对七叶一枝花多倍体诱导的影响,以期为进一步选育七叶一枝花优良多倍体品种提供材料,为探索秋水仙素诱导七叶一枝花多倍体育种研究提供参考。结果表明:秋水仙处理的七叶一枝花根尖均有明显的膨大现象,其中浓度为0.050%秋水仙素处理12 h的根尖膨大率最高,为51.69%;秋水仙素处理的七叶一枝花种子的胚根短且粗、胚轴伸长;经秋水仙素处理种子萌发的组培苗植株较对照植株的根茎明显加粗、节间变短。采用流式细胞仪检测发现,秋水仙素处理样品的组培苗的幼根细胞DNA荧光强度约是对照细胞DNA荧光强度的1.88倍,表明经秋水仙素处理的七叶一枝花种子萌发的组培植株细胞染色体出现了部分加倍。

**关键词:**七叶一枝花;秋水仙素;多倍体

**中图分类号:**S 567.23<sup>+</sup>9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)20-0056-05

重楼属植物隶属于广义百合科,2005年版《中华人民共和国药典》收录了云南重楼和七叶一枝花2个种。七叶一枝花属多年生草本植物,干燥根茎入药,具有清热解毒、消肿止痛、凉肝定惊等功效,用于咽喉肿痛、毒蛇咬伤、跌扑伤痛、惊风抽搐等<sup>[1]</sup>,是著名中成药云南白药、季德胜蛇药片、宫血宁和热毒清等的重要成分<sup>[2]</sup>。目前,七叶一枝花市场需求量大,而野生资源匮乏,供求矛盾突出。七叶一枝花的人工栽培是解决其供需矛盾的有效途径,而七叶一枝花的倍体育种研究是获得其优良栽培品种的重要途径之一。

多倍体药用植物一般具有根、茎、叶和花果的巨型性,抗逆性强、药用成分含量高等特性<sup>[3-5]</sup>。因此,七叶一

枝花的倍体培育有望获得优质、高产的新品种。秋水仙碱是目前公认的最有效的多倍体诱导剂<sup>[6]</sup>。其作用机理是与微管蛋白单体结合,抑制微管的形成,进一步抑制纺锤体的形成,使染色单体分离受阻,形成同源多倍体<sup>[7]</sup>。目前,秋水仙素已在丹参<sup>[6]</sup>、杜仲<sup>[8]</sup>、黄芩<sup>[9]</sup>、草莓<sup>[10]</sup>、西瓜<sup>[11]</sup>等植物的多倍体诱变育种研究中得到了广泛的应用,但七叶一枝花多倍体育种工作尚鲜见报道。现采用不同浓度秋水仙素诱导处理七叶一枝花种子,分析秋水仙素对七叶一枝花种子不同处理时间的根尖诱导率、胚根的平均长度和直径,以及组培苗植株的株高、叶片长和宽,胚根长度及直径,并采用流式细胞仪检测了秋水仙素处理样品植株的加倍情况,以期为进一步选育七叶一枝花优良多倍体品种提供材料,为探索秋水仙素诱导七叶一枝花多倍体育种研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

2012年10月采自湖北恩施土家族苗族自治州巴东七叶芬芳中药材科技开发有限公司种植基地新鲜的七叶一枝花成熟果实,去掉果皮和外种皮后,将白色种子室温晾干,4℃保存备用<sup>[12]</sup>。

**第一作者简介:**杨亚利(1986-),女,硕士研究生,研究方向为应用生物技术。E-mail:yangyaliwo@126.com

**责任作者:**张鹏(1977-),男,博士,副教授,现主要从事药用植物及其内生菌等研究工作。E-mail:zhangpenghust@126.com

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(31370118);中南民族大学基本科研业务费专项资金资助项目(CZW15019);校企合作资助项目(HZY14024);中南民族大学大学生创新创业资助项目(GXX14205,GCX15006,SCX15004)。

**收稿日期:**2015-05-21

恒温培养箱(广东省医疗器械厂),高压灭菌锅(华粤企业集团有限公司),流式细胞仪(北京中科盟科技有限公司),激光共聚焦显微镜(日本 OLYMPUS 株式会社),超净工作台(上海苏净实业有限公司),根系扫描仪(上海中晶科技有限公司)。

秋水仙素、赤霉、碘化丙啶 PI 染色液(配制方法:PI 15 mg,枸橼酸钠 0.1 g,NP-40 0.3 mL,加蒸馏水定容至 100 mL,4℃避光保存)购自武汉楚诚正茂科技工程有限公司;6-苄基嘌呤(6-BA)、萘乙酸(NAA)购自上海拜力生物科技有限公司;酒精、升汞以及该研究所用的其它化学试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。1/2MS 培养液(将 MS 培养液稀释 1 倍配制而成)购自上海科兴贸易有限公司。细胞裂解液配制方法:15 g CTAB 溶于 600 mL ddH<sub>2</sub>O,加入 75 mL 1 mol/L Tris-HCl(pH 8.0),58.5 g NaCl,30 mL 0.5 mol/L EDTA,充分混匀后,定容至 1 000 mL。

## 1.2 试验方法

1.2.1 种子的秋水仙素处理 根据宋发军等<sup>[12]</sup>研究结果,采用赤霉素处理七叶一枝花种子 3 000 粒,将处理过的种子放在铺有 2 层滤纸的培养皿中(50 粒/皿),18~20℃培养箱中培养 90 d,待胚根突破种皮时,分别用浓度为 0.025%、0.050%、0.100%、0.150% 和 0.200% 的秋水仙素处理已萌发的七叶一枝花种子,处理时间分别为 12、24、48、60 h,以无秋水仙素处理的种子做对照。然后,将处理完的种子转到铺有滤纸的培养皿上继续培养,并分别于 30、60、90 d 取出部分种子,经酒精和升汞消毒后接种在含有 6-BA 和 NAA 的 1/2MS 培养基上。在培养过程中不断观察种子根尖的膨大情况并统计 20 d 时种子根尖膨大率。

1.2.2 形态学以及细胞学鉴定 通过比较秋水仙素处理的七叶一枝花的种子与对照组种子,观察其根尖的膨大情况。然后将培养皿中培养 60 d 的秋水仙素处理的七叶一枝花种子,转移到 1/2MS 固体培养基中继续培养 60 d,并随机选取 60 棵组培苗,通过根系扫描仪扫描,分别统计株高、叶片长和宽,胚根长及直径,观察比较经秋水仙素处理的种子萌发的植株与对照组植株的生长情况。另外分别切取经秋水仙素处理的七叶一枝花的组培苗和对照组的幼根,在裂解液中将其幼根切碎,过滤膜。使用 PI 染液对细胞进行染色后,采用流式细胞仪检测样品细胞 DNA 荧光强度,观察经秋水仙素处理的七叶一枝花种子萌发的组培植株细胞染色体是否出现了加倍。

## 1.3 项目测定

分别在 12 h、24 h、60 h、7 d、10 d、20 d 时观察种子胚根根尖的膨大情况后拍照记录并统计 20 d 时的种子根尖膨大率。根尖诱导率(%)=诱导膨大的根尖/处理的根尖总数×100。同时,使用根系扫描仪扫描随机选取的 60 棵组培苗,分别统计株高、叶片长和宽,胚根长及直径,观察比较经秋水仙素处理的种子萌发的植株与对照组植株的生长情况。使用流式细胞仪检测样品细胞 DNA 荧光强度。

## 1.4 数据分析

采用 Excel 2007 进行数据统计和作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同浓度秋水仙素处理对七叶一枝花种子根尖膨大率的影响

由表 1 可知,经过秋水仙素处理的七叶一枝花的种子在 7 d 时开始有少量种子(约 340 粒)根尖出现膨大,10 d 时约有 1/3(1 000 粒)种子的根尖膨大,20 d 约有 50%(1 500 粒)种子的根尖膨大。不同浓度的秋水仙素对种子根尖膨大率影响较大,其中浓度为 0.050% 秋水仙素的诱导效果最好,随着秋水仙素浓度增加,种子的根尖膨大率下降;处理时间以 12 h 和 24 h 为宜,24 h 后随着处理时间增加,大部分种子根尖膨大率反而下降。综合比较分析,以浓度为 0.050% 的秋水仙素处理 12 h 的根尖膨大率最高,为 51.69%,可以作为秋水仙素诱导七叶一枝花多倍体的首选条件。

表 1 不同浓度秋水仙素处理的七叶一枝花种子的根尖膨大率

Table 1 The statistics of root tip swelling rate of polyphylla seeds treated with different colchicine concentrations for different times

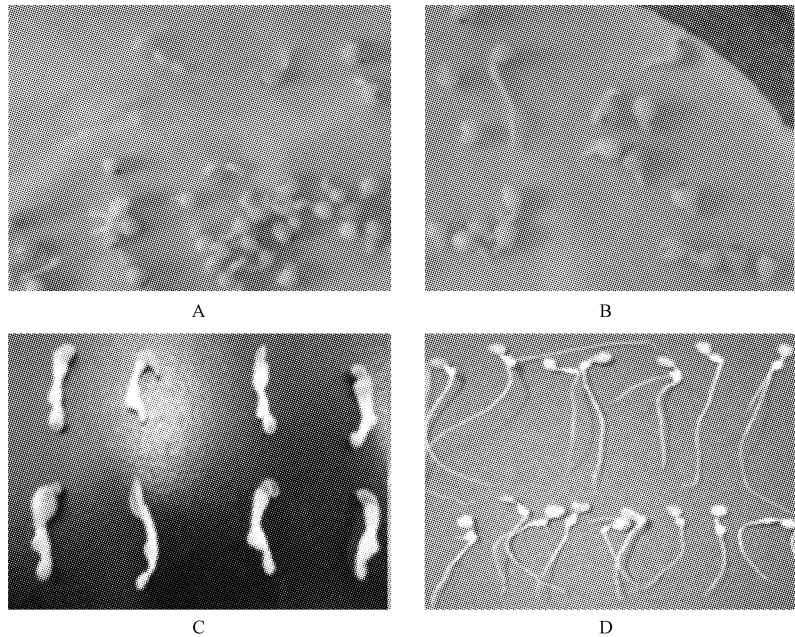
秋水仙素浓度	处理时间			
Colchicine concentration	Treatment time/h			
/ %	12	24	48	60
0.025	46.15±0.25	50.28±0.13	47.89±0.23	41.45±0.11
0.050	51.69±0.42	49.43±0.31	45.83±0.25	40.96±0.37
0.100	47.44±0.17	45.19±0.22	49.10±0.19	28.66±0.18
0.150	42.62±0.24	38.20±0.14	40.83±0.15	32.30±0.28
0.200	37.34±0.32	43.10±0.20	42.22±0.42	37.11±0.46

### 2.2 形态学鉴定

通过比较秋水仙素处理的种子与对照组种子,发现经秋水仙素处理的种子无论是培养 10 d(图 1A、B),还是 60 d(图 1C、D),其根尖的膨大情况均高于未经秋水仙素处理的种子的膨大情况,这与武延生<sup>[7]</sup>采用秋水仙素诱导大蒜根尖明显膨大的结果类似。随机选择萌发的种子 60 粒,通过根系扫描仪扫描萌发的种子胚根(图 2),

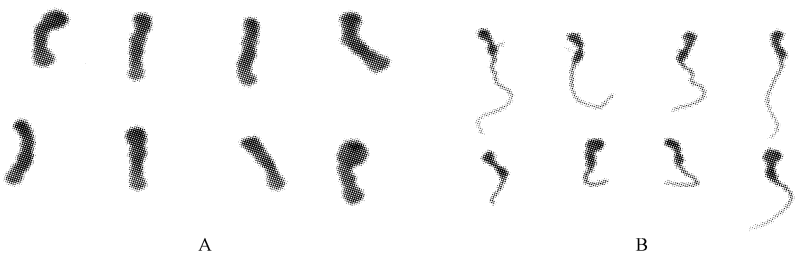
测量萌发种子胚根的平均长度和平均直径(表 2),结果进一步表明经过秋水仙素处理的种子较对照组胚根短

且粗,胚轴伸长,胚乳消耗较快。这可能是由秋水仙素诱导遗传物质加倍造成的。



注:A,C-秋水仙素处理过的种子;B,D-未用秋水仙素处理的种子(CK)。  
Note: A,C-colchicine-treated seeds; B,D-seeds not treated with colchicine (CK).

图 1 秋水仙素处理的七叶一枝花种子与对照组种子在培养皿中培养 10 d(A,B)和 60 d(C,D)后根尖膨大情况  
Fig. 1 The root tips of the polyphylla seeds cultured for 10 days (A,B) and 60 days (C,D) in a petri dish after treated with colchicine and CK



注:A-秋水仙素处理的种子;B-未用秋水仙素处理的种子(CK)。  
Note: A-colchicine-treated seeds; B-seeds non-treated with colchicine (CK).

图 2 根系扫描仪扫描的用秋水仙素处理七叶一枝花种子突破种皮的胚根与未经秋水仙素处理的种子的比较

Fig. 2 Comparison of the radicles of the polyphylla seeds treated with colchicine and without colchicine using root scanner

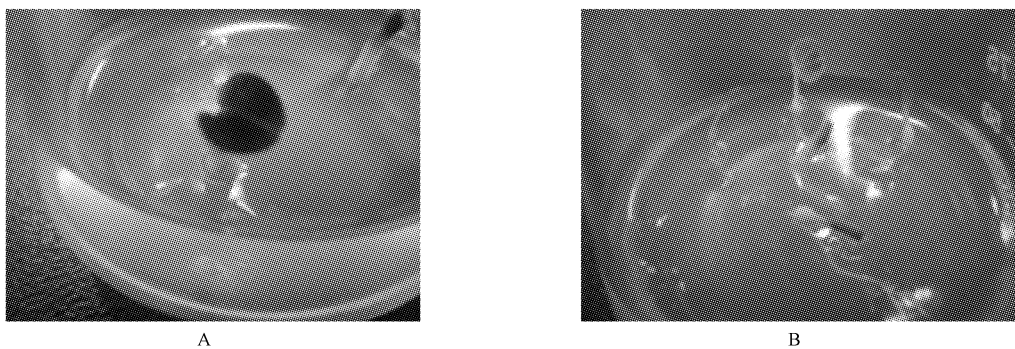
表 2 种子胚根长度与直径

指标 Item	秋水仙素处理过种子的胚根 The radicals of colchicine-treated seeds		未用秋水仙素处理的对照种子的胚根 The radicals of non-colchicine-treated seeds	
平均长度 Average length	1.942 7±0.001 1		2.117 1±0.001 3	
平均直径 Average diameter	1.220 4±0.002 7		0.894 6±0.000 8	

将培养皿中培养 60 d 的秋水仙素处理的七叶一枝花种子,转移到 1/2MS 固体培养基中继续培养 60 d (图 3),并随机选取 60 颗组培苗,通过根系扫描仪扫描,分别统计株高、叶片长和宽,胚根长及直径(表 3),发现经秋水仙素处理种子萌发的植株较对照植株,生

长势旺而浓绿,根茎明显加粗,节间变短,叶片加厚,叶色加深,植株呈现矮化粗壮,这与于文艳<sup>[13]</sup>采用秋水仙素诱导的大蒜植株其茎粗、茎长、叶片长与宽明显大于二倍体植株的结果类似,初步判定组培苗植株可能染色体加倍。





注:A-秋水仙素处理种子萌发的植株;B-对照组种子萌发的植株(CK)。

Note:A-the plants originated from colchicine-treated seeds;B-the plants originated from the control seeds (CK).

图3 秋水仙素处理的七叶一枝花种子(A)与对照组种子(B)转移到固体培养基中继续培养 60 d 的生长情况

Fig. 3 The plants originated from the polyphylla seeds treated(A) or non-treated (B) with colchicine after cultured on the 1/2MS agar-medium for 60 days

表3 植株的株高、叶片长和宽、胚根长及直径的统计

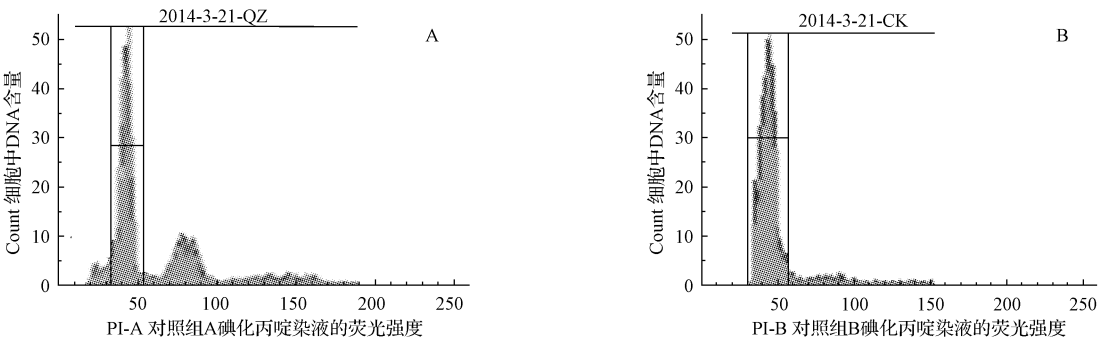
Table 3 The statistics of the plant height,the leaf length and width, the radicle length and diameter cm

指标 Item	秋水仙素处理种子萌发的植株 Plants originated from colchicine-treated seeds	对照植株 Plants originated from non-colchicine-treated seeds
叶片长 Leaf length	0.761 3±0.033 3	1.063 4±0.130 5
叶片宽 Leaf width	0.828 3±0.105 2	1.274 9±0.120 1
株高 Height	1.545 6±0.161 1	3.047 7±0.324 7
胚根长 Radicle length	1.188 2±0.101 9	2.328 6±0.264 5
胚根直径 Radicle diameter	0.157 9~0.394 3	0.104 6~0.153 9

2.3 细胞学鉴定

分别切取经秋水仙素处理种子萌发的组培苗和对

照组萌发的组培苗的幼根,在裂解液中将其切碎,过滤膜。PI 染液对细胞进行染色后,采用流式细胞仪检测样品细胞 DNA 荧光强度(图 4),结果表明,2 种样品的细胞 DNA 荧光强度值存在差异,未用秋水仙素处理的对照组细胞 DNA 荧光强度在约 45 处有明显的峰值,而秋水仙素处理样品的细胞 DNA 荧光强度在约 85 处有明显峰值。由于样品细胞荧光强度与 DNA 含量成正比,因此,可以推断秋水仙素处理样品的细胞 DNA 约是对照(二倍体)样品的 1.88 倍,符合四倍体细胞 DNA 含量特征<sup>[14]</sup>,表明经秋水仙素处理的七叶一枝花种子萌发的组培植株细胞染色体出现了部分加倍。



注:A-0.05%秋水仙素处理种子萌发的组培苗幼根,B-对照组组培苗幼根。

Note:A-the plants originated from 0.05% colchicine-treated seeds,B-the plants originated from non-colchicine-treated seeds.

图4 流式细胞仪检测结果

Fig. 4 The detection results of flow cytometry

3 结论与讨论

随着药用植物资源紧缺的加剧,药用植物多倍体新品种将以其速生、优质以及高抗逆性等特性,在生产实践中得到重视<sup>[5]</sup>。虽然药用植物多倍体育种还存在不少问题,如嵌合体现象严重、获得的多倍体孕性降低、稳定耗时长、育种成本高等问题<sup>[4]</sup>,但已有的研究已展现

出了多倍体育种的美好前景。对于不同的植物而言,不同浓度和处理时间的秋水仙素诱导细胞染色体加倍的结果是不一样的<sup>[15-17]</sup>,如闫秋洁等<sup>[15]</sup>研究秋水仙素对蚕豆胚根多倍体的最适诱导浓度和时间分别为 0.100% 和 48 h,而李桂双等<sup>[9]</sup>研究秋水仙素诱导黄芩多倍体的最适诱导浓度和时间则分别为 0.100% 和 24 h。因此,

如何选用适宜的秋水仙素诱导条件,是进行多倍体育种的关键。该研究首次采用秋水仙素处理七叶一枝花种子,以七叶一枝花种子的胚根诱导率和胚根膨大率作为筛选指标,筛选出了秋水仙素诱导的最佳浓度和处理时间组合,其中以浓度为 0.050% 处理 12 h,其多倍体诱导率最高(51.69%)。同时,获得了一批胚根部分加倍的七叶一枝花多倍体植株。与对照组相比,七叶一枝花多倍体植株的胚根短且粗、胚轴伸长,组培苗植株生长势旺而浓绿,根茎明显加粗,节间变短,叶片加厚,叶色加深,呈现矮化粗壮。采用流式细胞仪检测七叶一枝花多倍体植株组培苗的幼根,发现其幼根细胞的 DNA 荧光强度峰值约是对照组组培苗幼根细胞 DNA 荧光强度峰值的 2 倍,证明了经秋水仙素处理种子萌发的植株细胞染色体出现了部分加倍。这些结果为利用秋水仙素诱导七叶一枝花多倍体育种,获得生产性状优良、目标药用成分高的重楼种质资源提供了参考。

#### 参考文献

- [1] 马林喜,王俊丽,费良丹,等.武陵山地区特色药用植物七叶一枝花的研究与应用[J].中央民族大学学报(自然科学版),2014,23(3):75-79.
- [2] 左予桐.云南重楼抗肿瘤活性成分研究[D].天津:天津大学,2005.
- [3] 何韩军,杨跃生,吴鸿.药用植物多倍体的诱导及生物学意义[J].中草药,2010,41(6):1000-1006.
- [4] 杜艳伟,阎晓光,赵晋锋.药用植物多倍体育种的研究进展[J].生物技术进展,2011,1(4):249-253.
- [5] 张爱民,常莉,薛建平.药用植物多倍体诱导研究进展[J].中国中药杂志,2005,30(9):645-649.
- [6] 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):372-376.
- [7] 武延生.秋水仙素诱导大蒜根尖多倍体的研究[J].北方园艺,2012(23):36-38.
- [8] 张焕玲,李俊红,李周岐.秋水仙素处理杜仲种子诱导多倍体的研究[J].西北林学院学报,2008,23(1):78-81.
- [9] 李桂双,刘强,于凤,等.秋水仙素诱导黄芩多倍体的初步研究[J].种子,2009,28(10):94-96.
- [10] 张计育,李国平,乔玉山,等.秋水仙素对草莓离体叶片再生和多倍体诱导的影响[J].植物资源与环境学报,2009,18(3):69-73.
- [11] 陈娟.西瓜四倍体人工诱变及无籽西瓜主要数量性状遗传研究[D].合肥:安徽农业大学,2006.
- [12] 宋发军,黄宗华.七叶一枝花组织培养和种子萌发条件的研究[J].中南民族大学学报(自然科学版),2013,32(2):51-54.
- [13] 于文艳.大蒜四倍体植株诱导与鉴定[D].泰安:山东农业大学,2008.
- [14] 韩莎,李四军,许晓东,等.利用流式细胞仪快速鉴定桑树细胞的染色体倍数性[J].蚕业科学,2013,39(6):1042-1048.
- [15] 闫秋洁,杨琼.秋水仙素对蚕豆胚根生长的影响及多倍体诱导效应分析[J].广西植物,2012,32(5):386-391.
- [16] JIANG H E, LIU M J. Studies on polyploidy induction of Chinese jujube with colchicines[J]. Acta Horticult Sin, 2004, 31(5):647-650.
- [17] CHEN X S, WEI L J, TIAN Y N, et al. Regeneration of polyploidy plants of cassava induced with colchicines[J]. Chin J Trop Agric, 2008, 1:17-20.

## Effect of Different Concentrations of Colchicine on the Ployploid Breeding of *Paris polyphylla*

YANG Yali, LIU Jia, ZHANG Peng, SONG Fajun, YU Xiaodong, WANG Chuntao

(College of Life Sciences, South-Central University for Nationalities, National Committee Key Laboratory for Biotechnology, Hubei Provincial Key Laboratory for Protection and Application of Special Plant Germplasm in Wuling Area of China, Wuhan, Hubei 430074)

**Abstract:** In order to investigate the influence of different concentrations of colchicine on the ployploid breeding of *Paris polyphylla*, *P. polyphylla* seeds as experimental materials were treated by colchicine with the concentration of 0.025%, 0.050%, 0.100%, 0.150% and 0.200% for different time of 12, 24, 48, 60 hours, respectively. The results showed that the root tip swelling of polyphylla seeds treated with different colchicine concentrations for different times were more than the control seeds untreated with colchicine, and the highest swelling rate was 51.69% under the treatment of 0.05% colchicine for 12 hours. The radicles of colchicine-treated *P. polyphylla* seeds and the plants originated from colchicine-treated seeds were shorter and stronger than the control untreated with colchicine. The detection results of flow cytometry showed that the DNA fluorescence intensity of the radicle cells of the plants originated from colchicine-treated seeds was about 1.88 folds of the control non-treated with colchicine, indicating that the chromosome of the plants originated from colchicine-treated seeds were partially doubled. These results provided references for the development of ployploid breeding of *P. polyphylla*.

**Keywords:** *Paris polyphylla*; colchicine; ployploid