

田埂报春多倍体诱导及其形态学研究

张晓曼¹, 孙晓光², 杨建民¹

(¹河北农业大学园林与旅游学院,保定 071000;²保定市交通局公路管理处,保定 071000)

摘要:在离体培养条件下,比较不同浓度、不同处理时间的秋水仙素对田埂报春进行染色体加倍的诱导效果。结果表明:0.08%秋水仙素处理48h的诱变效果最佳,诱变率高达56%。经秋水仙素诱导后形成的多倍体植株与原二倍体植株比较,在形态上,四倍体植株表现出多倍体特征,叶片变厚,叶形指数减小,保卫细胞增大,单位面积气孔数减少,叶绿体数明显增多。对变异植株进行细胞学研究发现,体细胞中期染色体数目为 $2n=4x=36$,而原二倍体的染色体数目为 $2n=2x=18$,基数 $x=9$,因此,变异植株($2n=4x=36$)为四倍体。前者的核型公式为 $2n=4x=8L+12M2+4M1+12S$,核型属于1A;后者的核型公式为 $2n=2x=4L+6M2+2M1+6S$,核型也属于1A。检测发现少数个体有非整倍体变异。

关键词:田埂报春;秋水仙素;四倍体;染色体;核型

Polyploid Induction and Morphology of *Primula forbesii*

ZHANG Xiao-man¹, SUN Xiao-guang², YANG Jian-min¹

(¹College of Landscape Architecture and Tourism, Agricultural University of Hebei, Baoding 071000;

²Highway Administrative Office of Transportation Bureau of Baoding, Baoding 071000)

Abstract: *In vitro* culture of *Primula forbesii* was treated with colchicine at different concentrations and durations. The results showed that the induction rate was 56% with 0.08% colchicine for 48h. Compared with the normal diploid plants, the polyploid plants showed the general characteristics of tetraploids, such as thicker leaf, smaller leaf index, larger guard cells, less stomata per unit area and more chloroplasts in guard cells. Cytological observation showed the chromosome number of mutant plants was $2n=4x=36$, while that of the normal diploid plant was $2n=2x=18$ with $x=9$. Therefore, the mutant plants ($2n=4x=36$) belong to tetraploid plants. The karyotype formula of the former is thus $2n=4x=8L+12M2+4M1+12S$, and that of the latter is $2n=2x=4L+6M2+2M1+6S$. Both of the karyotypes belong to Stebbins's 1A type. It was also found that a few induced plants were aneuploid.

Key words: *Primula forbesii*; Colchicine; Tetraploid; Chromosome; Karyotype

报春花属 (*Primula*) 植物约有 500 种,我国有 294 种,21 亚种和 18 变种^[1]。为了使报春花的育种工作能有新的突破,必须充分利用我国的种质资源,尤其是一些我国特有种质资源的开发和利用。田埂报春 (*Primula forbesii*) 为我国所特有的报春花科报春花属植物,广泛分布于中国云南、四川等地的海拔相对较低处,引种驯化容易,是一种很有园林开发价值的野生花卉。目前除了对田埂报春的生物学特性及系统分类有过报道外,尚未对田埂报春的遗传育种工作开展研究。多倍体植物普遍具有器官巨大、

抗性强、新奇变异等特征^[2],是花卉育种中重要的育种手段。本文以田埂报春为材料,进行四倍体诱导和染色体核型分析研究,旨在建立田埂报春多倍体诱导和鉴定技术体系,为开展报春花属植物多倍体育种奠定技术基础。

1 材料与方法

1.1 材料

取田埂报春 ($2n=2x=18$) 盆栽植株幼叶为外植体,灭菌后接种到培养基 MS + 2mg/L 6-BA + 0.1mg/L

收稿日期:2010-04-28 修回日期:2010-07-18

基金项目:河北省科技支撑计划项目(09230603D)

作者简介:张晓曼,讲师,博士,从事报春花植物资源与育种研究。E-mail:zhangxiaoman1977@163.com

NAA 诱导丛生芽,以丛生芽为诱导多倍体的材料。

1.2 方法

1.2.1 多倍体诱导 将具有丛生芽的愈伤组织块切割成约 0.5cm × 0.5cm 的小块,利用不同浓度秋水仙素(0.02%、0.04%、0.08%和0.16%)和不同处理时间(24h、48h和72h)对丛生芽进行浸泡诱导多倍体,共12个处理组合,每处理50块。无菌水冲洗后接种至MS+0.5mg/L 6-BA+0.5mg/L NAA培养基上,培养温度(25±1)℃,光照强度1000~2000Lx,光照10~12h。当丛生芽长出3~5片叶子时,转至生根培养基MS+NAA 0.2mg/L培养,根长至3cm以上移植到经高压灭菌的栽培基质上,于日光温室培养种植。

1.2.2 形态学观察 以二倍体植株为对照,主要观测变异株的株高、植株冠径、花冠径、叶柄长、叶形指数、果实直径等。

1.2.3 气孔鉴定 选取植株中上部成熟叶片,用蒸馏水擦洗叶片下表皮后,在叶片的下表皮中部约1cm×3cm大小的面积上均匀涂上一层无色指甲油(Maypelline),待指甲油干燥后,将指甲油膜取下。将膜与叶片接触的一面向下置于载玻片上,盖上盖玻片(用镊子稍加压力,使膜平展),然后在10×16倍镜下随机观察10个视野,重复3次,记录各视野中的气孔数取平均数;在40×16倍镜下随机观察10个气孔,用标定好的目镜测微尺测量气孔大小取平均数,并记录各气孔保卫细胞中叶绿体数取平均数。

表1 秋水仙素不同浓度和处理时间的诱导效果

Table 1 Induction effects of colchicines concentration and treatment duration on *Primula forbesii*

浓度(%) Concentration	处理时间(h) Duration of treatment	处理芽块数 Number of treated	死亡数 Death number	死亡率(%) Death rate	变异数 Number of mutation	变异率(%) Mutation rate
0	0	50	0	0	0	0
0.02	24	50	0	0b	1	2b
	48	50	1	2b	2	4b
	72	50	4	8a	5	10a
0.04	24	50	0	0c	2	4c
	48	50	5	10b	6	12b
	72	50	8	16a	11	22a
0.08	24	50	2	4c	21	42b
	48	50	6	12b	28	56ab
	72	50	11	22a	20	40b
0.16	24	50	7	14c	23	46a
	48	50	16	32b	19	38b
	72	50	27	54a	14	28c

同一浓度内不同处理时间差异显著性检验采用新复极差法。小写字母表示0.05水平,相同字母表示差异不显著

The significance of different treatment duration at the same level of concentration were tested with Duncan's method. The data followed by the same lower-case letters are not significantly different at the 5% level of significance

气孔密度由如下公式求出:气孔密度(个/mm²)=各视野中气孔个数(个)/视野的真实面积(mm²)。

1.2.4 染色体核型鉴定 将新生根尖在0.1%秋水仙素溶液中进行预处理2h,取出后用蒸馏水冲洗3遍,放入卡诺固定液中固定3~24h,水洗后在1mol/L盐酸中60℃恒温水解10min,蒸馏水冲洗,卡宝品红染色30min左右,压片,OLYMPUS光学显微镜下观察和拍照。以50个染色体分裂中期细胞确定体细胞染色体数目,挑选5个体细胞中期染色体,根据李懋学等^[3]的标准进行染色体核型分析,按Stebbins方法^[4]做核型分类。

1.2.5 统计分析 所有试验数据均采用SAS软件分析处理。

2 结果与分析

2.1 秋水仙素处理的诱导效果

由表1可知,0.02%~0.16%的秋水仙素处理24~72h均能诱导出多倍体植株。丛生芽对秋水仙素敏感度大,随着秋水仙素浓度升高和处理时间延长,植株死亡率呈上升趋势;从诱变效果看,0.02%~0.16%的秋水仙素对田埂报春丛生芽的诱导均有效,低浓度(0.02%)随着处理时间的延长诱变率提高,高浓度(0.16%)则相反,在12个处理组合中,用0.08%的秋水仙素处理田埂报春丛生芽48h,诱导效果最好,死亡率为12%,变异率为56%,为最佳处理组合。

2.2 倍性鉴定

2.2.1 染色体核型鉴定 未经秋水仙素处理的田埂报春体细胞染色体数 $2n = 2x = 18$, 体细胞中期染色体由 18 条中部着丝点染色体组成(表 2, 图版 A)。臂指数为 51.65 ± 0.05 , 核型公式为 $K(2n) = 2x = 18m$, 核型不对称性属 1A 型。田埂报春作为我国特有种, 其染色体数的观察结果和 Richards^[4] 的报道一致, 核型为首次报道。

表 2 二倍体和四倍体田埂报春的核型

Table 2 The karyotype between diploid and tetraploid of *Primula forbesii*

田埂报春 <i>P. forbesii</i>	染色体相对长度组成 Constitution of relation length	臂指数(%) Fundamental number	核型公式 Karyotype formula	核型分类 Karyotype
二倍体	4L + 6M2 + 2M1 + 6S	51.65 ± 0.05	$K(2n) = 2x = 18m$	1A
四倍体	8L + 12M2 + 4M1 + 12S	51.32 ± 0.76	$K(2n) = 4x = 36m$	1A

经秋水仙素处理后的再生植株进行细胞染色体分析。结果发现, 部分再生植株为四倍体 ($2n = 4x =$

表 3 田埂报春形态变异比较

Table 3 Morphological variation of *Primula forbesii*

倍性 Ploidy	株高 (cm) Plant height	植株直径 (cm) Plant diameter	花冠径 (cm) Corolla diameter	叶柄长 (cm) Stipe length	叶形指数 Leaf index	果实直径 (cm) Fruit diameter
二倍体 Diploid	22.84 ± 5.03a	32.61 ± 7.58a	1.24 ± 0.55A	12.24 ± 0.89A	1.38 ± 0.24a	0.41 ± 0.15A
四倍体 Tetraploid	15.29 ± 3.12b	22.45 ± 2.24b	2.27 ± 0.03B	7.73 ± 0.57B	1.09 ± 0.07b	0.89 ± 0.07B

方差分析采用邓肯氏新复极差检测法。大写字母表示 0.01 水平, 小写字母表示 0.05 水平, 相同字母表示差异不显著, 下同

The data were tested with Duncan's method. The means followed by the same lowercase letters and capital letters are not significantly different at the 5% and 1% levels of significance, respectively

2.2.3 二倍体、四倍体植株的保卫细胞大小、密度及叶绿体数的比较 从图版 H、I 和表 4 中可以看出, 四倍体植株的气孔保卫细胞长度和宽度均明显大于二倍体, 二倍体保卫细胞平均长度为 $3.97 \mu\text{m}$, 四倍体保卫细胞平均长度为 $6.22 \mu\text{m}$ 。二倍体保卫细胞平均宽度为 $3.17 \mu\text{m}$, 四倍体保卫细胞平均宽度为 $5.51 \mu\text{m}$, 两者差异极显著。二倍体保卫细胞叶绿体数平均为 18 个, 四倍体保卫细胞叶绿体数平均为 55 个, 达到极显著差异, 气孔、保卫细胞大小和叶绿体数与倍性成正显著相关性。二倍体气孔密度为 $94.20 \text{ 个}/\text{mm}^2$, 四倍体气孔密度为 $78.91 \text{ 个}/\text{mm}^2$, 在气孔密度上二倍体与四倍体存在极显著差异。说明气孔保卫细胞大小及其内叶绿体数的观察, 是选择多倍体的一种间接有效的方法, 通过气孔长度和密度鉴定田埂报春四倍体是可靠的。

36)。通过核型分析, 四倍体田埂报春体细胞中期染色体由 36 条中部着丝点染色体组成(表 2, 图版 B)。臂指数为 51.32 ± 0.76 , 核型公式为 $K(2n) = 4x = 36m$, 核型不对称性属 1A 型。在进行田埂报春多倍体材料染色体观察时发现了少量非整倍体染色体细胞, 可能是多倍体细胞不正常分裂造成的。还发现少量的六倍体细胞, 可能是某些分生组织的染色体加倍后再加倍形成的。

2.2.2 二倍体、四倍体植株的形态特征比较 从图版 C、D、E、F 和 G 及表 3 中可以看出, 四倍体田埂报春比对照二倍体株高变矮, 叶柄变短变粗, 叶片明显变宽、变厚、颜色深绿, 叶片背面的绒毛变多变长。四倍体植株的平均叶形指数为 1.09, 对照二倍体平均叶形指数为 1.38, 差异显著。四倍体植株单花冠直径明显增大, 平均为 2.27 cm , 对照平均花冠直径为 1.24 cm , 差异极显著, 花的萼片、黄色的花眼都较对照增大。果实较对照增大, 四倍体植株的果实平均直径为 0.89 cm , 对照二倍体的果实平均直径为 0.41 cm , 两者差异极显著。

表 4 二倍体、四倍体气孔保卫细胞和叶绿体比较

Table 4 Comparisons of stomatas and chloroplasts between diploid and tetraploid plants

倍性 Ploidy	保卫细胞长 (μm) Length of guard cell	保卫细胞宽 (μm) Width of guard cell	保卫细胞叶绿体数 Number of chloroplasts per guard cell	气孔密度 ($\text{个}/\text{mm}^2$) Stomata density
二倍体 Diploid	3.97 ± 0.54A	3.17 ± 0.34A	18 ± 2.56A	94.20 ± 8.56A
四倍体 Tetraploid	6.22 ± 0.19B	5.51 ± 0.98B	55 ± 4.32B	78.91 ± 6.97B

3 讨论

把化学诱变育种技术与植物组织和细胞离体培养技术相结合, 对观赏植物遗传改良具有独特的优

势和发展潜力,具有不受环境条件限制、节省大量人工和时间、扩大变异谱和提高变异率等优点^[7-11]。通过植物离体组织诱导同源四倍体已经成为获得多倍体的有效途径。试验表明,这种处理方法适于田埂报春的多倍体诱导,操作简便,且诱变效果好,得到大批染色体加倍的植株。

在一定范围内诱变效果与秋水仙素浓度及其处理时间长短呈正相关,超过一定范围则呈负相关^[6]。说明秋水仙素对植物材料会造成毒害作用导致植物不能正常生长或死亡,秋水仙素诱导田埂报春多倍体以0.08%浓度秋水仙素溶液浸泡丛生芽48h诱导效果最好,死亡率为12%,变异率为56%。

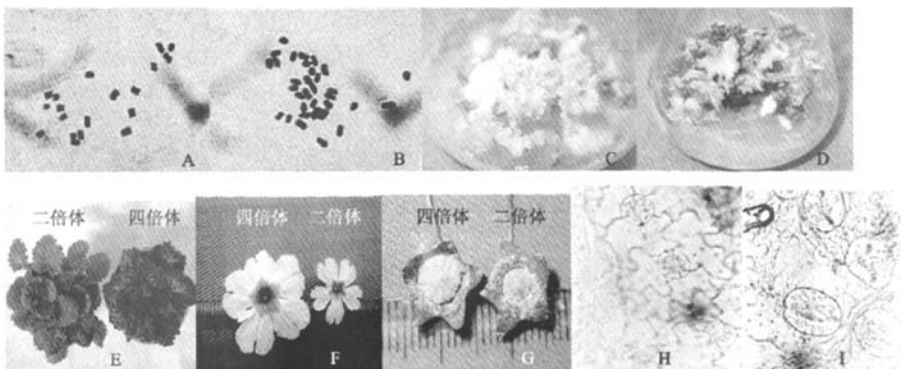
经细胞学鉴定田埂报春的体细胞染色体数目为 $2n = 2x = 18$;经加倍后的体细胞染色体数目为 $2n = 2 \times 2x = 2 \times 18 = 36$,是原二倍体的二倍,为同源四倍体,本研究获得了田埂报春四倍体植株,在以往研究中尚未见报道。本文在检测中发现有极少数个体出现非整倍变异。如: $2n = 4x = 36 + 1$; $2n = 4x = 36 + 2$; $2n = 4x = 36 - 1$ 的情况。这可能是在细胞分裂过程中姊妹染色单体出现滞后或者姊妹染色单体未及时分开的原因造成的。还发现少量的六倍体细胞,可能是某些分生组织的染色体加倍后再加倍形成的。

四倍体田埂报春在形态学和细胞学上都发生明显变化,与对照二倍体田埂报春比较,四倍体田埂报春株高变矮,叶片变大变厚,叶色浓绿,气孔明显增

大,单位面积气孔数目明显减少,花径增大,体细胞增大,染色体数目加倍。对加倍成功的四倍体田埂报春,有待于通过栽培管理、杂交育种并结合生物技术使其优良性状得到巩固和进一步提高,四倍体田埂报春与二倍体田埂报春的生物特性比较,我们将会继续报道,为以后进行报春花属新品种的选育工作打下基础。

参考文献

- [1] 陈封怀,胡启明.中国植物志第59卷第2分册[M].北京:科学出版社,1990:1-207
- [2] Bruun H G. Cytological studies in *Primula*[J]. *Symbolae Botanicae Upsalienses*,1932,1:1-239
- [3] 李懋学,陈瑞阳.关于植物核型分析的标准化问题[J].武汉植物学研究,1985,3(4):297-302
- [4] Richards J. *Primula*[M]. London:B. T. Batsford Ltd,1993:4-29
- [5] MENG Y,SUN H,YANG Y P, et al. Polyploidy and new chromosome counts in *Anaphalis* (Asteraceae Gnaphalidae) from the Qinghai-Tibet Plateau of China[J]. *Syst Evola*,2010,48:58-64
- [6] Li Wei,Hu Dong-nan,Li Hui, et al. Polyploid induction of *Lespedeza formosa* by colchicine treatment[J]. *Forest Studies China*,2007,9(4):283-286
- [7] 王永强,智慧,李伟,等.狗尾草属野生近缘种的染色体鉴定[J].植物遗传资源学报,2007,8(2):159-164
- [8] 张志胜,黎扬辉,姜蕾,等.红掌四倍体的离体诱导及其鉴定[J].园艺学报,2007,34(3):729-734
- [9] 张蜀宁,万双粉,张伟,等.同源四倍体青菜花粉母细胞的减数分裂[J].园艺学报,2007,34(2):387-390
- [10] 祝剑峰,刘幼琪,王爱云,等.异源六倍体水稻 AACDD 和三倍体水稻 ACD 生殖特性的细胞胚胎学研究[J].植物遗传资源学报,2008,9(3):350-357
- [11] 袁鹤,张成合,满红,等.4x 菜心 × 2x 芥蓝的胚胎发育观察及离体培养获得异源三倍体[J].植物遗传资源学报,2008,9(3):297-301



图版说明:A.二倍体植物根尖细胞中期染色体;B.四倍体植物根尖细胞中期染色体;C.二倍体组培苗;D.四倍体组培苗;E.二倍体和四倍体植株;F.二倍体和四倍体植株的花;G.二倍体和四倍体植株的果实;H.二倍体植株的气孔(400倍);I.四倍体植株的气孔(400倍)

Explanntion of plates:A. The metaphase somatic chromosome of diploid; B. The metaphase somatic chromosome of tetraploid; C. The diploid tissue culture plant; D. The tetraploid tissue culture plant; E. Diploid and tetraploid plant; F. Diploid and tetraploid flowers; G. Diploid and tetraploid fruits; H. Diploid stomatas (400X); I. Tetraploid stomatas (400X)

田埂报春多倍体诱导及其形态学研究

作者: [张晓曼](#), [孙晓光](#), [杨建民](#), [ZHANG Xiao-man](#), [SUN Xiao-guang](#), [YANG Jian-min](#)
 作者单位: [张晓曼, 杨建民, ZHANG Xiao-man, YANG Jian-min\(河北农业大学园林与旅游学院, 保定, 071000\)](#), [孙晓光, SUN Xiao-guang\(保定市交通局公路管理处, 保定, 071000\)](#)
 刊名: [植物遗传资源学报](#) **ISTIC** **PKU**
 英文刊名: [JOURNAL OF PLANT GENETIC RESOURCES](#)
 年, 卷(期): 2010, 11(6)

参考文献(11条)

1. 张蜀宁; 万双粉; 张伟 [同源四倍体青花菜花粉母细胞的减数分裂](#) [期刊论文] - [园艺学报](#) 2007(02)
2. 张志胜; 黎扬辉; 姜蕾 [红掌四倍体的离体诱导及其鉴定](#) [期刊论文] - [园艺学报](#) 2007(03)
3. 王永强; 智慧; 李伟 [狗尾草属野生近缘种的染色体鉴定](#) [期刊论文] - [植物遗传资源学报](#) 2007(02)
4. Li Wei; Hu Dong-nan; Li Hui [Polyploid induction of Lespedeza formosa by colchicine treatment](#) [期刊论文] - [Forest Studies China](#) 2007(04)
5. MENG Y; SUN H; YANG Y P [Polyploidy and new chromosome counts in Anaphalis\(Asteraceae Gnaphalidae\) from the Qinghai-Tibet Plateau of China](#) 2010
6. 袁鹤; 张成合; 满红 [4x菜心×2x芥蓝的胚胎发育观察及离体培养获得异源三倍体](#) [期刊论文] - [植物遗传资源学报](#) 2008(03)
7. 祝剑峰; 刘幼琪; 王爱云 [异源六倍体水稻AACDD和三倍体水稻ACD生殖特性的细胞胚胎学研究](#) [期刊论文] - [植物遗传资源学报](#) 2008(03)
8. Richards J [Primula](#) 1993
9. 李懋学; 陈瑞阳 [关于植物核型分析的标准化问题](#) [期刊论文] - [武汉植物学研究](#) 1985(04)
10. Bruun H G [Cytological studies in Primula](#) 1932
11. 陈封怀; 胡启明 [中国植物志第59卷第2分册](#) 1990

本文读者也读过(10条)

1. 张继先 [浅谈植物多倍体中纯合体与杂合体判断](#) [期刊论文] - [科学咨询](#) 2004(10)
2. 解玮佳. 李兆光. 蔡艳飞. 李涵. 李树发. 张兴春. 李世峰. XIE Wei-jia. LI Zhao-guang. CAI Yan-fei. LI Han. LI Shu-fa. ZHANG Xing-chun. LI Shi-feng [两种球花报春的生长特性研究初报](#) [期刊论文] - [江西农业学报](#) 2009, 21(5)
3. 李晓丽. 徐跃进. 田福发. 袁黎 [秋水仙素诱导菠菜和黄瓜四倍体方法的筛选](#) [期刊论文] - [湖北农业科学](#) 2003(1)
4. 张晓刚. 周明. 胡勋. 赵开弘. ZHANG Xiao-Gang. ZHOU Ming. HU Xun. ZHAO Kai-Hong [藻蓝蛋白裂合酶CpeS色氨酸定点诱变及体内重组功能研究](#) [期刊论文] - [武汉植物学研究](#) 2006, 24(3)
5. 马新才. 戴建民. 李培环. 董晓颖. 虞美人多倍体化学诱变研究初报 [期刊论文] - [莱阳农学院学报](#) 2003, 20(3)
6. 贾茵. 张启翔. JIA Yin. ZHANG Qi-xiang [\$^{60}\text{Co}\$ \$\gamma\$ -射线辐射对小报春种子萌发和M₁性状的影响](#) [期刊论文] - [种子](#) 2009, 28(11)
7. 何建. 冯焱. 王建辉. 陈克玲. 梁国鲁. HE Jian. FENG Yan. WANG Jian-hui. CHEN Ke-ling. HANG Guo-lu [长穗桑组织培养和四倍体新种质诱导](#) [期刊论文] - [西南农业学报](#) 2008, 21(1)
8. 任清. 李守勉. 姚彬. 王潇潇. REN Qing. LI Shou-mian. YAO Bin. WANG Xiao-xiao [人工诱变芦荟多倍体的初步研究](#) [期刊论文] - [华北农学报](#) 2007, 22(z2)
9. 曹德菊. 汤斌. 铅、镉及其复合污染对蚕豆根尖细胞的诱变效应 [期刊论文] - [激光生物学报](#) 2004, 13(4)
10. 邢辉. 杨亚丽. 宋冠瑛. 李美茹. 姜华武. 王洪利. 吴国江. XING Hui. YANG Ya-li. SONG Guan-ying. LI Mei-ru. JIANG Hua-wu. WANG Hong-li. WU Guo-jiang [航天诱变百脉根结瘤突变体的筛选](#) [期刊论文] - [热带亚热带植物学报](#)

2007, 15(5)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zwyczyxb201006022.aspx