

秋水仙素诱变离体卷丹多倍体的研究

陈 艾,杨利平,谭 艳,彭春涛,唐 彪

(长江师范学院生命科学与技术学院,重庆 408100)

摘要:用 0.15% 秋水仙素附加 2.00% 二甲基亚砷诱变离体培养的卷丹小鳞茎,避光条件下摇床诱导,用组织培养结合不定芽诱导技术获得了多倍体苗,并对多倍体染色体数目进行鉴定。结果显示,诱导 96 h 效果最好,变异率达到 54.29%。细胞学观察发现,对照为三倍体、非整倍体和极少数单倍体细胞组成的嵌合体,诱变出的 4 棵变异株细胞分别为染色体数目由 53~72 条的不同比例构成,属于典型的非整倍体的异倍型嵌合体。诱变株与对照植株间幼苗叶形指数、气孔密度及气孔大小等特征差异比较明显。

关键词:卷丹;多倍体;秋水仙素;染色体;嵌合体

Study on Polyploid Induction of *Lilium lancifolium* in Vitro with Colchicine Treatment

CHEN Ai, YANG Li-ping, TAN Yan, PENG Chun-tao, TANG Biao

(College of Life Science and Technology, Yangtze Normal University, Chongqing 408100)

Abstract: *Lilium lancifolium* bulblets were treated by 0.15% colchicine added with 2.00% dimethyl sulfoxide in vitro without light, and the polyploid seedlings were obtained by adventitious bud induction technology. The results of the chromosome quantity indicated that 96 h was the best induction time with the mutation rate of 54.29%. Via the cytological observation, as the control group was consisted by chimera including triploid, aneuploid, and few haploid, the chromosome quantity of these 4 mutative strains was consisted by the different proportion of 53–72 chromosome cells, and they were obviously aneuploid cytochimera. The mutant group showed obvious difference from the control group in leaf shape index of the seedling, stoma density, and stoma size.

Key words: *Lilium lancifolium*; polyploid; colchicines; chromosome; chimera

卷丹在长江流域广为栽培,为百合药材的主要来源,也是我国三大食用百合品种之一,同时也是园林普遍应用的球根花卉^[1-3]。中国药典 2010 版^[4]规定百合的药材来源为百合科植物卷丹(*Lilium lancifolium*)、百合(*L. brownii* var. *viridulum*)及细叶百合(*L. pumilum*)。虽然产地对百合有效成分影响较大,但药用百合中卷丹比百合、细叶百合总皂苷元含量分别高出 25.8%、25.5%^[5]。研究认为,卷丹在自然界有天然三倍体存在^[6],我国的卷丹几乎都是三倍体^[7],在日本的对马及韩国的济州岛和釜山

市存在二倍体^[8]。

多倍体育种在粮食、蔬菜、花卉及药用植物中已经普遍应用^[9-10]。多倍体植物农艺性状变化明显,表现为器官的巨型性,抗逆性、产量和有效成分增加。如药用植物四倍体金银花(*Lonicera japonica*)九丰一号比二倍体增产 58.7%^[11];板蓝根(*Baphicacanthus cusia*)四倍体有效成分含量比普通二倍体高出约 40% 等^[12]。百合多倍体育种研究主要集中在花卉用百合^[10,13-16]和食用百合多倍体诱导^[17-18]方面。目前药用百合多倍体育种工作

收稿日期:2014-02-11 修回日期:2014-05-04 网络出版日期:2014-10-13

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20141013.2016.005.html>

基金项目:重庆市科委直通车项目(2011BB1001);长江师范学院科研创新团队建设计划资助项目(2014XJTD06)

第一作者研究方向为百合组培快繁与育种。E-mail:742331063@qq.com

通信作者:杨利平,研究方向为花卉种质资源创新。E-mail:836711655@qq.com

还较薄弱,虽然有细叶百合 (*L. pumilum*) 成功获得四倍体幼苗的报道^[19],但国内栽培的卷丹还没有出现多倍体品种。本研究对卷丹进行多倍体诱导,以期得到个体大小、有效成分和抗病性方面都有良好表现的新种质,为今后的百合产业提供优良的种质资源。

1 材料与方法

1.1 材料

黑龙江省哈尔滨市种源卷丹灭菌后接种到培养基 MS + 0.5 mg/L6-BA + 0.2 mg/LNAA 上诱导愈伤组织和不定芽,建立高效组培体系,以不定芽块作为多倍体诱导的材料^[20]。

1.2 多倍体的诱导

参考前人的百合化学诱变工作^[13-18],选用秋水仙素作为诱变剂,二甲基亚砜为渗透剂,将 0.15% 秋水仙素附加 2.00% 二甲基亚砜高温灭菌,灭菌试剂分别浸泡无菌苗鳞茎(直径 0.9 ~ 1.5 cm) 24、48、72、96 和 120 h(避光,摇床),培养温度(25 °C),光照强度 2000 Lx,光照 14 h,继代接种后观察材料生长和形态变化状况。

1.3 多倍体的稳定

从叶片形态、植株颜色、植株长势 3 个方面比较多倍体植株与原植株在形态学上的差异。叶片呈暗绿色,叶片肥厚、变硬,叶表多不平等外形畸形,若出现这样变态叶片可初步认为疑似变异器官。将疑似变异器官在无菌台上割下,然后接种到 MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L 培养基上,待疑似变异器官重新脱分化、再分化出芽,将继代增殖成一个株系,并标记该疑似变异株系。

1.4 多倍体的鉴定

采用植物染色体常规压片法观察染色体数目^[21]。将正常对照植株和疑似变异株系植株无菌苗 25 °C 恒温生根培养(1/2 MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.2 mg/L),至根长 1 cm 左右,切取根尖放入 0.2% 秋水仙素溶液中,预处理 24 h,卡诺固定液 95% 乙醇:冰醋酸 = 3:1 固定 6 h,1 mol/L 盐酸 60 °C 恒温水浴解离 10 min,卡宝品红染色 15 min 后压片。显微镜下镜检,每个种源统计 30 个以上清晰分裂相的细胞染色体数目,并拍照。当无菌苗高在 6 cm 左右时炼苗移栽,比较对照植株和变异株的生长势、叶片形状及大小,其中,叶形指数 = 叶长/叶宽。选取相同培养条件下对照植株和变异植株的下表皮,在显微镜下观察拍照并对比气孔密度及气孔

大小的变化。

2 结果与分析

2.1 秋水仙素诱导卷丹

0.15% 的秋水仙素处理卷丹 24 h 时试验材料无死亡,也无变异现象产生。处理 48 h 的变异率较低,仅为 29.63%,72 h、96 h 变异率比较高,在 50% 左右。但是采用 72 h、96 h 处理的卷丹中出现了不同程度的小鳞茎中心褐化死亡现象,且比处理 48 h 严重得多。处理 120 h 死亡率为 57.14%,是 96 h 的 2 倍以上,而且相应的变异率降低。因此从存活和变异综合考虑,秋水仙素浸泡卷丹获得敏感植株的最佳时间为 96 h,处理时间延长不利于其成活(表 1)。

表 1 秋水仙素处理卷丹的诱变

Table 1 Induction of *Lilium lancifolium* treated by colchicine

处理时间 (h)	处理株数 No. of treated plants	死亡株数 No. of dead plants	死亡率 (%)	形态显著	
				变异植株 No. of plants with significant morphology variation	变异率 (%)
Treatment time	treated plants	dead plants	Death rate	with significant morphology variation	Mutation rate
24	30	0	0	0	0
48	27	2	3.70	8	29.63
72	30	5	16.67	14	46.67
96	35	9	25.71	19	54.29
120	28	16	57.14	10	35.71

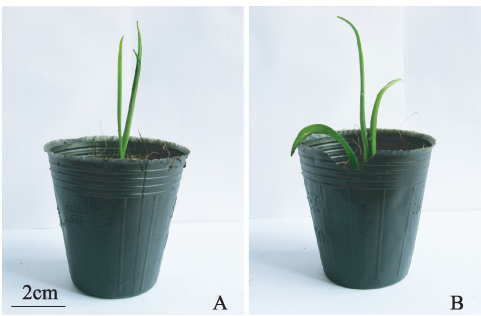
正常对照植株与秋水仙素处理后表型明显变异植株相比较,主要表现在叶片形态差异明显。通常正常对照植株叶片长披针形,较薄(图 1-A);而诱变处理后,植株出现叶片颜色加深、叶片表面粗糙、叶片增大、加厚、叶片肉质化、甚至有些畸形(图 1-B)等现象。待这些变异叶片生长到 1 cm 以上后,将叶片变异部分切下,置于继代培养基培养,使之脱分化出芽,对变异加以稳定(图 1-C)。将脱分化出的芽继代,使其生长出幼苗(图 1-D)。试验中通过上述方式共获得 4 株幼苗,这样的植株幼苗可以认为是疑似多倍化卷丹变异植株。对照植株与疑似多倍化植株在生根培养基中培养,对照植株生根较快,根系生长迅速,而疑似多倍化的植株分化能力弱,生长迟缓,很难生根。

2.3 卷丹诱变植株的叶片形态及气孔特征

经染色体数目鉴定确认为近似六倍体嵌合体的植株,在离体条件下进行扩繁和生根培养,炼苗移栽至草炭为基质的营养钵中,常规管理。15 d 后观测记录发现,4 个嵌合体株系幼苗表现比较一致。变异植株与对照植株相比叶长无明显差异,但变异植株的叶片宽度增加明显,叶形指数变小(表 3,图 3)。

表 3 诱变植株的叶片形态及气孔特征

	叶长 (cm)	叶宽 (cm)	叶形 指数	气孔长 (μm)	气孔宽 (μm)	气孔密度 (mm^2)
	Leaf length	Leaf width	Leaf index	Stoma length	Stoma width	Stoma density
对照	6.37 \pm 1.95	0.33 \pm 0.14	19.30	68.60 \pm 7.51	33.00 \pm 5.25	32
Control						
诱变植株	6.36 \pm 1.62	0.57 \pm 0.09	11.16	85.20 \pm 6.39	52.00 \pm 6.13	18
Variant plants						



A: 对照植株;B: 诱变植株;下同
A: Control plant, B: Mutant plant, the same as below

图 3 卷丹正常植株与诱变植株形态比较

Fig.3 Comparison of control and mutant plant of *Lilium lancifolium*

变异植株与对照植株相比气孔明显变大,但气孔变化在变异株系之间差异不大。变异植株气孔长度比对照平均增加 17 μm 、气宽度平均增加 19 μm ,但密度减少近 50% (表 3,图 4)。可见,叶形指数、气孔密度及气孔大小等特征在多倍体与对照植株之间差异比较明显,可以作为初步鉴别植物多倍体快速方法。

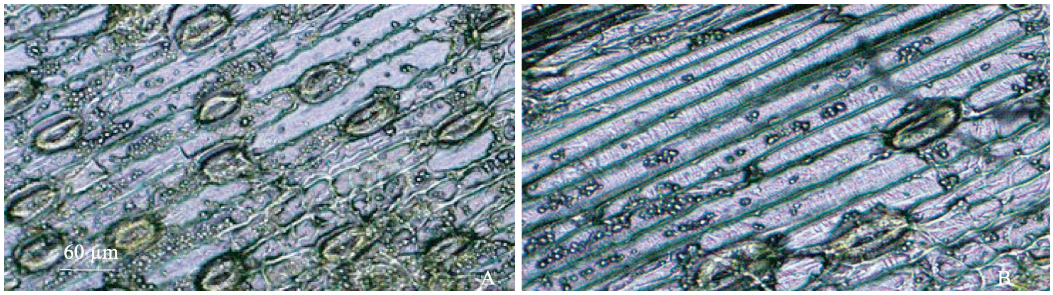


图 4 卷丹正常植株与诱变植株气孔特征比较

Fig.4 Stoma comparison of control and mutant plant of *Lilium lancifolium*

3 讨论

化学诱变和组织培养相结合对外植体进行加倍诱导,是获得园艺植物多倍体的有效方法,可以提高诱变率^[22]。近年来,在离体状态下利用秋水仙素诱导染色体加倍已经成为常见的诱变研究手段之一^[13-18,22-30]。在用秋水仙素处理诱导多倍体过程中,因细胞分裂不同步容易形成混倍体(或嵌合体),难以获得同质的多倍体^[23-25]。其中有的诱变结果全部为混倍体,如秋水仙素诱导离体培养越橘(*Vaccinium*),变异率达到 22.6%,诱变株系为二倍和四倍嵌合体^[27]。但多数诱变结果为不同倍性个体组成的群体,如秋水仙素诱导蝴蝶兰(*Phalaenop-*

sis hybrid)类原球茎 90 株再生苗中只检测出 8 棵染色体加倍苗,其中嵌合体的苗数有 2 棵^[28];君子兰(*Clivia miniata*)多倍体诱导得到四倍体、二倍体和混倍体植株^[22],有研究者认为利用不定芽诱导多倍体,较易获得同质的多倍体不定芽^[25],或对诱变后植物的丛生芽或愈伤组织进行连续切割转接,可大大降低常规诱变技术中产生嵌合体的比例^[29]。
园艺植物中无性繁殖植物的混倍体现象比较常见,可利用遗传型不同的细胞在嵌合体异层中的共存性,合成表层(第 1 层)抗病抗虫、内层(第 2 和第 3 层)优质的无性繁殖园艺植物,以解决抗病抗虫与优质的矛盾^[30]。在国产 21 个药用菊花(*Chrysan-*

themum morifolium)栽培类型中,普遍表现出不同程度的非整倍性^[31];牡丹月季品种为混倍体,包含三倍体、四倍体 2 种稳定核型^[32];梨(*Pyrus communis*)也有四倍体和六倍体的混倍体种质^[33]。

亚洲百合品种群(*Lilium Asiatic hybrids*)中有二倍和四倍嵌合体品种^[34],但百合属中其他品种类群中未见有嵌合体的报道。本试验材料为来自哈尔滨的卷丹,染色体数目分析显示该试验材料并非真正的三倍体,而是三倍体(36 条染色体 54.76%)、非整倍体和极少数单倍体细胞组成的嵌合体。诱变后获得的卷丹的嵌合体细胞中染色体数目多由 60~68 条中的不同比例构成,属于典型的非整倍的异倍型嵌合体,但已经接近 $2n=72$ 的六倍体的染色体数目。目前试验只初步稳定获得 4 个株系的幼苗,今后还要进一步做几代的稳定性观察工作,如果有稳定性类型出现,可以固定出新的种质;如果有部分植物嵌合体是不稳定的,在世代繁殖过程中会出现新的植株类型,从另一个侧面看对育种工作也是有益的。

参考文献

- [1] 汪发纛,唐进. 中国植物志:第 14 卷:百合科 [M]. 北京:科学出版社,1980:159-165
- [2] 柴春燕,胡东旭. 宜兴百合特性及高产栽培技术[J]. 广西园艺,2003(3):24-25
- [3] 车景超,丰杰,辛宁. 卷丹和百合化学成分与提取方法研究进展[J]. 时珍国医国药,2008,19(6):1500-1501
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:123
- [5] 高彦宁,周日宝,童巧珍,等. 不同来源百合中总皂苷元含量的比较研究[J]. 湖南中医药大学学报,2007,27(3):16-17
- [6] Noda S. Cytogenetic behavior, chromosomal differentiations, and geographic distribution in *Lilium lancifolium* (Liliaceae) [J]. Plant Spec Biol, 1986, 1(1):69-78
- [7] 杨利平,刘雪梅,张敦芳. 卷丹的细胞学研究[J]. 植物研究, 1997, 17(1):85-87
- [8] Kim J H, Kyung H Y, Choi Y S, et al. Geographic distribution and habitat differentiation in diploid and triploid *Lilium lancifolium* of South Korea [J]. Fac Agr Kyushu Univ, 2006, 51(2):239-243
- [9] Greplová M, Polzerová H, Domkářová J. Intra and inter specific crosses of *Solanum* materials after mitotic polyploidization in vitro [J]. Plant Breeding, 2009, 128(6):651-657
- [10] Khan N, Barba G R, Ramanna M S, et al. Relevance of unilateral and bilateral sexual polyploidization in relation to intergenomic recombination and introgression in *Lilium* species hybrids [J]. Euphytica, 2010, 171(2):157-173
- [11] 杨映红,张丽君,徐小强. 九丰一号金银花在水天地区的表现及栽培技术[J]. 农业科技通讯,2009(12):168-169
- [12] 张秋红,闫滨,王晓燕. 板蓝根及其倍体的研究概况[J]. 山东医药工业,2002,21(1):22-24
- [13] 黄济明. 百合的组织培养和试管内诱发多倍体试验[J]. 园艺学报,1983,10(2):125-127
- [14] 郑思乡,章海龙,董志渊,等. 东方百合多倍体诱导及种球繁育的研究[J]. 西南农业大学学报:自然科学版,2004,26(3):260-263
- [15] 何林,张洁,郭启高,等. 东方百合 Tiber 多倍体诱导及其快繁研究[J]. 西南农业大学学报:自然科学版,2006,28(6):945-949
- [16] 兰倩,杨利平. 麝香百合‘雪皇后’多倍体诱导[J]. 河北农业大学学报,2011,34(2):48-52
- [17] 连雪斌. 兰州百合多倍体诱导试验报告[J]. 甘肃农业科技, 1995(6):14-15
- [18] 张兴翠,周昌华,殷家明,等. 药用百合的多倍体诱导及快速繁殖[J]. 西南农业大学学报,2003,15(1):14-17
- [19] 杨英杰,葛蓓李,魏倩,等. 秋水仙素诱导细叶百合多倍体研究[J]. 中国农业大学学报,2013,18(1):128-133
- [20] 杨利平,宋晓红. 卷丹组培体系的构建[J]. 河北农业大学学报,2013,36(4):17-21
- [21] 李懋学,张敦芳. 植物染色体研究技术[M]. 哈尔滨:东北林业大学出版社,1991:31-58
- [22] 王冲,雷家军,邢桂梅,等. 君子兰未成熟胚四倍体诱导及染色体数鉴定[J]. 园艺学报,2011,38(7):1371-1376
- [23] 陈杰,周军,孙正海,等. 组织培养结合秋水仙素诱导滇杨多倍体的研究[J]. 云南农业大学学报,2013,28(2):251-256
- [24] 李正红,孙振元,彭镇华. 秋水仙素诱导地锦多倍体研究[J]. 核农学报,2005,19(6):430-435
- [25] 吴红芝,张锡庆,郑思乡,等. 彩色马蹄莲多倍体的诱导[J]. 园艺学报,2008,35(3):443-446
- [26] 朱雪云,陈利萍. 植物嵌合体的研究与应用[J]. 核农学报, 2010,24(6):1185-1191
- [27] 李晓艳,张志东,李亚东,等. 秋水仙素诱导离体培养越橘多倍体研究[J]. 东北农业大学学报,2010,41(1):38-42
- [28] 崔广荣,张子学,胡能兵,等. 蝴蝶兰类原球茎液体培养中用秋水仙素诱导多倍体[J]. 浙江大学学报:农业与生命科学版,2010,36(1):49-55
- [29] 刘进平,郑成木. 诱变结合植物组织培养在植物育种中的应用(综述)[J]. 上海农业学报,2004,20(1):19-22
- [30] 李明银,何云晓. 植物遗传嵌合体及其在观赏植物育种中的应用[J]. 植物学通报,2005,22(6):641-647
- [31] 王桃银,郭巧生,汪涛,等. 21 个药用菊花栽培类型的核型分析[J]. 南京农业大学学报,2012,35(6):13-18
- [32] 罗乐,张启翔,白锦荣,等. 16 个中国传统月季品种的核型分析[J]. 北京林业大学学报,2009,31(5):90-95
- [33] 孙清荣,孙洪雁,辛力,等. 梨多倍体化对离体叶片不定梢再生能力的影响[J]. 植物遗传资源学报,2012,13(1):134-137
- [34] Okazaki K, Hane Y. Comparison of diploid and chimeric forms ($4 \times / 2 \times$) of Asiatic hybrid lilies (*Lilium* spp.) under natural and early forcing culture[J]. New Zeal J Crop Hort Sci, 2005, 33(3):261-267