

# 京枣试管苗茎尖多倍体诱变研究

齐向英, 陈宗礼, 奚增军, 樊丽丽, 张向前, 任 宽

(延安大学 生命科学学院 陕西省红枣重点实验室(延安大学)陕西省区域生物资源保育与利用工程技术研究中心, 陕西 延安 716000)

**摘 要:**以京枣试管苗茎尖为试材,以秋水仙碱为诱变剂,通过在含不同浓度秋水仙碱的培养基中共培养来诱导京枣多倍体。结果表明:在含秋水仙碱 30 mg/L 的培养基中共培养 30 d 诱导率最高可达 36.67%。通过染色体观察确定变异植株染色体数目为 48 条。对照植株染色体数目为 24 条。四倍体植株气孔长度为 39.62  $\mu\text{m}$ 、宽度为 22.06  $\mu\text{m}$ 、气孔密度为 58.89 个/ $\text{mm}^2$ 、活体叶绿素平均含量为 11.71 spadr/ $\text{mm}^2$ ;分别为原二倍体植株的 1.546、1.662、0.636、2.366 倍。

**关键词:**京枣;试管苗;茎尖;秋水仙碱

**中图分类号:**S 665.103.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)23-0104-03

枣(*Ziziphus jujube* Mill.)为鼠李科(Rhamnaceae)枣属(*Ziziphus*)植物<sup>[1]</sup>,原产我国,是我国特色和优势果树。长期以来枣树的新品种选育工作仅限于从自然芽变中选取新、良品种。枣树人工新品种选育报道很少。多倍体(Polyploid)现象在植物中早已存在,而在枣树上迄今只发现一个自然三倍体品种<sup>[2]</sup>。枣树人工多倍体选育工作在近年来进展迅速,不断有报道出现,所用材料也十分广泛<sup>[3-8]</sup>,但通过试管苗幼茎诱变尚未见报道。组培快繁过程中枣树茎尖、特别是幼嫩茎尖十分丰富,取材十分方便,并且不影响快繁的进程。该研究目的是通过试管苗幼茎诱变多倍体,进一步丰富枣树多倍体育种方法,同时通过试管苗茎尖获得枣树试管多倍体。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

试验用材料为陕西省红枣重点实验室组织培养继代的京枣试管苗。将京枣试管苗在陈宗礼等<sup>[9]</sup>试验中筛选的枣树继代培养基(Cy4+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.2 mg/L+TDZ 0.01 mg/L,编号为 Z)中培养生长 25 d 后,取长度为 0.5 cm 的茎尖作为诱变处理材料。

第一作者简介:齐向英(1980-),男,陕西宝鸡人,硕士,讲师,研究方向为植物生物技术与植物遗传育种。E-mail:yd\_qixiangying@163.com。

责任作者:陈宗礼(1954-),男,陕西扶风人,本科,教授,硕士生导师,研究方向为植物遗传育种。E-mail:zongli\_chen@yahoo.com.cn。

基金项目:国家大学生文化素质基地资助项目(YDWH10-15);陕西省自然科学基金资助项目(2009JM3001-3);陕西省重点实验室专项资助项目(05JS39)。

收稿日期:2011-08-03

### 1.2 试验方法

1.2.1 诱变处理方法 将单个茎尖分别接入含秋水仙碱 10、30、50 mg/L 的 Z 培养基中,于培养的第 10、20、30 天分别抽取每个处理 30 个茎尖转入无激素培养基中培养备用。以无秋水仙碱的培养基为对照。

1.2.2 诱变试管苗分析 染色体分析:分别取诱变试管苗和对照二倍体植株试管苗茎尖,参考陈瑞阳等采用去壁低渗法<sup>[10]</sup>。气孔数量和大小分析:选取由茎尖向下 4 片展开的叶子作为材料采用透明胶布粘取法<sup>[11]</sup>。活体叶绿素含量分析:采用 SPAD-502 法<sup>[12]</sup>。

1.2.3 培养条件 光照时间 12 h/d、温度(24±1)℃、湿度(70%±5%)、光照强度 1 800 lx。

1.2.4 数据分析 数据依据统计学原理用 Excel2003 进行分析<sup>[13]</sup>。

## 2 结果与分析

经过秋水仙碱处理一段时间后,试验组的试管苗生长明显较慢。并且随处理时间的增加试验组的试管苗出现节间缩短、植株茎杆变粗、叶片皱褶程度增大、叶色浓绿等变化。

### 2.1 诱变结果

取每个处理对照苗和变异苗各 30 株,每株观察 30 个有效细胞分裂相,确定染色体数目(图 1、2),结果见表 1。在所有处理中除经过秋水仙碱 10 mg/L 培养 10 d 和 30 mg/L 培养 10 d 没有产生变异植株外,其它的处理均产生了变异植株。其中含秋水仙碱 10 mg/L 培养 20、30 d 和含秋水仙碱 50 mg/L 培养 10 d 产生的染色体数目分别为 24 条和 48 条的二四倍体的嵌合体。含秋水仙碱 10 mg/L 和 50 mg/L 的培养基中都产生嵌合体 2 株,诱变率最高的为含秋水仙碱 30 mg/L 培养 20 d,产生了 11 株多倍体(图 3),诱变率达到 36.67%。对照植株没有产生任何变异。

表 1 诱变结果

浓度 /mg · L <sup>-1</sup>	培养时间 /d	染色体数目			变异株数	变异率/%
		24 株数	24,48 株数	48 株数		
10	10	30				
	20	29	1		1	3.33
	30	28	1	1	2	6.67
30	10	30				
	20	20		10	10	33.33
	30	19		11	11	36.67
50	10	22	2	6	8	26.67
	20	28		2	2	6.67
	30	22		8	8	26.67
CK	10	30				
	20	30				
	30	30				

2.2 气孔数量和大小分析

变异植株和对照植株在气孔长度、气孔宽度和气孔数量上存在明显的差异(图 4、5),见表 2。变异植株的气孔长度平均值为 39.62 μm,为对照植株 25.62 μm 的 1.546 倍;变异系数 11.07 是变异植株 10.50 的 1.054 倍;说明气孔长度变异植株的变异度大于对照植株。气孔宽度变异植株为 22.06 μm,是对照植株 13.27 μm 的 1.662 倍,变异系数变异植株为 3.99,是对照植株 6.63 的 0.602 倍;说明气孔宽度性状变异植株变异程度小于对照植株。气孔数量变异植株为 58.89 个/mm<sup>2</sup>,是对照植株 92.66 个/mm<sup>2</sup> 的 0.636 倍;变异系数变异植株为 18.72,是对照植株 11.62 的 1.611 倍,说明变异植株气孔数量变化程度增大。

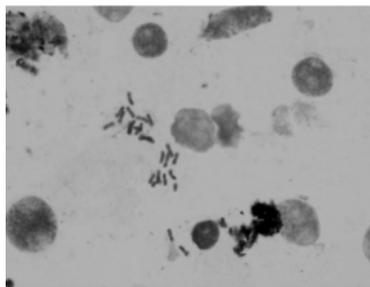


图 1 二倍体染色体数 24 条(100×10)

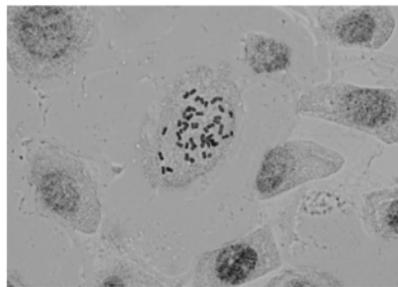


图 2 四倍体染色体数 48 条(100×10)



图 3 京枣四倍体与二倍体

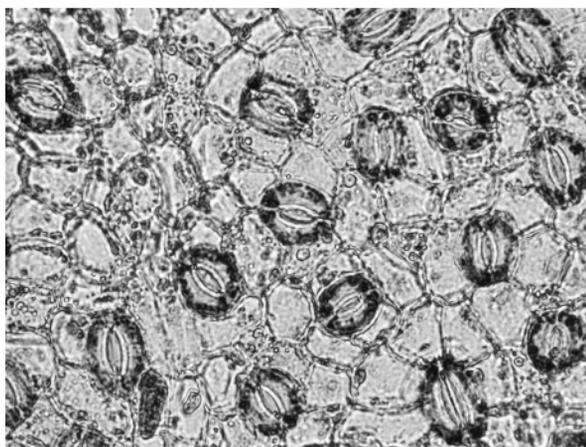


图 4 四倍体植株叶面气孔(40×10)

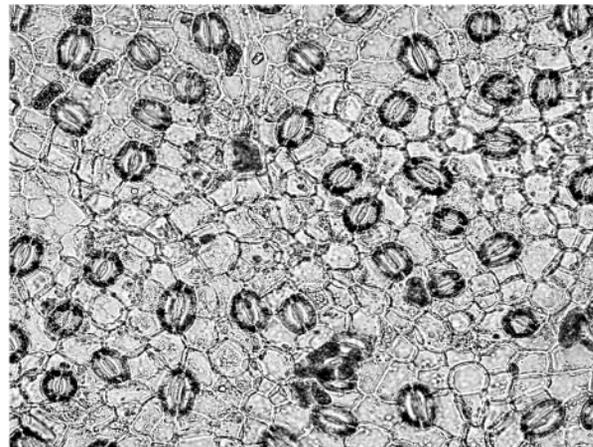


图 5 二倍体植株叶面气孔(40×10)

2.3 活体叶绿素含量

变异植株和对照植株活体叶绿素含量存在较大的差异。变异植株活体叶绿素含量为 11.71 spadr/mm<sup>2</sup>,是对照植株 4.95 spadr/mm<sup>2</sup> 的 2.366 倍,其变异系数

0.72 是对照植株 0.79 的 0.911 倍。说明变异植株叶绿素含量明显增加,并且叶绿素含量的变化程度小于对照植株。

表 2 变异植株和对照植株气孔数量、长宽度及活体叶绿素含量比较

	气孔长度	变异系数 (CV)	气孔宽度	变异系数 (CV)	气孔密度	变异系数 (CV)	叶绿体含量 /spadr · mm <sup>-2</sup>	变异系数 (CV)
变异植株	39.62	11.07	22.06	3.99	58.89	18.72	11.71	0.72
对照植株	25.62	10.50	13.27	6.63	92.66	11.62	4.95	0.79
变异幅度	1.546	1.054	1.662	0.602	0.636	1.611	2.366	0.911

### 3 讨论与结论

诱变过程中材料对秋水仙碱浓度和作用时间反应各不相同。刘贵仁等<sup>[3]</sup>通过金丝小枣愈伤组织培养获得的同源四倍体最早报道获得的枣树同源四倍体。其后通过秋水仙碱用不同材料诱导出多种枣树的同源四倍体。严仁玲等<sup>[4]</sup>用枣树组培苗通过秋水仙碱诱导出金丝小枣的同源四倍体,并发现用0.4%的秋水仙碱浸泡48 h诱变率可达到22.5%,同时成活率达到了64.5%。蒋洪恩等<sup>[5]</sup>在大田以冬枣、临猗梨枣和辣椒枣1 a生嫁接苗为试材,研究发现0.15%秋水仙碱处理茎尖18 h,临猗梨枣诱变率可达50%;0.1%秋水仙碱处理30 h冬枣的诱变率达到43.3%;0.15%处理18 h辣椒枣的诱变率最高可达43.3%。并且在辣椒枣中还发现了染色体数为 $2n=2x+2=26$ 及DNA含量为八倍体的细胞。王娜等<sup>[6]</sup>用组培苗丛生芽和茎段诱导出了冬枣和酸枣四倍体,并对不同的诱变方式做了研究。发现酸枣和冬枣丛生芽在含50 mg/L秋水仙素的MS培养基混培处理40 d,诱变频率分别为36.67%和26.67%;酸枣茎段在含0.4%的秋水仙素溶液处理4 d诱变频率为23.33%;冬枣茎段在同浓度的秋水仙碱溶液中处理为2 d诱变率为16.67%。齐向英等<sup>[7]</sup>通过茎段诱变获得了狗头枣、骏枣和木枣的同源四倍体,其中狗头枣用秋水仙碱10 mg/L处理45 d或50 mg/L处理30 d,诱变率均为33.3%;骏枣为秋水仙碱30 mg/L、处理30 d,诱变率为40.0%;木枣为秋水仙碱30 mg/L、处理45 d,诱变率可达46.7%。

诱变后材料的鉴定一般采用的为染色体鉴定、气孔鉴定、叶绿素含量鉴定以及核酸含量和茎尖分生层细胞大小几个方面<sup>[14]</sup>。张晓芬等<sup>[15]</sup>研究了辣椒染色体倍性与气孔性状的相关性,指出随着辣椒染色体倍性的提高,叶面气孔密度呈明显下降趋势,叶面的气孔密度、保卫细胞叶绿体数、保卫细胞横径可作为鉴定染色体细胞的有效依据。戴洪义等<sup>[16]</sup>对二、四倍体葡萄细胞内叶绿体数量进行比较发现,四倍体气孔保卫细胞内叶绿体的数量是二倍体的2倍。陈佰鸿等<sup>[11]</sup>用透明胶带粘取叶片表皮观察气孔的方法,这种方法简

单快捷,并且有很清楚的显示气孔的效果。齐向英等<sup>[17]</sup>通过对比研究发现该方法可直接测取活体叶绿素含量,简便快捷,可用于枣树叶绿素相对含量的测定。

该试验以京枣试管苗茎尖为材料,通过秋水仙碱处理诱导出二四倍体的嵌合体,变异幅度较高,同时在活体叶绿素含量、气孔长度和大小上诱变前后都存在明显变异。该试验结果验证了其它人的结果。

### 参考文献

- [1] 曲泽洲,王永惠.中国果树志·枣卷[M].北京:中国林业出版社,1993.
- [2] 曲泽洲,王永惠,温陟良.三倍体赞皇大枣的核型研究[J].河北果树,1990(4):23-25.
- [3] 刘贵仁,严仁玲,张磊,等.金丝小枣愈伤组织诱导植株再生及染色体变异的研究[J].天津农学院学报,1995,2(1):1-8.
- [4] 严仁玲,刘仁贵,张磊.离体诱导同源四倍体金丝小枣的研究[J].天津农学院学报,1996,3(1):1-4.
- [5] 蒋洪恩,刘孟军.秋水仙素诱导枣多倍体的研究[J].园艺学报,2004,31(5):647-650.
- [6] 王娜,刘孟军,代丽.秋水仙碱离体诱导冬枣和酸枣四倍体[J].河北农业大学学报,2005(5):132-137.
- [7] 齐向英.枣树组织培养诱变育种研究[D].延安:延安大学,2007.
- [8] 宁强,刘孟军,刘晓光,等.枣愈伤途径诱导多倍体[J].河北农业大学学报,2008,31(1):29-32.
- [9] 陈宗礼,延志莲,齐龙.枣叶片离体培养再生植株[J].植物生理学通报,1996(1):27-28.
- [10] 陈瑞阳,李懋学.关于植物核型分析的标准化问题[J].武汉植物学研究,1985(4):297-302.
- [11] 陈佰鸿,李新生,曹孜义.一种用透明胶带粘取叶面表皮观察气孔的方法[J].植物生理学通讯,2004,40(2):215-218.
- [12] 王娟,韩登武,任岗,等.SPAD值与棉花叶绿素和含氮量关系的研究[J].新疆农业科学,2006,43(3):167-170.
- [13] 吴权威,吕琳琳.Excel统计应用实务[M].北京:中国水利水电出版社,2004.
- [14] 郑永强,徐坤.秋水仙素在植物体细胞染色体加倍中的应用研究进展[J].中国农学通报,2003,19(5):89-9.
- [15] 张晓芬,耿三省,陈斌.辣椒染色体倍性与气孔性状的相关性[J].江苏农业学报,2009,25(2):339-342.
- [16] 戴洪义,孙敏,商传明,徐步玲.葡萄的染色体倍性与气孔性状的关系及其差别分析[J].葡萄栽培与酿酒,1990(2):5-9.
- [17] 齐向英,樊丽丽,赵鹏飞,等.枣树品种试管苗叶绿素含量分析[J].湖北农业科学,2009,48(10):2473-2475.

## Study on Polyploid Mutation in Jingzao Jujube with *in vitro* Shoot-tips

QI Xiang-ying, CHEN Zong-li, XI Zeng-jun, FAN Li-li, ZHANG Xiang-qian, REN Kuan

(College of Life Science, Yanan University, Shaanxi Key Laboratory of Chinese Jujube (Yanan University), Shaanxi Engineering and Technological Research Center for Conversation and Utilization of Regional Biological Resources, Yan'an, Shaanxi 716000)

**Abstract:** Taking Jingzao jujube *in vitro* shoot-tips as material, colchicine as a mutagen and at the same time culture to studied on polyploid mutation. The results showed that with colchicine 30 mg/L culture medium of cultured for 30 days, induced the highest rates was 36.67%. The chromosome observations for 48 tetraploid and the original diploid group were 24. Tetraploid plants stomatal length 39.62  $\mu\text{m}$ , width of 22.06  $\mu\text{m}$ , density of 58.89/ $\text{mm}^2$ ; were the original diploid plant 1.546 times, 1.662 times, 0.636 times and 2.366 times.

**Key words:** Jingzao jujube; *in vitro* plant; stem tip; colchicine