

核桃多倍体诱导技术研究

刘喜星¹, 顾玉红², 李保国¹, 齐国辉¹, 张雪梅¹, 施丽丽¹

(1. 河北农业大学 林学院, 河北 保定 071000; 2. 河北农业大学 生命科学院, 河北 保定 071000)

摘要:以‘绿岭’核桃种子、1 a 生‘绿岭’核桃实生苗的新梢、5 a 生采穗圃的‘绿岭’核桃新梢为试材, 通过不同浓度的秋水仙素和不同时间的处理对核桃进行多倍体诱导, 并用流式细胞仪进行倍性鉴定。结果表明: 幼苗茎尖浸润法、新梢掐茎尖浸润法、种仁浸泡法、胚浸泡法、刺激隐芽法、刺激腋芽法处理后变异率均为 0%, 幼苗掐茎尖浸润法处理后, 1.0% 的秋水仙素溶液处理 8 d 的 30 株幼苗中有 4 株变异, 变异率为 13.3%。对叶片明显变大、变厚, 叶色变深, 叶片变皱的植株进行倍性鉴定表明, 1 株是四倍体, 3 株是混倍体。

关键词:核桃; 秋水仙素; 多倍体诱导; 倍性鉴定

中图分类号:S 664.103.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)02-0113-04

核桃为胡桃科核桃属落叶乔木, 又名胡桃, 与扁桃、腰果、榛子并称为世界四大干果^[1]。核桃在我国分布广泛, 其面积和产量均居世界首位^[2]。虽然近年来陆续选育了不少新品种, 但是, 缺乏综合性状优良的品种, 因此, 需不断培育优良品种。

多倍体植株表现生长健壮、抗逆力增强、果实增大以及维生素、氨基酸和其它营养物质含量提高。据报道, 多倍体诱导在葡萄、杜仲、香蕉、柿、枣、西瓜^[3-8]等植物上已经取得了成功。然而, 尚未见核桃多倍体诱导的研究报道。为开展核桃多倍体育种技术研究, 以不同浓度、不同处理时间和不同处理方法研究了秋水仙素的浓度和时间诱导多倍体核桃植株的效果。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料分别为‘绿岭’核桃种子、1 a 生‘绿岭’核桃实生苗的新梢、5 a 生采穗圃的‘绿岭’核桃新梢。

1.2 试验方法

1.2.1 生长点浸润法 幼苗茎尖浸润法: 成熟的‘绿岭’核桃种子经浸种催芽后, 播种于室内的营养钵内。当幼苗生长至 3~4 cm 时, 将蘸有秋水仙素溶液的脱脂棉小球放在生长点上, 每天 8:00 和 18:00 各滴秋水仙素溶液

1 次, 滴后盖上塑料薄膜, 保持脱脂棉湿润, 以药液浸透而不滴落为准。秋水仙素处理浓度分别为 0%、0.1%、0.2%、0.4%、0.6%、0.8% 和 1.0%, 处理时间分别为 1、2、3、4 和 5 d, 采用随机区组设计, 10 株为 1 个小区, 3 次重复。幼苗掐茎尖浸润法: 成熟的‘绿岭’核桃种子经浸种催芽后, 播种于室内的营养钵内, 当幼苗长出后, 掐掉一部分茎尖刺激下部产生萌蘖, 将蘸有秋水仙素溶液的脱脂棉小球放在断茎处, 其它处理同幼苗茎尖浸润法。秋水仙素处理浓度分别为 0.0%、0.8%、1.0% 和 1.2%, 处理时间分别为 6、8 和 10 d, 采用随机区组设计, 10 株为 1 个小区, 3 次重复。新梢掐茎尖浸润法: 当 1 a 生‘绿岭’实生苗长出新梢(长 15 cm 左右时)后, 掐掉茎尖, 将蘸有秋水仙素溶液的脱脂棉(棉球重 0.02 g)小球放在断茎上, 每天 8:00 和 18:00 各滴秋水仙素溶液 1 次, 滴后在新梢上套上白色和黑色塑料袋, 苗木上面再搭一个遮阳网, 保持脱脂棉湿润, 以药液浸透而不滴落为宜。秋水仙素处理浓度分别为 0%、0.8%、1.0% 和 1.2%, 处理时间为 8 d, 采用随机区组设计, 10 个新梢 1 个小区, 3 次重复。

1.2.2 种子浸泡法 种仁浸泡法: 将成熟的‘绿岭’核桃种子剥去硬壳, 在 20~25℃ 清水中浸泡 3 d 后, 转移至不同浓度的秋水仙素溶液中浸泡 15 min, 捞出后放于干净的瓷盘中, 用湿润纱布 5~6 层覆盖保湿, 置于 20~25℃ 避光条件下培养, 间隔 12 h 重新用原来处理浓度的秋水仙素溶液中浸泡 15 min, 根据试验设计处理 4~10 次, 将处理后的核桃种仁种在营养钵内, 置于光照培养箱中。处理浓度分别为 0%、0.4%、0.8%、1.2% 和 1.4%, 处理次数分别为 4、6 和 10 次, 每处理 30 个种仁。胚浸泡法: 将秋水仙素分别配成 0%、0.4%、0.6%、0.8% 共 4 个浓度, 在超净工作台里抽滤灭菌后, 将去掉子叶的核桃(2011.7.1 采的青皮核桃)胚浸入其中, 在摇床上震荡处

第一作者简介:刘喜星(1986-), 女, 河北保定人, 在读硕士, 现从事经济林栽培生理研究工作。E-mail: liuxixing1234@126.com。

责任作者:李保国(1958-), 男, 河北武邑人, 教授, 博士生导师, 现从事经济林栽培生理与山区开发技术研究及经济林栽培教学工作。E-mail: lbg888@163.com。

基金项目:河北省“十二五”重点科技支撑计划资助项目(11230115D); 国家林业公益性行业科研专项资助项目(201004093)。

收稿日期:2011-11-17

理时间为 2、3 和 4 d。然后将处理后的种胚用 75%酒精消毒 30 s,再用无菌水冲洗 3 次,用滤纸吸干水分后接种到 MS 培养基上。每天观察 1 次,记录生长情况。每处理分别接入 10 个种胚,3 次重复。

1.2.3 芽诱导法 刺激隐芽法:掰去采穗圃苗木上的新梢,将蘸有秋水仙素溶液的脱脂棉(棉球重 0.05 g)小球放在伤口上,每天 8:00 和 18:00 各滴秋水仙素溶液 1 次,滴后在苗木上套上白色和黑色塑料袋,苗木上面再搭一个遮阳网,保持脱脂棉湿润,以药液浸透而不滴落为宜。秋水仙素处理浓度分别为 0.0%、0.8%、0.9%、1.0%、1.1%和 1.2%,处理时间 8 d,采用随机区组设计,10 个新梢 1 个小区,3 次重复。刺激腋芽法:剪去采穗圃新梢的茎尖部分,将蘸有秋水仙素溶液的脱脂棉(棉球重 0.03 g)小球放在叶柄的叶腋内,每天 8:00 和 18:00 各滴秋水仙素溶液 1 次,以后处理同刺激隐芽法。采用随机区组设计,10 个腋芽 1 个小区,3 次重复。

1.2.4 形态学观察 以正常二倍体植株为对照,将真叶叶片明显变大、变厚、变绿、变皱植株记为变异株,进行调查统计。

1.2.5 流式细胞仪鉴定 取植株(包括对照和变异株)上层新鲜叶片 1 g,分别在 2 mL 细胞裂解液(0.18% Tris, 0.74% Na₂ EDTA, 0.01% Spermine, 5.8% KCl, 0.1% Triton X-100)中,用锋利的刀片切碎、过滤、收集滤液,经 800 r/min 离心 5 min 后,用 PI(Propidium iodide 碘化丙啉, 50 μg/mL)染液对细胞核 DNA 进行荧光标记,置于暗处 30 min 后,用流式细胞仪进行植株倍性鉴定。上样后流式细胞仪自动形成代表该样品倍性的 DNA 含量分布图。采用美国 BD 公司的 FACSCalibur 流式细胞仪(flow cytometry)对变异叶片和正常二倍体叶片进行倍性检测。使用 Mod Fit 软件(YeritySoftware House 公司)分析结果。

2 结果与分析

2.1 生长点浸润法的诱变效果

秋水仙素不同浓度和不同处理时间的幼苗茎尖浸润结果表明,幼苗茎尖浸润法处理后的植株除 0.1%秋水仙素处理 4 d、0.6%秋水仙素处理 4 d 的死亡率均为 3.3%,0.8%秋水仙素处理 4 d、1.0%秋水仙素处理 4 d 的死亡率均为 10.0%,其它处理的死亡率都是 0%。该方法处理后叶片有畸形现象,但是没有变异植株产生,可能是秋水仙素浓度太低或作用于茎尖的时间不够长,细胞还能按正常的方式分裂;也可能是核桃生长太快,细胞分裂还没有受到抑制就长起来了。因此,应该采取加大剂量、加长时间和抑制核桃生长的措施进行诱导。

由表 1 可看出,幼苗掐茎尖浸润法处理后随着秋水仙素浓度的升高和处理时间的延长,植株死亡率呈上升趋势,秋水仙素浓度为 1.2%,处理时间为 10 d 时,死亡

率达到 20.0%;而秋水仙素浓度为 1.2%、处理时间为 8 d 时,叶片有褶皱和变大的现象,变异率为 13.3%,死亡率为 6.7%。当浓度和时间再增加时,处理苗的存活率降低,有些存活苗茎段干枯后基部萌发不定芽,所以植株的变异率也很低。

幼苗茎尖浸润法和幼苗掐茎尖浸润法处理后,核桃幼苗生长受到抑制。约经过 2~4 周后有些幼苗最终能长出新芽和真叶,有些幼苗整个干枯死亡,有些茎段干枯,从基部长出 2~3 个新梢。1 a 生新梢经处理后,新梢顶端部分干枯,中部和下部叶腋间长出腋芽并发育成正常新梢。

表 1 秋水仙素不同浓度和处理时间幼苗掐茎尖浸润的诱导结果

Table 1 The inductive effect of colchicine with different concentration and different treated time infiltrated the seedlings stem tip by top-pinching

秋水仙素浓度 Colchicine concentration /%	处理 时间 time/d	处理数 Number of treated plant /株	死亡数 Number of dead plant /株	死亡率 Death rate /%	变异数 Number of variation /株	变异率 Variation rate /%
0	6	30	0	0	0	0
0	8	30	0	0	0	0
0	10	30	0	0	0	0
0.8	6	30	0	0	0	0
0.8	8	30	0	0	0	0
0.8	10	30	1	3.3	0	0
1.0	6	30	0	0	0	0
1.0	8	30	2	6.7	4	13.3
1.0	10	30	2	6.7	0	0
1.2	6	30	3	10.0	0	0
1.2	8	30	5	16.7	0	0
1.2	10	30	6	20.0	0	0

秋水仙素不同浓度和处理时间的 1 a 生新梢掐生长点后浸润的诱导结果表明,1 a 生新梢处理后的成活率为 100%,但是没发生变异。这可能与秋水仙素的处理时间和处理剂量有关,也可能是处理部位不到位。此种方法有待于进一步探讨。综上所述,以上 3 种处理方法中,只有幼苗掐茎尖浸润法处理后,1.0%的秋水仙素溶液处理 8 d 的植株产生了变异,诱导效果较好。

2.2 种子浸泡法的诱变效果

秋水仙素不同浓度和处理时间对种仁浸泡的诱导结果表明,用秋水仙素处理的种仁死亡率为 100%,用水处理的死亡率为 33.3%。种仁浸泡法处理后,用秋水仙素溶液泡 4~6 次的种仁播种后 2 d 种仁发霉,泡 10 次的播种之前发霉。这可能是秋水仙素毒性太大、处理浓度和时间不合适的原因。由表 2 可知,用 0.4%和 0.8%的秋水仙素溶液处理胚后,1 个都没有转绿,只有 0.6%处理 2、3 和 4 d 的胚分别转绿了 3 个、4 个、3 个,但是 1 个月没有长叶,仅仅 0.6%处理 2 d 的长了 1 条主根。死亡率高可能是因为胚是完全裸露的,直接与秋水仙素接触,受毒害比较重。

表2 秋水仙素不同浓度和处理时间
胚浸泡的诱导结果Table 2 The inductive effect of colchicine with different
concentration and treated time immersed the embryo

秋水仙素浓度 Colchicine concentration	处理 时间 Treated time/d	处理数 Number of treated plants /个	死亡数 Number of dead plants /个	死亡率 Death rate /%	变异数 Number of variation /个	变异率 Variation rate /%
0	2	30	2	6.7	0	0
0	3	30	0	0	0	0
0	4	30	0	0	0	0
0.4	2	30	30	100.0	0	0
0.4	3	30	30	100.0	0	0
0.4	4	30	30	100.0	0	0
0.6	2	30	27	90.0	0	0
0.6	3	30	24	80.0	0	0
0.6	4	30	27	90.0	0	0
0.8	2	30	30	100.0	0	0
0.8	3	30	30	100.0	0	0
0.8	4	30	30	100.0	0	0

2.3 芽诱导法的诱变效果

不同浓度秋水仙素处理8 d刺激‘绿岭’核桃腋芽的诱导效果表明,0.0%、0.8%、0.9%、1.0%、1.2%、1.4%处理的死亡芽数依次为4、7、9、10、11和12个,死亡率依次为13.3%、23.3%、30.0%、33.3%、36.7%和40.0%,随着秋水仙素浓度的上升,腋芽的死亡数呈上升趋势。不同浓度秋水仙素处理8 d刺激‘绿岭’核桃隐芽的诱导效果表明,0.0%、0.8%、0.9%、1.0%、1.2%和1.4%处理的死亡芽数依次为3、10、11、11、13和14个,死亡率依次为10.0%、33.3%、36.7%、36.7%、43.3%和46.7%,随着秋水仙素浓度的上升,隐芽的死亡数呈上升趋势。腋芽和隐芽萌发新梢后,叶片没有多大变化。

2.4 多倍体的倍性鉴定

对形态上明显变异的植株,采用流式细胞仪进行了细胞DNA含量测定和分析。图1~3中纵坐标Number值代表测定细胞数的相对值,横坐标Channel值代表荧光的通道值,峰值的通道位置反映的是测试样品的倍性。流式细胞仪倍性结果分析见图1~3,对照二倍体植株主峰荧光强度位于50左右(图1),有的变异株主峰荧光强度位于约100左右(图2),其值约为对照的2倍,说明变异株细胞DNA含量为对照植株的2倍,为四倍体

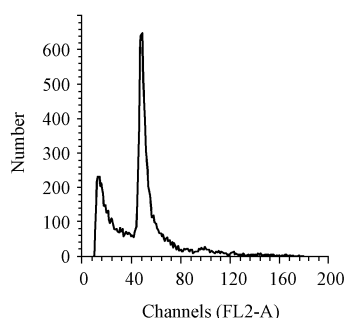


图1 二倍体细胞DNA含量分布图

Fig. 1 The DNA distribution of diploid cell

植株;有的变异株主峰荧光强度位于50和100左右(图3),这样的变异株为混倍体植株。其中混倍体是指同一叶片是由二倍体、四倍体这2种倍性的细胞组成,且混倍体中的二倍体细胞占大部分,而四倍体细胞占少部分。由流式细胞仪鉴定的结果可知,1.0%的秋水仙素溶液处理8 d的4株变异株中1株是四倍体,3株是混倍体。

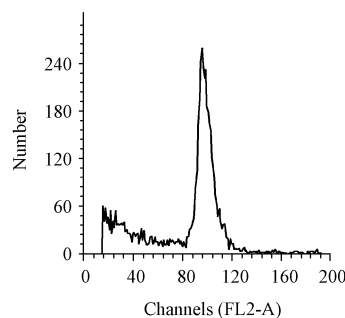


图2 四倍体细胞DNA含量分布图

Fig. 2 The DNA distribution of tetraploid cell

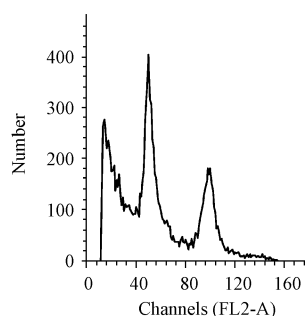


图3 混倍体细胞DNA含量分布图

Fig. 3 The DNA distribution of mixoploidy cell

3 讨论与结论

人工诱导多倍体是获得植物新类型或新种质的重要途径之一。迄今为止,人工诱导多倍体的最有效药剂是秋水仙素,成功的诱导方法主要有浸渍法^[9]、滴生长点法^[10]、组织培养^[11]等。该研究采用的方法中只有幼苗掐茎尖浸润法使植株产生了变异,这就说明不同的树种生长特性不同,多倍体的有效诱导方法也不同,核桃的多倍体诱导的有效方法为幼苗掐茎尖浸润法。

秋水仙素有效浓度和处理时间是诱导多倍体成功的关键。人们多采用低浓度的秋水仙素进行多倍体诱变。贾美丽等^[3]在葡萄多倍体诱导的初步研究中,利用不同浓度的秋水仙素溶液处理葡萄花药、花丝诱导愈伤组织基础上产生的胚状体及幼苗,获得了葡萄多倍体试管苗,其中以0.05%的秋水仙素溶液处理胚状体48 h和0.1%的秋水仙素溶液处理幼苗96 h加倍效果尤为显著,分别达到了16%和60%。张海凤等^[4]在杜仲四倍体的诱导与鉴定中,以杜仲籽苗为材料,采用秋水仙素溶液处理生长点的诱变方法,得出最佳处理组合为0.1%秋水仙素处理生长点12 h,变异株率和四倍体株率分别为63.3%和36.7%。胡玉林等^[5]在秋水仙素诱导

GCTCV-119 香蕉多倍体研究中,分别采用 0.05、0.10、0.20 和 0.40 g/L 秋水仙素对 GCTCV-119 组培苗单个茎尖进行不同时间(1、2、3 和 4 d)的诱导处理表明,以 0.2%的秋水仙素溶液处理 1 d 的诱导效果最好,其诱导率为 33.3%。

该研究利用不同的方法、不同浓度的秋水仙素溶液进行不同时间处理,发现浓度越高时间越长,对材料的伤害越大,死亡率越高,而浓度过低时间过短,诱导效果不佳。在幼苗掐茎尖的秋水仙素诱导法中,尤以 1.0%处理 8 d 的诱变效果最好,诱导结果有混倍体和四倍体。但由于该研究所设浓度和时间处理只是初步探索,诱导率也不高,最佳处理组合需要进一步的研究。

多倍体鉴定的方法有根尖压片染色体计数法、保卫细胞长度测量法、气孔保卫细胞叶绿体计数法等^[12-14]。这些方法不仅费时,技术难度较大,而且不易准确把握细胞所处的易于观察的分裂期。但是利用流式细胞仪检测细胞的 DNA 含量,它不仅可准确地测定细胞是否进行了染色体加倍,而且还可测定染色体加倍和未加倍的细胞数目,从而确定是否为倍性嵌合体,因此近年来越来越多地被采用^[15-19]。此外,该方法不受植物体取材部位和细胞所处时期的限制,取材部位可以是叶片、茎、根、花、果皮、种子等,它的可操作性比染色体计数好。该研究中诱导出的变异株较少,利用流式细胞仪进行了鉴定,确实是一种简单易行并且又准确的方法。

参考文献

- [1] 张毅萍.世界及我国核桃生产概况和几个问题[J].林业科技与市场信息,2002(3):52-55.
- [2] 梅立春,郭春会,刘林强.中美核桃业之差距与对策[J].西北农林科技大学学报,2002,30(4):79-82.
- [3] 贾美丽,王飞,贾爱平,等.秋水仙素诱导葡萄风信子多倍体的研究[J].西北农业学报,2011,20(1):114-118.
- [4] 张海凤,郭宝林,张成合,等.杜仲四倍体的诱导与鉴定[J].园艺学

报,2008,35(7):1047-1052.

- [5] 胡玉林,谢江辉,郭启高,等.秋水仙素诱导 GCTCV-119 香蕉多倍体[J].果树学报,2006,23(3):462-464.
- [6] 谷晓峰,罗正荣.秋水仙素处理‘罗田甜柿’获得 12 倍体再生植株[J].园艺学报,2003,30(3):325-327.
- [7] 王娜,刘孟军,代丽,等.秋水仙素离体诱导冬枣和酸枣四倍体[J].园艺学报,2005,32(6):1008-1012.
- [8] 施先锋,彭金光,王宏太,等.秋水仙素诱导西瓜多倍体的研究[J].长江学报,2010(8):17-19.
- [9] 郑君强,陈露薇,罗筱玉,等.金柑多倍体诱导初探[J].亚热带农业研究,2005,1(4):17-20.
- [10] 付金娥,覃斯华,李天艳,等.秋水仙素诱变薄皮甜瓜同源四倍体研究[J].中国瓜菜,2008(2):11-15.
- [11] 周堂英,李惠波,向素琼,等.粉葛组织培养及同源四倍体诱导[J].中草药,2005,36(8):1230-1233.
- [12] 武晓阳,孟义江,袁静娅,等.乌拉尔甘草四倍体的离体诱导及倍性鉴定[J].河北农业大学学报,2008,31(4):18-21.
- [13] Ikko Shiga, Yuichi Uno, Michio Kanechi, et al. Identification of polyploidy of *in vitro* anther-derived shoots of *Asparagus officinalis* L. by flow cytometric analysis and measurement of stomatal length[J]. J. Japan. Soc. Hort. Sci., 2009,78(1):103-108.
- [14] 周玉丽,任士福,张成合.连翘多倍体诱导与鉴定[J].河北农业大学学报,2011,34(1):73-77.
- [15] 范国强,杨志清,曹艳春,等.毛泡桐同源四倍体的诱导[J].植物生理学通报,2007,43(1):109-111.
- [16] 马爱红,范培格,孙建设,等.四倍体葡萄诱导技术的研究[J].中国农业科学,2005,389(8):1645-1651.
- [17] 张振超,张蜀宁,张伟,等.四倍体不结球白菜的诱导及染色体倍性鉴定[J].西北植物学报,2007,27(1):28-32.
- [18] 杨晓伶,程舟,李珊,等.秋水仙素诱导文旦柚 2n 配子获得自交三倍体[J].园艺学报,2006,33(5):1045-1047.
- [19] Nobuo Kobayashi, Sachiko Yamashita, Katsumi Ohta, et al. Morphological characteristics and their inheritance in colchicine-induced salvia polyploids[J]. J. Japan. Soc. Hort. Sci., 2008,77(2):186-191.

(该文作者还有孙萌、牛宝清,工作单位河北农业大学林学院;张占芳,工作单位河北农业大学生命科学院。)

Study on Polyploid Induction Technique of Walnut

LIU Xi-xing¹, GU Yu-hong², LI Bao-guo¹, QI Guo-hui¹, ZHANG Xue-mei¹, SHI Li-li¹, SUN Meng¹, NIU Bao-qing¹, ZHANG Zhan-fang²
(1. College of Forestry, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071000; 2. College of Life Science, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071000)

Abstract: The ‘Lvling’ walnut seeds, the annual ‘Lvling’ walnut seedling shoots and 5 years old ‘Lvling’ walnut scion nursery shoots were used as materials to induct polyploid plants by different colchicine solution concentrations and different treated time, the materials were identified by flow cytometry. The results showed that the variation rates were 0% respectively with the methods of shoot apex infiltration, shoot top-pinching infiltration, seeds kernel immersion, embryo immersion, kryptoblast stimulation and stimulating axillary bud stimulation; with the method of seedlings top-pinching infiltration, there were 4 varied plants in 30 seedlings after infiltrated with 1.0% colchicine solution for 8 d, and the variation rate was 13.3%. The plants whose leaves were notably larger, thicker, darker and wrinkled than that of normal were identified, the result showed that 1 plant was tetraploid, 3 plants were mixoploidy.

Key words: walnut; colchicine; polyploid induction; chromosome identification