

DOI:10.11937/bfyy.201702005

秋水仙素处理对芦笋“达宝利” 四倍体诱导效果的影响

鹿志伟^{1,2}, 侯晓婉¹, 高建明³, 张燕梅^{1,2}, 周文钊^{1,2}, 易克贤⁴

(1. 中国热带农业科学院 南亚热带作物研究所, 广东 湛江 524091; 2. 湛江市热带作物遗传改良重点实验室, 广东 湛江 524091;
3. 中国热带农业科学院 热带生物技术研究所, 海南 海口 571101; 4. 中国热带农业科学院 环境与植物保护研究所, 海南 海口 571101)

摘 要:以芦笋“达宝利”露白种子为试材,秋水仙素(添加2% DMSO)处理浓度和处理时间作为诱导因子,设计多个梯度的正交实验,研究秋水仙素对芦笋四倍体诱导率的影响,以期获得最佳的芦笋多倍体诱导条件。结果表明:最佳的秋水仙素处理组合为0.15%的秋水仙素(添加2% DMSO)处理16 h,诱导率高达28.33%;经鉴定发现二倍体芦笋的染色体数目为20条,而四倍体染色体数目为40条;与二倍体相比,四倍体芦笋植株粗壮、叶片长度和直径增加,气孔细胞密度减少,气孔细胞体积增大,叶绿体数目和叶绿素含量增加。

关键词:芦笋;四倍体;秋水仙素;诱导;育种

中图分类号:S 644.603.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)02-0023-08

芦笋(*Asparagus officinalis* L.)属百合亚目天门冬科多年生草本植物^[1]。作为世界十大名贵蔬菜之一,其地上可食用茎部分具有低热量、味道鲜美、质感脆嫩、富含多种营养物质以及活性成分等优点,深受国内外人士所喜爱^[2]。但是随着国内外市场对芦笋需求量的日益增加,以及芦笋生产上茎枯病、根腐病以及其它病虫害和种植模式的不合理等问题的出现,导致目前芦笋逐渐出现了供不应求的现象,抗病、高产新品种的培育已迫在眉睫。

多倍体即含有2组或者2组以上同源染色体组的生物个体^[3],多倍体植物与二倍体相比具有植株更加粗壮,营养含量增加,抗逆性增强等优势^[4-7]。多倍体诱导常用的方法即化学诱变,主要的诱变剂有氨磺乐灵、秋水仙素、除草剂、生物碱等,其中秋水仙素是众多诱变剂中诱导效果最好的试剂之一^[8],且在冬葱、白杨木、洋槐和西瓜等作物上均取得了良

好的效果^[9-11]。目前国内有关芦笋多倍体诱变方面的报道很少,只有少数几人有过相关研究,如张元国等^[12]采用多种化学诱变剂对芦笋露白种子进行多倍体诱导,并得到了芦笋四倍体;郑思乡等^[13]利用秋水仙素对芦笋试管苗进行多倍体诱导,并建立了芦笋的组培快繁体系;陈春桦^[14]利用秋水仙素对芦笋露白种子和幼苗进行处理,得到了四倍体植株并进行了形态学等方面的鉴定。在国外,有关芦笋育种方面的研究侧重于杂交育种技术,对芦笋多倍体诱变育种方面的研究很少^[15-17]。

该研究拟在前人研究的基础上,从处理浓度和处理时间2个方面来进一步探究秋水仙素对芦笋多倍体的诱导作用,经流式细胞仪鉴定后,分别对二倍体和四倍体芦笋植株的形态学、细胞学、染色体水平以及叶绿素含量等参数进行综合对比分析,研究二者的差异性,从而为下一步芦笋多倍体育种的进行和推广奠定理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试芦笋品种“达宝利”(‘Dc Paoli F1’, $2n=2x=20$)为市售。

1.2 试验方法

1.2.1 露白种子处理 取“达宝利”芦笋种子

第一作者简介:鹿志伟(1990-),男,硕士研究生,研究方向为作物育种。E-mail:luzhiwei@126.com

责任作者:易克贤(1964-),男,博士,研究员,现主要从事作物遗传育种等研究工作。E-mail:yikexian@126.com

基金项目:湛江市热带作物遗传改良重点实验室建设资助项目(2015A06005);海南省应用技术研发与示范推广专项资助项目(ZDXM2015047)。

收稿日期:2016-09-27

3 600 颗,于 30 ℃条件下蒸馏水浸种 2 d^[18],期间每天换 1 次蒸馏水。2 d 后将“达宝利”芦笋种子分别放入干净的托盘中,同时在托盘中喷洒一些蒸馏水以保持湿润环境,随后用保鲜膜密封起来,每隔 6 h 观察 1 次芦笋种子露白情况。

1.2.2 秋水仙素处理芦笋露白种子 以前人的研究为基础^[12,14],该研究采用添加 2% DMSO(二甲基亚砜)的秋水仙素溶液作为芦笋多倍体的诱导剂,选取露白长度 1 cm 左右的芦笋种子作为处理对象。将“达宝利”芦笋露白种子浸泡于浓度为 0、0.05%、0.15%、0.25%、0.35%、0.45%的秋水仙素溶液中,浸泡时间为 2、4、8、16、32、64 h。置于摇床内 150 r·min⁻¹ 振荡处理,使秋水仙素(添加 2% DMSO)溶液与芦笋露白种子充分作用。每个处理 30 粒露白种子,重复 3 次。每组试验材料处理后,用蒸馏水清洗露白种子 5 次,去除残留秋水仙素,播种于 21 孔的营养穴盘中(注意播种时只需将种子埋于土壤表层即可,太深芦笋种子容易死亡)。定期观察芦笋生长状况,统计死亡率。待芦笋苗长到 15 cm 左右时进行多倍体鉴定,并统计四倍体诱导率。四倍体诱导率(%)=四倍体个数/总处理个数×100;死亡率(%)=死亡个数/总处理个数×100。

1.3 项目测定

1.3.1 流式细胞仪鉴定 流式细胞仪进行倍性测定的原理主要是测量样品中经适当染色后的细胞所发出的散射光和荧光。染色后的单个细胞在悬液中单行流过高强度光源的焦点,当每个细胞经过焦点时,都会发出一束荧光或者散射光。然后这些荧光或者散射光被收集到一个固态装置,将散射光定量转化成电信号,再由数字转换器进行数字化后而变成整数,最后进行电子存储,以便后续的数据分析以及 DNA 曲线图的绘制。样品制备:取待测的新鲜芦笋茎尖 3 cm 部位,约 0.1 g。用刀片切碎(注意不可太碎,防止碎片过多,影响测定结果),以使细胞核得到最大的限度的释放,放入培养皿中。每份样品加入适量的细胞核提取液。然后将样品提取液通过 30 μm 的尼龙网细胞过滤膜,标准试管收集细胞,900 r·min⁻¹ 离心 5 min,加入 DAPI 进行避光染色 30 min 后,即可进行上机测量。进行样品测量时,以未经秋水仙素诱导处理的芦笋苗为临时对照,每测定 10 个样品即对流式细胞仪清洗 1 次,防止因旧样品的残留对新样品倍性测定分析的影响。测试样品的细胞核 DNA 含量都是以对照为标准的相对值。

1.3.2 染色体计数鉴定 对经流式细胞仪鉴定过的四倍体芦笋苗再次进行染色体水平的鉴定,选择 09:00—12:00(该时段细胞生长旺盛,显微镜下看到有丝分裂中期相的机会比较大),取芦笋茎尖,染色体制片采用茎尖敲片技术,选择视野内染色体形态标准、分散良好的细胞有丝分裂中期分裂相进行拍照记录。具体步骤:1)切取生长旺盛时段芦笋茎尖;2)0.002 mol·L⁻¹ 饱和的 8-羟基喹啉预处理 4 h,蒸馏水清洗 3 次;3)固定液(乙醇:冰醋酸=3:1)4 ℃固定 10 h 以上,蒸馏水清洗 3 次;4)30 g·L⁻¹ 纤维素酶 37 ℃处理 2 h,蒸馏水清洗 3 次;5)1 mol·L⁻¹ HCl 60 ℃处理 15 min,蒸馏水清洗 3 次。立刻置于载玻片上,滴 1 滴改良品红试剂染色 22 min,盖上盖玻片,擦镜纸吸去多余的染色液,用短的玻璃棒来回轻轻碾压玻片,注意用力均匀,中间与酒精灯上来回移动 4 s,直到肉眼看到茎尖碎片均匀分布于载玻片上,制片完成。

1.3.3 细胞学鉴定 在确定四倍体植株与二倍体植株的基础上,对四倍体进行细胞学鉴定,即从气孔细胞大小以及叶绿体含量方面进行对比描述,以间接证明四倍体与二倍体之间的差别。具体步骤如下:取一个清洗干净的载玻片,于载玻片中央滴 1 滴 ddH₂O,用尖嘴镊子从芦笋针形叶片上轻轻撕下叶片表皮,然后置于载玻片中央水滴上,铺平叶片表皮,盖上盖玻片。最后置于显微镜下进行观察,并统计保卫细胞长度、宽度,每个样品测定 3 片叶子,每个叶片重复观察 3 次。同时测定视野下的气孔密度以及单个气孔内的叶绿体数目。气孔密度计算:为了方便计算并确保试验结果的准确性,气孔密度即一个视野内(10×40 倍)的气孔个数。叶绿体数目计算:10×100 倍视野下,单个保卫细胞内的叶绿体数目。

1.3.4 形态学鉴定 观察四倍体与二倍体在相同外界培养条件下外部形态上的差异,包括叶片长度、叶片厚度、节间长度、颜色深度等特征,其中叶片长度、叶片厚度、节间长度使用游标卡尺进行测量,从而从侧面间接鉴定芦笋倍性,每个样品重复 3 次测量。

1.3.5 叶绿素含量测定 芦笋叶片中的叶绿素含量是反映叶片生理状态的重要指标,与光合作用密切相关。丙酮法提取叶片中叶绿素的操做方法如下,1)取样:分别称 0.5 g 二倍体植株和四倍体植株的针形叶,剪碎后放入 25 mL 试管中,每个样品重复 3 次测量;2)浸泡提取:向试管中加入 20 mL 80%丙

酮,暗处静止过夜后,可以看到植物组织变成白色,而试管中溶液变成鲜绿色,将溶液转移到 25 mL 容量瓶中,用滴管吸取 80%丙酮将试管洗净,清洗液加入容量瓶中,用 80%丙酮定容,摇匀;3)吸光度测量:以 80%丙酮溶液为空白对照。测定溶液在 663、645 nm 处的吸光度。每个样品重复测定 3 次;4)浓度测定:根据 645、663、652 nm 处测得的吸光度计算叶绿素 a、b 含量和总含量。再计算单位质量的叶绿素 a、b 含量和总含量。叶绿素 a($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)= $(12.72 \times A_{663} - 2.59 \times A_{645}) V / 1\ 000W$; 叶绿素 b($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)= $(22.28 \times A_{645} - 4.67 \times A_{663}) V / 1\ 000W$; 叶绿素总量($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)=叶绿素 a+叶绿素 b;计算叶绿素含量,重复 3 次,取平均值。式中 A_{663} 为波长 663 nm 的吸光值; A_{645} 为波长 645 nm 的吸光值;V 为混合液体积;W 为叶片质量。

2 结果与分析

2.1 芦笋多倍体诱导死亡率统计

由表 1 可知,由于 2% DMSO 的添加,对照组芦笋露白种子也存在一定的死亡率,但是相对较低。使用 SPSS 19.0 分析软件对芦笋多倍体诱导死亡率

进行处理,在 Duncan 多重比较分析中发现,在相同浓度处理下,随着处理时间的延长,露白种子死亡率随之增加。在相同时间处理下,随着秋水仙素浓度的增加,露白种子死亡率也随之增加。在方差分析中可知,时间和浓度这 2 个因素的 Sig. 均小于 0.05,即时间和浓度均与芦笋多倍体诱导死亡率相关。而由 III 型平方和大小可知,相对于时间,浓度对露白种子的死亡率影响作用更大。当处理时间达到 64 h,“达宝利”芦笋露白种子在秋水仙素浓度分别为 0.35%、0.45%时,芦笋露白种子完全死亡。总的来说芦笋露白种子的死亡率是与秋水仙素处理浓度和处理时间相关的,处理时间越长,浓度越高,死亡率越高。

将处理后的芦笋露白种子播种到室外育苗袋中培养时,观察芦笋苗生长状况,可以看出,用秋水仙素处理过的露白种子,出现不同程度的生长滞后现象。处理时间越长,浓度越高,这种生长滞后现象越明显。分析其原因可能是秋水仙素对露白种子具有毒害作用,芦笋苗需要一定的恢复期。后期发现当芦笋苗生长一段时间后,处理苗与对照苗生长状况基本一致。

表 1 秋水仙素浸泡法处理“达宝利”芦笋露白种子的死亡率

浓度 Concentration/%	2	4	8	16	32	64
0	0±0r	3.33±0.77qr	0±0.82r	1.11±0.00r	5.55±0.15pq	0±0.66r
0.05	5.55±0.79pq	0±0r	0±0.03r	8.89±1.64nop	10.00±0.26no	28.89±7.70k
0.15	7.78±2.36op	12.22±1.85n	22.22±1.29l	33.33±1.23j	50.00±2.12gh	62.22±1.43e
0.25	11.11±3.84no	16.67±0.00m	33.33±2.07j	50.00±0.42gh	63.33±3.00e	76.67±1.20c
0.35	36.67±0.00ij	40.00±0.12i	51.11±2.45g	61.11±3.47ef	78.89±1.57c	100.00±0.57a
0.45	46.67±0.00h	57.78±2.45f	68.89±2.31d	78.89±1.44c	93.33±0.88b	100.00±1.54a

注:采用邓肯多重比较方法分析,不同字母表示显著性差异($P<0.05$, $n=3$),相同字母表示差异不显著。表 3、表 5~7 同。

Note: With the Duncan multiple comparison analysis method, different letters indicate significant differences ($P<0.05$, $n=3$), the same letters mean no significant differences. The same as Table 3, Table 5~7.

表 2 秋水仙素浸泡法处理“达宝利”芦笋露白种子的死亡率方差分析

源 Source	III 型平方和 Type III sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	显著性检验 F	显著性 Sig.
纠正模型 Corrected model	32 771.605a	10	3 277.160	28.979	0.000
截距 Intercept	48 890.123	1	48 890.123	432.325	0.000
处理浓度 Treating concentration	24 172.840	5	4 834.568	42.751	0.000
处理 Treating	8 598.765	5	1 719.753	15.207	0.000
误差 Error	2 827.160	25	113.086		
总计 Total	84 488.889	36			
校正的总计 Corrected total	35 598.765	35			

注:SPSS 测验, Sig. <0.05, 表示显著性差异, k 表示平均值。表 4 同。

Description: SPSS test, Sig. <0.05, the difference was significant, k was average value. The same as Table 4.

2.2 芦笋多倍体诱导结果

使用 SPSS 19.0 软件对表 3 数据进行分析,通过对四倍体诱导率数据进行 Duncan 多重比较分析,发现相同的秋水仙素浓度处理下,在一定范围内随着秋水仙素处理时间的延长,四倍体诱导率逐渐增加。相同的处理时间下,在一定范围内随着秋水仙素浓度的增加,四倍体诱导率也逐渐增加。但是当处理时间过长或者秋水仙素浓度过高时,四倍体诱导率会出现降低的现象。在 Duncan 分析中可以看出,秋水仙素浓度 0.15% 和处理时间 16 h 的试验组合对应的“达宝利”芦笋四倍体诱导率差异最显著,

且四倍体诱导率为 28.33%。因此“达宝利”芦笋最佳的四倍体诱导组合均为:0.15% 的秋水仙素溶液(含 2% DMSO)浸泡 16 h。

使用 SPSS 19.0 软件对芦笋多倍体诱导结果进行方差分析发现,秋水仙素浓度和处理时间作为影响多倍体诱导率的 2 个主要因素,其方差分析结果中的 Sig. 均小于 0.05,说明这 2 个因素对芦笋多倍体诱导都有显著影响,相关性很大。另外由 III 型平方和可知,秋水仙素浓度对芦笋多倍体诱导的相关性比处理时间大,即芦笋多倍体的诱导率对秋水仙素浓度更敏感(表 4)。

表 3 “达宝利”芦笋露白种子的四倍体诱导率

Table 3 Induction rate of the ‘Dc Paoli F1’ seeds for tetraploid						
浓度 Concentration/%	处理时间 Treatment time/h					
	2	4	8	16	32	64
0				0		
0.05	3.53±0.07no	5.55±1.93mn	11.11±0.29ijkl	21.96±0.46bc	24.69±2.14b	21.67±2.89bc
0.15	6.00±1.99mn	8.83±1.97klm	17.15±0.42defg	28.33±2.89a	24.44±2.31b	17.78±0.52def
0.25	7.51±0.32lm	12.00±0.00hijk	20.00±0.00cd	24.44±1.63b	18.46±2.67cde	14.29±0.00fghi
0.35	8.77±3.04jkl	14.81±3.21efgh	13.65±0.55ghij	14.14±4.37fghi	15.87±1.37efg	0±0o
0.45	10.42±3.61jkl	15.87±1.37efg	10.74±0.64ijkl	16.19±3.30efg	0±0o	0±0o

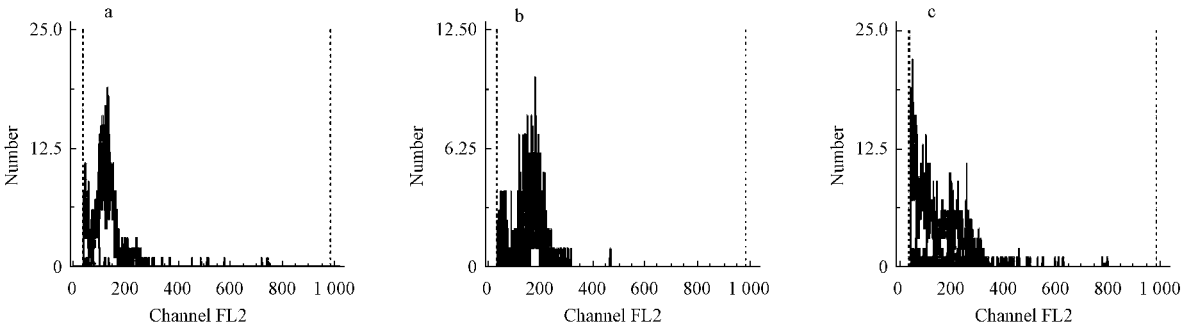
表 4 “达宝利”芦笋露白种子的四倍体诱导率方差分析

Table 4 ANOVA analysis of the ‘Dc Paoli F1’ seeds for tetraploid induction rates						
源 Source	III 型平方和 Type III sum of squares	自由度 <i>df</i>	均方 Mean square	显著性检验 <i>F</i>	显著性 Sig.	
纠正模型 Corrected model	1 573.540a	10	157.354	4.450	0.001	
截距 Intercept	3 982.241	1	3 982.241	112.618	0.000	
处理时间 Treating time	464.355	5	92.871	2.626	0.048	
处理浓度 Treating concentration	1 109.185	5	221.837	6.274	0.001	
误差 Error	884.014	25	35.361			
总计 Total	6 439.795	36				
纠正的总计 Corrected total	2 457.554	35				

2.3 流式细胞仪鉴定

利用流式细胞仪对秋水仙素处理的芦笋材料进行 DNA 含量的测定和分析,根据二倍体与变异芦笋

植株的 DNA 荧光强度吸收峰值位置的相对比例而对芦笋倍性进行快速鉴定,结果见图 1。图 1 中横坐标 channel 值表示荧光的通道值,纵坐标 number 值



注:a. 二倍体细胞 DNA 含量;b. 四倍体细胞 DNA 含量;c. 混倍体细胞 DNA 含量。

Note:a. The DNA distribution histogram of diploid cells;b. The DNA distribution histogram of tetraploid cells;c. The DNA distribution histogram of triploid cells.

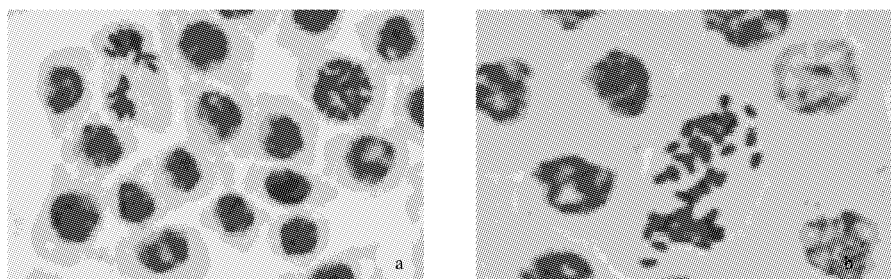
图 1 细胞 DNA 含量分布
Fig. 1 DNA distribution histogram of cells

表示细胞数的相对值,峰值位置表示样品的倍性。a 对照组芦笋 DNA 样品荧光强度吸收峰值在大概 100 位置处,而 b 芦笋 DNA 样品荧光强度吸收峰值在大概 200 位置处,约为对照组的 2 倍,说明该样品为四倍体芦笋植株;c 芦笋 DNA 样品在 100 和 200 位置处均有荧光强度吸收峰值,说明该样品为混倍体芦笋植株,即芦笋植株既含有二倍体细胞又含有四倍

体细胞,又可以称作嵌合体。试验中除存在四倍体外,还存在一部分混倍体。

2.4 染色体计数鉴定

对上述经过流式细胞仪鉴定过的“达宝利”芦笋四倍体和对照组二倍体芦笋针形叶片进行染色体敲片计数,经鉴定芦笋二倍体细胞染色体数目为 $2n=2x=20$,而四倍体细胞染色体数目则为 $4n=4x=40$,见图 2。



注:a.“达宝利”; $2n=2x=20$;b.“达宝利”; $4n=4x=40$ 。

Note;a. 'Dc Paoli F1'; $2n=2x=20$;b. 'Dc Paoli F1'; $4n=4x=40$ 。

图 2 “达宝利”芦笋茎尖细胞染色体数(10×100 倍,bar: $4.2\ \mu\text{m}$)

Fig. 2 Numbers of chromosome for 'Dc Paoli F1' asparagus shoot tip cells(10×100 ,bar: $4.2\ \mu\text{m}$)

2.5 细胞学鉴定

在使用流式细胞仪以及染色体敲片技术对芦笋多倍体进行鉴定的基础上,通过比较芦笋多倍体与二倍体气孔细胞的特征,来进一步了解多倍体与二倍体之间的差异。由表 5 可知,“达宝利”四倍体芦笋气孔细胞的气孔长度和宽度均比对照组二倍

体大,气孔密度均比二倍体小(图 4),而气孔细胞叶绿体数目却比二倍体多(图 3)。芦笋四倍体的这些特征有利于提高芦笋光合作用,降低呼吸作用,进而增加营养物质的积累。这也解释了芦笋四倍体植株颜色比二倍体深、营养物质更加丰富等特征。

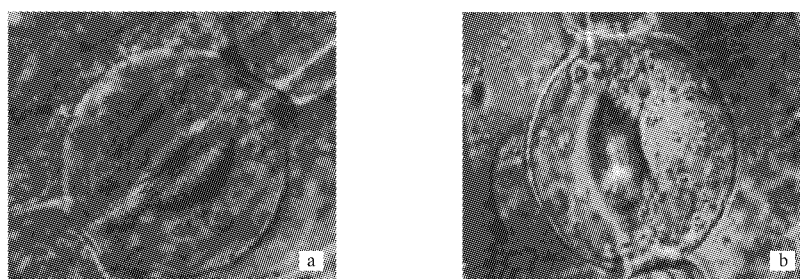
表 5

二倍体和四倍体针形叶片气孔细胞差异

Table 5

Differences between diploid and tetraploid leaf stomatal cells

倍性 Ploidy	细胞长度 Stomatal length/ μm	细胞宽度 Stomatal width/ μm	细胞密度 Stomatal density/个	叶绿体 Chloroplast/个
二倍体“达宝利”Diploid 'Dc Paoli F1'	$42.26\pm 1.29\text{b}$	$40.09\pm 1.61\text{b}$	$10.67\pm 0.58\text{a}$	$16.67\pm 1.15\text{b}$
四倍体“达宝利”Tetraploid 'Dc Paoli F1'	$48.00\pm 0.57\text{a}$	$46.06\pm 1.49\text{a}$	$5.33\pm 1.15\text{b}$	$32.33\pm 1.53\text{a}$



注:a.“达宝利”二倍体气孔细胞;b.“达宝利”四倍体气孔细胞。下同图 4。

Note;a. The diploid stomatal cells of 'Dc Paoli F1';b. The tetraploid stomatal cells of 'Dc Paoli F1'. The same as Fig. 4.

图 3 芦笋气孔细胞(10×100 倍,bar: $10\ \mu\text{m}$)

Fig. 3 Stomatal cells of asparagus(10×100 ,bar: $10\ \mu\text{m}$)

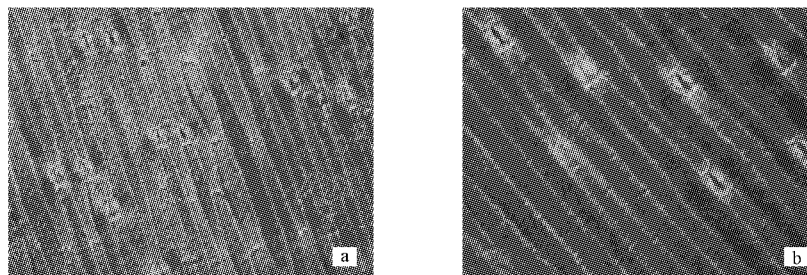


图4 芦笋气孔细胞(10×40倍,bar:21.2 μm)

Fig.4 Stomatal cells of asparagus(10×40,bar:21.2 μm)

2.6 形态学鉴定

采用相同外界培养条件的芦笋四倍体与二倍体植株进行形态学比较分析。由表6可以看出,“达宝利”四倍体芦笋植株叶片长度和叶片直径都要比二倍体芦笋植株大,而节间长度却要比二倍体小。结合图5、6可以更直观的看出这些差异,即四倍体芦笋植株与二倍体植株相比,针形叶片更加粗大,叶片密度显著增大,叶片颜色也变深,这些特征都可以作为对四倍体植株进行初步鉴定的依据。

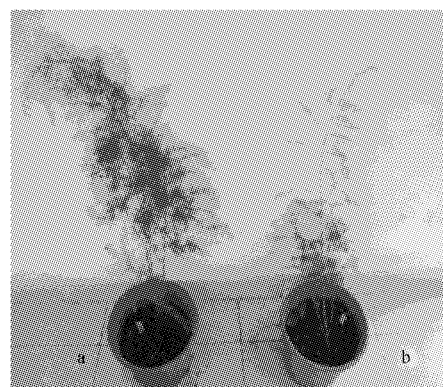
表6 二倍体与四倍体形态学分析结果

Table 6 Analytical results for diploid and tetraploid

morphology characteristics			mm
倍性 Ploidy	叶片长度 Leaf length	叶片直径 Leaf diameter	节间长度 Inter-stem length
二倍体“达宝利” Diploid ‘Dc Paoli F1’	16.40±1.76b	0.23±0.00b	27.96±1.31a
四倍体“达宝利” Tetraploid ‘Dc Paoli F1’	26.30±0.07a	0.37±0.05a	21.31±2.14b

2.7 叶绿素含量测定

叶绿素是植物进行光合作用的重要物质,是研究植物氮代谢状况和植物生长特性等的重要指标。在一定条件下可以认为植物叶绿素含量与其光合



注:a.“达宝利”四倍体植株;b.“达宝利”二倍体植株。

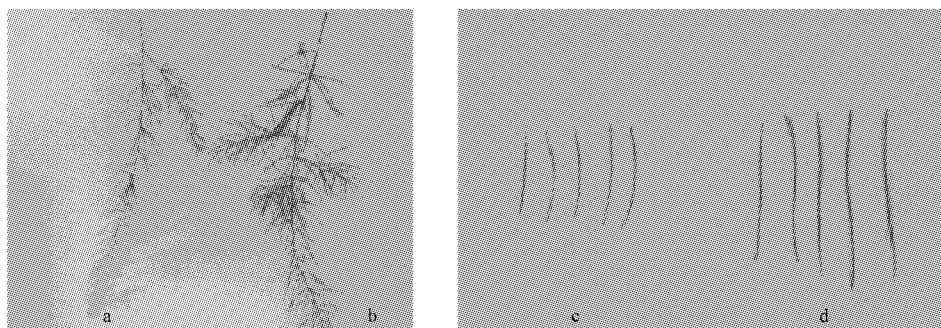
Note:a. The tetraploid seedlings of ‘Dc Paoli F1’; b. The diploid seedlings of ‘Dc Paoli F1’.

图5 芦笋植株差异

Fig.5 The differences of asparagus seedlings

用成正比,叶绿素含量越高,植物光合作用越强。因此植物叶绿素含量可以作为植物光合作用与干物质积累强度的初步判断标准。

从表7可以看出,达宝利四倍体叶绿素含量大于二倍体,约为二倍体含量的2~3倍,这间接说明了四倍体光合作用强度要比二倍体强,四倍体芦笋



注:a.“达宝利”二倍体茎段;b.“达宝利”四倍体茎段;c.“达宝利”二倍体针形叶片;d.“达宝利”四倍体针形叶片。

Note:a. Diploid stems of ‘Dc Paoli F1’; b. Tetraploid stems of ‘Dc Paoli F1’; c. Diploid leaves of ‘Dc Paoli F1’; d. Tetraploid leaves of ‘Dc Paoli F1’.

图6 芦笋茎段和针形叶片差异

Fig.6 Differences of asparagus stems and leaves

表 7

芦笋二倍体和四倍体植株叶绿素含量

Table 7	Chlorophyll content for diploid and tetraploid asparagus			mg · g ⁻¹
倍性 Ploidy	叶绿体 a 含量 Chlorophyll a content	叶绿体 b 含量 Chlorophyll b content	叶绿体总含量 Chlorophyll total content	
二倍体“达宝利” Diploid ‘De Paoli F1’	0.28±0.07b	0.41±0.21b	0.68±0.21b	
四倍体“达宝利” Tetraploid ‘De Paoli F1’	0.61±0.14a	1.37±0.67a	1.96±0.70a	

植株体内可以比二倍体积累更多营养成分。

3 讨论与结论

目前,有关利用秋水仙素作为植物多倍体诱导剂的研究有很多,其中多倍体诱导率随植物基因型、诱导方式及秋水仙素处理浓度和处理时间的变化而变化。如从生福禄考(*Phlox subulata* L.)的离体组织的诱导率达到了 20%^[19],而芒草离体嫩茎的多倍体诱导率却为 14.9%^[20]。盾叶薯蓣(*Dioscorea zingiberensis*)愈伤组织经 0.3%秋水仙素浸泡处理 16 h 时,多倍体诱导率可高达 36.7%^[20]。

在该研究中,芦笋露白种子经过 0.15%的秋水仙素溶液(含 2% DMSO)浸泡 16 h 后,产生高达约 28.33%的多倍体诱导率,这与张元国等^[12]、郑思乡等^[13]、陈春桦^[14]对芦笋多倍体诱导的研究相比诱导效率提高了很多。另外,在该研究结果中可以发现,高诱导效率、非致死性的诱变剂处理浓度是决定多倍体诱导率高低的关键要素,同时诱变剂的处理时间和处理浓度严重影响着外植体的存活率。由芦笋多倍体诱导死亡率和诱导率统计分析结果可知,在一定范围内,芦笋多倍体诱导率越高,相应的试验处理组的死亡率就越高,二者存在一定的正比例关系,与 ASCOUGH 等^[21]、KARIMIANI 等^[22]和 THAO 等^[23]的研究结果相似。

由于基因是生物体遗传信息的载体,因此细胞染色体加倍可能会对植物体多种表型性状产生影响,如细胞体积增大、叶绿素含量增加、植株粗壮、叶片增厚等。到目前为止,有许多有关植物多倍体化多植株表型影响的研究^[19,24-25],而有关芦笋这方面的描述较少。

该试验对不同倍性的芦笋多倍体进行了形态学特征、气孔细胞学特征以及叶绿素含量等方面对比,发现与芦笋二倍体相比,四倍体叶片直径和长度增加、植株更加粗壮、气孔密度降低、气孔细胞体积增大、叶绿体数目增多、叶绿体含量增加。这与在其它植物上的研究结果相似,如在胡椒中,多倍体气孔细胞密度要比二倍体小,而气孔细胞体积却比二倍体大^[26]。

该研究的高效芦笋多倍体诱导方法有助于获得

大量的多倍体植株,进而为芦笋多倍体育种提供丰富的种质资源,为进一步培育高产新品种奠定基础,另外在后续工作中还需要对田间芦笋产量和质量进行进一步的验证统计分析。

该研究以秋水仙素(添加 2% DMSO)处理“达宝利”芦笋品种的露白种子,获得了最佳的多倍体诱导方法,诱导率可达 28.33%。与二倍体相比,四倍体芦笋植株具有粗壮、叶片长度和直径增加,气孔细胞密度减少,气孔细胞体积增大,叶绿体数目和叶绿素含量增加等特征,最后得到了 60 多株具有优良性状的四倍体植株。

参考文献

- [1] HUANG X F, LIN Y Y, KONG L Y. Steroids from the roots of *Asparagus officinalis* and their cytotoxic activity[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2008, 50(6): 717-722.
- [2] BLASBERG C. Phases of the anatomy of *Asparagus officinalis* [J]. Botanical Gazette, 1932, 94: 206-214.
- [3] MEYERS L A, LEVIN D A. On the abundance of polyploids in flowering plants[J]. Evolution, 2006, 60(6): 1198-1206.
- [4] 彭静, 魏岳荣, 熊兴华. 植物多倍体育种研究进展[J]. 中国农学通报, 2010, 26(11): 45-49.
- [5] GALLONE A, HUNTER A, GERRY C D. Polyploid induction *in vitro* using colchicine and oryzalin on Hebe ‘Oratia Beauty’: Production and characterization of the vegetative traits[J]. Scientia Horticulturae, 2014, 179: 59-66.
- [6] 武振华, 牛炳韬, 王新宇. 药用植物染色体加倍的研究进展[J]. 西北植物学报, 2005, 25(12): 2569-2574.
- [7] 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.
- [8] GLOWACKA K, JEZ OWSKI S, KACZMAREK Z. *In vitro* induction of polyploidy by colchicine treatment of shoots and preliminary characterisation of induced polyploids in two *Miscanthus* species[J]. Industrial Crops and Products, 2010, 32(2): 88-96.
- [9] SUMINAH, SUTARNO, SETYAWAN A D. Polyploid induction of *Allium ascalonicum* L. by colchicine[J]. Biodiversitas, 2002, 3(1): 174-180.
- [10] EWALD D, ULRICH K, NAUJOKS G, et al. Induction of tetraploid poplar and black locust plants using colchicine: chloroplast number as an early marker for selecting polyploids *in vitro* [J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2009, 99(3): 353-357.
- [11] RAZA H, JASKANI M J, KHAN M M, et al. *In vitro* induction of polyploids in watermelon and estimation based on DNA content[J]. International Journal of Agriculture and Biology (IJAB), 2003, 5(3): 298-302.

- [12] 张元国,于继庆,陈桂英,等. 芦笋多倍体育种技术[J]. 北方园艺,1997(6):45.
- [13] 郑思乡,李利良,甘红霞,等. 芦笋多倍体诱导及其离体培养的研究[J]. 湖南农业科学,1996(1):22-23.
- [14] 陈春桦.“井岗 701”芦笋四倍体诱导及其组织培养研究[D]. 海口:海南大学,2014.
- [15] ITO T, KONNO I, KUBOTA S, et al. Production and characterization of interspecific hybrids between *Asparagus kiusianus* Makino and *A. officinalis* [J]. Euphytica, 2011, 182(2):285-294.
- [16] ITO T, OCHIAI T, ASHIZAWA H, et al. Production and analysis of reciprocal hybrids between *Asparagus officinalis* L. and *A. schoberioides* Kunth [J]. Genet Resour Crop Evol, 2007, 54(5):1063-1071.
- [17] KUBOTA S, KONNO I, KANNO A. Molecular phylogeny of the genus *Asparagus* (Asparagaceae) explains interspecific crossability between the garden *Asparagus* (*A. officinalis*) and other *Asparagus* species [J]. Theor Appl Genet, 2012, 124(2):345-354.
- [18] 王婧宇,张雪平,杨如,等. 生长素在芦笋组培扩繁体系中的影响[J]. 华东师范大学学报(自然科学版), 2010(6):101-108.
- [19] ZHANG Z H, DAI H Y, XIAO M, et al. *In vitro* induction of tetraploids in *Phlox subulata* L. [J]. Euphytica, 2008, 159:59-65.
- [20] HUANG H, GAO S L, CHEN L L, et al. *In vitro* induction and identification of autotetraploids of *Dioscorea zingiberensis* [J]. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 2008, 44(5):448-455.
- [21] ASCOUGH G D, van STADEN J, ERWIN J E. Effectiveness of colchicine and oryzalin at inducing polyploidy in *Watsonia lepidota* NE Brown [J]. Hort Science, 2008, 43(7):2248-2251.
- [22] KARIMIANI Z G, BAGHERI A, DAVARYNEJAD G H, et al. Investigating the in vitro growth inhibition of oryzalin-treated *Gerbera jamesonii* [J]. Acta Sci Pol-hortor, 2009, 829:309-312.
- [23] THAO N, URESHINO K, MIYAJIMA I, et al. Induction of tetraploids in ornamental *Alocasia* through colchicine and oryzalin treatments [J]. Plant Cell Tissue Organ Cult, 2003, 72(1):19-25.
- [24] SPECKMANN G J, POST J J, DIJKSTRA. The length of stomata as an indicator for polyploidy in Rye-Grasses [J]. Euphytica, 1965, 14:225-230.
- [25] LIU G F, LI Z N, BAO M Z. Colchicine-induced chromosome doubling in *Platanus acerifolia* and its effect on plant morphology [J]. Euphytica, 2007, 157(1):145-154.
- [26] NAIR R R, RAVINDRAN P N. Induced polyploid in black pepper (*Piper nigrum* L.) [J]. Journal of Spices and Aromatic Crops, 1992, 1(2):151-153.

Effect of Colchicine Treatment on Asparagus ‘Dc Paoli F1’ for Tetraploid Induction

LU Zhiwei^{1,2}, HOU Xiaowan¹, GAO Jianming³, ZHANG Yanmei^{1,2}, ZHOU Wenzhao^{1,2}, YI Kexian⁴

(1. South Subtropical Crops institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Zhanjiang, Guangdong 524091; 2. Tropical Crop Genetic Improvement Key Laboratory of Zhanjiang, Zhanjiang, Guangdong 524091; 3. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, CATAS, Haikou, Hainan 571101; 4. Environment and Plant Protection Institute, CATAS, Haikou, Hainan 571101)

Abstract: The sprouting seeds of the ‘Dc Paoli F1’ asparagus varieties were selected as the experimental materials. With the treating concentrations and time of colchicine (2% DMSO added) as inducing factors, multiple gradients of orthogonal experiments were designed to study the effect of colchicine on asparagus tetraploid induction rate and identify the optimum treating combinations of colchicine. The results showed that the combination of 0.15% colchicine (2% DMSO added) with 16 hours was the best treatment combinations with an induction rate of up to 28.33%. The number of diploid and tetraploid chromosome in asparagus were 20 and 40 respectively. Compared with diploid asparagus, tetraploid asparagus had thicker individual, longer leaf, increased diameter, decreased stomatal cells density, larger stomatal cells volume, more chloroplast and chlorophyll concentration.

Keywords: asparagus; tetraploid; colchicines; induction; breeding