

兰州百合多倍体诱导及鉴定

刘 静¹, 赵庆芳², 丁 兰²

(1. 安康学院 农学与生命科学院, 陕西 安康 725000; 2. 西北师范大学 生命科学学院, 甘肃 兰州 730070)

摘 要:以兰州百合鳞片为试材,利用秋水仙碱溶液对兰州百合进行了人工多倍体诱导。结果表明:秋水仙碱最佳处理浓度和最佳处理时间分别为 0.1%、24 h,细胞诱变率达 60%。对获得的兰州百合多倍体与二倍体叶片气孔大小及密度进行测定,通过方差分析,气孔大小及密度差异达到极显著水平。对兰州百合多倍体和二倍体植株根尖染色体计数发现,二倍体植株所有细胞染色体数为 $2n=2x=24$,多倍体植株中有的细胞染色体数为 $2n=2x=24$,而有些细胞染色体数为 $2n=4x=48$ 。

关键词:兰州百合;多倍体;秋水仙碱

中图分类号:S 682.2⁺65 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)18-0138-04

兰州百合 (*Lilium davidii* var. *unicolor* (Hoog) Cotton), 又称菜百合, 是川百合 (*L. davidii* Duch var. *willmottiae* (Wilson) Ruffil) 的变种, 具有很高的食用价值, 为我国最佳食用百合品种^[1]。目前兰州百合已成为甘肃省兰州市周边地区的支柱产业之一, 长期的无性繁殖使得各种病毒在百合植株中逐代积累, 导致品种严重退化。经过染色体加倍的多倍体百合具有植株鳞片肥厚、健壮、高产优质等特点, 因此兰州百合的染色体加倍研究具有十分重要的理论意义和经济价值。有关兰州百合多倍体新品种培育的研究国内已见报道^[2-5], 该试验在前人研究的基础上, 对兰州百合进行多倍体诱导, 以期获得高产、优质的兰州百合多倍体新种质。

1 材料与方法

1.1 试验材料

兰州百合鳞茎, 采自兰州市西果园镇。

1.2 试验方法

1.2.1 多倍体诱导 无菌材料的获得: 剥取种球鳞片, 用洗衣粉水清洗 20 min, 自来水冲洗 15 min, 0.1% 的升汞消毒 10 min, 0.2% 次氯酸钠消毒 15 min, 经无菌水漂洗 3~4 次, 备用。多倍体诱导: 将浸有不同浓度 (0、0.02%、0.05%、0.1%) 秋水仙碱溶液的棉花经过灭菌后覆盖于上述消毒过的百合鳞片的基部, 接种于诱导培养基 (MS+BA 1.0 mg/L+NAA 1.0 mg/L)

中, 一定时间 (12、24、48 h) 后将鳞片取出用无菌水冲洗 3 次并接种于诱导培养基中黑暗培养。待小鳞茎长出后切下转入继代培养基 (MS+BA 0.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L) 中。待得到完整植株后, 将百合无菌苗切成单株, 接种在生根培养基 (1/2MS+IBA 0.2 mg/L) 中, 用根尖染色体压片进行倍性鉴定。

1.2.2 多倍体鉴定 形态学观察: 百合鳞片用秋水仙碱溶液处理后, 初代培养诱导出的小鳞茎转入继代培养基中得到完整植株后, 观察对照植株 (未用秋水仙素处理) 和变异植株的发育情况, 叶片的厚薄, 颜色的深浅, 叶面是否皱褶, 是否有韧性^[6]。叶片气孔大小及密度的测定: 用尖嘴镊子轻轻撕取叶片下表皮, 置于载玻片上, 用双蒸水铺平, 盖上盖玻片后, 在目镜带测微尺的普通显微镜 16×10 倍下取 3 个视野测气孔长度, 宽度, 每个样品测定 2 片叶, 每叶重复观测 3 次, 计算平均值。在 16×10 倍镜下随机取 10 个视野, 统计每个视野内的气孔数目, 计算气孔密度。根尖压片鉴定: 取试管苗的根尖 → 预处理 (0.05% 的秋水仙素和 0.0028 mol/L 羟基喹啉为 1:1) 3 h → 固定 (无水乙醇: 冰醋酸 = 3:1) 2 h 以上清洗 → 解离 (1 mol/L HCl 在 60℃ 下) 7 min → 清洗、染色 (改良品红染液) → 压片 → 镜检、鉴定、摄像^[7-8]。统计其中的四倍体细胞个数和二倍体细胞数。诱变率 = 四倍体细胞个数 / (四倍体细胞个数 + 二倍体细胞数) × 100%。

1.2.3 多倍体的稳定 对兰州百合的变异株鉴定发现, 多倍体植株根尖细胞中既有二倍体细胞又有四倍体细胞, 即为嵌合体, 将嵌合体的幼苗切割只留下 1 cm 左右, 将芽分割后接种到继代培养基上诱导不定芽, 反复多代后, 对再生的不定芽进行倍性鉴定。

第一作者简介: 刘静 (1978-), 女, 硕士, 助教, 研究方向为植物细胞工程。E-mail: 1119614491@qq.com。

基金项目: 甘肃省科技攻关计划资助项目 (2GS042-A41-001-11)。

收稿日期: 2011-06-21

2 结果与分析

2.1 多倍体诱导

秋水仙碱对兰州百合多倍体的诱导有一定的作用,随着秋水仙碱浓度的增加,兰州百合的加倍率增加,秋水仙碱浓度为 0.1%,处理时间 24 h 加倍率最大,可达到 60%(表 1)。经秋水仙碱处理过的与未经秋水仙碱处理过的(对照)在小鳞茎生长和外形上均有差异。百合鳞片经秋水仙碱处理后,小鳞茎生长表现

为生长缓慢,其小鳞茎外形各异,鳞片张开。而对照组小鳞茎生长表现为生长快,其小鳞茎外形整齐,鳞片紧包。处理同样的时间,随着秋水仙碱浓度的增大,平均生成鳞茎数、小鳞茎产生率逐渐减少;秋水仙碱浓度相同时,随着处理时间的延长,平均鳞茎数、小鳞茎产生率也逐渐减少。当秋水仙碱浓度达到 0.1%,处理时间为 48 h 时鳞片从基部向上逐渐褐化,最终死亡。

表 1 不同浓度的秋水仙素浓度与不同处理时间对百合诱变率的影响

Table 1 Mutagenic effect on squamas of Lily treated with different concentrations of colchicines for different time periods							
秋水仙素浓度	处理时间	处理鳞片数	平均鳞茎数	小鳞茎产生率	观察细胞数		诱变率
Concentrations of colchicines	Treatment	Number of treatment	Average of bulblets	Rate of bulblets inducement	Number of cell		Rate of mutagenensis
/ %	time/h	/个	/个	/ %	2×	4×	/ %
0	12	30	7.8	100	40	0	0
0.02	12	30	5.4	90	32	11	26
0.05	12	30	5.0	65	24	15	38
0.1	12	30	4.0	15	12	12	50
0	24	30	7.7	100	40	0	0
0.02	24	30	3.3	66	18	14	44
0.05	24	30	3.1	32	10	11	52
0.1	24	30	2.9	20	6	9	60
0	48	30	7.5	100	40	0	0
0.02	48	30	1.7	19	13	11	46
0.05	48	30	0.9	10	4	5	56
0.1	48	30	0	0	0	0	0

2.2 兰州百合多倍体鉴定

2.2.1 兰州百合变异株的形态学观察 对照植株生长正常,叶片颜色浅绿,叶片较薄,叶面平整,叶片有韧性;变异株生长缓慢,畸形、矮化,叶片颜色较深,叶片较厚,并且叶面粗糙,较脆,易折断(图 1)。

保卫细胞内叶绿体数明显增多(图 3)。通过方差分析,气孔大小及密度差异达到极显著水平(表 3)。

表 2 变异植株与对照植株气孔大小与密度的测量结果

Table2 Comparative observation of leaf stoma size and density between control plantlets and variant plantlets					
样本	气孔器		增大率		气孔密度
Material	Stoma/ μm		Proportion of increase/%		Density of stoma
	长	宽	长	宽	/个 $\cdot\text{mm}^{-2}$
Length	Width	Length	Width		
对照植株	70.38	47.175			66
Control plantlets			61.59	44.07	
变异植株	113.73	67.965			21
Variant plantlets					

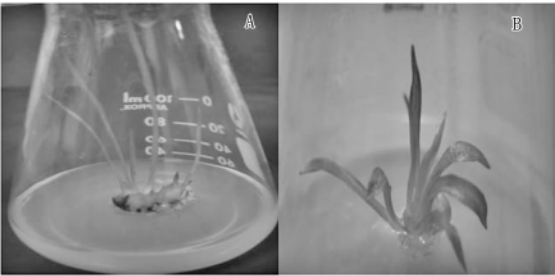


图 1 兰州百合对照植株与变异植株形态学观察
注:A:二倍体植株;B:变异植株。

Fig. 1 Morphology observation of control plants and variation plant of *L. davidii* var. *unicolor*(Hoog) Cotton
Note: A: Diploid plantlet; B: Variant plantlet.

2.2.2 变异植株与对照植株气孔大小及密度的测定

在相同生长阶段和环境条件下,通过对变异株的气孔大小及频度的测定发现,多倍体植株气孔大小明显增大,长度为二倍体的 162%,较二倍体增大了 61.59%。宽度是二倍体的 144%,较二倍体增大了 44.07%。气孔长度的增大程度要大于宽度的增加程度(表 2、图 2)。气孔的密度小,是二倍体的 32%,同时

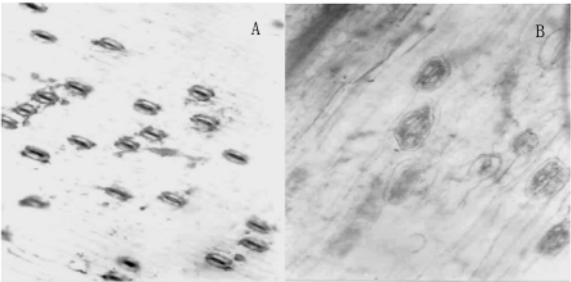


图 2 兰州百合对照植株与变异植株气孔密度比较
注:A:二倍体气孔器(35×);B:变异株气孔器(35×)。

Fig. 2 Compare of stomatal frequency of control plants and variation plant of *L. davidii* var. *unicolor*(Hoog) Cotton
Note: A: Stomas of diploid; B: Stomas of variant plantlets.

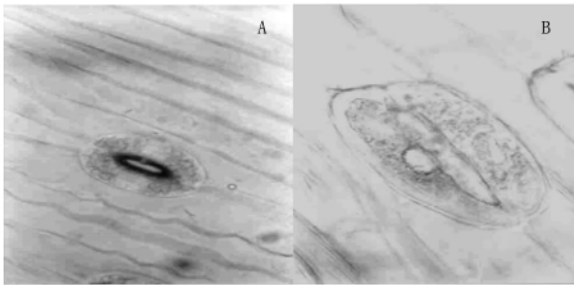


图3 兰州百合对照植株与变异植株气孔大小比较
注:A:二倍体气孔器(140×);B:变异株气孔器(140×)。
Fig. 3 Compare of stoma size of control plants and variation plant of *L. davidii* var. *unicolor*(Hoog) Cotton
Note: A: Stoma of diploid; B: Stoma of variant plantlets.

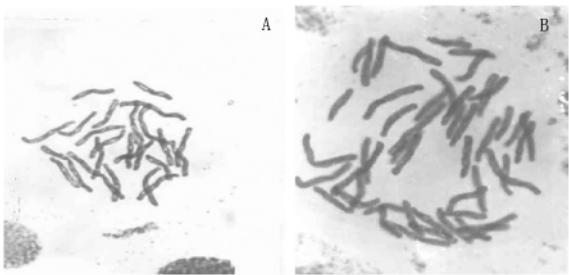


图4 兰州百合对照植株与变异植株染色体数目比较
注:A:兰州百合二倍体染色体; B:兰州百合变异株染色体。
Fig. 4 Chromosome numbers of diploid *L. davidii* var. *unicolor*(Hoog) Cotton
Note: A: Chromosomes of diploid *L. davidii* var. *unicolor*; B: Chromosomes of variant plantlets *L. davidii* var. *unicolor*.

2.2.3 兰州百合根尖染色体压片结果分析 经细胞学观察发现,兰州百合二倍体细胞的染色体数为 $2n=$

$2x=24$,而经秋水仙素诱导的多倍体植株的体细胞染色体为 $2n=2x=24$ 和 $2n=2x=48$ (图4)。

表3 对照植株与变异植株气孔大小与频度差异显著性比较

样本 Material	气孔长度 Length of stoma/ μm			气孔宽度 Width of stoma/ μm			气孔密度 Density of stoma/个 $\cdot\text{mm}^{-2}$		
	平均值 Average	显著性 5% Significance at 5% level	显著性 1% Significance at 1% level	平均值 Average	显著性 5% Significance at 5% level	显著性 1% Significance at 1% level	平均值 Average	显著性 5% Significance at 5% level	显著性 1% Significance at 1% level
对照株 Control plantlets	70.38	A	a	47.175	A	a	66	A	a
变异株 Variant plantlets	113.73	B	b	67.965	B	b	21	B	b

3 结论与讨论

该试验研究发现,秋水仙素对兰州百合多倍体的诱导有一定的作用,随着秋水仙素浓度的增大,诱变率增加,在相同浓度的秋水仙素处理下,随着处理时间的延长,鳞片死亡率增加,诱变率增加,同一材料,随着处理浓度升高和时间的延长,染色体的加倍率增大,但是秋水仙素对细胞的伤害也增大,从而得到的变异株的绝对数量变少。可能的原因是秋水仙素对细胞存在剧毒作用,这种剧毒作用随着浓度及时间的延长,导致诱导植株的绝对数量减少,但是却使四倍体细胞诱导率增加。所以,选择合适的浓度和处理时间,对染色体的加倍至关重要。该试验中得到的变异植株基本上都是嵌合体,通过组织培养技术分离纯化嵌合体植株,经过多次继代培养后,得到了更多的变异苗,变异苗生长状况良好。

参考文献

[1] 杨云光,邓成忠.食用百合品种介绍[J].中国果菜,2002(5):13.
[2] 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):125-128.
[3] 边雪斌.兰州百合多倍体诱导试验报告[J].甘肃农业科技,1995(6):14-15.
[4] 张兴翠,周昌华.药用百合的多倍体诱导及快速繁殖[J].西南农业大学学报,2003,25(1):14-17.
[5] 王丽艳,荆瑞勇.秋水仙碱诱导兰州百合四倍体[J].核农学报,2008,22(5):581-584.
[6] 孙庆华,韩振海.果树多倍体鉴定研究进展[J].山东农业科学,2008(2):11-14.
[7] 朱徽.植物染色体及染色体技术[M].北京:科学出版社,1996.
[8] 李懋学,张赞平.作物染色体研究技术[M].北京:中国农业出版社,1996.

Polyploid Iduction and Indentification of *Lilium davidii* var. *unicolor*(Hoog) Cotton

LIU Jing¹, ZHAO Qing-fang², DING Lan²

(1. College of Agriculture and Life Sciences, Ankang University, Ankang, Shaanxi 725000; 2. College of Life Science, Northwest Normal Universtiy, Lanzhou, Gansu 730070)

菜用大黄组培苗不定芽增殖能力比较研究

吴亚蓓, 蔡祖国, 张有铎, 赵一鹏

(河南科技学院 园林学院, 河南 新乡 453003)

摘 要:以 5 个欧洲菜用大黄品种‘RT’、‘RO’、‘RV’、‘R5’和‘R19’种子为试材,以组培苗茎尖为外植体,在 MS+1.0 mg/L NAA+1.0 mg/L 6-BA+5.3 g/L 琼脂+30 g/L 蔗糖培养基上进行连续 24 d 的离体培养,研究不同欧洲菜用大黄品种组培苗不定芽增殖能力差异。结果表明:5 个品种的不定芽再生方式可以分为基部愈伤组织萌发再生不定芽和腋芽萌发再生不定芽。各品种间不定芽再生能力差异显著,‘RT’的再生不定芽增殖速度最快,增殖系数最大,为 3.71,‘R19’的再生不定芽增殖速度最慢,增殖系数最小,为 1.96;根据各品种增殖系数连续变化曲线得出,菜用大黄合理的继代周期为 24 d。

关键词:菜用大黄;组织培养;再生能力

中图分类号:S 644.9;Q 813.1⁺2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)18-0141-03

菜用大黄(*Rheum rhaiponticum* L.)为蓼科大黄属多年生四倍体($2n=4x=44$)草本植物,以叶柄为食用器官,其产量高、适应性强、且便于管理,一次定植可连续收获 4~6 a^[1]。叶柄粗嫩多汁,营养丰富,风味独特,是理想的芳香保健类蔬菜,由它制成的饼派、甜点、果酱、果酒等已经成为西方国家人们日常生活中不可或缺的传统食品^[2-4]。近年来,随着 2008 北京奥运会的举行,菜用大黄作为一种“新兴特色保健类蔬菜”开始逐渐走入中国人的视野^[5]。

2004 年以来,河南科技学院菜用大黄引种育种课题组赵一鹏教授从英国引入了几个优良的菜用大黄栽培种,并通过茎尖离体培养成功地建立起了菜用大黄组培快繁体系^[6-8]。然而,在离体培养条件下,各品种的再生能力之间有着显著的差异。该试验研究了菜用

大黄各品种的不定芽再生方式、增殖能力之间的差异性,菜用大黄组培苗合理的继代培养周期,为深入探讨菜用大黄离体条件下的快速繁殖奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

该试验所用种子均来自英国 Writtle 学院种质资源库,所选用的 5 个欧洲菜用大黄品种分别是:(1)‘RT’,(2)‘RO’,(3)‘RV’,(4)‘R5’,(5)‘R19’。种子经过消毒灭菌后,置于不添加任何激素的 MS 基本培养基上进行无菌萌发。当幼苗长至 2 cm 左右时,切取 1 cm 长的茎尖作为外植体。

1.2 试验方法

培养环境的温度保持在 $(25\pm 1)^{\circ}\text{C}$,光周期为 16 h/d,光照强度为 1 500 lx。将由种苗获得的茎尖外植体接种于 MS+2.0 mg/L+1.0 mg/L+30 g 蔗糖+5.3 g 琼脂^[6]的培养基上进行愈伤组织诱导,待再生不定芽发生后,将再生不定芽转入不添加任何植物生长调节剂的 MS 基本培养基上培养 2 周,随后接入 MS+1.0 mg/L+1.0 mg/L+30 g 蔗糖+5.3 g 琼脂^[6]上进行不定芽增殖培养。所有培养基均经过 121 $^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 30 min,pH 5.8。

第一作者简介:吴亚蓓(1986-),女,在读硕士,研究方向为蔬菜种质资源与育种。E-mail:yabeiwu@126.com。

责任作者:赵一鹏(1962-),男,博士,教授,研究方向为园艺植物种质资源。E-mail:yipengzhao@hist.edu.cn。

基金项目:河南省杰出人才创新基金资助项目(074100510019)。

收稿日期:2011-06-01

Abstract: *L. davidii* var. *unicolor*(Hoog)Cotton scale was used as test material to inducted the polyploidy of *L. davidii* var. *unicolor*(Hoog)Cotton using colchicine solution. The results showed that best concentration of colchicine was 0.1% in chromosome doubling induction of *L. davidii* var. *unicolor*(Hoog)Cotton. Under the concentration,the optimal time was 24 h,and the mutagenesis rate was 60%. Comparing the size and the number of stomata per unit leaf area of the leaf of diploid and the polyploidy plants,by the statistical analysis those index was significantly different. Cytological observation showed that the chromosome number of some cells were $2n=4x=48$,and the others were $2n=2x=24$ in polyploidy plants. In diploid plants the chromosome number of all cells were $2n=2x=24$.

Key words: *Lilium davidii* var. *unicolor*(Hoog) Cotton; polyploidy; colchicin