

预培养时间对观音莲染色体加倍的影响

陈 荣, 朱 昌 参

(广西生态工程职业技术学院 生态工程系, 广西 柳州 545004)

摘 要:以观音莲组培苗茎段外植体为诱导材料,采用秋水仙素处理方法进行观音莲的离体诱导,研究预培养时间和共培养时间对诱导效果的影响。结果表明:四倍体诱导率因预培养时间和共培养时间不同而异,在预培养时间为 0、3、6、9 d 4 个梯度和共培养时间为 8、12、16 d 3 个梯度组成的 12 个处理中,切取茎段外植体为诱导材料,在未添加秋水仙素的增殖培养基中预培养 6 d,再转入添加秋水仙素 120 mg/L 的增殖培养基中共培养 16 d 的处理获得了最大的诱导率和四倍体数目,此时的诱导率达到 46.4%;随着预培养时间的增加,外植体成活率及每瓶有效不定芽株数逐渐增加,可见预培养影响外植体的成活、增殖培养及诱导效果。

关键词:观音莲;秋水仙素;四倍体

中图分类号:S 681.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)01-0105-03

观音莲(*Alocasia indica* Schott)属天南星科观音莲属花卉,具有重要的观赏价值和经济价值,其株形紧凑,叶形奇特,叶色墨绿,叶脉清晰如画,斑纹清晰醒目,极富诗情画意,风格独特,为时尚的高档观叶植物,在国际观叶植物市场上很受欢迎,在高档次的室内摆饰及庭园和水景设计中,观音莲的应用比较广泛,具有很好的商业价值。同时也在插花中作为切叶使用,市场前景广阔^[1]。

我国天南星科花卉的产业开发起步较晚,基础研究和育种工作相对滞后。近年来倍性育种技术在花卉育种中的应用受到植物育种家的重视,其中天南星科花卉单倍体育种和多倍体育种均有报道^[2-3]。目前鲜见观音莲的倍性育种相关研究文献,该研究以观音莲为试材,研究预培养时间对其四倍体诱导效率的影响,旨在建立观音莲高效的四倍体诱导技术,为该种花卉植物的多倍体育种提供技术基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试观音莲(*Alocasia indica* Schott)是由广西生态工程职业技术学院生物技术中心提供的组培瓶苗,切取茎段为外植体。

第一作者简介:陈荣(1977-),男,广西全州人,博士,讲师,现主要从事植物倍性育种研究工作。E-mail:chentianyi@126.com

责任作者:朱昌参(1975-),男,硕士,工程师,现主要从事植物生物技术研究工作。

基金项目:广西自然科学基金资助项目(2010GXNSFB013024)。

收稿日期:2012-09-17

1.2 试验方法

1.2.1 培养基及培养方法 MS+3%蔗糖+0.6%琼脂+BA 0.6 mg/L+IBA 0.4 mg/L+肌醇 0.1 mg/L 为增殖基本培养基,pH 5.6~5.8,通过改变秋水仙素浓度及秋水仙素处理时间进行试验比较。1/2MS+1.5%蔗糖+0.6%琼脂+IBA 0.4 mg/L+肌醇 0.1 mg/L 为生根培养基,pH 5.6~5.8。培养基按常规方法配制,每瓶分装培养基约 40 mL,秋水仙素添加采用过滤法在培养基冷却到不烫手时加入。培养环境温度为(24±2)℃,光照强度为 2 000 lx,光照时间为 12 h/d。

1.2.2 不同预培养时间对观音莲四倍体诱导的影响 设定预培养处理时间为 0、3、6、9 d 共 4 个设计,每个设计设定秋水仙素处理时间分别为 8、12、16 d,共 12 个处理,每个处理 5 次重复,每重复 10 个外植体接入同一培养瓶中,在未添加秋水仙素的增殖培养基中进行设定的预培养时间培养后,转入添加秋水仙素浓度为 120 mg/L 的加倍培养基中进行设定时间的加倍培养,再转入不添加秋水仙素的增殖基本培养基中培养 70 d 后转入生根培养基进行生根培养。

1.2.3 增殖植株的倍性鉴定 采用常规压片法对增殖材料的染色体数目进行观察,并对好的细胞分裂相进行拍照,具体处理的步骤见文献^[4],考虑到四倍体染色体条数较多,为了方便计数,有必要使其染色体紧缩,故在文献报道的基础上适当增加预处理时间。切取根尖白色分生组织部分于载玻片上使用卡宝品红染色 20 min,压片后在莱卡显微镜下镜检计数和拍照。统计外植体成活率、每瓶有效不定芽株数、四倍体数和诱导率,其中诱导率=每重复四倍体数/该重复有效不定芽株数。

1.3 数据分析

使用 SPSS 统计分析软件进行方差分析和多重比较。

2 结果与分析

2.1 不同预培养时间对观音莲四倍体诱导的影响

由表 1 可以看出,从外植体存活率来看,12 个处理中预培养 9 d 后加倍 8 d 的处理获得了最大的数值,此时外植体的存活率为 88%,显著高于除预培养 6 d 加倍 8 d 和预培养 9 d 加倍 12 d 这 2 个处理外的其它 9 个处理;在预培养 9 d 的 3 个处理中,随着加倍时间的延长,外植体存活率逐渐降低,预培养 0、3、6 d 的 9 个处理中,也具有同样的趋势,可见加倍时间的延长对外植体存活率有不利影响;外植体存活率最低的是无预培养加倍 16 d 的处理,此时的外植体存活率为 28%,显著低于除预培养 3 d 加倍 16 d 处理外的其它 10 个处理。12 个处理中预培养 9 d 后加倍 8 d 的处理获得了最高的每瓶有效不定芽株数,此时的每瓶有效不定芽株数为 24.6 株,显著高于除预培养 9 d 加倍 12 d 处理外的其它 10 个处理,在预培养 9 d 的 3 个处理中,随着加倍时间的延长,每瓶有效不定芽株数逐渐降低,预培养 0、3 d 的 6 个处理中,也具有同样的趋势,可见加倍时间的延长对观音莲增殖存在不利影响;每瓶有效不定芽株数最低的是无预培养加倍 16 d 的处理,此时的每瓶有效不定芽株数为 7.4 株,显著低于除预培养 3 d 加倍 16 d 处理、无预培养加倍 12 d 共 2 个处理外的其它 9 个处理。每瓶四倍体数最高的处理是预培养 6 d 加倍 16 d 的处理,此时的每瓶四倍体数为 5.2 株,无预培养加倍 16 d 的每瓶四倍体数最低,为 0.8 个,出现这种情况的原因可能是因为在无预培养情况下,秋水仙素的细胞毒性导致出芽困难,从而四倍体植株数量变少。就诱导率来看,预培养 6 d 加倍 16 d 的处理获得了最高的诱导率 46.4%,显著高于除无预培养加倍 8 d、预培养 3 d 加倍 12 d 这 2 个处理外的其它 9 个处理,诱导率最低的处理是预培养 9 d 加倍 8 d 的处理,此时的诱导率为 8.9%,出现这种情况的原因可能是因为预培养较长时间导致增殖效果较好,出芽多,此时的每瓶有效不定芽株数达到最高的 24.6 株,从而分母变大,使诱导率最低。

由图 1 可知,每瓶有效不定芽株数平均值按照从低到高的顺序排列依次为预培养 0、3、6、9 d 的处理,分别为 10.6、12.9、15.7、21.3 株,可见随着预培养时间的增加,每瓶有效不定芽株数平均值有增高的趋势;由斜率可见,预培养时间越高,芽增殖效果越好,每瓶有效不定芽株数平均值增加越明显,从无预培养的 10.6 株,到预培养 3 d 时的 12.9 株,增加了 2.3 株,而预培养 6 d 比预培养 3 d 增加了 2.8 株,预培养 9 d 比预培养 6 d 时增加了 5.6 株,可见预培养有利于观音莲芽的增殖。

表 1 不同预培养时间对观音莲四倍体诱导的影响

Table 1 Effect of pre-culture duration on tetraploid induction of

Alocasia indica Schott

处理 编号	预培养 时间/d	加倍天数 /d	外植体存 活率/%	每瓶有效不 定芽株数	每瓶四倍 体数	诱导率 /%
1	0	8	54 c	13.6 cd	5.0	36.8 a
2	0	12	46 c	10.8 de	2.4	22.2 bc
3	0	16	28 d	7.4 e	0.8	10.8 e
4	3	8	64 bc	15.0 cd	3.6	24.0 b
5	3	12	52 c	13.4 cd	5.0	37.3 a
6	3	16	36 d	10.2 de	2.4	23.5 b
7	6	8	80 ab	17.8 bc	3.2	18.0 cd
8	6	12	64 bc	18.0 bc	4.6	25.6 b
9	6	16	50 c	11.2 d	5.2	46.4 a
10	9	8	88 a	24.6 a	2.2	8.9 e
11	9	12	80 ab	21.8 ab	3.4	15.6 d
12	9	16	64 bc	17.4 bc	3.8	21.8 bc

注:数据后小写字母不同表示在 $P \leq 5\%$ 水平存在显著差异。

Note: Datas followed with different letters mean significant difference at $P \leq 5\%$ level.

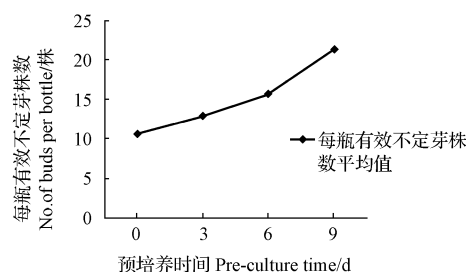


图 1 预培养时间对观音莲增殖的影响

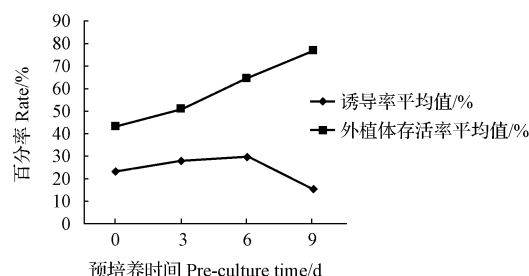
Fig. 1 Effect of pre-culture time on axillary bud formation of *Alocasia indica* Schott

图 2 预培养时间对观音莲组培及加倍的影响

Fig. 2 Effect of pre-culture time on culture and tetraploid induction of *Alocasia indica* Schott

由图 2 可以看出,外植体存活率平均值随着预培养时间的增加而增加,数值按照从低到高的顺序依次排列为 43%、51%、65%、77%,可见预培养有利于减轻秋水仙素的细胞毒性,有利于外植体的存活,同时结合图 1 来看,还有利于芽的增殖,这一点二者具有一致性,结合试验中观察到的现象来看,经过预培养处理的外植体在秋水仙素共培养后,褐化现象也较为严重,甚至较无预培养处理褐化率高,但是有较多出现部分褐化现象的外植体仍然存活且有不定芽产生,而无预培养的处理经秋水仙素共培养后出现褐化的外植体往往因整体褐化而导致无不定芽产生。从诱导率平均值来看,与每瓶有效

不定芽株数平均值及外植体存活率平均值二者比较,变化趋势不太一致,后二者随着预培养时间的增加而增加,而诱导率平均值随着预培养时间的增加,先增加后降低,预培养 9 d 时诱导率平均值最低,这可能与预培养时间增加,每瓶有效不定芽株数平均值增加较多,而得到的四倍体数目反而较少,从而出现分母变大,分子变小的原因有关。

2.2 增殖植株的倍性鉴定

采用压片法对试验材料增殖植株进行染色体计数。结果表明,二倍体观音莲其染色体数目为 $2n=2\times=28$;部分增殖植株的染色体数目为 $2n=4\times=56$,为四倍体。

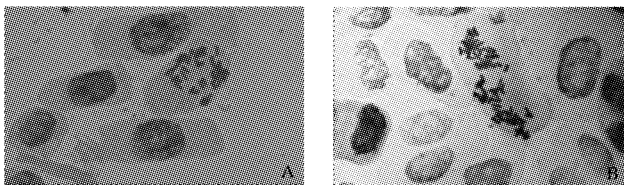


图 3 观音莲倍性鉴定

注:A 为二倍体($2n=2\times=28$),B 为四倍体($2n=4\times=56$)。

Fig. 3 Ploid identification of *Alocasia indica*

Note: A diploid($2n=2\times=28$), B tetraploid($2n=4\times=56$).

3 讨论与结论

利用秋水仙素处理组织培养过程中产生的丛生芽、原球茎、体细胞胚、无菌扦插枝等中间繁殖体是诱导观赏植物多倍体的有效手段,且具有经济、方便、诱导作用专一性强等特点。近年来,在离体培养条件下,利用秋水仙素进行多倍体诱导的报道越来越多,但多为秋水仙素浓度、处理方式、处理时间等方面的报道,如张兴翠^[5]的研究结果表明,2 000 mg/L 秋水仙素浓度是诱导花叶绿萝丛生芽产生多倍体的有效浓度,诱导率高达 71%;李涵等^[6]以齿瓣石斛丛生芽为材料,研究秋水仙素处理时间和处理浓度对多倍体诱导的影响,结果表明,用 300 mg/L 秋水仙素处理 24 h 效果最好;张志胜等^[3]的

研究表明,以红掌愈伤组织为诱导材料,在含秋水仙素 200 mg/L 的液体培养基中振荡培养 14 d,四倍体诱导率最高,为 45.5%。目前关于预培养时间对秋水仙素加倍诱导效果影响的报道很少,Nilanthi 等^[7]在对紫锥菊进行四倍体诱导时提及在外植体与秋水仙素共培养前,对外植体进行 7 d 的预培养,该试验并未对预培养时间做不同天数的比对试验^[7]。Cai 等^[8]对小青杨进行秋水仙素诱导加倍研究时,发现预培养 6 d 处理加倍效果好。就观音莲而言,预培养 6 d,以 120 mg/L 秋水仙素处理 16 d 效果最好,此时的诱导率最高;试验结果还表明,随着预培养时间的增加,外植体成活率平均值、每瓶有效不定芽株数平均值均随之增加;可见预培养时间的长短影响外植体的成活率、增殖培养及诱导效果。

初步的外形观察可以看出,与二倍体相比,四倍体植株叶片长度稍有缩短,宽度略有增加,叶色相对较深,部分特征与前人的研究结果一致,具体的形态学特征还有待于进一步的栽培观察。

参考文献

- [1] 黄玉源,张施君. 天南星科观赏植物重要品种及其繁育技术[J]. 仲恺农业技术学院学报,2002,15(4):54-59.
- [2] 杜宝贵,黄丽娟,张志胜,等. 红掌花药培养[J]. 生物技术通报,2009(增刊):189-195.
- [3] 张志胜,黎扬辉,姜蕾,等. 红掌四倍体的离体诱导及其鉴定[J]. 园艺学报,2007,34(3):729-734.
- [4] 李庆玲,陈荣,杨跃生,等. 两种天南星科植物根尖组织染色体观察方法的优化[J]. 北方园艺,2012(2):134-136.
- [5] 张兴翠. 花叶绿萝的多倍体诱导及快速繁殖[J]. 西南农业大学学报,2004,26(1):58-60.
- [6] 李涵,郑思乡,龙春林. 齿瓣石斛多倍体的诱导初报[J]. 云南植物研究,2005,27(5):553-556.
- [7] Nilanthi D, Chen X L, Zhao F C, et al. Induction of tetraploids from petiole explants through colchicine treatments in *Echinacea purpurea* L[J]. J Biomed Biotech, 2009, 1155/2009/343485.
- [8] Cai X, Kang X Y. *In vitro* tetraploid induction from leaf explants of *Populus pseudo-simonii* Kitag[J]. Plant Cell Rep, 2011, 30:1771-1778.

Study on Effect of Precultivation Period on Chromosome Doubling of *Alocasia indica*

CHEN Rong, ZHU Chang-san

(Department of Eco-engineering, Guangxi Eco-engineering Vocational and Technical College, Liuzhou, Guangxi 545004)

Abstract: Explants of petiole were taken from *in vitro* grown plants and to induce polyploids through colchicine treatments. The results showed that tetraploid inductivity was different with different precultivation period and cocultivation period. In 12 cases including four different precultivation periods (0, 3, 6 and 9 days) and three different cocultivation periods (8, 12 and 16 days), inducing with petiole explants, preculturing in propagation medium without colchicine for 6 days and coculturing in propagation medium with 120 mg/L colchicine for 16 days was the most efficient condition for tetraploid induction, yielding highest inductivity (46.4%). Prolonging precultivation period, explants survival percentage and effective shoots per culture bottle increased gradually.

Key words: *Alocasia indica*; colchicine; polyploid