

黄色马蹄莲多倍体诱导研究

邵果园¹, 梁国鲁²

(1. 浙江林学院 农业与食品科学学院, 浙江 临安 311300; 2. 西南大学 园艺园林学院, 重庆 400716)

摘要: 为探明秋水仙素诱导彩色马蹄莲多倍体的最佳处理方法, 以黄色马蹄莲奇妙 *Zantedeschia elliottiana* 'Black Magic' 球茎为材料, 在离体条件下诱导愈合组织并产生芽点, 放入 0.2, 0.5 及 1.0 g·L⁻¹ 秋水仙素溶液中分别浸泡 24, 48 和 72 h, 诱导黄色马蹄莲多倍体。结果显示: 秋水仙素能成功诱导黄色马蹄莲多倍体, 其最佳处理是使用 0.5 g·L⁻¹ 秋水仙素浸泡芽点 48 h, 四倍体诱导率 13.3%。四倍体植株体细胞染色体数目为 $2n = 4x = 64$ 。获得的四倍体植株与二倍体比较, 外部形态特征、气孔特性等方面有显著性差异, 具有植株强健, 叶片变大增厚, 保卫细胞增大, 叶绿体数目增多, 气孔密度减少等特点。图 3 表 3 参 18

关键词: 园艺学; 黄色马蹄莲; 组织培养; 秋水仙素; 多倍体

中图分类号: S682.2+64; S603.2 文献标志码: A 文章编号: 1000-5692(2008)05-0630-05

Polyploidy induction in *Zantedeschia elliottiana*

SHAO Guo-yuan¹, LIANG Guo-lu²

(1. School of Agriculture and Food Science, Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300, Zhejiang, China;

2. College of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: To determine colchicine's best concentration and treating time for inducing polyploidy in colorful calla lily, test materials with yellow cultivar of bulbs from *Zantedeschia elliottiana* 'Black Magic', were induced in vitro to form small buds from callus. Then, the small buds were soaked in the chemical reagent colchicine of 0.2, 0.5 and 1.0 g·L⁻¹ for 24, 48 or 72 hours with 30 replications to induce polyploidy. Then, count the number of chromosome, and compare morphologic difference between the polyploidy and the diploid. Results showed that soaking small buds in 0.5 g·L⁻¹ of colchicine for 48 hours could successfully induce tetraploid with an induction rate of 13.3%. The tetraploid were stronger and had thicker and larger leaves, larger guard cells, more chloroplasts, and less stoma density than the diploid. The tetraploid would mend the pace of new breed varieties. [Ch, 3 fig. 3 tab. 18 ref.]

Key words: horticulture; *Zantedeschia elliottiana*; tissue culture; colchicine; polyploidy induction

彩色马蹄莲是黄色马蹄莲 *Zantedeschia elliottiana* 和红花马蹄莲 *Z. rehmannii* 的总称, 属天南星科 Araceae 马蹄莲属 *Zantedeschia* 球根花卉^[1], 其色彩艳丽, 形态高雅, 不仅是切花中的佼佼者, 也是盆花栽培的佳品, 被公认为 21 世纪“花卉之星”。彩色马蹄莲在中国还属新兴的贵族花卉, 有很大的开发价值和市场发展潜力。彩色马蹄莲绝大多数为二倍体 ($2n = 2x = 32$)^[2], 存在花朵小, 不耐高温, 易感软腐病的问题^[3]。本研究旨在采用组织培养技术结合秋水仙素化学诱导, 获得黄色马蹄莲四倍体新种质, 加快彩色马蹄莲新品种的选育进程。

收稿日期: 2007-11-26; 修回日期: 2008-01-15

基金项目: 浙江林学院科研发展基金资助项目(2451013007)

作者简介: 邵果园, 讲师, 硕士, 从事园艺植物遗传育种研究。E-mail: shaoguoyuan@zjfc.edu.cn。通信作者: 梁国鲁, 教授, 博士生导师, 从事园艺植物遗传育种研究。E-mail: lianggl1960@126.com

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试材 黄色马蹄莲奇妙 *Zantedeschia elliottiana* 'Black Magic' 种球, 由西南大学果树重点实验室提供。

1.1.2 试剂 秋水仙素采用国药集团化学试剂有限公司的产品。

1.1.3 培养基 采用 MS(Murashige and Skoog) 基本培养基^[4], 卡拉胶 $5.8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 蔗糖(食用) $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 5.8。

1.2 试验方法

1.2.1 愈合组织培养 种球先用 $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的赤霉素(GA_3) 浸泡处理 3 h, 促进芽眼的萌发。20 d 左右芽眼萌动后, 采用质量浓度 $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的多菌灵处理已萌动的黄色马蹄莲球茎, 在摇床上振荡处理 24 h 后取出, 用软毛刷刷洗, 并用刀片刮去表面褐色皮层, 自然水下冲洗。挖取 0.5 cm^2 的芽眼, 在超净工作台上用体积分数为 75% 的乙醇漂洗 10 s, 再用 $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 升汞灭菌 20 min, 无菌水清洗 5 次, 接种于 MS 培养基上。经初代培养, 芽长高至 2 cm 时, 将芽对半切开, 转入 MS 培养基 + $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{BA} + 0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{NAA}$ 诱导获得愈合组织。愈合组织继代培养基为 MS + $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{BA} + 0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{NAA}$ 。

1.2.2 多倍体的诱导 采用离体浸泡法结合组织培养诱导多倍体, 在 $25 \sim 30$ 的温度条件下进行处理。处理分 2 步进行: 选用愈合组织继代后产生的芽点, 放入 $0.2, 0.5, 1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的秋水仙素溶液中分别浸泡处理 24, 48, 72 h, $80 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡处理, 以无菌水浸泡处理同样时间为对照; 处理结束后, 用无菌水清洗 3 ~ 5 次, 转入不含秋水仙素的分化培养基中进行分化培养成苗, 并诱导生根。每个组合处理芽点 30 个(表 1)。

1.2.3 多倍体的鉴定 采用直接观察染色体数目的方法, 参照李懋学^[5]的去壁低渗火焰干燥法。切取组培苗根尖 预处理 3 h ($0.002 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 8-羟基喹啉) 固定 2 h (固定液) 前低渗(去离子水浸泡至无味) 酶解 ($30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的混合酶液) 后低渗(去离子水浸泡 10 min) 再固定 涂片 Giemsa 染色 镜检。染色体数目检测重复 5 次以上, 检测的分裂细胞中 85% 以上为四倍体细胞, 确定为四倍体植株^[6]。

1.2.4 形态特征比较 随机选取培养条件一致、生长良好的四倍体和二倍体组培苗叶片 10 张, 用直尺测量株高、叶片的长和宽; 游标卡尺测出叶片的厚度。求出平均值作为不同倍性的株高、叶长、叶宽和叶厚。重复 3 次。

1.2.5 叶片气孔特征比较 分别随机选取有代表性的叶片 3 张, 用尖镊子撕取下表皮, 置于载玻片上, 用碘-碘化钾溶液染色, 加盖玻片。在普通显微镜 10×20 倍镜下随机选取 10 个视野, 统计每个视野下的气孔数目, 表示气孔密度 ($\text{个}\cdot\text{视野}^{-1}$); 并在 10×100 倍镜下统计 30 个细胞的叶绿体数目。在 Olympus 显微镜 (目镜带测微尺) 10×40 倍镜下随机选取 10 个视野, 测量 10 个保卫细胞的长度和宽度。每个样品每叶重复观测 3 次, 计算平均值求出不同倍性的气孔密度、叶绿体数目和保卫细胞大小。

表 1 不同质量浓度秋水仙素处理不同时间的诱导效果比较

Table 1 Comparison of inducing effect of different colchicine concentration and treatment time

秋水仙素处理		处理芽点 数/个	死亡 数/个	成活率/%	四倍体诱 导率/%
质量浓度/ ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	时间/h				
0 (ck)	24	30	0	100	0
	48	30	0	100	0
	72	30	0	100	0
0.2	24	30	0	100	0
	48	30	2	93.3	0
	72	30	4	86.7	3.3
0.5	24	30	8	73.3	10.0
	48	30	11	63.3	13.3
	72	30	16	46.7	10.0
1.0	24	30	12	60.0	3.3
	48	30	17	43.3	6.7
	72	30	21	30.0	0

1.3 数据处理

运用对比试验统计方法处理数据, 差异显著性分析采用 Duncan 的新复极差法(SSR)^[7]。

2 结果与分析

2.1 秋水仙素不同处理诱导多倍体的效果

秋水仙素对植物有一定的毒害作用, 合适的质量浓度和处理时间对植物诱导染色体加倍至关重要。研究表明, 秋水仙素对黄色马蹄莲球茎芽点的生长影响较大, 经秋水仙素浸泡处理后, 有的芽点直接死亡, 有的芽点在培养过程中慢慢褐化失去生活力, 有的虽然没有褐化死亡, 但无法继续分化成苗, 有的即便能够分化成苗, 但生长出现畸形。从表 1 统计的试验数据可以看出: 随着秋水仙素质量浓度的加大, 对植物材料的伤害也随之加大, 芽点的死亡数增多; 用秋水仙素浸泡的时间越长, 对材料的伤害也越大。四倍体的诱导率并没有和使用秋水仙素的质量浓度及处理时间呈正相关关系。不同质量浓度的秋水仙素的不同处理时间效果比较表明: 0.5 g·L⁻¹秋水仙素处理 24, 48 和 72 h 均有较高的四倍体诱导率, 但以采用 0.5 g·L⁻¹的秋水仙素处理 48 h 的组合较好, 有 63.33% 的成活率和 13.3% 的四倍体诱导率(图 1)。

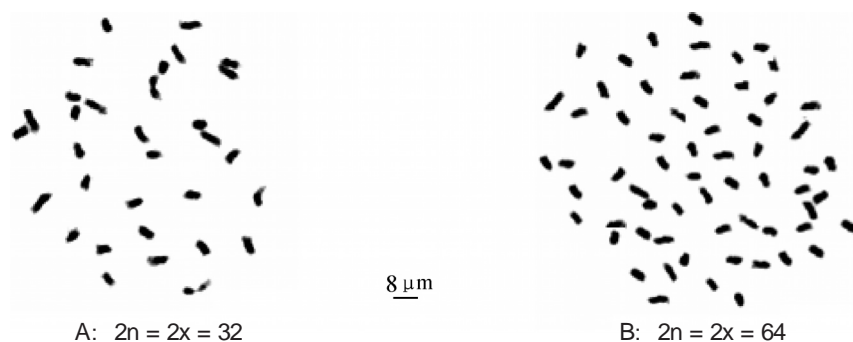


图 1 黄色马蹄莲二倍体(A)与四倍体(B)体细胞染色体数目

Figure 1 Chromosome number of the diploid(A) and the tetraploid (B)

2.2 四倍体与二倍体的外部形态特征比较

与二倍体植株相比, 四倍体黄色马蹄莲在培养基中具有以下特征: 生长旺盛, 株型高大, 叶柄粗长, 叶色浓绿, 叶片变长变宽, 叶面积变大, 叶尖变尖且反卷, 叶脉粗等(图 2)。从表 2 可以看出, 在株高和叶片形态上, 四倍体植株体现了器官的巨大性: 株高为二倍体的 134.3%, 差异极显著; 叶片的长度和宽度均大于二倍体, 长度为二倍体的

表 2 黄色马蹄莲四倍体与二倍体植株叶片形态的差异显著性比较

Table 2 Comparison the diploid with the tetraploid on leaf characteristics

倍性	叶长/m	叶宽/cm	叶形指数	叶厚/mm
4x	6.14 aA	3.99 aA	1.53 bB	0.043 aA
2x	4.85 bB	2.63 bB	1.84 aA	0.027 bA

说明: 小写字母不同表示同列在 0.05 水平上差异显著; 大写字母不同表示在 0.01 水平上差异显著。

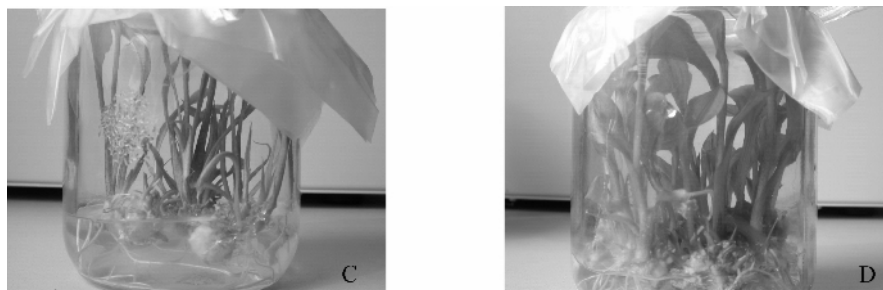


图 2 黄色马蹄莲二倍体(C)与四倍体(D)组培苗

Figure 2 Plants in vitro of the diploid (C) and the tetraploid (D)

126.6%，宽度为二倍体的 151.7%；叶片明显增厚，为二倍体的 159.2%，达显著性差异；叶形指数变小，为二倍体的 83.1%。程金水^[8]认为，多倍体器官的巨大性是随着染色体的加倍，细胞核和细胞变大，因而组织器官也多变大。

2.3 四倍体与二倍体的叶片气孔特征比较

气孔是植物叶片与外界进行气体交换的主要通道，气孔特征与植物的光合作用性能密切相关^[9]。观察发现，与二倍体植株比较，四倍体植株叶片气孔相关特征有差异(图 3)：四倍体的气孔密度变小，为二倍体的 59.7%；保卫细胞变大，纵径为二倍体的 156.1%，横径为二倍体的 143.2%；叶绿体数目增加，为二倍体的 213.7%。相关数据统计显示各项特征差异极显著(表 3)。这表明黄色马蹄莲的倍性与气孔密度存在着负相关的关系，与保卫细胞的大小、叶绿体的数目呈正相关的关系。这与有关报道^[10,11]相一致。本试验中，植物叶片的气孔密度、保卫细胞的大小、叶绿体数目等特征可以作为判断黄色马蹄莲倍性的辅助方法之一。

表 3 黄色马蹄莲四倍体与二倍体植株叶片气孔特征的差异显著性比较

倍性	气孔密度/(个·视野 ⁻¹)	叶绿体数目/个	保卫细胞纵径/ μm	保卫细胞横径/ μm
4x	14.1 bB	110.9 aA	67.6 aA	48.1 aA
2x	23.6 aA	51.9 bB	43.3 bB	33.6 bB

说明：小写字母不同表示同列在 0.05 水平上差异显著；大写字母不同表示在 0.01 水平上差异显著。

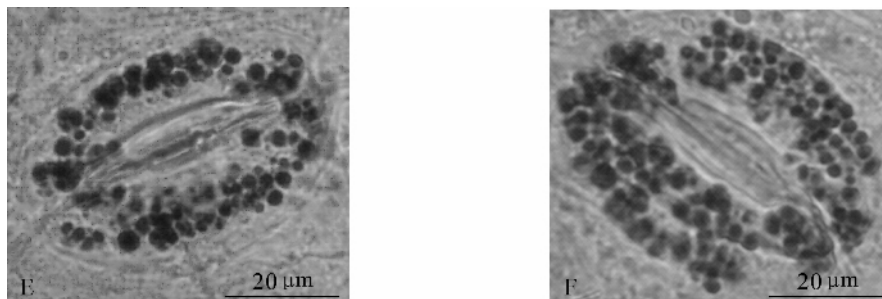


图 3 黄色马蹄莲二倍体(E)和四倍体(F)的保卫细胞及叶绿体

Figure 3 Guard cell and chloroplasts of the diploid (E) and the tetraploid (F)

3 讨论

3.1 秋水仙素的质量浓度与处理时间

秋水仙素是目前人工诱导染色体加倍应用最为广泛的化学试剂，其毒性极强，如果处理时所用的质量浓度太大，会影响植物材料的正常生长，甚至死亡；但处理质量浓度太小，又往往起不到作用。处理的适宜时间以处理材料完全被浸透，并有足够的药量进入生长点细胞为准，而且处理所持续的时间还受到诱变剂的水解半衰期影响^[12]。一般情况下，使用较高质量浓度的秋水仙素时处理时间缩短，反之则延长处理时间，但具体因植物材料的种类而异^[13,14]。

秋水仙素常用的有效质量浓度范围是 0.1 ~ 10.0 g·L⁻¹，一般以 2.0 ~ 5.0 g·L⁻¹ 较好^[8,13,14]。在本研究中，秋水仙素的有效质量浓度为 0.2 ~ 1.0 g·L⁻¹，处理时间和质量浓度的大小相关，结果显示以 0.5 g·L⁻¹ 处理 48 h 为最佳组合。

3.2 黄色马蹄莲倍性鉴定的方法

染色体计数法是鉴定倍性最直接，也是最准确的方法。由于黄色马蹄莲组培苗的茎尖极短，且包裹于叶片内，切取茎尖进行染色体计数极容易完全破坏植株，故只能等植株生根，然后利用根尖进行检测。利用根尖染色体进行鉴定会出现染色体缺失或增多等现象，需要经过多次反复的检测，操作过程繁琐，工作量大，难以早期分离多倍体。形态观察是鉴定多倍体最简单最快捷的方法。本研究获得的四倍体组培苗与二倍体相比，表现出叶片加厚，叶色较深，叶片变长、变宽、叶形指数变小等特点，可作为对变异植株的初步筛选，能大大减少工作量。但该方法过于粗糙，且组培苗移栽于大田管理

过程中会出现性状差异, 故该法需与其他方法结合进一步鉴定。许多研究证明, 气孔大小和密度与染色体倍性存在明显的相关性, 叶绿体数目能大致反应植物的倍性, 这在许多果树及农作物等植物的多倍体研究中也得到证实^[15]。本研究中四倍体植株和二倍体的气孔密度、保卫细胞长度、宽度和叶绿体数目存在极显著差异, 可作为鉴别黄色马蹄莲倍性的重要参数。

3.3 黄色马蹄莲四倍体的意义

植物多倍体一般比二倍体具有开花多, 茎干粗壮, 叶片肥厚, 花朵大而艳丽, 花瓣厚实、耐储运, 抗逆性增强等的特点^[8], 这在百合 *Lilium* spp.^[16], 非洲菊 *Gerbera jamesonii*^[17], 香石竹 *Dianthus caryophyllus*^[18]等花卉植物中已有较多的报道。本试验研究获得的黄色马蹄莲四倍体表现了器官的巨大性: 株型高大, 叶柄粗长, 叶色浓绿, 叶面积变大, 叶脉粗等, 并表现为生长旺盛。但黄色马蹄莲从瓶苗到开花需要 2 ~ 3 a。本研究诱导获得的黄色马蹄莲多倍体植株尚未能成花, 这将在后续的研究中进一步开展。

黄色马蹄莲四倍体植株可用于马蹄莲的进一步育种, 如四倍体与二倍体杂交产生三倍体, 四倍体加倍获得八倍体, 再杂交获得六倍体等等, 为进一步培育抗性强, 观赏价值高, 鲜切花寿命长的彩色马蹄莲新品种的选育加快进程。

参考文献:

- [1] SINGH Y, VAN WYK A E. Floral biology of *Zantedeschia aethiopica*(L.) Spreng(Araceae) [J]. S Afr J Bot, 1996, 62 (3): 146 - 150.
- [2] YAO J L, ROWLAND R E, COHEN D. Karyotype studies in genus *Zantedeschia*(Araceae) [J]. S Afr J Bot, 1996, 60: 4 - 7.
- [3] 吴丽芳, 蒋亚莲, 杨春梅. 我国彩色马蹄莲种苗和种球生产技术研究进展[C]//中国园艺学会球根花卉分会. 中国球根花卉年报. 北京: 中国农业科技出版社, 2005: 192 - 196.
- [4] 陈嫣嫣. 彩色马蹄莲离体快繁技术及栽培措施研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2005.
- [5] 李懋学, 张赞平. 作物染色体及其研究技术[M]. 北京: 中国林业出版社, 1996: 23 - 37.
- [6] 匡全, 梁国鲁, 郭启高, 等. 秋水仙素诱导牛蒡多倍体[J]. 植物生理学通报, 2004, 40 (2): 157 - 158.
- [7] 盖益均. 实验统计方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 81 - 88.
- [8] 程金水. 园林植物遗传育种学[M]. 北京: 中国林业出版社, 2001: 175 - 178.
- [9] 潘瑞炽. 植物生理学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2004.
- [10] CHANDLER C K, LYRENE P M. Relationship between guard cell length and ploidy in *Vaccinium*[J]. Hort Sci, 1982, 17 (1): 53 - 54.
- [11] 常月梅. 果树多倍体鉴定进展[J]. 山西林业科技, 2000 (1): 1 - 9.
- [12] 徐冠仁. 植物诱变育种学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1992.
- [13] 何建. 长穗桑多倍体新种质培育的技术研究[D]. 重庆: 西南大学, 2006.
- [14] 聂振鹏. 颠茄的组织培养和新种质选育研究[D]. 重庆: 西南大学, 2006.
- [15] 梁国鲁. 天然三倍体枇杷的筛选及其遗传特性与基因组分析[D]. 重庆: 西南大学, 2006.
- [16] 覃丽平, 刘志敏. 百合快速繁殖及染色体加倍的最新进展[J]. 湖南农业科学, 2003 (3): 11 - 13.
- [17] 王晓红, 谭晓风. 用秋水仙碱诱导非洲菊多倍体的研究[J]. 中南林学院学报, 2005, 25 (4): 57 - 61.
- [18] 瞿素萍, 熊丽, 莫锡君, 等. 香石竹的多倍体诱导及其变异研究[J]. 西南农业大学学报: 自然科学版, 2004, 26 (5): 609 - 612.