

秋水仙碱诱导重瓣大岩桐 (*Sinningia speciosa*) 多倍体的研究

¹王鸿鹤 ²葛欣 ³徐启江 ²吴绛云

¹(中山大学生命科学学院, 广州 510275) ²(东北农业大学生物工程系, 哈尔滨 150030)

³(东北农业大学农学院, 哈尔滨 150030)

摘要 以重瓣大岩桐叶片为外植体, 经秋水仙碱处理得到大量的多倍体植株。在培养基中加入秋水仙碱 20 mg L⁻¹ 处理一周, 可使重瓣大岩桐的诱变率达到 62.5%。对再生植株进行形态学观察表明, 多倍体植株比二倍体的茎粗壮, 叶片增大, 加厚。细胞学鉴定四倍体染色体数为 $2n=4x=52$, 而二倍体的染色体数为 $2n=26$ 。形态学观察和细胞学观察有很好的符合性。对多倍体植株进行过氧化物同工酶分析表明, 多倍体植株的同工酶酶谱与二倍体有很大的差异, 在四倍体的酶谱中观察到了两条新谱带。

关键词 大岩桐; 秋水仙碱; 多倍体; 同工酶

中图分类号 Q943

IN VITRO INDUCTION OF POLYPLOID PLANTS FROM COLCHICINE-TREATED *SINNINGIA SPECIOSA*

¹Wang Honghe ²Ge Xin ³Xu Qijiang ²Wu Jiangyun

¹(School of Life Science, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

²(Department of Bioengineering, Northeast Agricultural University, Harbin 150030)

³(School of Agronomy, Northeast Agricultural University, Harbin 150030)

Abstract The polyploid plants were obtained from the leaves of *Sinningia speciosa* (Lodd.) Hiern treated by colchicine. Best result for inducing tetraploid was by adding colchicine 20 mg L⁻¹ into the medium treated for one week rather than by colchicine soaking. Morphological observation showed that the stems and the leaves of tetraploid plants were respectively thicker and larger than the diploid ones. The chromosome number of tetraploid plants was $2n=4x=52$, while that of diploid plants was $2n=26$. Peroxidase isoenzyme analysis showed that the enzyme activities between the polyploid and the diploid plants were quite different. Two new bands were observed in the isoenzyme map of tetraploid plants.

Key words *Sinningia speciosa*; Colchicine; Polyploid; Isoenzyme

重瓣大岩桐为苦苣苔科多年生草本花卉, 是著名的观赏花卉之一^[1]。大岩桐属异花授粉植物, 种子量少, 用种子繁殖的后代难以保持原有优良种性, 而且对于极为珍贵的重瓣品种来说, 由于雌雄蕊的退化丧失了结实能力, 因此用大岩桐的种子进行繁殖受到一定程度的限制。

一般利用组织培养来快速繁殖, 同时还可以进行性状的改良。多倍体花卉往往具有粗壮, 叶大, 花大等特征^[2-4], 常规的方法是用秋水仙碱处理实生苗的生长点, 但加倍率较低, 易于出现嵌合体。利用组织培养在试管内诱导多倍体, 可以提高多倍体发生频率, 减少嵌合体出现的频率, 而且可在短期内繁殖出大量的多倍体植株。

本文选用重瓣大岩桐的叶片作外植体, 研究秋水仙碱诱导多倍体的效果, 并获得了大量的多倍体植株, 具有理论和实践意义。

1 材料与方 法

培养基 分化培养基 MS+BA 2 mg L⁻¹(单位下同)+NAA 0.2(预培养培养基为同一培养基); 生根培养基 1/2MS+IBA 1.0+AC(活性炭) 1.0。

取重瓣大岩桐(*Sinningia speciosa*) 幼叶流水冲洗后, 70% 酒精中泡 30 s。0.1% 升汞(加吐温一滴) 8 min, 无菌水冲洗三遍后用无菌滤纸吸干, 切成 1 cm² 左右的小块, 正面置于分化培养基上^[5,6], 分化出不定芽后, 将其转入生根培养基中生根。在 25±1℃, 光强 1500 lx, 10 h d⁻¹ 下培养。一般 5 周左右即可从不定芽途径获得再生植株。

加入培养基处理法 将秋水仙碱过滤灭菌后按 0、5、10、15、20、25 mg L⁻¹ 的浓度分别加入分化培养基中。将叶片预培养 1 周后转入上述培养基中, 分别处理 1 或 2 周后, 无菌水冲洗, 用无菌滤纸吸干后转入分化培养基培养。

浸泡法 将秋水仙碱配成 0.5、1、2、3、4 mg L⁻¹ 的溶液, 以无菌水为对照, 将预培养 1 周的外植体浸入其中, 24 h 后取出, 无菌水冲洗 3 次, 用无菌滤纸吸干, 置于分化培养基上培养。

细胞学观察 对作加倍处理的试管苗, 在转入生根培养基上培养 10 d 左右, 一般在早上 8:00—8:30 取其茎尖(顶芽或去掉顶芽后萌发出的侧芽)^[7], 在饱和对二氯苯水溶液中进行预处理 2 h 左右。取出用蒸馏水冲洗 3 遍, 放入卡诺固定液中固定 3—24 h, 水洗后在 1 mol/L HCl 中 60℃ 水解 10 min。蒸馏水冲洗, 石炭酸品红染色 15 min 左右, 压片, 镜检, 拍照。

再生植株同工酶测定 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳分析重瓣大岩桐再生植株的过氧化物同工酶, 依据酶带数及酶活性强弱进行差异比较。取材部位为第 3—6 片幼叶。

以上各处理均重复 2 次。

2 结果与分析

2.1 秋水仙碱处理对重瓣大岩桐生长、分化的影响

加入培养基处理法 将叶片预培养一周, 转到含不同浓度秋水仙碱的培养基中处理, 以不加秋水仙碱的为对照, 处理相同的时间。秋水仙碱浓度越高, 处理时间越长, 外植体受害越严重, 分化率亦随之降低(表 1)。受害严重的叶片不再分化, 不久便发黑死亡, 变褐面积在 1/2 以下的一段时间后稍有增殖, 经一段时间的恢复可逐渐转为正常。

在研究中发现, 秋水仙碱加入培养基处理使重瓣大岩桐的分化比对照迟且缓慢, 对照 36 d 左右开始分化, 而所有处理均比对照分化晚。浓度越高, 处理时间越长则分化越晚。低浓度的处理起始生长缓慢, 但分化后长势良好, 对幼苗的抑制作用不明显。随着浓度的升高起始生长

更加缓慢,说明秋水仙碱的加入对分化的起始及幼苗的长势均有一定的抑制作用,且浓度越高抑制作用也越明显(图1)。

表1 秋水仙碱加入培养基处理对重瓣大岩桐生长及再分化的影响

Table 1 Effect of medium with colchicine on the growth and redifferentiation

处理时间 Treatment time	浓度 Concentration (mg L ⁻¹)	外植体数 No. of explants	死亡率 Death rate (%)	受害率 Injury rate (%)	不定芽发生率(%) Frequency of adventitious bud
一周 One week	0	30	0	0	66.7
	5	30	0	6.7	60
	10	30	6.7	13.3	56.7
	15	30	13.3	13.3	46.8
	20	30	16.6	20	40
	25	30	26.6	23.3	23.3
两周 Two weeks	5	30	13.3	13.3	25.7
	10	30	20	16.6	30
	15	30	26.6	20	20
	20	30	23.3	26.7	13.3
	25	30	33.3	33.3	10

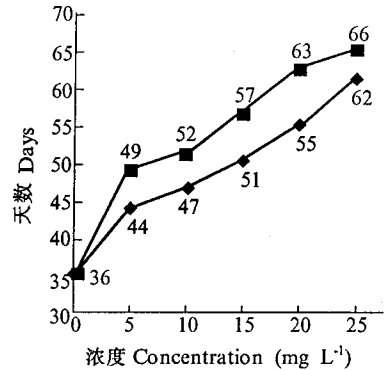


图1 秋水仙碱对重瓣大岩桐再分化的影响

Fig. 1 Inhibitory effect of colchicine on the redifferentiation of *Sinningia speciosa*
 ◆—一周 One week; ■—两周 Two weeks

液体浸泡处理法 液体浸泡处理法比培养基处理法对外植体的作用更直接,两种处理方法剂量上虽然相差很大,但对重瓣大岩桐的生长分化状况的影响表现出一致的趋势。即浓度越高死亡率越高,分化率随之降低(表2)。0.5 mg L⁻¹的低剂量处理时外植体没有死亡现象,1.0 mg L⁻¹及以上处理受害率和死亡率逐渐升高,分化受到明显抑制。

表2 液体浸泡处理法对分化率的影响

Table 2 Effect of colchicine liquid soaking treatment on differentiation frequency

浓度 Concentration (mg L ⁻¹)	外植体数 No. of explants	死亡率 Death rate (%)	受害率 Injury rate (%)	分化率* Differentiation rate (%)	分化不定芽数 No. of adventitious buds
0	30	0	0	70 a	61
0.5	30	0	6.7	66.7 a	52
1.0	30	10	16.7	56.7 b	43
2.0	30	26.7	23.3	33.3 c	22
3.0	30	46.7	36.7	26.7 d	10
4.0	30	56.7	40	13.3 e	2

*分化率后的字母为差异显著水平(0.05水平)

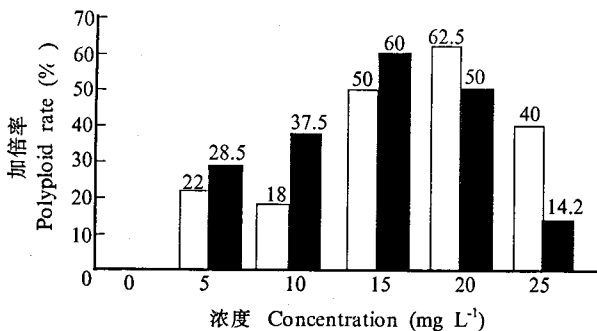


图2 处理时间和处理浓度对加倍效果的影响

Fig. 2 Effect of medium with colchicine on polyploid rate

□ 一周 One week; ■ 两周 Two weeks

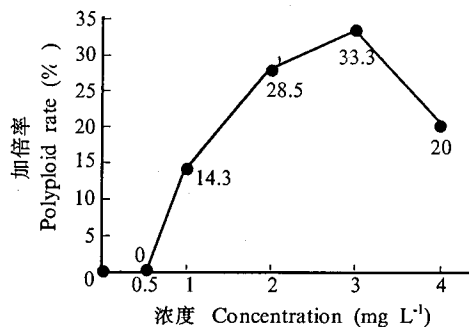


图3 液体浸泡处理法对加倍效果的影响

Fig. 3 Effect of colchicine soaking treatment on polyploid rate

2.2 秋水仙碱处理对再生植株加倍效果的研究

利用秋水仙碱处理离体培养的重瓣大岩桐叶片，使无性系后代产生大量的多倍体植株，其中大部分为四倍体植株 ($2n=4x=52$)，少数为非整倍体及八倍体植株。对照为二倍体 ($2n=2x=26$) (图版 I:1-4)。与二倍体比较，多倍体植株在外部形态上表现为茎、叶柄粗壮，叶片肥厚、有时皱缩扭曲、生长势强等特点^[2-4,8-12](图版 I:5,6)。实验证明，外部形态与细胞学检验结果有很好的一致性。

从图 2 我们可以看到，加入培养基处理法中， $15-25 \text{ mg L}^{-1}$ 处理一周， $10-20 \text{ mg L}^{-1}$ 处理两周均有利于多倍体的发生，从多倍体的诱导频率来看， 20 mg L^{-1} 处理一周， 15 mg L^{-1} 处理两周加倍效果最好。我们知道随着处理浓度的提高及时间的延长，外植体的死亡率及受害率也随之提高，而且再生能力也相应下降。诱变的关键是既要获得较高的变异率又要保持较高的成活率。目前，人们对诱变最适剂量的看法有所不同，有人认为半致死剂量为诱变的最适剂量，而另一些人认为应更高些或低些^[2,4,9]。我们的实验证明，在某个剂量范围内变异率随诱变剂量的升高而增加，当超过某一剂量时，变异率反而有所下降。所以综合考虑以上几个因素，我们认为 20 mg L^{-1} 处理一周比较适宜。

液体浸泡处理法也可以得到一定频率的多倍体植株。多倍体出现的频率随浓度不断增高而增加，但加倍频率较培养基处理法低。从图 3 可以看到， 0.5 mg L^{-1} 的处理没有得到加倍植株， $1.0、2.0、3.0、4.0 \text{ mg L}^{-1}$ 处理得到不同频率的加倍植株，以 3.0 mg L^{-1} 最高，为 33.3%，继续升高浓度加倍效果亦呈下降趋势。液体浸泡处理法对外植体的伤害较直接，而且由于重瓣大岩桐叶片表面密布表皮毛，增加冲洗次数又增加了外植体受污染的机会，所以我们认为液体浸泡处理法不论在操作上还是在加倍效果上均不如培养基处理法。

2.3 再生植株过氧化物同工酶分析

我们对秋水仙碱处理后产生的再生植株进行了过氧化物同工酶酶谱的分析比较，结果表明：二倍体再生植株与原植株相比，同工酶谱带只有一些细微的差别。而经秋水仙碱处理产生的多倍体植株与二倍体植株的过氧化物酶酶谱差异明显，在较高的体细胞倍数水平上其过氧化物酶活性提高的同时，单个酶带活性也发生了变化，多倍体的有些酶带活性与二倍体的酶带活性相同，而另外一些则较高(图 4，图版略)。研究中还发现，四倍体较二倍体多出两条特征性谱带，而八倍体和非整倍体均无这两条带，酶带数目与倍性之间并无相关性。

3 讨论

利用秋水仙碱进行染色体加倍具有经济、方便、诱变作用专一性强等特点，在多种植物上都曾获得成功，并育成了一些品种。对离体培养的细胞或组织进行诱变处理，产生的变异效果更加明显。本实验通过对离体培养的重瓣大岩桐叶片进行秋水

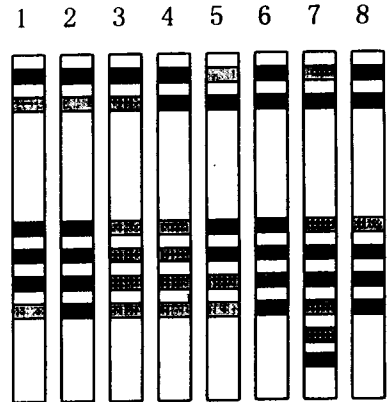


图 4 过氧化物同工酶变异示意图

Fig. 4 Sketch map of variation of peroxidase isoenzyme bands

1 对照 Control; 2-5 二倍体再生植株 Diploid regenerated plants; 6 八倍体 Octoploid; 7 四倍体 Tetraploid; 8 亚四倍体 Subtetraploid

仙碱处理,得到了大量的多倍体植株(其中多数是四倍体植株),再生植株在形态上表现出了多倍体的典型特征,诸如:茎、叶柄粗壮,叶片肥厚,叶色深绿,生长势强等特点。所用的两种方法都得到了多倍体植株,但从操作和加倍效果两方面来考虑,加入培养基处理是一种较为简单又高效的方法,优于液体浸泡处理法。

再生植株过氧化物酶同工酶分析表明,多倍体在生理生化特性上也发生了改变。Demaggia和Lambrubos^[12]在研究*Todea barbata*多倍体系列的过氧化物酶活性及Albuzio^[13]在番茄多倍体糖类代谢的酶中都观察到了相同的现象。Demaggia和Lambrubos^[12]在四倍体材料中也观察到两条新的同源多倍体同工酶带。Carlson^[11]研究了曼陀罗初级和次级三体中的酶,发现基因剂量对酶活性有明显的作用并指出,每个基因的转录速率是恒定的,与基因数目无关,而基因产物的量和酶活性的增加与基因数目的增加有关。但这并不能解释为什么会有新的酶带产生,可能除了转录速率外,还存在某种类型的调节机制控制多倍体同工酶的活性。同工酶本身就是植物在长期进化过程中基因突变和自然适应的结果,一些微小的变异可以直接从同工酶谱的变化上观察到,因此从植株同工酶变化,辅以外部形态学及内部解剖学,遗传学观察,相互比较,综合分析,对多倍体的认识将会更加细致和深入。

在研究中还发现,同一时期得到的苗,四倍体较二倍体开花普遍延迟一到三个月,但多倍体植株在花器官上没有表现出特别的特征,为什么四倍体的开花会延迟有待于进一步的研究。

参考文献

- 1 园丁. 珍稀室内盆花—大岩桐. 花卉, 1991, (3):14-15
- 2 黄济明. 花卉育种知识. 北京: 中国林业出版社, 1987, 18-26, 53-65
- 3 黄济明. 百合组培和试管内诱发多倍体试验. 园艺学报, 1983, 10(2):125-128
- 4 Chen C H, Goeden-Kallemeyn Y C. *In vitro* induction of tetraploid plants from colchicine-treated diploid daylily callus. Euphytica, 1979, 28:705-709
- 5 陈家银, 朱鹿鸣. 大岩桐叶愈伤组织的诱导和植株再生. 植物生理学通讯, 1990, (3):46
- 6 刘本叶, 张艳萍, 吴绛云等. 大岩桐叶片培养再生植株的研究. 生物技术, 1995, 5(2):22-24
- 7 徐根第, 沈大棱. 几种组织培养植物的染色体分析. 上海农学院学报, 1995, 13(1):53-56
- 8 陈绍潘, 陈绍裘, 杨英华等. 秋水仙碱诱变甜菊多倍体的研究. 武汉植物学研究, 1995, 13(1):1-7
- 9 连雪斌. 兰州百合多倍体诱导试验报告. 甘肃农业科技, 1995, (6):14-15
- 10 Carlson P S. Induction and isolation of autotetraploid mutants in somatic cell culture of *Nicotiana tabacum*. Science, 1970, 168:487-489
- 11 Carlson P W. Locating gene loci with aneuploids. Mol Gen Genet, 1972, 114:273-380
- 12 Demaggia A E, Lambrubos J. Polyploidy and gene dosage effects on peroxidase activity in ferns. Biochem Genet, 1974, 12:429-440
- 13 Albuzio A, Pettoli P, Cacco G. Changes in gene expression from diploid to autotetraploid status of *Lycopersicon esculentum*. Physiol Plant, 1978, 44:77-80

图版说明

秋水仙碱处理产生再生植株的染色体变异($\times 1400$ 左右)及植株变异。

1. 对照($2x=26$); 2. 亚四倍体($4x-1=51$); 3. 四倍体($4x=52$); 4. 八倍体($8x=104$); 5. 加倍植株的叶片对比(左:对照; 右:四倍体); 6. 秋水仙碱处理产生的加倍植株(左:四倍体; 右:对照)。

Explanation of plate

Chromosome variation ($\times 1400$) and plant variation of the plantlets treated by colchicine.

1. Control ($2x=26$); 2. Subtetraploid ($4x-1=51$); 3. Tetraploid ($4x=52$); 4. Octoploid ($8x=104$); 5. Comparison between leaves (Left: control; Right: tetraploid); 6. Diploid and tetraploid plantlets (Left: tetraploid; Right: control).