

文章编号 1000-5013(2005)04-0412-04

阳桃四倍体植株诱导试验

刘建福^① 杨道茂^① 吴 清^② 梁国鲁^③

(^① 华侨大学材料科学与工程学院, 福建 泉州 362021;

^② 宜宾市规划和建设局, 四川 宜宾 644000; ^③ 西南大学园艺园林学院, 重庆 400716)

摘要 利用秋水仙素对阳桃茎尖进行四倍体植株诱导. 结果表明, 浸泡法处理的效果最好, 诱导频率最高可达 29.6%, 而混培法和点滴法较差. 浸泡法以质量分数为 0.002 的秋水仙素处理 25 h 为最适宜, 混培法以质量分数为 0.002 的秋水仙素处理 20 d 效果最好. 秋水仙素诱导产生的变异植株经染色体倍性鉴定, 其染色体数目为 $2n=44$, 属四倍体植株类型. 同时, 对阳桃二倍体和四倍体植株进行形态观察发现, 四倍体植株叶色浓绿, 叶面积增大, 但叶长与叶宽的比值却减小, 保卫细胞的长度、宽度, 以及叶绿体含量也增大, 气孔密度变小.

关键词 阳桃, 四倍体, 秋水仙素, 植株诱导, 选育

中图分类号 Q 943.1; Q 949.752.1 文献标识码 A

阳桃(*Averrhoa carambola*)属酢酱草科阳桃属植物, 具有较高营养价值和药用价值^[1,2]. 目前, 我国阳桃品种落后, 果实小且种子多, 急需加强优良品种的引种和选育工作. 因此, 培育多倍体对于提高果实品质和发展阳桃生产很有意义. 染色体多倍化使植株基因活性与酶的差异性增强, 对不利环境的适应性明显增强, 经济性状得到改善, 生理上表现出优良特性^[3]. 三倍体植物的无籽特性在阳桃上具有诱人的前景^[4~6], 通过诱导四倍体与正常二倍体杂交获得不育的三倍体是比较实际的途径. 本试验旨在建立阳桃的四倍体植株诱导体系, 为实现阳桃快速繁殖和选育优良品种提供理论依据.

1 实验方法

1.1 秋水仙素诱导四倍体植株方法

以植株芽尖为外植体, 用体积分数为 0.75 的乙醇处理 8~15 s, 并用质量分数为 0.001 的 HgCl₂ (加数滴吐温) 复合消毒处理约 10 min. 然后, 采取如下 3 种方法进行四倍体诱导. (1) 浸泡法. 将获得的无菌外植体(长为 0.5 cm) 分别转移到质量分数为 0.000 5, 0.001 0, 0.002 0, 0.004 0 的秋水仙素溶液中, 处理时间(h) 分别为 15, 25, 35 和 45. 对照用无菌水处理外植体材料, 每种处理的茎段均置于摇床上轻轻摇动使其充分接触, 处理后用无菌水冲洗 2~3 次. (2) 混培法. 将获得的无菌外植体转移到添加质量分数分别为 0.000 5, 0.001 0, 0.002 0, 0.004 0 的秋水仙素溶液的培养基上, 处理时间(d) 分别为 10, 15, 20 和 25. 对照用不含秋水仙素的培养基. 培养基的配方为 MS+ 6-BA 0.5 mg · L⁻¹ + NAA 0.2 mg · L⁻¹ + GA 0.2 mg · L⁻¹, 培养温度为(25±2) °C, 光照强度 1 500~2 000 μmol · (m² · s)⁻¹, 光照时间 12~14 h. (3) 点滴法. 用无菌脱脂棉浸以不同质量分数(0.000 5, 0.001 0, 0.002 0, 0.004 0) 的无菌秋水仙素溶液, 处理无菌培养条件下的外植体茎尖. 每天处理两次, 连续处理 3 d, 对照相同条件下用无菌脱脂棉浸无菌水处理材料. 以上 3 种方法在处理后的外植体, 均转入到不含秋水仙素的继代培养基上继续培养. 待长势恢复良好后, 切去茎尖(对应建立株系) 进行染色体倍性鉴定, 确认为四倍体的株系予以保留并繁殖.

收稿日期 2004-12-28

作者简介 刘建福(1975), 男, 讲师, 主要从事植物学和生物技术的研究. E-mail: drakeliu@126.com

基金项目 华侨大学科研基金资助项目(03HZR1)

1.2 四倍体植株鉴定方法

(1) 形态鉴定法. (a) 叶片形态测定. 选取种植的 1 a 生植株, 以从下至上的第 4 片复叶的顶叶为测定对象. 采用坐标法测定叶面积(A), 用游标卡尺测叶长(L)、叶宽(H), 测定相同标准的 10 张叶片, 取其平均值. (b) 气孔、保卫细胞及所含叶绿体粒数的测定. 选取与叶面积测定相同标准的叶片, 用解剖针或镊子撕去叶下表皮并置于载玻片上. 经卡宝品红染色后压片显微观察, 在 10×100 倍下摄影并统计保卫细胞内叶绿体粒数(n); 在 10×25 倍下, 取 10 个视野测气孔密度 ρ (视野边缘的气孔以小数计). 气孔的大小、保卫细胞长(l)和宽度(h)的照片经冲洗后, 在相同倍数的标尺下测定 20 个气孔和保卫细胞并取平均值. (2) 细胞染色体鉴定法. 以茎尖细胞的倍性为标准染色体计数法. 剥出茎尖生长锥, 在 $0.002\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 8-羟基喹啉预处理 1.5~ 2.0 h. 在甲醇: 冰醋酸(3: 1) 中固定 2 h 以上, 进行前低渗及酶解(纤维素酶: 果胶酶= 1: 1) 3~ 4 h. 然后, 进行后低渗 10 min 并固定 30 min 以上. 样品经涂片、风干, 在 $0.067\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 溶液预染 30 min 并经质量分数为 0.005 的 Giemsa 染色 6 min. 最后, 进行镜检鉴定和摄影.

1.3 嵌合体的分离

将秋水仙素诱导所获得的嵌合体茎尖接种到增殖培养基上诱导不定芽, 对再生的不定芽进行倍性检测, 连续进行 3~ 4 次.

2 结果和分析

2.1 秋水仙素对四倍体植株诱导

浸泡外植体是组织培养条件下, 用秋水仙素诱导四倍体较为有效的方法, 也是最为直接的一种. 实验结果表明, 经不同质量分数的秋水仙素处理后, 产生一定的诱导效果. 随着秋水仙素质量分数(w) 和浸泡时间(t) 的增加, 外植体的伤害程度加重, 生长分裂受到抑制, 甚至部分死亡. 在一定的浸泡时间内, 诱导率(δ) 逐渐提高; 浸泡时间过长, 其诱导率反而下降. 这是因为浸泡时间和秋水仙素质量分数的增加虽有利于诱导四倍体植株, 但外植体的伤害程度加重, 从而导致高质量分数的秋水仙素和长时间的浸泡降低诱导率. 因此, 浸泡外植体用质量分数为 0.002 秋水仙素处理 25 h 效果最佳, 其诱导率达 29.6%, 如表 1 所示. 表中, m 为接种数, η 为死亡率. 在培养基中添加不同质量分数的秋水仙素诱导四倍体植株

表 1 秋水仙素对阳桃四倍体诱导的影响

处理方法	w	t/h	$m/\text{个}$	$\eta(\%)$	$\delta(\%)$	处理方法	w	t/h	$m/\text{个}$	$\eta(\%)$	$\delta(\%)$
浸泡法	0.000 5	15	30	0	0	混培法	0.000 5	240	15	6.7	0.0
		25	30	6.7	0			260	15	0	0.0
		35	28	7.1	7.1			480	13	0	0.0
		45	27	14.8	7.4			540	15	13.3	6.7
	0.001 0	15	30	0	13.3		0.001 0	240	15	0	0
		25	30	6.7	16.7			360	15	6.7	6.7
		35	30	13.3	20.0			480	15	13.3	13.3
		45	30	16.7	13.3			540	16	37.5	12.5
	0.002 0	15	30	6.7	20.0		0.002 0	240	15	13.3	6.7
		25	27	18.5	29.6			360	14	35.7	14.3
		35	30	20.2	23.3			480	16	43.8	18.8
		45	29	31.0	17.2			540	15	46.7	13.3
	0.004 0	15	28	14.3	21.4		0	240	14	35.7	7.1
		25	26	23.3	11.6			360	15	40.0	6.7
		35	303	30.0	10.0			480	17	47.1	5.8
		45	30	46.7	6.7			540	15	53.3	0
	0	45	30	0	0		0	25	15	0	0

续表

处理方法	<i>w</i>	<i>t</i> /h	<i>m</i> /个	η (%)	δ (%)	处理方法	<i>w</i>	<i>t</i> /h	<i>m</i> /个	η (%)	δ (%)
点滴法	0.000 5	72	16	56.3	3.3	点滴法	0.004 0	72	14	100.0	0
	0.001 0	72	15	80.0	6.7			72	15	0	0
	0.002 0	72	16	100.0	0						

的混培法,能够降低秋水仙素对外植体的伤害程度;但与浸泡法相比,四倍体的诱导率明显降低.从表 1 可知,混培法以质量分数为 0.001 的秋水仙素处理 480 h 的效果最好.在同一处理时间下,诱导率在一定范围内,随质量分数的增加而提高,高质量分数下诱导率明显下降.在同一质量分数下,外植体死亡率(η)随时间延长而升高,诱导率也表现为随时间的延长而升高趋势.点滴法是由脱脂棉浸泡秋水仙素溶液,在高温、高湿、密闭的条件下处理外植体,其毒害作用较浸泡法严重,死亡率剧增.从表 1 可见,点滴法诱导四倍体也有一定效果,但较前两种方法差.试验的结果表明,以质量分数为 0.001 的秋水仙素诱导效果最好.

2.2 四倍体植株的形态特征和染色体特性

2.2.1 形态特征 由于植物多倍体具有营养器官巨大性的特点,从形态上便可较为明显地进行辨别.形态特征是鉴定多倍体常用且经典的鉴定法.表 2 为阳桃四位体与二倍体植株形态比态表.结果说明,四倍体的叶面积明显大于二倍体,叶色浓绿,叶长/叶宽比值减小;保卫细胞长度和宽度增加,保卫细胞的叶绿体数目也增加,而气孔密度(ρ)降低.

表 2 阳桃四倍体植株和二倍体植株形态的比较

植株倍性	<i>A</i> /mm ²	<i>L</i> / <i>H</i>	叶色	ρ /个·mm ⁻²	<i>n</i> /个	<i>l</i> /μm	<i>h</i> /μm
四倍体	152.20	1.51	深绿	361±7	8.2	8.86±0.90	2.89±0.54
二倍体	67.86	1.82	浅绿	651±28	5.1	6.86±0.54	2.57±0.36

2.2.2 细胞染色体特性 细胞染色体鉴定是多倍体最为直接、准确的方法.将阳桃离体培养的再生植株和自然环境下的植株,经去壁低渗法制染色体片后显微观察,发现两者的染色体数目均为 $2n=2X=22$,未发现有其他倍性的细胞.这说明阳桃在离体再生体系中,遗传性相当稳定经秋水仙素处理所获得再生植株,存在一定比例的嵌合体(表 3),同时也获得纯合的四倍体.经统计四倍体染色体数目为 $2n=4x=44$.

表 3 不同秋水仙素处理方法对染色体多倍性的影响

处理方法	染色体多倍性			
	2X	4X	2X+4X	其他
混培法	30	16	4	0
浸泡法	17	27	5	1
点滴法	9	18	13	10

2.3 不同秋水仙素处理方法对染色体多倍性的影响

经秋水仙素诱导的植株中发现有嵌合现象存在,且所占比例较高,最高可达 16%.表 3 为不同处理方法的植株进行倍性统计.结果表明,浸泡法得到四倍体比例高,其次是点滴法和混培法;浸泡法和点滴法植株产生变异的比例高,而嵌合体和非整倍体出现频率也较高.由于嵌合体在培养中,各种倍性的细胞增殖速率不同,为了获得四倍体植株,避免发生“回复突变”,应及时将嵌合体分离获得纯合的四倍体植株,以稳定其倍性.即将鉴定确认的嵌合体转接到增殖培养基上诱导其产生不定芽,再检测不定芽的倍性.如此反复,从中分离得到纯合的四倍体植株.

3 结论

近年来,利用组织培养结合化学诱变剂是多倍体植株诱导的快捷途径,它具有不可比拟的优越性.如可在组织培养条件下,反复大批量处理,从而大大提高了诱导成功率,它可以不受季节限制,诱导条件易于控制,可大大缩短诱导时间.同时,诱变后的植株易于早期筛选、鉴定,而一旦筛选鉴定之后,短期内可快速繁殖出大量的试管苗,进行田间鉴定、生产试验和示范推广等^[7,8].虽然,秋水仙素这类以纺锤体为生物学作用终点的致诱变剂,对细胞的毒性和遗传的毒性不及那些以损伤 DNA 和染色体为生物学作用终点的致诱变剂所造成的伤害明显,但这并不意味着秋水仙素这类纺锤体毒物只在染色体数目上引起异常而未对染色体结构造成影响.所以,秋水仙素诱变对染色体畸变效应的影响,还有待于进一步探索.另外,秋水仙素诱变浓度及处理时间,也对染色体、细胞乃至植株造成伤害度.本实验证明,在

相同时间下,秋水仙素浓度与受伤害程度呈正比;而在同一浓度下,受伤害程度随着处理时间的延长而加剧.所以,在诱变过程中,应权衡诱导效果与伤害程度之间的平衡,提倡高浓度、短时间,或者低浓度、多次诱导的方式.

经秋水仙素处理,发现有嵌合体的存在.一般认为,这是正常细胞的分裂增殖强于诱导的异常细胞所致.随着继代次数的增加,多倍体与二倍体细胞比例会发生变化,而多倍体和二倍体细胞所占的比例对竞争过程中两者的消长有着重要的作用.如果二倍体在嵌合体中占优势,多倍体细胞由于在竞争中处于劣势而逐渐恢复为稳定的二倍体;相反,在多倍体细胞占优势的嵌合体中,二倍体细胞在竞争中也会消失而成为稳定的多倍体^[9].因此,嵌合体细胞间的竞争并不都是向着有利于二倍体的方向发展的.对于嵌合体现象,应及时对器官、组织或细胞进行分离提纯.目前,多采用嵌合体组织离体培养诱导不定芽或芽丛来加以提纯,获得稳定多倍体.另外,应及时生根移栽以稳定其倍性.

参 考 文 献

- 1 China Tropical Horticultural Society. South China fruit cultural practice:*Averrhoa carambola*[M] . Beijing: China Agricultural Press,2000 153~ 180
- 2 Xiao Bangsen, Xie Honghui, Lei Xintao. Cultural practice of *Averrhoa carambola*[M] . Beijing: China Agricultural Press, 2001. 166~ 180
- 3 Li Ziyong. Cell engineering[M] . Beijing: Science Press,2003. 192~ 193
- 4 Liu Jianfu, Wu Qing. Rapid in vitro propagation of *Averrhoa carambola*[J] . Journal of Tropical and Subtropical Botany,2004, 12 (3): 265~ 267
- 5 Liu Jianfu, Wu Qing, Liang Guolu. Tissue culture and plantlet regeneration of *Averrhoa carambola*[J] . Letters of Plant Physiology,2004, 40(1) : 69~ 111
- 6 Liu Jianfu, Wu Qing. Callus induction and plant regeneration from endosperm of *Averrhoa carambola* Invitro[J]. Journal of Tropical and Subtropical Botany,2004, 12 (4) : 367~ 370
- 7 Chen Baijun, Gao Sanlin, Bian Yunyun. The inducing of autotetraploid of scutellaria baicalensis georgi by tissue culture[J]. Journal of Plant Resources and Enviroment,2000, 9(1) : 9~ 11
- 8 Harlan J R, Dewet J M. Winge and a prayer: The origins of polyploidy[J] . Bot Rev, 1995, 41: 361~ 390
- 9 Tamura M, Tao R, Sugiera A. Production of dodecaploid plants of Japanese persimmon by colchicines treatment of protoplasts[J] . Plant Cell Reports, 1996, 15(7) : 470~ 473

Inducing Tetraploid Plantlet of *Averrhoa carambola*

Liu Jianfu^① Yang Daomao^① Wu Qing^② Liang Guolu^③

(^① College of Material Science and Engineering, Huaqiao University, 362021, Quanzhou, China;

^② Planning and Construction Bureau of Yibin, 644000, Yibin, China;

^③ College of Horticulture and Landscape, Southwest University, Chongqing, China)

Abstract To induce tetraploid plantlet of *Averrhoa carambola* by applying colchicine, the apical meristem of its cultivar ‘B₁₀’ were treated with colchicine solution in different concentrations and in different ways of treatments. The optimal effect can be obtained either by immersing it in 0.2% colchicine solution for 25 hrs or by culturing it in the medium supplemented with 0.2% colchichine for 20 days. Its mutant plantlet engendered by colchicine induction contains chromosome in a number of 44(2n= 44) and belongs to the type of tetraploid plantlet. Differing from diploid plantlet in morphology, this tetraploid plantlet is characterized by the deep green leaves with larger leaf area and smaller ratio of leaf length to leaf width and also by the increase in length and width of stomatal guard cells and the increase in the quantity of chloroplasts but the decrease in the density of stomas.

Keywords *Averrhoa carambola*, tetraploid, colchicine, inducing, breeding