

毛泡桐同源四倍体的诱导

范国强*, 杨志清, 曹艳春, 翟晓巧

河南农业大学泡桐研究所, 郑州 450002

提要: 在含有不同浓度秋水仙素双层培养基上以叶片作外植体诱导毛泡桐同源四倍体植株, 用变异植株根尖细胞染色体计数和成熟叶片中单细胞DNA含量测定的方法进行倍性分析。结果表明, 在16个试验组合中, 预培养6d的毛泡桐叶片经 $20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 秋水仙素处理72h的四倍体诱导率可达20%。

关键词: 毛泡桐; 叶片; 秋水仙素; 四倍体; 培养基

Induction of Autotetraploid of *Paulownia tomentosa* (Thunb.) Steud

FAN Guo-Qiang*, YANG Zhi-Qing, CAO Yan-Chun, ZHAI Xiao-Qiao

Institute of Paulownia, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

Abstract: Induction of autotetraploid of *Paulownia tomentosa* from the leaves of the diploid with different concentrations of colchicines on the double MS media through chromosome numbering of the plant tip cells and DNA content in leaf cell were investigated. The results indicated that the highest tetraploid induction rate might reach 20% from the leaves pre-cultured for 6 d and treated with $20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ colchicine for 72 h on the double media among 16 experiment combinations.

Key words: *Paulownia tomentosa*; leaf; colchicine; tetraploid; medium

目前, 泡桐生产中存在的丛枝病和低干大冠等问题还未得到解决。根据多倍体植物有较强抗逆能力的看法(康向阳等2004; 李云和冯大领2005; 杨今后2004), 人们自然而然地产生了泡桐多倍体可能会解决这些问题的思路。对此, 平吉功(1950)曾用种子开展过毛泡桐多倍体诱导, 但诱导率低, 并且诱导的植株也没有保存下来。此后, 再也未见有泡桐四倍体植株诱导的报道。近年来, 随着泡桐体外植株高效再生系统的完善(范国强等2002, 2005; 翟晓巧等2004; Bergman和Moon 1997; Rao等1996), 采用组织培养技术建立毛泡桐四倍体诱导体系以提高毛泡桐四倍体诱导率的想法又萌动起来。本文就是在这样的思路下开展这项研究的。

材料与amp;方法

材料为我所用种子培养80d的毛泡桐[*Paulownia tomentosa* (Thunb.) Steud]组培苗叶片。秋水仙素处理毛泡桐无菌苗叶片试验采用 $L_{12}(3^4)$ 正交设计(袁志发和周静芋2000)。秋水仙素浓度为5、10、20和 $30\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 外植体预培养时间为0、6、12和18d, 秋水仙素处理时间为24、48、72和96h(表1)。处理时, 将毛泡桐无菌苗叶片剪成 0.5

$\text{cm}\times 1.0\text{ cm}$ 的小块(外植体), 分别接种于盛有40mL $\text{MS}+0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NAA}+15\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ BA}$ 培养基(翟晓巧等2004)的容积为100mL的三角瓶中, 预培养0、6、12和18d后, 放在秋水仙素浓度分别为5、10、20和 $30\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的双层培养基[2层培养基含有相同的 $\text{MS}+0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NAA}+15\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ BA}$ 成分, 不同的是上层为10mL加入秋水仙素的液体培养基(不加琼脂粉), 下层为30mL加入相同浓度秋水仙素的固体培养基(上铺2层无菌滤纸)]上, 然后, 在温度为 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的黑暗条件下处理24、48、72和96h。处理结束后, 先用无菌水清洗外植体3次, 再用无菌滤纸吸干外植体表面液体后转到不含秋水仙素的上述固体培养基上, 于温度为 $(25\pm 2)\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、光强为 $130\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、光照时间 $16\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ 的培养室内培养。每一处理60个外植体。40d时统计外植体存活率(存活外植体数/放置外植体总数)及芽诱导率(诱导出芽的外植体个数/放置外植体总数), 并选取长约2cm的幼芽转入 $1/2\text{ MS}+0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NAA}$ 培养基中诱导生根, 20d后

收稿 2006-10-23 修定 2006-12-18

资助 河南省高校创新人才基金(2002012)。

*E-mail: zlx64@sohu.com; Tel: 0371-63558077

剪其2 cm长顶芽放到生根培养基中继代培养。每20 d继代一次,共继代5次。第5次继代苗培养20 d时,先剪其根尖制临时压片放于尼康TS-100荧光倒置显微镜($\times 2000$)下进行染色体(舒寿兰1985)观察,再用流式细胞仪测定染色体数变化的毛泡桐幼苗叶片单细胞的DNA含量(Hcini等2006),以确定诱变植株的倍性。同时,计算四倍体诱导率(流式细胞仪确认诱导出四倍体的外植体数/放置外植体总数)。每组试验重复2次。

表1 正交设计的试验组合

Table 1 Orthogonal design of treatment combination

A (秋水仙素浓度)/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	B (处理时间)/h	C (外植体预培养时间)/d
A ₁ (5)	B ₁ (24)	C ₂ (6)
A ₁ (5)	B ₂ (48)	C ₃ (12)
A ₁ (5)	B ₃ (72)	C ₁ (0)
A ₁ (5)	B ₄ (96)	C ₄ (18)
A ₂ (10)	B ₁ (24)	C ₃ (12)
A ₂ (10)	B ₂ (48)	C ₂ (6)
A ₂ (10)	B ₃ (72)	C ₄ (18)
A ₂ (10)	B ₄ (96)	C ₁ (0)
A ₃ (20)	B ₁ (24)	C ₁ (0)
A ₃ (20)	B ₂ (48)	C ₄ (18)
A ₃ (20)	B ₃ (72)	C ₂ (6)
A ₃ (20)	B ₄ (96)	C ₃ (12)
A ₄ (30)	B ₁ (24)	C ₄ (18)
A ₄ (30)	B ₂ (48)	C ₁ (0)
A ₄ (30)	B ₃ (72)	C ₃ (12)
A ₄ (30)	B ₄ (96)	C ₂ (6)

结果与讨论

1 秋水仙素处理对毛泡桐叶片四倍体诱导率的影响

由秋水仙素对毛泡桐叶片影响的结果(表2)可以看出,秋水仙素浓度和处理时间以及叶片预培养时间对毛泡桐叶片存活率、芽诱导率和四倍体诱导率的影响存在一定的差异。随着秋水仙素浓度的升高,毛泡桐叶片最高存活率和最高芽诱导率逐渐下降,而最高四倍体诱导率则出现先上升后下降的趋势。这意味着秋水仙素浓度越高越易导致毛泡桐叶片最高存活率和最高芽诱导率的快速下降。秋水仙素浓度过大过小都不利于毛泡桐四倍体的诱导。此外,叶片预培养时间和秋水仙素处理时间与四倍体诱导率的关系随着秋水仙素浓度

的不同表现出一定的差异。因此认为,在用毛泡桐叶片进行四倍体诱导时,要考虑秋水仙素浓度和处理时间以及叶片预培养时间三因素的综合效应。以在A₃B₃C₂组合中的毛泡桐叶片四倍体诱导率最高。即将经过预培养6 d的毛泡桐叶片放在浓度为20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的秋水仙素双层培养基中处理72 h后得到的四倍体诱导率最高。

表2 秋水仙素对毛泡桐四倍体的诱导

Table 2 The induction of tetraploid of *P. tomentosaplants* with colchicine

组合	存活率/%	芽诱导率/%	四倍体诱导率/%
A ₁ B ₁ C ₂	36.7	18.3	0
A ₁ B ₂ C ₃	35.0	20.0	8.3
A ₁ B ₃ C ₁	30.0	16.7	6.7
A ₁ B ₄ C ₄	40.0	36.7	11.7
A ₂ B ₁ C ₃	25.0	18.4	16.7
A ₂ B ₂ C ₂	20.0	15.0	15.0
A ₂ B ₃ C ₄	36.7	33.3	11.7
A ₂ B ₄ C ₁	18.3	11.7	8.3
A ₃ B ₁ C ₁	28.3	18.3	11.7
A ₃ B ₂ C ₄	35.0	31.3	15.0
A ₃ B ₃ C ₂	26.7	20.0	20.0
A ₃ B ₄ C ₃	16.7	11.7	11.7
A ₄ B ₁ C ₄	33.3	26.7	11.7
A ₄ B ₂ C ₁	28.3	11.7	8.3
A ₄ B ₃ C ₃	18.4	16.7	16.7
A ₄ B ₄ C ₂	8.3	6.7	6.7

2 四倍体毛泡桐植株的鉴定

图1和图2显示,(1)经秋水仙素处理而诱变的毛泡桐幼苗根尖细胞的染色体条数为 $2n=4x=80$,未经秋水仙素处理的幼苗根尖细胞的染色体数为 $2n=2x=40$ 。即发生诱变的毛泡桐根尖细胞中染色体数为二倍体植株的2倍。也就是说,诱导变异的毛泡桐幼苗为四倍体植株。(2)从流式细胞仪测

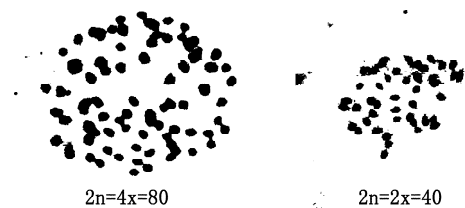


图1 四倍体和二倍体毛泡桐细胞染色体
Fig. 1 Chromosome numbers of the tetraploid and diploid of the plants

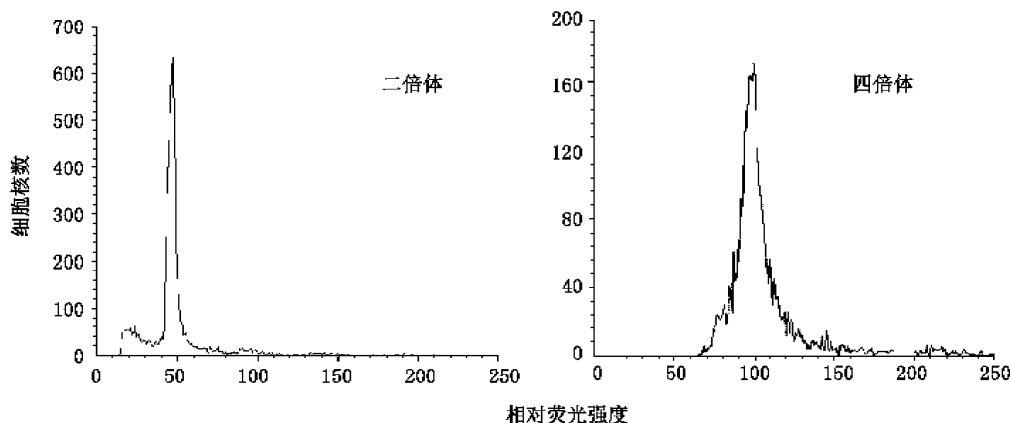


图2 毛泡桐叶中DNA含量分布

Fig. 2 Distribution of DNA content in the leaves of *P. tomentosa*

定继代5次经秋水仙素处理的染色体发生变化植株和二倍体植株叶片单细胞DNA相对含量的分布图来看,二倍体植株仅在相对荧光强度值为50的位置上出现1个单峰,诱导变异植株在接近100的位置上出现1个单峰,在50和100位置以外未出现明显的其他峰。也就是说,变异植株叶中单细胞的DNA含量为二倍体叶片的2倍。结合毛泡桐诱变植株染色体的结果,可以确定经秋水仙素处理后所获得的变异植株为四倍体植株。

总之,在目前人们用种子进行植物多倍体诱导时,诱变植株中经常出现嵌合体和非整倍体(陈高和孙卫邦2006;韩礼星和张海璇1998;李云和冯大领2005;罗耀武等1997;平吉功1950;Hcini等2006)。其原因可能是用秋水仙素处理萌发植物种子时,只有秋水仙素与植物种子胚芽原基中特定的1~3层处于分裂中期的细胞完全作用时,染色体才能加倍,并且这些加倍的细胞再进一步生长发育后才能形成四倍体植株。如果秋水仙素作用的这些细胞染色体不能全部加倍,就可能导致嵌合体或非整倍体的植株出现。本文将预培养6d的毛泡桐叶片放到含有 $20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 秋水仙素的双层培养基上诱导72h时,由于细胞分裂的同步性较好,因此处于分裂中期的细胞与秋水仙素作用时,其细胞中的染色体就容易加倍,并且此部分加倍的细胞在双层培养基上通过脱分化直接形成四倍体幼苗。所以,用此法诱导出的毛泡桐变异植株很难有嵌合体和非整倍体植株出现。即使有嵌合体或非整倍体植株的出现,经过5次继

代后还能恢复到原二倍体状态(李云和冯大领2005)。因而,本试验未检测到嵌合体和非整倍体植株。至于二倍体与四倍体植株生长量和材质之间的差异将在后续论文中报道。

参考文献

- 陈高,孙卫邦(2006).秋水仙素诱导七里香多倍体.植物生理学通讯,42(2):229~231
- 范国强,翟晓巧,蒋建平,刘新诚(2002).不同种泡桐叶片愈伤组织诱导及其植株再生.林业科学,38(1):29~35
- 范国强,翟晓巧,马新业(2005).两种泡桐叶片体细胞胚胎发生及植株再生.核农学报,19(4):274~278
- 韩礼星,张海璇(1998).猕猴桃多倍体诱导研究.果树科学,15(3):273~276
- 康向阳,张平冬,高鹏,赵芳(2004).秋水仙碱诱导白杨三倍体新途径的发现.北京林业大学学报,26(1):1~4
- 李云,冯大领(2005).木本植物多倍体育种研究进展.植物学通报,22(3):375~382
- 罗耀武,乔子靖,朱子英,皇甫中泗,常金华(1997).人工诱变获得四倍体玫瑰香葡萄的研究.园艺学报,24(2):125~128
- 舒寿兰(1985).四种泡桐染色体数目的初步研究.河南农业大学学报,19(1):48~50
- 杨今后(2004).桑树四倍体的诱导及其应用.桑业科学,30(1):6~10
- 袁志发,周静芋(2000).试验设计及统计.北京:高等教育出版社
- 翟晓巧,王政权,范国强(2004).泡桐体外器官直接发生的植株再生.核农学报,18(5):357~360
- 平吉功(1950).森林植物における人为倍数の研究.II.キノ倍体におけるの观察. Seikenziho, 4: 17~21
- Bergmann BA, Moon HK (1997). *In vitro* adventitious shoot production in *Paulownia*. Plant Cell Rep, 16: 315~319
- Hcini K, Walker DJ, Bouzid S, González E, Frayssinet N, Correal E (2006). Determination of ploidy level and nuclear DNA content in Tunisian populations of *Atriplex halimus* L. Gen Res Crop Evol, 53: 1~5
- Rao CD, Goh CJ, Kumar PP (1996). High frequency adventitious shoot regeneration from excised leaves of *Paulownia* spp. cultured *in vitro*. Plant Cell Rep, 16: 204~209