

诱变剂对芦笋单倍体染色体加倍的比较

包艳存, 李保华, 牟萌, 牛晓雪, 李霞* (山东省潍坊市农业科学院, 山东潍坊 261071)

摘要 [目的]建立芦笋单倍体染色体加倍的方法。[方法]以秋水仙碱与 Oryzalin 为诱变剂(均添加 2%DMSO),在离体培养条件下,分别用浸泡法和培养基添加法处理芦笋单倍体材料的茎尖,通过传统的根尖压片法检测染色体数目,比较不同试剂、不同处理方法、不同浓度、不同处理时间下诱导二倍体的效果。[结果]秋水仙碱的处理效果优于试剂 Oryzalin;培养基添加法的诱导效果优于浸泡法,在培养基中添加 0.2%秋水仙素并处理 5 d 时诱导效果最佳,染色体加倍效率与成活率分别可达 38.3%和 50%。[结论]秋水仙碱仍是芦笋单倍体加倍最有效的诱变剂。

关键词 芦笋;单倍体;加倍;秋水仙碱;Oryzalin

中图分类号 S644.6 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2019)05-0058-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.05.016



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Comparative of Mutagenic Agent on Chromosome Doubling of *Asparagus Haploid*

BAO Yan-cun, LI Bao-hua, MU Meng et al (Weifang Academy of Agricultural Sciences, Weifang, Shandong 261071)

Abstract [Objective] To establish the method of doubling the haploid chromosome of asparagus. [Method] Under the conditions of *in vitro* culture, Colchicine and Oryzalin were used as mutants(both added 2% DMSO). The stem tips of asparagus haploid materials were treated by soaking method and medium addition method, and the number of chromosomes was detected by the traditional root tip pressing method. Induced diploid effect of the different reagents, different treatment methods, different concentrations, different time were compared. [Result] Colchicine was better than the reagent Oryzalin. The induction effect of medium addition method was better than that of immersion method. When 0.2% colchicine was added to the medium and treated for 5 days, the induction effect was best. The chromosome doubling frequency and survival rate could reach 38.3% and 50%, respectively. [Conclusion] Colchicine is still the most effective mutagenic agent for the haploid doubling of asparagus.

Key words *Asparagus officinalis* L.; Haploid; Doubling; Colchicine; Oryzalin

芦笋学名石刁柏(*Asparagus officinalis* L.),具有丰富的营养价值和药用价值,被列为世界“十大名菜”之一,在国际市场上享有“蔬菜之王”的美称^[1-2]。芦笋为雌雄异株植物,雄株发茎数多,产量比雌株高 25%左右,其全雄育种已成为国内外芦笋育种研究的热点^[3]。

在自然群体中芦笋雄株的基因型是 Mm,雌株的基因型是 mm,通过优良雄株进行芦笋花药培养获得单倍体植株,其基因型为 M 或 m,其中 M 型的单倍体植株经染色体加倍后,可获得超雄株(MM),与优良雌株(mm)进行杂交,可育成 Mm 型的全雄性植株^[4]。单倍体植株染色体加倍的目的在于获得遗传组成同质和纯合的加倍单倍体,即 DH 系^[5]。通过单倍体植株染色体加倍,可获得同质型雌株(mm)和同质型雄株,即超雄株(MM)。应用于芦笋杂交育种中,育成的品种与常规育种获得的品种相比,一致性、稳定性将大大提高。

秋水仙碱是目前应用最为广泛且加倍效果最好的化学诱变剂,但秋水仙碱在诱导植物染色体加倍时,需要较高的浓度,而且其易对被处理的植物材料产生毒害作用,对人体也有危害^[6-8]。国外研究者认为 Oryzalin、Surflan 等试剂能够替代秋水仙碱作为染色体加倍试剂,植物对于使用 $\mu\text{mol/L}$ 浓度这种除草剂的反应与使用 mmol/L 浓度秋水仙碱处理后的反应类似,且具有毒性低、用量小、加倍率高等特点。

基金项目 山东省潍坊市科学技术发展计划项目“利用生物技术创制优良纯合芦笋种质”(2017ZJ1159)。

作者简介 包艳存(1979—),女,湖北随州人,高级农艺师,硕士,从事芦笋育种与栽培研究。*通信作者,副研究员,硕士,从事芦笋育种与栽培研究。

收稿日期 2018-10-17

Oryzalin,中文名称氨磺灵,化学名 3,5-二硝基 N^4, N^4 -丙基磺胺。用 Oryzalin 处理玉米花药培养获得的愈伤,能有效增加染色体加倍率。而且 Oryzalin 可使百合(*Lilium*)和尼润(*Nerine*)种间不育性杂种的染色体加倍^[9]。Oryzalin 还应用于如甜菜、梨、杜鹃花、大蒜、葡萄等其他植物染色体加倍的研究中,而且其在应用过程中,需要的浓度也较秋水仙碱低,研究者认为 Oryzalin 最合适替代传统染色体加倍试剂。

研究表明,在染色体加倍试验中,加入二甲基亚砜(DMSO)溶液能提高加倍效率。DMSO 虽然本身并不能提高染色体的加倍效果,但其能提高溶液通过植物分生组织的穿透力,从而使染色体加倍试剂更加活跃,从而达到提高加倍效率的目的。朱惠琴等^[10]研究表明二甲基亚砜对秋水仙碱的加倍作用有促进作用,4 g/L 秋水仙碱+20 g/L(2%) DMSO 处理比单独使用秋水仙碱烟草单倍体的加倍效率提高 2 倍以上。目前已有利用秋水仙碱对芦笋单倍体进行加倍的研究^[11]。笔者采用添加 DMSO 的不同浓度秋水仙碱和 Oryzalin 溶液对芦笋单倍体茎尖进行加倍处理,旨在比较它们的加倍效应,以期为芦笋染色体加倍找到合适的秋水仙碱替代物。

1 材料与方法

1.1 试验材料 供试材料为芦笋“冠军”品种优良雄株的花药培养单倍体再生植株的茎尖,取自山东省潍坊市芦笋所植物组织培养实验室。

1.2 主要药品及试剂的制备 主要药品:秋水仙碱、Oryzalin、二甲基亚砜(DMSO)。Oryzalin 储备溶液的制备:将 0.346 3 mg Oryzalin 完全溶解在 10 mL DMSO 内后,用 DMSO

稀释至 100 mL,此储备溶液的浓度为 10^{-2} mol/mL。Oryzalin 工作溶液的制备:用去离子水将储备溶液稀释至所需浓度。

1.3 试验方法

1.3.1 浸泡法。切取 0.2~0.3 cm 单倍体芦笋离体幼苗茎尖,在 25 °C 条件下,分别用浓度为 0.05%、0.10%、0.20% 的秋水仙碱(添加 2%DMSO)浸泡处理 7、12、16 h。切取 0.2~0.3 cm 单倍体芦笋离体幼苗茎尖,在 25 °C 条件下,分别用 0.005%、0.010%、0.020% 的 Oryzalin 溶液(添加 2%DMSO)浸泡处理 7、12、16 h。

处理完后用无菌水冲洗 3~5 遍,吸干水分,接种于 1/2MS+IBA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L+KT 0.1 mg/L 的生根培养基上培养。每个处理 3 个重复,每瓶培养基接 20 个茎尖。前期先用弱光培养 10~15 d,再转换到新培养基上培养。待植株生根后取根尖检测。

1.3.2 培养基添加法。切取 0.2~0.3 cm 单倍体芦笋离体幼苗茎尖,在 25 °C 条件下,将茎尖垂直朝下接种于添加 2% DMSO 的 MS 培养基上。培养基中添加秋水仙碱的浓度分别为 0.1%、0.2%、0.5%;培养基中 Oryzalin 的浓度分别为 0.01%、0.02%、0.05%。

每个处理 3 个重复,每瓶培养基接 20 个茎尖。先置于弱光环境培养 5、7、10 d,然后将茎尖取出,用无菌水冲洗干净,再茎尖朝上正常接种于新的 1/2MS+IBA 1.0 mg/L+NAA

0.1 mg/L+KT 0.1 mg/L 生根培养基上培养,待植株生根后取根尖检测。

1.3.3 植株倍性的鉴定。采用根尖压片法和 DNA 流式细胞仪检测法,检测经诱变剂处理后的芦笋植株染色体数目,从而判断其倍性。

2 结果与分析

2.1 浸泡法的诱导效果 由表 1 可知,采用浸泡法处理单倍体芦笋茎尖,以秋水仙素的药害最明显,处理后的植株生长速度明显变慢,出现玻璃化或者茎尖失绿的现象,失绿的会逐渐变黄变白,最后死亡(图 1、2)。随着试剂浓度的增加,植株的存活率随之下降。而且芦笋茎尖对秋水仙碱、Oryzalin 的敏感度不同,其中使用 2%秋水仙碱处理 16 h 后,植株成活率仅为 5%。Oryzalin 处理后植株存活率相对较高。在同一试剂、同一浓度下,成活率也会随着浸泡时间的延长明显降低,尤其是在高浓度下。

使用 0.1%秋水仙碱处理后加倍率最高,达 23.3%。而 Oryzalin 溶液处理的加倍率最高为 18.3%。不同浓度秋水仙碱之间加倍效率差异明显,以 0.1%秋水仙碱加倍效率最高,0.2%效率最低。而对于 Oryzalin 溶液而言,0.010%的加倍效率高,0.005%和 0.020%差异不显著。

用浸泡法诱导,最终还是以用 0.1%秋水仙碱浸泡处理茎尖 12 h 的方案,染色体加倍效率最高,达 23.3%。

表 1 浸泡法处理单倍体芦笋的诱导效果

Table 1 Induction effect of Haploid asparagus treated with immersion method

诱变剂 Mutagenic agent	处理浓度 Treatment concentration//%	处理时间 Treatment time h	处理数 Treatment number	成活数 Survival number	成活率 Survival rate %	染色体加倍数 Chromosome doubling number//个	染色体加倍效率 Chromosome doubling efficiency//%
秋水仙碱 Colchicine	0.05	7	60	38	63.3	9	15.0
		12	60	28	46.7	12	20.0
		16	60	22	36.7	8	13.3
	0.10	7	60	29	48.3	11	18.3
		12	60	23	38.3	14	23.3
		16	60	11	18.3	4	6.7
Oryzalin	0.005	7	60	48	80.0	4	6.7
		12	60	40	66.7	5	8.3
		16	60	31	51.7	3	5.0
	0.010	7	60	36	60.0	11	18.3
		12	60	28	46.7	9	15.0
		16	60	22	36.7	6	10.0
0.020	7	60	30	50.0	6	10.0	
	12	60	20	33.3	4	6.7	
	16	60	12	20.0	2	3.3	

2.2 培养基添加法的诱导效果 从表 2 可以看出,利用培养基添加法,以添加秋水仙碱的方案优于 Oryzalin,其中用 0.2%秋水仙碱处理 5 d,加倍效率最高,达 38.3%,而 Oryzalin 的加倍效率最高为 25%。培养基添加法的诱导效果优于浸泡法。

植株成活率与试剂浓度、处理时间均成反比。但染色体加倍频率不同,当在试剂浓度低的情况下,会随处理时间的延长而提高;但在高浓度情况下,则随着时间的延长而降低。低浓度长时间处理和高浓度短时间处理,差异不显著。

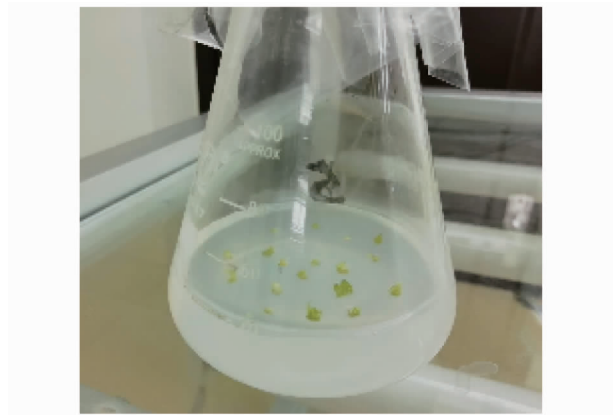


图1 0.005% Oryzalin 处理 7 h

Fig.1 0.005% Oryzalin treatment for 7 h

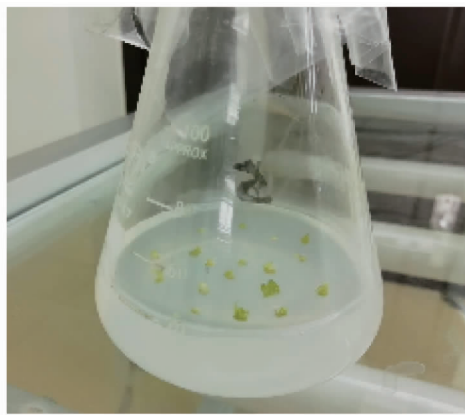


图2 0.2%秋水仙碱处理 16 h

Fig.2 0.2% colchicine treatment for 16 h

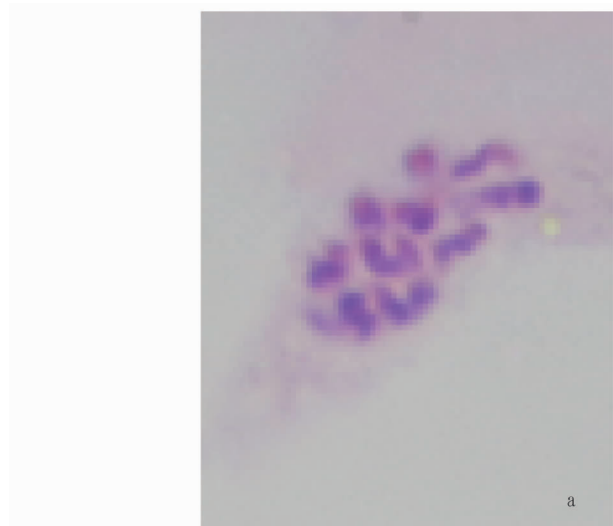
表2 培养基添加法处理单倍体芦笋的诱导效果

Table 2 Induction effect of haploid asparagus treated with medium addition

诱变剂 Mutagenic agent	处理浓度 Treatment concentration//%	处理时间 Treatment time h	处理数 Treatment number	成活数 Survival number	成活率 Survival rate %	染色体加倍数 Chromosome doubling//个	染色体加倍效率 Chromosome doubling efficiency//%
秋水仙碱 Colchicine	0.1	5	60	45	75.0	10	16.7
		7	60	39	65.0	16	26.7
		10	60	32	53.3	12	20.0
	0.2	5	60	30	50.0	23	38.3
		7	60	26	43.3	20	33.3
		10	60	22	36.7	18	30.0
Oryzalin	0.5	5	60	23	38.3	14	23.3
		7	60	20	33.3	10	16.7
		10	60	16	26.7	9	15.0
	0.01	5	60	54	90.0	7	11.7
		7	60	48	80.0	9	15.0
		10	60	42	70.0	10	16.7
0.02	5	60	43	73.3	15	25.0	
	7	60	36	60.0	13	21.7	
	10	60	26	43.3	10	16.7	
0.05	5	60	34	56.7	9	15.0	
	7	60	28	46.7	8	13.3	
	10	60	22	36.7	6	10.0	

2.3 植株倍性的鉴定 单倍体植株的染色体数为 $n=10$ (图 3a),若经处理植株的染色体数目加倍为 $2n=20$,则认为该植

株已成功加倍为二倍体(图 4a)。单倍体和二倍体生根苗见图 3b、图 4b。



a



b

图3 单倍体根尖染色体数目及生根苗

Fig.3 Chromosome number of haploid root tip and rooting seedlings

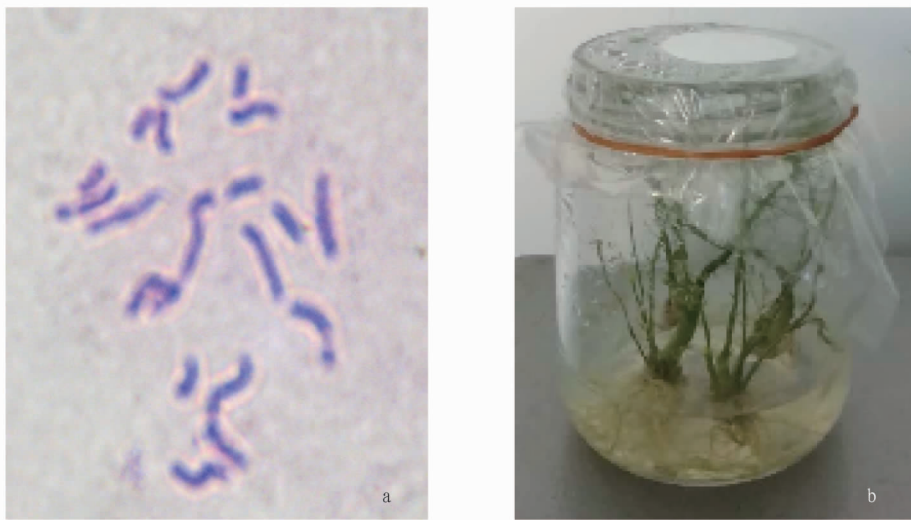


图 4 二倍体根尖染色体数目及生根苗

Fig. 4 Chromosome number of diploid root tip and rooting seedlings

3 结论与讨论

该研究结果表明,在离体培养条件下,用秋水仙碱和 Oryzalin 溶液处理单倍体芦笋的茎尖,均可以诱导单倍体芦笋的染色体加倍。不管是用浸泡法还是培养基添加法,均是秋水仙碱的加倍效率优于 Oryzalin(其中培养基添加法的诱导效果优于浸泡法)。秋水仙碱仍是芦笋单倍体加倍最有效的诱变剂。

秋水仙碱一直以来是植物多倍体育种的优良诱变剂,但其自身存在剧毒性,对被处理的植物材料、试验操作人员和生态环境会造成危害,而且在诱导植物染色体加倍时需要使用较高的浓度。国外研究者认为 Oryzalin、Suflan、Trifulan 是秋水仙素的有效代用品。这类染色体加倍剂能有效地抑制植物的有丝分裂,达到染色体加倍的效果,且具有毒性低、用量小、加倍率高等特点。Hansen 等^[7]研究了 Trifulan 在芸苔属植物染色体加倍上的应用;Takanmura 等利用 surflan 对百合进行诱导,获得了百合多倍体植株;其他研究者将 Oryzalin 应用于甜菜、梨、杜鹃花。

该试验选用 Oryzalin 与秋水仙碱进行对比研究,发现利用 2 种方法,Oryzalin 也均能诱导芦笋单倍体染色体加倍。其中利用培养基添加法,0.02% Oryzalin 培养 5 d,染色体加倍效率也能达 25%,植株成活率达 73.3%。虽然加倍率低于秋水仙碱,但成活率明显高,这与其低毒性有关。

用培养基添加法,在 0.01% Oryzalin 下,随着处理时间的延长,染色体加倍效率提高。在 0.02%、0.05% Oryzalin 时,随着处理时间的延长,染色体加倍效率反而降低。其中当浓度为 0.02%,处理时间为 5 d 时,加倍效率最高,达 25%。整

体上看,浓度为 0.01% 与 0.05% 的加倍效率差异不大。可能 Oryzalin 适宜的处理浓度为 0.01%~0.02%,适宜的处理时间为 5~7 d。

虽然该试验结果显示秋水仙碱仍是芦笋单倍体加倍的最有效诱变剂。但还应对用 Oryzalin 对芦笋单倍体染色体加倍做进一步研究,如优化处理浓度和处理时间,优化后期的培养方法等,Oryzalin 有望替代秋水仙碱作为诱变剂。

参考文献

- [1] 李书华. 芦笋标准化栽培技术[M]. 北京:中国农业出版社,2004:8-14, 67-69.
- [2] 叶劲松. 芦笋的食疗与食谱[M]. 北京:台海出版社,2005:15-41.
- [3] 张元国,于继庆,陈桂英,等. 芦笋全雄株品种的培育途径及其关键技术[J]. 农业科技通讯,1997(6):16-17.
- [4] 王小佳. 蔬菜育种学(各论)[M]. 北京:中国农业出版社,2000:241-251.
- [5] CHOO T M, REINBERGS E, KASHA K J. Use of haploids in barley breeding[J]. Plant breeding reviews, 1985, 3:219-252.
- [6] 周维燕. 植物细胞工程原理与技术[M]. 北京:中国农业大学出版社,2001:127.
- [7] HANSEN N J P, ANDERSEN S B. Efficient production of doubled haploid wheat plants by *in vitro* treatment of microspores with trifluralin or APM[J]. Plants breeding, 1998, 117(5):401-405.
- [8] 李静,李春明,卓泳杉,等. 秋水仙碱诱导山杨异源多倍体[J]. 安徽农业科学,2014,42(4):1098-1100.
- [9] VAN TUYL J M, MEIJER B, VAN DIEN M P. The use of Oryzalin as an alternative for Colchicine in *in-vitro* chromosome doubling of *Lilium* and *Nerine*[J]. Acta horticulturae, 1992, 325:625-629.
- [10] 朱惠琴. 二甲基亚砜(DMSO)对烟草单倍体植株的染色体加倍效应[J]. 青海师范大学学报(自然科学版),2004(2):54-56.
- [11] 张天翔,林宗铨,蔡坤秀,等. 芦笋单倍体染色体加倍技术研究[J]. 中国农学通报,2011,27(13):212-215.
- [12] TAKAMURA T, LIM K B, van TUYL J M. Effect of a new compounds on the mitotic polyploidization of *Lilium longiflorum* and oriental hybrid lilies[J]. Acta horticulture, 2002, 572:37-42.
- [13] 辽宁林业科技,2009(5):46-47.
- [14] 杜春梅,欧滢蔓,董锡文,等. 三种维生素对滑菇固体培养的影响[J]. 北方园艺,2014(21):149-151.
- [15] 冯杉,江林炎,李赛楠,等. 无机盐和维生素对固体培养槐耳菌丝生长影响的研究[J]. 中草药学,2015,13(6):591-593.
- [16] 贾洛,张红,王广耀. 不同生长调节物质对白灵菇菌丝生长的影响[J]. 北方园艺,2009(11):226-227.

(上接第 57 页)

- [8] 王妍,杜春梅,姜忠元,等. 不同培养基对黑木耳锁状联合菌丝比率的影响[J]. 安徽农业科学,2016,44(35):49-50.
- [9] 林衍铨,马路,应正河,等. 碳源和氮源对绣球菌菌丝生长的影响[J]. 食用菌学报,2011,18(3):22-26.
- [10] 张玉龙,石文平,王承禄,等. 不同培养基对黑木耳菌丝生长的影响