

## 秋水仙素对马尾松种子发芽的影响

李玉璞, 仲维赫, 李敏, 赵杨\* (贵州大学林学院, 贵州贵阳 550025)

**摘要** [目的]研究秋水仙素对马尾松种子发芽的影响。[方法]研究不同浓度的秋水仙素对马尾松种子发芽及幼苗生理特性的影响。[结果]当秋水仙素的浓度为 60 和 80 mg/L 时,种子的平均发芽时间明显延长,当秋水仙素的浓度大于 60 mg/L 时种子发芽后畸形率为 37%,当秋水仙素的浓度高于 80 mg/L 时种子致死率为 81.7%;经秋水仙素处理后的植株表现为针叶粗短,颜色加深,叶形指数减小,气孔变大,叶绿素含量、可溶性蛋白含量、可溶性糖含量均高于对照组。[结论]该研究为马尾松突变体的产生筛选及良种选育提供了基础。

**关键词** 秋水仙素;多倍体;发芽率

**中图分类号** S791.248 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)09-03781-02

Effects of Colchicine on Seeds Germination of *Pinus massoniana* Lamb.

LI Yu-pu et al (College of Forestry, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025)

**Abstract** [Objective] The paper was to study the effects of colchicine on seeds germination of *Pinus massoniana* Lamb. [Method] The effects of different concentrations of colchicine on the germination and seedling physiological characteristics of *P. massoniana* were studied. [Result] When the concentrations of colchicine were 60 and 80 mg/L, the average germination times were significantly prolonged; when the concentration of colchicine was greater than 60 mg/L, the teratogenic rate after seed germination was 37%; when the concentration of colchicine was higher than 80 mg/L, the lethality rate of seeds was up to 81.7%. Plants treated by colchicine showed the pine needles turned to be short and thick with deep colors and a decrease of leaf shape index, accompanied with air hole extended. The contents of chlorophyll, soluble protein and soluble sugar of treatment groups were higher than that of control group. [Conclusion] The study provided foundation for the generation and screening of *P. massoniana* mutants and the breeding of excellent varieties.

**Key words** Colchicine; Polyploid; Germination rate

马尾松以其速生、丰产、适生能力强、分布广、全树综合利用程度高、用途广泛等优良特性,成为我国南方最主要优质用材树种,是我国松属树种中分布最广的一种。马尾松对气候、土壤的适应性很强,在广泛复杂的地理环境中,经过长期的自然选择形成了多样的种源。而这些不同种源之间的遗传特性、生产力以及生物学特性都表现出明显的差别。然而多倍体在自然界分布广泛则表明多倍体可增强植物的适应性和竞争力<sup>[1]</sup>,多倍体特别是异源多倍体在染色体加倍后可带来营养器官的巨大变化,在自然界中表现为花叶硕大、茎粗、颜色加深、抗逆性强等优点,因此可通过多倍体育种培育出速生优质的林木品种,缩短栽培利用的周期<sup>[1]</sup>。目前多倍体在杨树育种研究中应用最为广泛,成效最为显著。

1935年,Nilsson在瑞典发现了一株叶片巨大且生长迅速的巨型三倍体欧洲山杨<sup>[2]</sup>,由此掀起了林木多倍体育种的开端。针叶树种因具有庞大的基因组,严重阻碍了其多倍体育种的研究进程。目前已发现的多倍体针叶树种包括北美红杉、日本柳杉、智利柏、红松、赤松、落叶松等数十种<sup>[3-4]</sup>。1937年Blakeslee等采用曼陀罗等植物证实秋水仙素对多倍体的诱导具有显著效果,进一步掀起了多倍体诱导研究的热潮<sup>[5]</sup>。康向阳等用秋水仙素处理毛新杨雄花芽,成果诱导出 $2n$ 花粉,并通过与正常的雌花授粉杂交,得到三倍体毛白杨,显著提高了毛白杨的生长速度<sup>[6]</sup>。利用秋水仙素处理种子

后,体细胞染色体数目加倍,可进一步分化形成多倍体植株。付育等用0.3%秋水仙素处理侧柏种子,浸种72h后,获得了四倍体变异植株<sup>[7]</sup>。通过研究对比发现,以种子作为诱导材料时诱导率会更高,且操作简便,较易得到多倍体。针叶树种基因组庞大,在自然界中产生多倍体的几率很小,人工诱导多倍体过程中会产生大量嵌合体,这些植株具有不稳定的染色体数目,减数分裂异常,表现出高度不育。

文中针对秋水仙素处理对不同种源马尾松种子的影响进行研究,旨在了解秋水仙素对马尾松种子发芽及初期种苗的影响,为马尾松的多倍体育种研究奠定基础。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 马尾松种子,是来源于贵州省都匀国家良种基地的优良种子。秋水仙素购自美国Sigma公司。

**1.2 种子处理** 对种子进行初步筛选,挑选籽粒饱满的种子作为研究对象,用0.2%高锰酸钾溶液浸泡30min,初温40℃,温水浸泡24h催芽后,散布于用75%酒精消毒的发芽盒中。

**1.3 培养条件** 将发芽盒置于培养箱中,日照时间12h/d,空气湿度80%,培养温度25℃,先培养48h待种子初萌发后再用不同浓度的秋水仙素进行处理。秋水仙素浓度分别设置为0、20、40、60、80mg/L,每日喷洒一次,连续喷洒15d。

## 1.4 秋水仙素诱导效果鉴定

**1.4.1 植株形态观测。**对用不同浓度秋水仙素处理的马尾松种子发芽后幼苗的形态指标进行测定。

**1.4.2 可溶性蛋白质。**可溶性蛋白含量的测定采用考马斯亮蓝G-250方法。取0.5g新鲜针叶洗净,擦干,放入研钵中,加2~3ml ddH<sub>2</sub>O,研磨至糊状,定容至10ml,取1ml样液,加入5ml考马斯亮蓝G-250溶液,充分混合,放置2min后在595nm下比色,记录吸光值,并通过吸光值计算可溶性

**基金项目** 贵州省农业攻关项目(黔科合NY字[2010]3062号);贵州省重大科技专项。

**作者简介** 李玉璞(1986-),男,河北平山人,硕士研究生,研究方向:种苗繁育与生物技术,E-mail:liyupu12315@126.com。\*通讯作者,副教授,博士,从事林木遗传育种教学与研究,E-mail:zhy737@126.com。

**收稿日期** 2013-03-28

蛋白质含量。

**1.4.3 叶绿素提取。**取 2 g 新鲜针叶洗净,擦干,放入研钵中,加入少许石英砂及 2~3 ml 95% 乙醇,研磨至糊状,再加入 10 ml 95% 乙醇,提取 35 min,上清液过滤后置于 25 ml 容量瓶中,清洗 2~3 次,定容。用紫外分光光度计测定吸光值。

**1.4.4 还原性糖含量的测定。**为减小气候因素对可溶性糖含量测定的影响,采样时间选在清晨 6:00~8:00 之间,采样时,从植株不同方向采取成熟叶片,混匀标记后带回实验室待测。可溶性糖含量采用蒽酮比色法测定<sup>[8]</sup>。

## 2 结果与分析

**2.1 诱变效果** 马尾松种子经秋水仙素诱导处理后,生长受到抑制,发芽时间延长,子叶肥大,颜色加深,根尖茎尖发育变缓,约经 3 周才开始长出新芽,在高浓度处理下的幼芽基本停止发育,经约 2~3 周后死亡。对存活的幼苗进行调查统计,将针叶粗短、颜色加深或根长变短的植株记做形态变异植株。

从图 1 中可看出,随着秋水仙素浓度的升高,植株畸形率逐渐升高,死亡率也呈明显上升趋势。其中 40~60 mg/L 的秋水仙素对马尾松种子的处理效果明显。当秋水仙素浓度为 80 mg/L 时,种子的发芽率明显下降,株型变异率最高。对不同处理时间下马尾松种子的形态变异率进行对比,结果显示,在相同浓度下,株型变异率与处理时间无明显相关性。

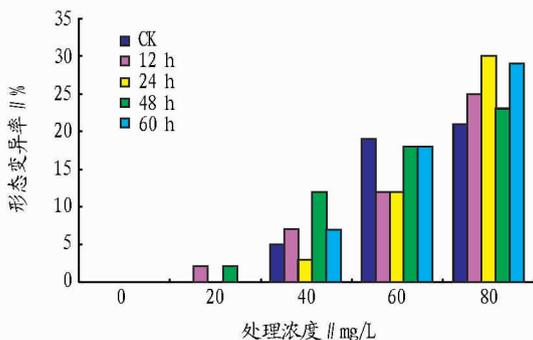


图 1 秋水仙素不同浓度的诱变效果

**2.2 叶绿素含量测定** 由图 2 可见,叶绿素在 470 和 665 nm 波长下的含量在 20、40、60 mg/L 处理下逐渐增加。但在 80 mg/L 秋水仙素的处理下,655 和 649 nm 波长下叶绿素的含量呈下降趋势。在 470 nm 波长下叶绿素的含量均低于对照组,但随着秋水仙素浓度的增加,幼苗叶片中叶绿素浓度呈先升高后降低的趋势,在 20 mg/L 浓度时含量最低,在 60 mg/L 浓度时含量达最高值,但均低于对照组含量。

**2.3 可溶性蛋白质含量测定** 由 3 图可看出,经过秋水仙素处理的马尾松种子在幼苗期间的可溶性蛋白含量均高于对照组,在秋水仙素浓度为 40 mg/L 时可溶性蛋白含量达最大值。之后随着秋水仙素浓度的升高,可溶性蛋白含量逐渐降低。

**2.4 可溶性糖含量测定** 由图 4 可看出,在秋水仙素低浓度时期可溶性糖的变化不明显,当秋水仙素浓度达 60 mg/L 时可溶性糖的含量明显提高,在 80 mg/L 时达最大值。

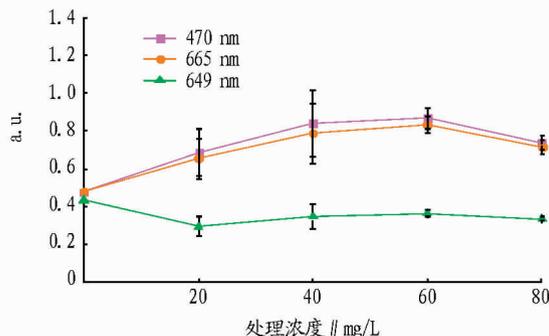


图 2 不同浓度秋水仙素对马尾松幼苗叶绿素含量的影响

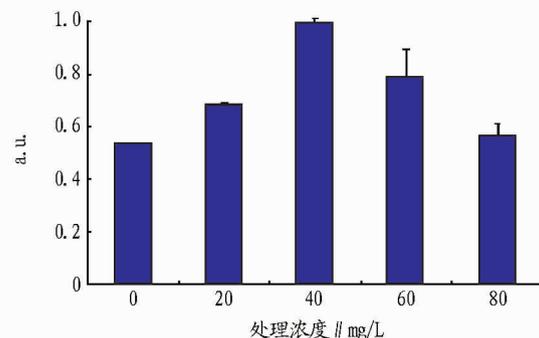


图 3 不同秋水仙素浓度对马尾松幼苗可溶性蛋白的影响

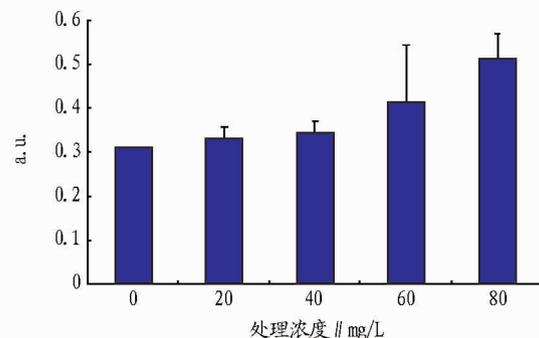


图 4 不同秋水仙素浓度对马尾松幼苗可溶性糖含量的影响

## 3 讨论

秋水仙素是诱导多倍体产生的重要手段之一。大量研究表明,多倍体是高等植物在进化中产生变异的重要过程。高等植物多倍体化后其等位基因数目加倍,从而产生出更多的基因组合。相对二倍体而言,多倍体拥有更高的杂合性与更高的环境适应能力。然而针叶树种由于基因组较大,在进化过程中产生多倍体几率很小,且采用秋水仙素处理产生多倍体的难度很大,因此针叶树种多倍体研究仍然很少,在很大程度上限制了针叶树种多倍体在生产实践中的应用。

尽管近几十年来育种学家在多倍体研究中取得了巨大的成就,但人工诱导的针叶树种多倍体普遍生长缓慢、个体矮小、高度不育,营养生长优势不明显。经研究发现,秋水仙素处理的种子萌发时间延长,发芽率降低。

叶绿素是高等植物进行光合作用的主要物质。光合作用的强弱直接取决于植物叶片中叶绿素的含量。该研究中,在秋水仙素浓度为 60 mg/L 时,叶绿素含量达最高,此时最

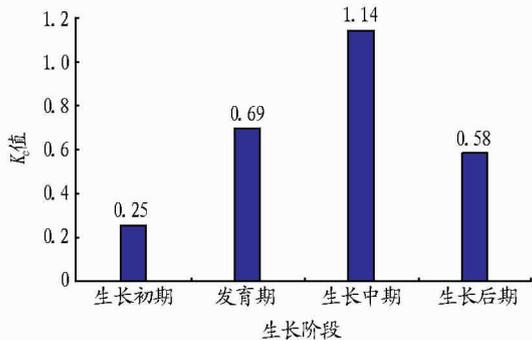
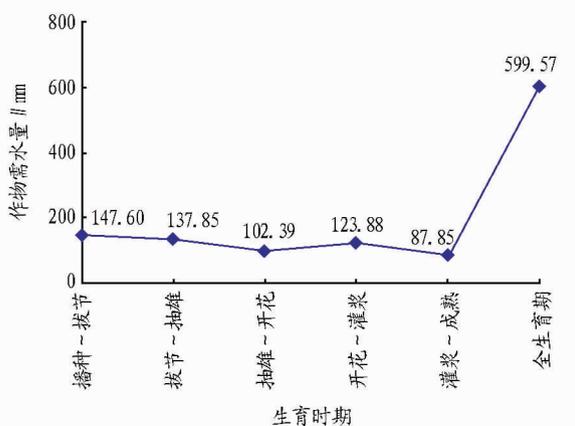
图5 玉米 K<sub>c</sub> 值

图6 玉米不同生育时期需水量

线型变化,在灌浆期达到最大值。

(2)玉米生长最快时期(玉米的拔节和抽雄期)及时采用井水灌溉,可较好地满足作物生长需水要求,故长势较好。作物随生育进程的发展叶面积指数呈现抛物线型变化,从苗期接近于0到灌浆初期达到最大,之后随着植株老化,叶面积指数缓慢减小。

(3)需水量计算首先需计算参考作物蒸发蒸腾量,然后利用作物系数进行修正得出各种作物的需水量。参考作物蒸发量的计算采用修正后的彭曼公式可取得较为理想的结果,生育期的作物系数可根据试验实测资料和气象资料,根据需水量计算通用图表进行。井渠双灌条件下玉米生长初期作物系数0.25、发育期0.69、生长中期1.14、生长后期0.58;玉米整个生育期需水量为599.57 mm,需水强度2.60~5.99 mm/d。

#### 参考文献

- [1] PEREIRA L S. Calculation of reference evapotranspiration [M]. FAO, 1996.
- [2] 冯文基,申利刚,冯婷,等. 内蒙古自治区主要作物灌溉制度与需水量等值线图[M]. 呼和浩特:远方出版社,1996.
- [3] 李继超,陈瑄,李振华. 试论河套灌区发展井灌的可行性与建设中应注意的问题[J]. 内蒙古水利,2003(4):24-25.
- [4] 陈玉民,郭国双. 中国主要作物需水量与灌溉[M]. 北京:水利电力出版社,1995.
- [5] 王新坤,蔡焕杰,曹兵. 单井膜下滴灌灌溉制度优化[J]. 灌溉排水学报,2002,21(3):12-16.
- [6] 朱丽,史海滨,王宁,等. 基于 ISAREG 模型的小麦间作玉米优化灌溉制度研究[J]. 灌溉排水学报,2012(4):26-31.
- [7] 郭克贞,赵淑银,苏佩凤,等. 草地 SPAC 水分运移消耗与高效利用技术[M]. 北京:中国水利水电出版社,2008.

(上接第3782页)

利于植物进行光合作用。可溶性蛋白是植物进行氮循环过程中的重要物质,通常作为评价植物生理过程的重要指标。在植物体内的可溶性蛋白大多是参与各种代谢的酶类,在植物的抗寒、抗旱中起重要作用。该研究中,在40 mg/L的秋水仙素处理下可溶性蛋白含量达最大,表明此浓度处理可提高马尾松幼苗的抗旱与抗寒特性。可溶性糖是高等植物的主要光合作用产物,也是碳水化合物代谢和储藏能量的主要形式,在植物代谢过程中占有重要的位置。该研究中,在80 mg/L的秋水仙素处理下可溶性糖的含量达最高,表明高浓度的秋水仙素处理对马尾松幼苗碳代谢过程有明显的促进作用。

通过以上研究发现,40、60 mg/L秋水仙素处理对马尾松种子的发芽有促进作用,秋水仙素浓度为60 mg/L时处理效果显著高于40 mg/L,可明显提高幼苗的株型变异率、叶绿素含量、可溶性蛋白含量以及可溶性糖含量,表明在此浓度的秋水仙素最有利于马尾松幼苗的生长与干物质的积累。但随着浓度的增加,马尾松种子的发芽率迅速降低,萌发植株

的株型变异率增加,严重影响了马尾松幼苗前期的生理生长。试验最终确定秋水仙素的处理浓度为60 mg/L,此时秋水仙素对马尾松幼苗生理生长的促进作用最为明显,并且保持较高的株型变异率,有利于进行筛选多倍体的研究。

#### 参考文献

- [1] 康向阳,林木多倍体育种研究进展[J]. 北京林业大学学报,2003,25(4):70-74.
- [2] NILSSON E H. Note regarding the gigas form of *Populus tremula* found in nature[J]. Hereditas, 1936,21:372-382.
- [3] MILYUTIN L I, MURATOVA E N, LARIONOVA A Y. Conifer biodiversity in Mongolia and adjacent regions of Russia using morphological, karyological and genetical features [J]. Eurasian J For Res, 2004,7(2):59-66.
- [4] MURATOVA E N, SEDEL' NIKOVA T S, KARPYUK T V. Karyological and cytogenetic studies of conifers from West Siberia and Far East [J]. Contemporary Problems of Ecology, 2008,1:263-271.
- [5] BLAKESLEE A F, AVERY A G. Methods of inducing doubling of chromosome in plants [J]. Hered, 1937,28:393-411.
- [6] 康向阳,张平冬,高鹏,等. 秋水仙碱诱导白杨三倍体新途径的发现[J]. 北京林业大学学报,2004,26(1):1-4.
- [7] 付育,李竟,施丽丽,等. 秋水仙碱诱导侧柏多倍体的研究初报[J]. 中国农学通报,2007,23(7):194-197.
- [8] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社,2003:195-197.