

秋水仙素诱导获得 5 个木薯品种的同源四倍体植株

聂扬眉 文峰 郭文武

华中农业大学园艺林学学院/园艺植物生物学教育部重点实验室, 武汉 430070

摘要 为获得纯合稳定的木薯(*Manihot esculenta* Crantz)同源四倍体,以不同质量浓度(0.1、0.3、0.5 g/L)的秋水仙素和时间(3、6、9 h)组合对 5 个木薯品种的腋芽进行诱导处理,然后转入 MS 培养基培养再生试管苗,采用流式细胞仪和根尖压片技术鉴定其倍性,筛选出四倍体。经多代无性繁殖,结果显示 5 个品种均获得稳定的四倍体植株。将木薯 Col22 和华南 8 号的四倍体移入温室,5 个月后与对照二倍体相比,其叶片变宽、变厚,气孔的长度、宽度、密度等方面均有显著差异。同源四倍体新种质的创制为进一步用于木薯品种改良提供了珍贵的试材。

关键词 木薯;秋水仙素;同源四倍体;离体培养;种质创新

中图分类号 S 533.351 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2013)06-0008-05

木薯(*Manihot esculenta* Crantz)属于大戟科(Euphorbiaceae)木薯属(*Manihot*)植物,与甘薯、马铃薯统称为“世界三大薯类”,具有光合效率高、淀粉含量高、耐贫瘠、耐干旱等优良特点,是全球热带地区仅次于水稻、甘蔗、玉米的第四大粮食作物。木薯的基因型高度杂合、花粉育性低、有性子代性状严重分离等特点造成了木薯常规杂交育种困难,而多倍体育种是克服常规育种困难的又一条途径。植物多倍体植株一般具有生长健壮,花、果、叶较大,细胞内有效成分增加等特点,且木薯多倍体能通过无性繁殖方式固定其性状,在生产上加以利用。秋水仙素在植物同源多倍体诱导研究中广泛应用,在水稻^[1]、苹果^[2]、甜柿^[3]、柑橘^[4-5]、枣^[6]、紫薇^[7]、杨树^[8]等植物中均有报道。木薯同源多倍体诱导也有一些零星报道,Graner 等^[9]用分别蘸有 0.5% 和 1% 的秋水仙素溶液的脱脂棉涂抹木薯田间植株顶芽,3 次/d,连续处理 8 d,获得多倍体植株;与对照相比,多倍体的气孔、花以及花粉粒等均有明显差异。Awolaye 等^[10]用 2.5 mmol/L 秋水仙素附加 2% 的二甲基亚砜处理木薯品种 Col22 田间植株的腋芽 48 h,经过无性繁殖 3 代后能获得 42% 的多倍体植株。陈显双等^[11]利用 4 g/L 秋水仙素作为诱导剂,处理 GR891、SM1600、华南 124 等木薯品种田间植株腋

芽生长点,对其变异枝条进行无性繁殖和染色体鉴定,结果显示变异后代在形态特征、染色体数目上都有变化,表现出多倍体特征。本研究以 5 个木薯品种组培苗为试材,探索适合诱导木薯组培苗获得同源多倍体的方法并创制一批同源多倍体植株,丰富木薯的多倍体种质资源库。

1 材料与方法

1.1 试验材料

华南 5 号(SC5)、南植 188(NZ188)、南植 199(NZ199)、哥伦比亚 22 号(Col22)等 4 个木薯品种的组培苗由中国科学院上海生理生态研究所张鹏研究员提供,华南 8 号(SC8)组培苗由中国热带农业科学院郭安平研究员提供。SC5 是 ZM8625 与华南 8013 的杂交后代经过多代评选育成,是目前我国推广面积最大的品种之一;SC8 是通过国际热带农业研究中心(Centro Internacional de Agricultura, CIAT)从泰国引进的自然杂交种选育而成;NZ188 为从 CIAT 引进并试种的推广品种;NZ 199 为华南植物研究所育种的品种;Col22 为 CIAT 培育,目前是哥伦比亚等国的主栽品种之一。选择的 5 个木薯品种具有一定的代表性。

1.2 同源四倍体诱导方法

在预备试验的基础上,设计质量浓度和时间的

收稿日期:2012-09-12

基金项目:国家“973”计划项目(2010CB126606)

聂扬眉,硕士.研究方向:木薯种质创新. E-mail: nieyangmei@webmail.hzau.edu.cn

通讯作者:郭文武,博士,教授.研究方向:果树细胞工程与种质创新. E-mail: guoww@mail.hzau.edu.cn

双因素试验,其中质量浓度为 0.1、0.3、0.5 g/L,时间为 3、6、9 h。无菌条件下,取生长状态一致的组培苗,切成带腋芽的茎段,放入灭过菌的相应质量浓度的秋水仙素溶液中浸泡相应时间后,接入培养基中培养,培养基配方为 MS,附加 0.02 mol/L 萘乙酸、3%蔗糖、8%琼脂,调 pH 值至 5.8。对照为双蒸水处理。

1.3 倍性鉴定方法

1) 流式细胞仪鉴定植株倍性。参照张俊娥等^[12]的方法,使用德国 Partec 公司生产的流式细胞仪 (Partec D-48161, Münster, Germany),取 1 cm² 大小的幼嫩叶片于小塑料皿中,加入 0.5 mL Partec HR-A 缓冲液,用单面刀片将叶片切碎后放置 3 min,加入约 0.5 mL HR-B 染液,通过微孔过滤器过滤到 2.5 mL 小试管中,上样测定。DNA 含量的分布曲线由流式细胞仪自动生成。并将得到的四倍体植株切成茎段进行多代无性繁殖,检测无性繁殖后代的倍性。

2) 根尖压片鉴定植株倍性。取生长状态良好的根尖 1 cm 左右,洗净并加入 0.01 mol/L 的 8-羟基喹啉,预处理 3 h 后在卡诺固定液 ($V_{\text{冰醋酸}} : V_{\text{无水乙醇}} = 1 : 3$) 中固定 24 h,放入 1 mol/L HCl,然后在 60 °C 下恒温水浴 13 min,改良苯酚品红染色 3 min,压片镜检^[13]。

1.4 气孔观察

取成熟叶片,用指甲油沿叶背主脉两侧均匀涂

抹一薄层,5 min 后用镊子揭下风干的指甲油薄膜放在玻片上,显微镜 (Olympus Optical Co. Ltd) 下观察拍照。以保卫细胞的长度和横径做为气孔的长度和横径,每个材料取 5 个叶片,每个叶片统计 10 个视野,用 Image pro plus 5.1 (Image-Pro Plus, version 5.1, Media Cybernetics) 软件测量气孔的长度及宽度,并统计气孔个数。SAS 8.1 分析其差异显著性。

2 结果与分析

2.1 秋水仙素处理腋芽的诱变效果

经过大量预备试验后,5 个品种的材料在选择 0.1~0.5 g/L 秋水仙素处理后得到了稳定的四倍体,但不同的品种在不同组合的诱导下,其诱导效果和腋芽死亡情况有明显差异。如表 1 所示,南植 199 在试验中只获得 3 株四倍体,二倍体与嵌合体居多,而华南 5 号则有 63% 的四倍体诱导率。

2.2 倍性鉴定

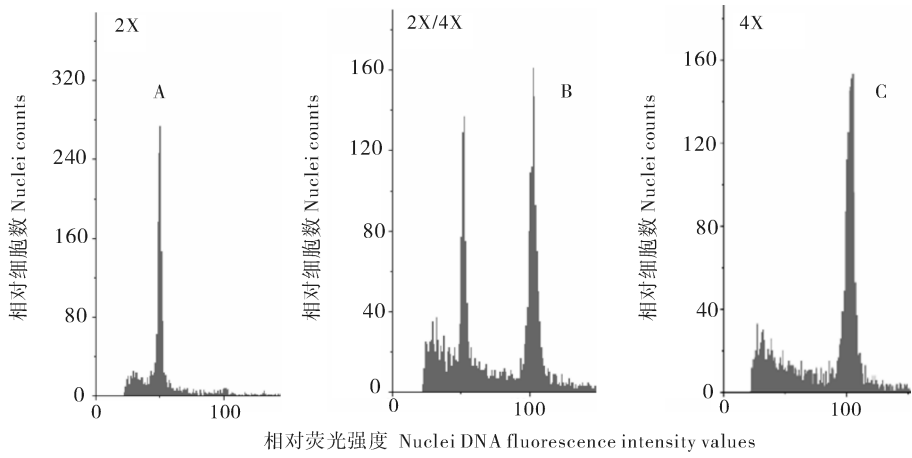
采用流式细胞仪对所有诱导成苗的植株进行倍性鉴定(图 1),对照二倍体的峰值在 50 左右,四倍体的峰值在 100 左右,嵌合体则在 50 和 100 处均有峰。对流式细胞仪筛选出来的四倍体植株经扩繁后,取其根尖压片进行染色体计数,二倍体对照的染色体数为 $2X = 36$,四倍体的染色体数为 $4X = 72$ (图 2)。

表 1 不同质量浓度秋水仙素及不同时间组合诱导木薯四倍体的效果¹⁾

Table 1 Effect of different combinations of colchicine concentration and time on tetraploid induction

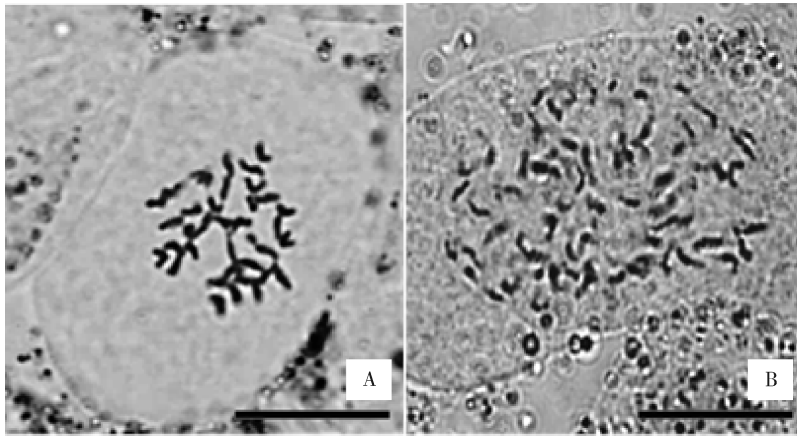
质量浓度/(g/L) Mass concentration	时间/h Time	芽数 Number	华南 8 号 SC8			华南 5 号 SC5			哥伦比亚 22 号 Col22			南植 188 NZ188			南植 199 NZ199		
			I ²⁾	II ³⁾	III ⁴⁾	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
			0.1	3	6	0	0	6	0	0	5	0	0	5	0	0	6
	6	6	1	4	1	0	3	2	2	0	3	2	2	2	1	2	1
	9	6	2	1	0	3	2	1	4	0	1	2	2	1	1	1	2
	3	6	0	0	4	2	0	4	1	0	5	1	1	4	0	1	5
0.3	6	6	3	1	1	2	2	1	2	1	0	3	0	2	1	0	1
	9	6	3	2	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1
	3	6	0	0	5	1	1	3	0	0	5	1	2	3	0	2	4
0.5	6	6	1	1	1	4	0	0	2	1	1	1	1	2	0	1	1
	9	6	1	0	0	4	2	0	1	2	0	1	1	3	0	1	1
	9	6	0	0	6	0	0	6	0	0	6	0	0	6	0	0	6

1) 每个试验组合处理不同品种的 6 个腋芽,部分腋芽在处理过程中死亡(得到的植株不足 6 株) Six axillary buds from each cultivar were induced in one combination, and some of them died from colchicine treatment; 2) I. 四倍体 Tetraploid; 3) II. 嵌合体 Chimeric; 4) III. 二倍体 Diploid.



A:二倍体(2X),峰值 50 The peak value of diploid plantlet is 50; B:嵌合体(2X/4X),峰值 50/100 The peak value of chimera plantlet is 50/100; C:四倍体(4X),峰值为 100 Tetraploid plantlet is 100.

图 1 流式细胞仪分析再生植株的倍性
Fig.1 Ploidy analysis by flow-cytometry



A:SC8 二倍体; B:SC8 四倍体(标尺=10 μm) A:Diploid of SC8; B:Tetraploid of SC8. Bar=10 μm.

图 2 木薯根尖压片染色体图片

Fig.2 Chromosome counting from cassava root tip squash

2.3 不同倍性植株的叶片观察与比较

将试管苗移栽入温室,由于武汉气温偏低以及温室光照不足,其生长势较弱。但四倍体与二倍体

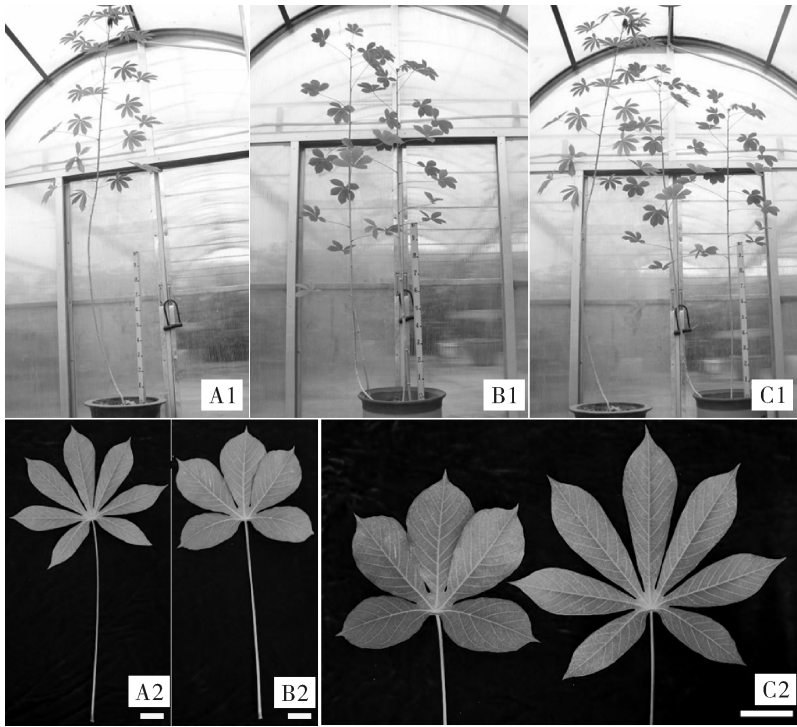
比较,差异明显,其叶片变厚、变宽(图 3),叶片气孔的长度以及宽度变大,单位面积上的气孔数目减少,具有极显著差异(表 2)。

表 2 不同倍性植株气孔的差异比较¹⁾

Table 2 Comparison of stoma size and density among different ploidy plants

品种 Cultivar	倍性 Ploidy level	长度/μm Length	宽度/μm Width	密度/mm ⁻² Density
华南 8 号 SC8	二倍体 Diploid	13.94 A	6.29 A	1 152.43 A
	四倍体 Tetraploid	14.82 B	6.56 A	742.25 B
哥伦比亚 22 号 Col22	二倍体 Diploid	12.43 A	8.11 A	1 191.49 A
	四倍体 Tetraploid	17.37 B	11.17 B	703.18 B

1)不同大写字母间表示在 0.01 水平上差异显著 Different capital letters indicate significant difference at 0.01 level.



A1、A2:二倍体植株及叶片; B1、B2:四倍体植株及叶片; C1、C2:二倍体及四倍体混合照; 标尺=2 cm。A1、A2: The plant and leaf of diploid; B1、B2: The plant and leaf of tetraploid; C1、C2: The plant and leaf of diploid and tetraploid. Bar = 2 cm.

图3 Col22不同倍性的植株以及叶片比较

Fig. 3 Morphology comparison of diploid and autotetraploid Col22

3 讨论

3.1 材料及试验条件的选择

在木薯中,前人均是用秋水仙素涂抹田间植株腋芽的方法诱导多倍体^[9-11],而本试验选择组培苗腋芽作为诱导材料。同田间植株腋芽相比,组培苗腋芽取材方便、不受季节和环境条件限制,而且诱导后植株再生周期短。在组织培养技术的基础上,能够严格控制试验的各项条件,试验的可操作性和重复性强。

在保证木薯腋芽不受秋水仙素毒害的前提下,为提高木薯多倍体的诱导率,我们进行了大量预备试验,以确定合适的质量浓度和时间。5个木薯品种在设计的试验组合处理下大多都能得到四倍体,并且5个木薯品种最后都得到了稳定的四倍体植株,说明通过腋芽浸泡法诱导木薯同源多倍体的方法适合多数木薯品种,只是不同品种的耐药性有一定的区别,如NZ199在秋水仙素质量浓度为0.5 g/L时,腋芽死亡明显。

3.2 多倍体植株的筛选

本试验利用流式细胞仪对诱导后再生植株的倍性进行鉴定,剔除二倍体及嵌合体,保留多倍体,其操作简便快捷,提高了研究效率。同时随机抽取部分多倍体植株进行根尖压片,对流式细胞仪的结果进行验证,以进一步确定植株倍性。秋水仙素处理后获得的多倍体植株,其腋芽初期长出的叶片畸形、叶色较深,与童俊等^[7]、莫官站等^[14]在其他植物上的研究结果相似,早期也可根据这些形态特点确定多倍体植株。

3.3 试验中存在的问题

诱导四倍体植株的过程中,少数多倍体植株后代发生“回复突变”,产生了嵌合体和二倍体,其原因可能是秋水仙素处理的腋芽细胞加倍不完全,后代二倍体细胞生长势优于四倍体。本研究将倍性稳定的Col22和SC8四倍体在温室进行了试种,与对照相比,叶片变宽、变厚,形态差异较大;但由于武汉地区温度相对较低,不适合木薯生长,再生的同源四倍体材料已全部转入海南热带地区进行田间种植研究,观测其块根生长量以及淀粉含量,以期进一步用

于木薯品种改良。

致谢 感谢中国科学院上海生理生态研究所张鹏研究员、中国热带农业科学院郭安平研究员提供木薯品种的组培苗。

参 考 文 献

- [1] 黄慧君, 黄道强, 刘丽娟, 等. 水稻体细胞同源四倍体的人工诱导及遗传特性研究[J]. 广东农业科学, 1995(1): 9-12.
- [2] 王长泉, 李雅志, 崔德才, 等. 苹果叶片离体培养中秋水仙素加倍效应的研究[J]. 核农学报, 1997, 11(1): 21-25.
- [3] 谷晓峰, 罗正荣. 秋水仙素处理‘罗田甜柿’获得 12 倍体再生植株[J]. 园艺学报, 2003, 30(3): 325-327.
- [4] WU J H, MOONEY P. Autotetraploid tangor plant regeneration from *in vitro* citrus somatic embryogenic callus treated with colchicines[J]. Plant Cell Tissue & Organ Culture, 2002, 70: 99-104.
- [5] DUTT M, VASCONCELLOS M, SON K J. *In vitro* production of autotetraploid Ponkan mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) using cell suspension cultures[J]. Euphytica, 2010, 173: 235-242.
- [6] 蒋洪恩, 刘孟军. 秋水仙碱诱导枣多倍体的研究[J]. 园艺学报, 2004, 31(5): 647-650.
- [7] 童俊, 叶要妹, 冯彪, 等. 秋水仙素诱导三种紫薇多倍体的研究[J]. 园艺学报, 2009, 36(1): 127-132.
- [8] CAI X, KANG X Y. *In vitro* tetraploid induction from leaf explants of *Populus pseudo-simonii* Kitag[J]. Plant Cell Rep, 2011, 30: 1771-1778.
- [9] GRANER E A. Polyploid cassava; induced by colchicine treatment[J]. Heredity, 1941, 32: 281-288.
- [10] AWOLEYE F, VAN-DUREN M, DOLEZEL J. Nuclear DNA content and *in vitro* induced somatic polyploidization cassava (*Manihot esculenta* Crantz) breeding[J]. Euphytica, 1994, 78: 195-202.
- [11] 陈显双, 韦丽君, 田益农, 等. 木薯多倍体植株的诱导研究[J]. 热带农业科学, 2008, 28(1): 17-20.
- [12] 张俊娥, 刘继红, 邓秀新. 采用倍性分析仪鉴定柑橘愈伤组织的遗传变异[J]. 遗传学报, 2003, 30(2): 168-174.
- [13] 冯斗, 王建岭, 席世丽, 等. 木薯根尖染色体的观察技术[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(9): 3711-3712.
- [14] 莫官站, 张启翔, 潘会堂, 等. 秋水仙素诱导甘菊多倍体研究[J]. 核农学报, 2010, 24(3): 527-531.

Colchicine-induced autotetraploids of five cassava cultivars

NIE Yang-mei WEN Feng GUO Wen-wu

Key Laboratory of Horticultural Plant Biology (Ministry of Education) /
College of Horticulture & Forestry Sciences, Huazhong Agricultural University,
Wuhan 430070, China

Abstract Using five cassava cultivars as explants, different colchicine concentrations (0, 1, 0.3, 0.5 g/L) and time duration of treatment (3, 6, 9 h) were combined to induce autotetraploids of cassava *in vitro* using axillary buds. Generated shoots were transferred onto the basic MS medium for further development. Ploidy analysis via both flow cytometry and root tip squash technique verified that recovered plantlets from all five cultivars were stable autotetraploids after several subcultures. Autotetraploid plantlets originated from Col22 and SC8 and its corresponding parental plants were transferred into greenhouse. Phenotypes of autotetraploids were comparatively analyzed after five-month growth. Results showed that leaves of autotetraploids became significantly wider and thicker than those of parental plants. The length and width and density of stomas had significant difference between the control and autotetraploids. These novel autotetraploids have great potential for the further genetic improvement of cassava.

Key words cassava; colchicines; autotetraploid; *in vitro* culture; germplasm enhancement

(责任编辑: 张志钰)