

# 秋水仙素处理‘罗田甜柿’获得 12 倍体再生植株

谷晓峰<sup>1</sup> 罗正荣<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup> 华中农业大学园艺林学学院, 武汉 430070; <sup>2</sup> 湖北民族学院园艺系, 恩施 445000)

**摘 要:** 以‘罗田甜柿’试管苗离体叶片为材料, 研究了秋水仙素浓度及处理时间对诱导染色体倍性变异的影响。结果表明: 0.3%秋水仙素处理 4~6 d, 可诱导染色体加倍; 与对照比较, 再生变异植株的气孔孔径增大, 密度降低, 根尖染色体数  $2n = 12x = 180$ , 叶片 DNA 含量为对照的两倍。LI、LII、LIII 细胞层均加倍的证据表明, 获得的倍性变异株为同质 12 倍体。

**关键词:** 柿; 秋水仙素; 多倍体; 再生植株

**中图分类号:** S 665.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2003) 03-0325-03

## 1 目的、材料与方法

‘罗田甜柿’ (*Diospyros kaki* Thunb.) 是我国原产第 1 个完全甜柿品种, 风味浓郁, 产量高, 但有果小核多的缺陷。利用  $2n$  配子进行甜柿育种可望选育出综合性状优良的大果无核新品种<sup>[1,2]</sup>。由于控制被子植物许多重要经济性状的基因源自母本<sup>[3]</sup>, 因此  $2n$  雌配子在育种上具有广阔的应用前景, 但迄今还未有柿属植物天然  $2n$  雌配子大量存在的报道。栽培柿多为  $2n = 6x = 90$  的 6 倍体, 如果人工诱导获得 12 倍体, 其减数分裂产生的雌配子与 6 倍体植株  $2n$  雌配子倍性相同, 与正常  $n$  花粉杂交, 可望获得 9 倍体 (相当于种内 3 倍体, 通常表现 3 倍体的染色体行为和伪单性结实特性)。

试材采自华中农业大学果树标本园柿圃 8 年生‘罗田甜柿’。选取枝条中上部休眠芽剥取茎尖, 接种于  $1/2$  MS + Zeatin 2 mg/L + IAA 0.05 mg/L 培养基上, 诱导分化。组培苗保存在 MS + Zeatin 1.1 mg/L<sup>[4]</sup> 培养基上, 4~6 周继代 1 次。取组培苗顶部下数 2~3 节的展开叶, 切除叶柄和叶尖, 沿中脉将叶片切成 4~6 小片, 置入含有 0.1%、0.3%、0.5%、1.0% 的秋水仙素溶液中, 处理时间设 2、4 和 6 d。从秋水仙素溶液中取出叶片, 无菌水冲洗 3 次。愈伤诱导及植株分化参照 Tao 等<sup>[4,5]</sup>、生根参照谷晓峰等<sup>[6]</sup>、根尖染色体倍性鉴定参照唐仙英等<sup>[7]</sup>的方法, 采用碱煮法统计气孔长度及密度, 采用 PA 倍性分析仪检测 DNA 相对含量, 分析步骤参照说明书。

## 2 结果与分析

### 2.1 倍性变异诱导

由表 1 可见, 秋水仙素对离体叶片诱导效果因处理浓度及时间不同而异。0.1%秋水仙素对离体叶片伤害最小, 但诱变效果较差, 即使延长处理时间也无法获得染色体加倍的新梢 (图版, 1)。随着秋水仙素处理浓度加大, 诱变效果增强, 以 0.3%浓度处理 4~6 d 为宜。但高浓度秋水仙素对叶片毒害作用较大, 1.0%秋水仙素即使仅处理 2 d, 不定芽再生率即为 0, 无法获得诱变新梢。

### 2.2 倍性鉴定

2.2.1 形态学鉴定 变异株 (图版, 4) 与对照 (图版, 1) 相比, 生长缓慢, 节间较短, 茎粗壮。由表 2 可见, 变异株单位面积气孔数目减少, 大约为对照的  $1/2$ , 但气孔孔径变大 (图版, 2、5)。

收稿日期: 2002-06-06; 修回日期: 2002-09-19

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30070529); 教育部优秀青年教师资助计划项目; 高等学校博士学科专项基金项目 (1999004001)

\* 通讯作者。Author for correspondence (E-mail: luozhr@mail.hzau.cn).

2.2.2 细胞学鉴定 对照 6 倍体‘罗田甜柿’根尖染色体  $2n=6x=90$  (图版, 3), 6 株变异株根尖染色体数加倍, 均为  $2n=12x=180$  (图版, 6)。秋水仙素处理诱导的植株中还有少量非整倍体, 对本研究意义不大, 在表 1 中没有统计。

2.2.3 DNA 含量测定 采用 PA 倍性分析仪分析了 6 株变异株混合叶片细胞核 DNA 相对含量 (图 1), 结果显示对照 (6 倍体罗田甜柿试管苗叶片) 的主峰荧光强度为 134.63, 而变异株则为 251.07, 约为对照的两倍, 从而确认变异株为 12 倍体。

栽培柿品种染色体数目较多 ( $2n=6x=90$ ), 而且单宁含量丰富, 培养过程中褐化严重, 离体加倍难度较大, 目前仅有‘次郎’甜柿获得 12 倍体植株的报道<sup>[8]</sup>。本试验通过对变异株气孔、根尖染色体数目的检测结果表明, L I 层及 L III 层细胞染色体已加倍。叶片由原基的 L I、L II、L III 层细胞共同形成, 利用 PA 倍性分析仪测定叶片 DNA 含量, 发现变异株仅有一个主峰出现, 说明 3 层细胞染色体均成功加倍。因此, 可以确认本试验获得的变异株为染色体加倍的同质 12 倍体。

由于控制完全甜柿甜涩性状的基因为隐性<sup>[9]</sup>, 只有完全甜柿间相互杂交, 才能获得 100% 的完全甜柿后代。而迄今所知的甜柿  $2n$  花粉大多是在不完全甜柿品种中发现的。通过  $2n$  花粉授粉并结合胚抢救虽然已经获得 9 倍体<sup>[10]</sup>, 但程序复杂且得率很低。完全甜柿 12 倍体的诱导成功, 通过正常花粉授粉即可方便地获得 9 倍体新种质。因此, 本试验结果在完全甜柿倍性育种中有重大的应用价值。

表 1 秋水仙素处理对‘罗田甜柿’叶片外植体新梢再生和变异株形成的影响

Table 1 Effects of colchicine on shoot regeneration and mutated plantlet formation of ‘Luotian Tianshi’ persimmon

秋水仙素 Colchicine (%)	处理时间 Time(d)	愈伤形成率 Calli formation (%)	不定芽再生 率 Shoot formation(%)	变异株数 No. of mutated plantlet
0.1	2	63.3	71.9	0
0.1	4	32.2	57.1	0
0.1	6	13.3	41.7	0
0.3	2	27.7	44.0	0
0.3	4	17.8	25.0	3
0.3	6	7.8	14.3	2
0.5	2	16.7	13.3	1
0.5	4	4.4	0	0
0.5	6	0	0	0
1.0	2	5.5	0	0
1.0	4	0	0	0
1.0	6	0	0	0

表 2 变异植株与正常植株气孔密度和长度比较

Table 2 Comparison of density and length of stomata among mutated and normal plant

植株类型 Plant type	单株编号 Accession	气孔密度 Density(Stomata/mm <sup>2</sup> )	气孔长度 Length(μm)
变异株 Mutated plantlet	1	121.11 A	36.54 A
	2	113.71 A	34.36 A
	3	126.93 A	34.72 A
6 倍体 Hexaploid		204.15 B	25.97 B

注: 同列相同字母表示经邓肯氏新复极差法检验在 0.01 水平上差异不显著。Note: Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at  $P=0.01$ .

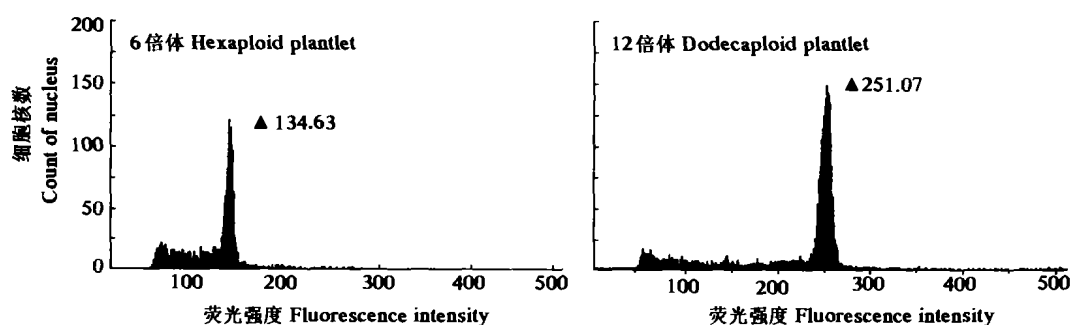


图 1 罗田甜柿 ( $2n=6x=90$ ) 和诱变植株 ( $2n=12x=180$ ) 核 DNA 流式细胞光度分析

Fig. 1 Flow cytometry of nuclear DNA content of ‘Luotian Tianshi’ persimmon ( $2n=6x=90$ ) and mutated plantlet ( $2n=12x=180$ )

## 参考文献:

- 1 Veileux R. Diploid and polyploid gametes in crop plants: mechanisms of formation and utilization in plant breeding. Plant Breeding Reviews, 1985, 3: 252~288
- 2 唐仙英, 罗正荣, 蔡礼鸿. 植物未减数配子及其应用研究进展. 武汉植物学研究, 1999, 17 (增刊): 1~7

- 3 胡适宜. 被子植物质体遗传的细胞学研究. 植物科学, 1997, 39 (4): 363 ~ 371
- 4 Tao R, Tamura M, Yonemori K, et al. Plant regeneration from protoplast of adult Japanese persimmon. Plant Science, 1991, 79: 119 ~ 125
- 5 Tao R, Murayama H, Moriguchi K, et al. Plant regeneration from callus cultures derived from primordial leaves of adult Japanese persimmon. HortScience, 1988, 23 (6): 1055 ~ 1056
- 6 谷晓峰, 唐仙英, 罗正荣. 罗田甜柿幼胚培养条件的研究. 果树学报, 2001, 18 (2): 80 ~ 83
- 7 唐仙英, 罗正荣. 部分中国柿品种及其胚培养后代的染色体倍性研究. 园艺学报, 2000, 27 (4): 235 ~ 239
- 8 Tamura M, Tao R, Sugiura A. Production of dodecaploid plants of Japanese persimmon (*Diospyros kaki* L.) by colchicines treatment of protoplasts. Plant Cell Report, 1996, 15: 470 ~ 473
- 9 罗正荣, 蔡礼鸿, 胡春根. 柿属植物种质资源及其利用研究现状. 华中农业大学学报, 1996, 19 (4): 381 ~ 388
- 10 Sugiura A, Ohkuma T, Choi Y A, et al. Production of nonaploid ( $2n=9x$ ) Japanese persimmon (*Diospyros kaki* L.) by pollination with unreduced ( $2n=6x$ ) pollen an embryo rescue culture. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 2000, 125 (5): 609 ~ 614

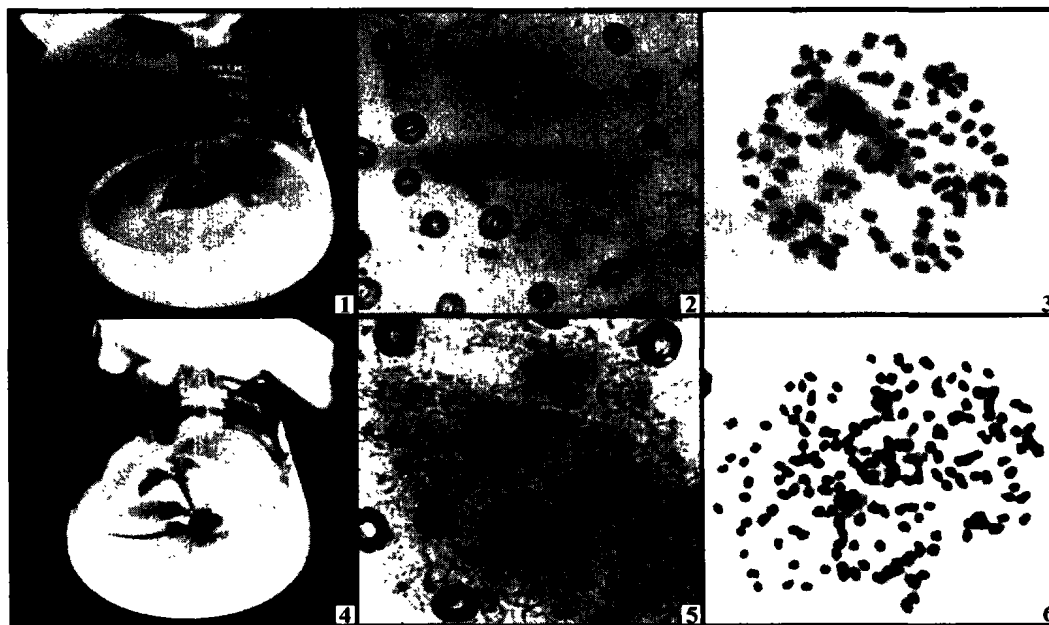
## Regeneration of Dodecaploid Plants from in Vitro Leave of ‘Luotian Tianshi’ Persimmon Treated with Colchicine

Gu Xiaofeng<sup>1</sup> and Luo Zhengrong<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup> College of Horticulture and Forestry, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; <sup>2</sup> Department of Horticulture, Hubei Institute for Nationalities, Enshi 445000, China)

**Abstract:** A study of inducing polyploidy by treating ‘Luotian Tianshi’ persimmon in vitro leaflet explants with colchicine solution was performed. The results indicated that mutated plantlets can be induced by treating the leaflet in 0.3% colchicines solution for 4–6 d. Stomata of the mutated plantlets were significantly larger than those of the normal plantlets, but the density of stomata were reduced significantly. The chromosome number of root-tip cell of mutated plantlets was  $2n=12x=180$ , and nuclear DNA content of the mutated plantlets were twice as much as normal hexaploid plantlets. These results suggest that the ploidy of mutated plantlets was autododecaploid.

**Key words:** Persimmon; Colchicine; Dodecaploid; Regeneration



图版说明: 1~3. 罗田甜柿 6 倍体 (1. 组培苗; 2. 气孔,  $\times 120$ ; 3. 根尖染色体  $2n=6x=90$ ,  $\times 800$ ); 4~6. 诱变产生的 12 倍体 (4. 组培苗; 5. 气孔,  $\times 120$ ; 6. 根尖染色体  $2n=12x=180$ ,  $\times 800$ ).

**Explanation of plates:** 1–3. Hexaploid (1. Plantlet; 2. Stomata,  $\times 120$ ; 3. Chromosomes of root-tips,  $2n=6x=90$ ,  $\times 800$ ); 4–6. Dodecaploid (4. Plantlet; 5. Stomata,  $\times 120$ ; 6. Chromosomes of root-tips,  $2n=12x=180$ ,  $\times 800$ ).