

# 秋水仙素诱导中间锦鸡儿多倍体的研究

沈河溪<sup>1,2</sup>, 梁国鲁<sup>1</sup>, 韩素英<sup>3</sup>, 齐力旺<sup>2,\*</sup>

(<sup>1</sup>西南大学园艺园林学院, 南方山地园艺学教育部重点实验室, 重庆 400715; <sup>2</sup>中国林业科学研究院林业研究所细胞生物学实验室, 北京 100091; <sup>3</sup>中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所, 北京 100091)

**摘要:** 以中间锦鸡儿 (*caragana intermedia*) 种子为试验材料, 通过秋水仙素浸泡种子的方法研究了不同浓度及作用时间下秋水仙素对其染色体加倍的诱导效果。结果表明, 直接浸泡种子, 以 0.3% 秋水仙素浸泡 48 h 为最佳, 诱变率为 53.3%; 种子经萌发 12 h 后再处理, 以 0.15% 秋水仙素浸泡 36 h 诱变率最高, 为 73.3%。对变异株根尖进行染色体计数后发现, 二倍体对照  $2n = 2x = 16$ , 变异株  $2n = 3x = 24$  为三倍体, 变异株  $2n = 4x = 32$  为四倍体, 同时也发现存在嵌合体现象。

**关键词:** 中间锦鸡儿; 多倍体; 秋水仙素

**中图分类号:** S 68

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2011) 08-1595-06

## Studies on Polyploid Induction of *Caragana intermedia* by Colchicine

SHEN He-xi<sup>1,2</sup>, LIANG Guo-lu<sup>1</sup>, HAN Su-ying<sup>3</sup>, and QI Li-wang<sup>2,\*</sup>

(<sup>1</sup>School of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Key Laboratory of Horticulture Science for Southern Mountainous Regions, Ministry of Education, Chongqing 400715, China; <sup>2</sup>Laboratory of Cell Biology, Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China; <sup>3</sup>Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

**Abstract:** *Caragana intermedia* were treated with different concentrations of colchicine solution at different stages in order to figure out the best inducing method and obtain polyploids. The results indicated that the mutation rate of seeds was 53.3% with the treatment of 0.3% colchicines for 48 h, while for sprouting seeds immersed in 0.15% colchicines for 36 h, the mutation rate was 73.3%. Chromosome observation found that the chromosome number of mutated plants was  $2n = 4x = 32$  (tetraploid) and  $2n = 3x = 24$  (triploid), while that of the control plants was  $2n = 2x = 16$ . The chimera was also found among treatment plants. A few polyploid seedlings were obtained in this study, this will provide the good base for *Caragana* polyploid breeding.

**Key words:** *Caragana intermedia*; polyploid; colchicine

中间锦鸡儿 (*Caragana intermedia*) 属于豆科 (Fabaceae) 锦鸡儿属 (*Caragana*) 植物, 分布于山西、陕西、宁夏及内蒙古自治区等省、区 (牛西午, 1999)。中间锦鸡儿是典型草原带和荒漠草原带的沙生旱生灌木, 具有耐寒、耐酷热、抗干旱、耐贫瘠的特性, 对沙地环境有很强的适应能力, 可防风固沙, 保持水土, 改善局部小环境, 在沙地植被恢复进程中常作为主要物种进行大面积种植,

收稿日期: 2010-12-27; 修回日期: 2011-07-22

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目 (2006BAD01A16); 国家“863”计划项目 (2007AA10Z182, 2007AA100105)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: lwqi@caf.ac.cn)

而且具有较高的饲用价值(时永杰和常根柱, 2003; 许冬梅等, 2004)。此外, 锦鸡儿属植物还是重要的园林绿篱植物, 也是中国北方重要的绿化物种, 已在北方的多个省市中大面积栽种, 其花色鲜艳, 奇特美观, 作为观赏植物已经在园林上广泛利用(吴江, 2004; 李佩萍, 2009)。

多倍体对高等植物的进化有着十分重要的作用, 在性状上多表现出花大、果大、叶大等器官的巨大性, 可以提高环境适应性和抗逆性, 增强园艺观赏植物特征(Lumaret, 1988; Shao et al., 2003)。秋水仙素作为染色体加倍的诱变剂已经在多种植物, 如柑橘(Wu & Mooney, 2002)、刺槐(Blakesley et al., 2002)、海芋属(Thao et al., 2003)的加倍中获得成功。目前国外对中间锦鸡儿的研究报道还很少, 国内的研究主要集中在生态功能与抗逆能力、薪碳林建设、饲料加工利用、细胞核型及栽培技术等方面(赵一之, 1993; 庞琪伟等, 2009)。本研究中以中间锦鸡儿种子为材料, 以秋水仙素为诱导剂, 在不同的条件下处理, 通过染色体制片显微观察, 旨在筛选出一种最佳的秋水仙素诱导中间锦鸡儿种子的方法, 获得一批中间锦鸡儿多倍体育种材料, 为培育多倍体新品种提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

中间锦鸡儿成熟种子于 2009 年 7 月采自内蒙古自治区林业科学研究院树木园。2011 年 1—7 月在中国林业科学研究院林业研究所细胞生物学实验室进行诱变研究。秋水仙素和 8-羟基喹啉由北京鼎国生物技术有限公司提供, 果胶酶由 Fluka 公司提供, 纤维素酶由北京中北林格生物技术有限公司提供。

### 1.2 种子处理及诱变

挑选饱满的中间锦鸡儿种子, 温水浸泡 6 h, 多菌灵浸泡 5 min 进行种子表面杀菌后分为两部分。①吸干种子表面残留水分, 用 0 (对照) 和 0.1%、0.2%、0.3%、0.4% 浓度的秋水仙素溶液分别浸泡种子 24、36、48 h, 然后埋于筛选好的细沙中萌发。②将种子放于铺有灭菌滤纸的培养皿中萌发 12 h, 再转入 0 (对照) 和 0.1%、0.15%、0.2%、0.25%、0.3% 浓度的秋水仙素溶液中分别浸泡 24、36、48 h, 然后埋于筛选好的细沙中萌发。共 26 个处理组合, 每处理组合 30 粒种子(图版, A)。

### 1.3 多倍体的鉴定

待种子萌发根长至 2~3 cm 时切取根尖, 经 8-羟基喹啉预处理 4 h, 用卡诺氏固定液固定 24 h, 然后纤维素—果胶酶酶解 4.5 h, 再固定后火焰干燥涂片, Giemsa 染色后镜检(陈瑞阳等, 1979)。观察的细胞数不少于 30 个, 检测的分裂细胞中 85% 以上为恒定一致的染色体数即为该植物的染色体数。气孔观察采用直接剥离法(梁维等, 2009), 用镊子直接剥离或撕下样品下表皮, 将剥离的叶片下表皮平展在滴有水滴的载玻片上, 盖上盖玻片置于光学显微镜上观察。诱变率(%) = (嵌合体数 + 多倍体数) / 处理数 × 100; 多倍体诱导率(%) = 多倍体数 / 处理数 × 100。用普通光学显微镜(Olympus CX31)进行观察和拍照(相机为 Olympus c5060), 图像处理用 Photoshop CS 软件。

## 2 结果与分析

### 2.1 秋水仙素浓度和处理时间对中间锦鸡儿染色体加倍的影响

不同浓度秋水仙素直接浸泡处理种子的变异情况见表 1。用 0.3% 秋水仙素处理种子 48 h, 有少

部分死亡（图版，C），但诱变率和多倍体诱导率都最高，分别为 53.3%和 20.0%，为比较适宜的处理。由诱变率可以看出中间锦鸡儿种子在秋水仙素浓度范围为 0.1%到 0.4%之间是比较敏感的，随着处理浓度升高和时间延长，种子的死亡数增加，而诱变率则表现为先上升后下降的趋势。

表 1 秋水仙素浸泡处理中间锦鸡儿种子诱导效果  
Table 1 The induction effects of colchicine on seeds of *C. intermedia*

秋水仙素浓度/% Concentration of colchicine	浸泡时间/h Time of immersing	处理种子数 Treatment number	死亡数 Death number	嵌合体数 Chimera of number	三倍体数 Triploid number	四倍体数 Tetraploid number	诱变率/% Mutation rate	多倍体诱导率/% Polyploid inducing rate
0	24	30	0	0	0	0	0	0
0.1	24	30	0	3	1	0	13.3	3.3
	36	30	0	4	0	2	20.0	6.7
	48	30	1	6	0	3	30.0	10.0
0.2	24	30	3	5	0	1	20.0	3.3
	36	30	1	11	0	0	36.7	0
	48	30	2	11	0	2	43.3	6.7
0.3	24	30	3	7	0	3	33.3	10.0
	36	30	4	8	0	3	36.7	10.0
	48	30	5	10	0	6	53.3	20.0
0.4	24	30	4	8	0	1	30.0	3.3
	36	30	8	8	0	0	26.7	0
	48	30	10	9	0	0	30.0	0

不同浓度秋水仙素处理萌发 12 h 后的中间锦鸡儿种子，统计结果见表 2。以 0.15%秋水仙素处理 36 h 的诱变率和多倍体诱导率最高，分别为 73.3%和 23.3%。与直接浸泡种子相比，萌发 12 h 后再处理的诱变率明显提高，但种子死亡率提高，从生长情况看出，部分长出叶片的植株也有可能死亡。

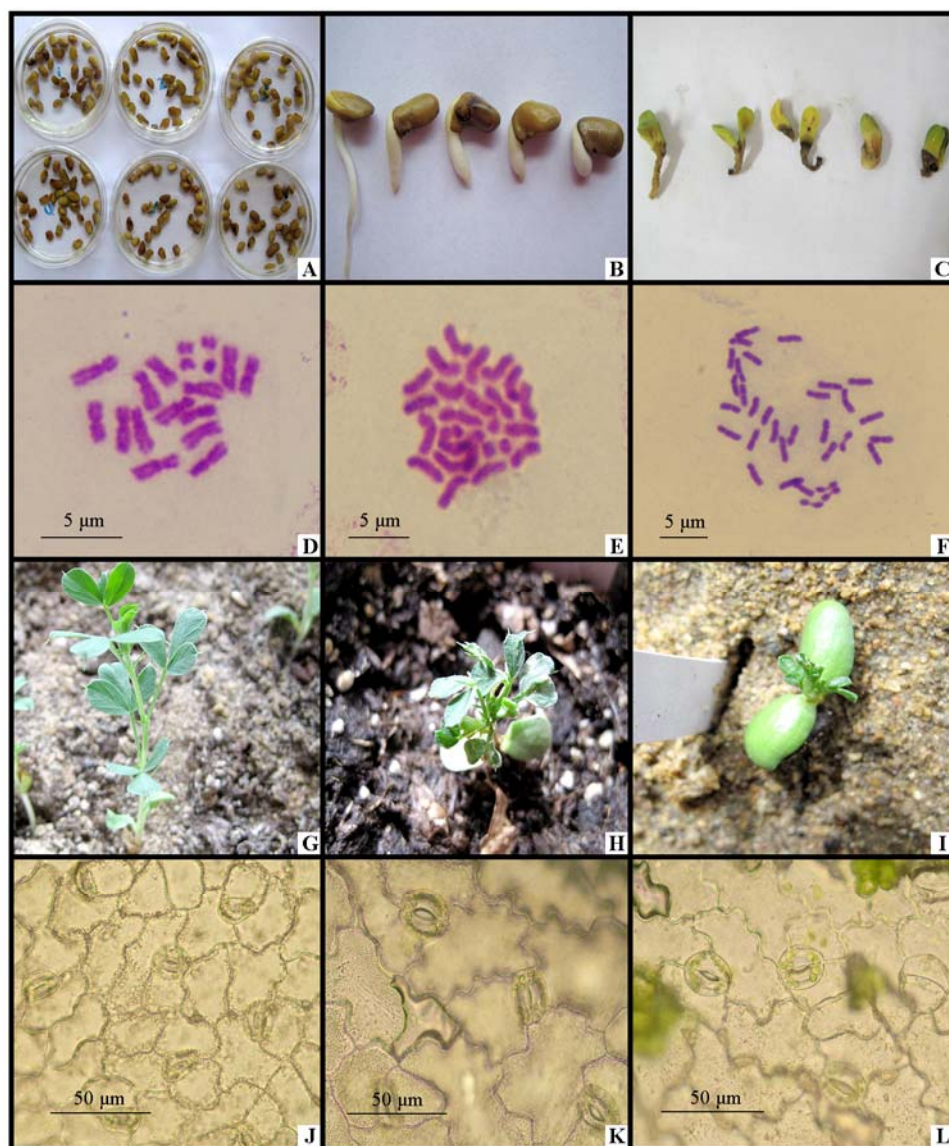
表 2 中间锦鸡儿种子萌发 12 h 后秋水仙素浸泡处理的诱导效果  
Table 2 The induction effects of colchicine on seeds of *C. intermedia* after 12 h seed germination

秋水仙素浓度/% Concentration of colchicine	浸泡时间/h Time of immersing	处理种子数 Treatment number	死亡数 Death number	嵌合体数 Chimera of number	三倍体数 Triploid number	四倍体数 Tetraploid number	诱变率/% Mutation rate	多倍体诱导率/% Polyploid inducing rate
0	24	30	0	0	0	0	0	0
0.10	24	30	6	6	0	0	20.0	0
	36	30	5	6	0	1	23.3	3.3
	48	30	6	7	0	1	26.7	3.3
0.15	24	30	7	14	0	1	50.0	3.3
	36	30	8	15	0	7	73.3	23.3
	48	30	10	14	0	3	56.7	10.0
0.20	24	30	10	17	0	1	60.0	3.3
	36	30	13	13	0	3	53.3	10.0
	48	30	12	13	0	4	56.7	13.3
0.25	24	30	12	11	0	2	43.3	6.7
	36	30	14	12	0	4	53.3	13.3
	48	30	13	14	0	3	56.7	10.0
0.30	24	30	20	8	0	1	30.0	3.3
	36	30	18	9	0	3	40.0	10.0
	48	30	20	10	0	0	33.3	0

2.2 多倍体鉴定

中间锦鸡儿正常的染色体数为  $2n = 2x = 16$ ，三倍体植株的染色体数为  $2n = 3x = 24$ ，四倍体植株的染色体数为  $2n = 4x = 32$ （图版，D ~ F）。另外通过观察发现大部分嵌合体植株为二倍体与四倍体的嵌合体。

经秋水仙素浸泡的种子萌发后根部明显变大, 部分已长出子叶的幼苗根部出现溃烂而死亡(图版, B、C)。多倍体与二倍体相比, 前期生长比较缓慢, 叶片长而厚, 叶色浓绿, 茎秆短而粗。生长 40 多天的植株, 与正常二倍体植株相比, 三倍体长势缓慢, 而且叶片严重畸形, 四倍体植株长势也很慢, 前期子叶肥大浓绿, 叶片稍微畸形, 叶片较大而厚(图版, G ~ I)。四倍体、三倍体植株单位面积的气孔数明显减少, 但气孔变大, 保卫细胞中叶绿素的含量也明显增加, 三倍体气孔稍大于四倍体气孔, 叶绿体也较多(图版, J ~ L), 这与张凌媛等(2005)的研究结果类似。



#### 图版说明:

A. 秋水仙素浸泡种子; B. 秋水仙素处理后根形态变化(左一为对照); C. 秋水仙素处理后部分幼苗死亡; D. 二倍体根尖染色体( $2n = 2x = 16$ ); E. 三倍体根尖染色体; F. 四倍体根尖染色体; G. 二倍体苗; H. 三倍体苗; I. 四倍体苗; J. 二倍体气孔; K. 三倍体气孔; L. 四倍体气孔。

#### Explanation of plates:

A. Immersing seeds by colchicine; B. Appearance of roots after the treatment by colchicine (left No.1 is control); C. The death of seedling; D. Chromosome from the needle of diploid root ( $2n = 2x = 16$ ); E. Chromosome from the needle of triploid root ( $2n = 3x = 24$ ); F. Chromosome from the needle of tetraploid root ( $2n = 4x = 32$ ); G. Diploid plant; H. Triploid plant; I. Tetraploid plant; J. Diploid stoma; K. Triploid stoma; L. Tetraploid stoma.

### 3 讨论

利用秋水仙素进行植物多倍体育种是目前比较常用的方法,在中间锦鸡儿多倍体诱导的过程中,浸渍种子具有很强的可操作性,试验条件容易控制,并且试验结果重复性强。本试验通过对中间锦鸡儿多倍体诱导的研究发现,秋水仙素是中间锦鸡儿合适的诱变剂。从诱导效果来看,0.3%的秋水仙素直接浸泡处理 48 h 的效果较好,诱变率达 53.3%,多倍体诱导率为 20.0%。萌发 12 h 后种子萌芽长度大约为 0.5 cm 左右,进行的诱导处理以 0.15%秋水仙素处理 36 h 的诱变率最高为 73.3%,多倍体诱导率为 23.3%,从两种处理方法的对比中可以发现,萌芽的种子对秋水仙素更为敏感,诱变率有很大提高,但死亡率也较高,多倍体的获得率提高并不明显,还需对诱导方法作进一步的研究。两种处理中都可得到四倍体苗,但诱导的四倍体苗前期比较脆弱,容易在缓慢生长过程中死亡,正常成活的较少。

在本试验中仅得到了 1 株三倍体,但在相同浓度和处理时间的重复试验中并没有再得到三倍体,这株三倍体很有可能是天然的四倍体,下步试验很有必要从大量的种子中直接筛选天然多倍体。三倍体植株前期生长极其缓慢,刚长出来的叶片多数畸形,但三倍体与其他多倍体相比,其营养生长通常是最好的,大多数三倍体对外界环境具有较强的适应性,是比较难得的研究材料。

根尖染色体计数是鉴定植株染色体数最常用最可靠的方法之一。在本试验进行之前,对中间锦鸡儿实生苗的根尖进行染色体观察和计数,在对 1 200 多粒种子的实生苗观察中没有发现天然多倍体,从染色体制片观察中还发现中间锦鸡儿有两条染色体在制片过程中极易断裂,这给染色体计数上带来了一定的困扰。在染色体制片过程中,考虑到中间锦鸡儿有两条染色体容易断裂,对制片技术进行有针对性的改良,如适当延长预处理和固定的时间,缩短后低渗的时间及在火焰干燥制片过程中对制片手法进行调整,取得了一定效果,染色体断裂的频率有所下降,但仍需进一步改良。本研究得到的染色体数与牛西午等(2006)、孔红(2007)、胡钠梅等(2009)的研究结果一致,为  $2n = 2x = 16$ ,而段永红和李素清(2006)的研究结果为  $2n = 2x = 18$ ,推测很可能是两条染色体断裂所致。对秋水仙素处理过植株进行染色体观察,发现大部分变异植株其细胞染色体数介于 16 和 32 之间,是二倍体和四倍体的嵌合体。

还将进一步在田间对所获得的多倍体植株的性状进行观察,期望能筛选到有用性状的多倍体植株,为中间锦鸡儿的育种提供研究基础。

### References

- Blakesley D, Allen A, Pellny T K, Roberts A V. 2002. Natural and induced polyploidy in *Acacia dealbata* Link. and *Acacia mangium* Willd. *Annals of Botany*, 90: 391 - 398.
- Chen Rui-yang, Song Wen-qin, Li Xiu-lan. 1979. A new method for preparing mitotic chromosomes from plant. *Acta Botanica Sinica*, 21 (3): 297 - 298. (in Chinese)
- 陈瑞阳, 宋文芹, 李秀兰. 1979. 植物有丝分裂染色体标本制作的新方法. *植物学报*, 21 (3): 297 - 298.
- Duan Yong-hong, Li Su-qing. 2006. Karyotype analysis of four species in *Caragana* Fabr. *Journal of Wuhan Botanical Research*, 24 (5): 413 - 417. (in Chinese)
- 段永红, 李素清. 2006. 锦鸡儿属植物 4 个种的核型分析. *武汉植物学研究*, 24 (5): 413 - 417.
- Hu Na-mei, Han Su-ying, Liang Guo-lu, Qi Li-wang. 2009. Study on chromosome variation of *Caranaga intermedia*. *Biotechnology Bulletin*, (z1): 204 - 208. (in Chinese)
- 胡钠梅, 韩素英, 梁国鲁, 齐力旺. 2009. 中间锦鸡儿染色体变异研究. *生物技术通报*, (z1): 204 - 208.
- Kong Hong. 2007. Karyotypes of three species in *Caragana* genus. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 27 (3): 612 - 615. (in Chinese)

- 孔 红. 2007. 锦鸡儿属 3 种植物的核型研究. 西北植物学报, 27 (3): 612 - 615.
- Li Pei-ping. 2009. Application of *Caragana sibirica* Fabr. in urban greening. Journal of Chinese Urban Forestry, (6): 70 - 71. (in Chinese)
- 李佩萍. 2009. 树锦鸡儿在城市绿化中的应用. 中国城市林业, (6): 70 - 71.
- Liang Wei, Yang Xiao-hong, Chen Ji-yu, Zhou Zhi-qin. 2009. A comparison of several specimen preparation methods for light microscopic observation of mulberry leaf epidermis. Science of Sericulture, 35 (1): 116 - 120. (in Chinese)
- 梁 维, 杨晓红, 陈吉裕, 周志钦. 2009. 几种用于光学显微镜观测的桑叶表皮整体制片方法比较. 蚕业科学, 35 (1): 116 - 120.
- Lumaret R. 1988. Adaptive strategies and ploidy levels. Acta Oecol Plant, (9): 83 - 93.
- Niu Xi-wu. 1999. The distribution and description of *Caragana* Fabr. in China. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 19 (5): 107 - 133. (in Chinese)
- 牛西午. 1999. 中国锦鸡儿属植物资源研究——分布及分种描述. 西北植物学报, 19 (5): 107 - 133.
- Niu Xi-wu, Tian Ru-xia, Li Gui-quan, Chang Zhi-jian. 2006. The sectioning of *Caragana* chromosomes and the karyotypes of three *Caragana* species. Acta Bot Boreal-Occident Sin, 26 (5): 1043 - 1047. (in Chinese)
- 牛西午, 田如霞, 李贵全, 畅志坚. 2006. 锦鸡儿属植物染色体制片与 3 个种的核型分析. 西北植物学报, 26 (5): 1043 - 1047.
- Pang Qi-wei, Jia Li-ming, Zheng Shi-guang. 2009. The research status of *Caragana micraphylla* in China. Hebei Journal of Forestry and Orchard Research, 24 (3): 280 - 283. (in Chinese)
- 庞琪伟, 贾黎明, 郑士光. 2009. 国内柠条研究现状. 河北林果研究, 24 (3): 280 - 283.
- Shao J, Chen C, Deng X. 2003. *In vitro* induction of tetraploid in pomegranate (*Punica granatum*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 75: 241 - 246.
- Shi Yong-jie, Chang Gen-zhu. 2003. *Caragana intermedia* Kuang et H.C.Fu. Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine, (Special): 148 - 149. (in Chinese)
- 时永杰, 常根柱. 2003. 中间锦鸡儿. 中兽医医药杂志, (专辑): 148 - 149.
- Thao N T P, Ureshino K, Miyajima I, Ozaki Y, Okubo H. 2003. Induction of tetraploids in ornamental *Alocasia* through colchicine and oryzalin treatments. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 72: 19 - 25.
- Wu J, Mooney P. 2002. Autotetraploid tangor plant regeneration from *in vitro* *Citrus* somatic embryogenic callus treated with colchicine. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 70: 99 - 104.
- Wu Jiang. 2004. Potting technique and development of *Caragana korshinskii*. Forest By-Product and Speciality in China, (3): 16. (in Chinese)
- 吴 江. 2004. 锦鸡儿的盆栽技术与开发利用. 中国林副特产, (3): 16.
- Xu Dong-mei, Cui Wei-xian, Guo Si-jia. 2004. A fine forage shrub species in sandy land - *Caragana intermedia*. Heilongjiang Journal of Animal Science and Veterinary Medicine, (4): 51 - 52. (in Chinese)
- 许冬梅, 崔慰贤, 郭思加. 2004. 沙地优良饲料灌木中间锦鸡儿. 黑龙江畜牧兽医, (4): 51 - 52.
- Zhang Ling-yuan, Guo Qi-gao, Li Xiao-lin, Zeng Hong, Tan Jian-min, Liang Guo-lu. 2005. Study on the relationship between the number of chloroplast in stomata guard cell and the ploidy of loquat cultivars. Journal of Fruit Science, 22 (3): 229 - 233. (in Chinese)
- 张凌媛, 郭启高, 李晓林, 曾 洪, 谭健民, 梁国鲁. 2005. 枇杷气孔保卫细胞叶绿体数目与倍性相关性研究. 果树学报, 22 (3): 229 - 233.
- Zhao Yi-zhi. 1993. Taxonomical study of the genus *Caragana* from China. Acta Sci Nat Univ Neimongol, 24 (6): 631 - 653. (in Chinese)
- 赵一之. 1993. 中国锦鸡儿属的分类学研究. 内蒙古大学学报: 自然科学版, 24 (6): 631 - 653.