

# 秋水仙素诱导大葱多倍体的研究

董 飞<sup>1</sup>, 陈运起<sup>2,\*</sup>, 刘世琦<sup>1</sup>, 高莉敏<sup>2</sup>, 王传增<sup>1</sup>, 陈 伟<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 山东农业大学园艺科学与工程学院, 山东泰安 271018; <sup>2</sup> 山东省农业科学院蔬菜研究所/山东省设施蔬菜生物学重点实验室/国家蔬菜改良中心山东分中心, 济南 250100)

**摘 要:** 以章丘大葱种子为材料, 研究了秋水仙素处理浓度和时间对大葱体细胞染色体加倍的效果, 并利用形态观察, 根尖细胞染色体计数及流式细胞仪等方法进行倍性鉴定。结果表明, 0.8%秋水仙素处理 48 h 的诱变效果最佳。诱变植株存在明显“玻璃化”现象, 生根困难, 移栽后不能成活。通过组织培养去“玻璃化”, 获得正常生长的四倍体植株。四倍体植株的细胞染色体数  $2n = 4x = 32$ , 植株多倍体形态特征明显, 植株生长健壮, 叶色浓绿, 叶面气孔变大, 气孔密度减少; 株高、葱白长度等与二倍体植株相比极显著增加。

**关键词:** 大葱; 秋水仙素; 四倍体诱导; 鉴定

**中图分类号:** S 633.1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2011) 12-2381-06

## Colchicines Induced Polyploid Plants and Identification in Welsh Onion

DONG Fei<sup>1</sup>, CHEN Yun-qi<sup>2,\*</sup>, LIU Shi-qi<sup>1</sup>, GAO Li-min<sup>2</sup>, WANG Chuan-zeng<sup>1</sup>, and CHEN Wei<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China;  
<sup>2</sup> Vegetable Research Institute of Shandong Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory for Biology of Greenhouse Vegetable of Shandong Province/National Improvement Center for Vegetable, Shandong Branch, Ji'nan 250100, China)

**Abstract:** The welsh onion seeds were treated with colchicines at different concentration and treatment time duration, and the ploidy level was identified by morphological trait, chromosome number and flow cytometry techniques. The results showed that the best effect was obtained by the treatment of 0.8% colchicines with 48 hours. The mutated plants we got were vitreous seedlings, they could not survive after transplanting. By tissue culture we obtained tetraploids. The chromosome number of tetraploids was  $2n = 4x = 32$ , the plants showed the general characteristics of tetraploids, such as darker leaf color, larger stomata, fewer stomata per unit area. Comparing the plant height and welsh onion stalk length, there were remarkable difference between tetraploids and the control.

**Key words:** welsh onion; colchicine; tetraploid induction; identification

大葱 (*Allium fistulosum* L.) 以植株营养体为产品器官, 因此培育植株高大的新品种是提高大葱产量的关键, 也是大葱育种者普遍追求的目标 (张国进 等, 2010)。依据多倍体具有相对“巨大性”等特点, 开展大葱多倍体诱导技术研究, 对培育植株高大的大葱新品种具有重要的现实意义。

收稿日期: 2011-09-22; 修回日期: 2011-11-29

基金项目: 国家公益性行业 (农业) 科研专项 (200903018); 山东省良种产业化项目

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: chyq-57721@163.com)

目前关于大葱多倍体诱导方面的研究已经开展,但尚未见获得正常生长的大葱多倍体植株的相关报道。谢芝馨(2004)用秋水仙素处理大葱愈伤组织时发现,多数愈伤组织由于秋水仙素的毒害作用慢慢褐化死亡,最终得到畸形的变异材料,很难生根;宗红(2007)用秋水仙素诱导大葱愈伤组织时发现同样的问题,由于秋水仙素的毒害作用,愈伤组织褐化现象极其严重,不定芽分化受阻,最终诱导只得到2种嵌合体植株,没能得到四倍体植株;国外学者(Keller, 1990; Juðkevicienė et al., 2005)仅对大葱进行了单倍体诱导及组织培养的研究。因此,到目前为止,尚无获得大葱多倍体植株和构建大葱多倍体植株再生体系的成熟技术。

本研究中以大葱种子为试材,以秋水仙素为诱变剂,研究秋水仙素诱导大葱染色体加倍的最佳处理浓度与处理时间;通过对诱变植株进行组织培养,克服了诱变植株“玻璃化”的不利影响,获得了正常生长的四倍体植株,为大葱多倍体育种提供了技术支持和材料储备。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

以山东省农业科学院蔬菜研究所提供的章丘大葱品种种子为试验材料。

### 1.2 多倍体诱导与培养

秋水仙素处理浓度:0、0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0%;处理时间:24 h 和 48 h;共12个处理。每个处理100粒种子,3次重复。将大葱种子在秋水仙素中浸泡处理后,置于超净工作台上用75%酒精浸泡0.5~1.0 min,转入有效浓度2%(体积比)的次氯酸钠消毒40 min,最后用无菌水冲洗3~5遍。将灭过菌的种子接种到MS培养基上,在光照强度 $30 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ,光周期16 h·d<sup>-1</sup>,温度(25±1)℃的条件下培养。

### 1.3 多倍体植株的获得

由于秋水仙素的毒害作用,使得经秋水仙素浸泡诱导得到的多倍体植株存在严重的“玻璃化”现象(图1),移栽后不能成活。将“玻璃化”幼苗的畸形根和黑色子叶切去,取绿色胚轴(图1两个箭头之间的部位)作外植体,根据宗红(2007)筛选的适宜大葱组织培养的培养基,将外植体接种在MS+1.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA培养基上诱导不定芽;在MS培养基上诱导生根,获得正常生长的多倍体植株。



图1 大葱玻璃化苗(左)与正常组培苗(右)

Fig. 1 Vitreous (left) and normal seedlings (right) of welsh onion

1.4 形态学观察

将经组织培养获得的组培苗进行驯化移栽，首先在组培室内打开组培瓶盖驯化培养 3 d，然后将幼苗小心的用镊子取出，用水将根基部的培养基冲洗干净，移栽到经高温灭菌的基质中，直至幼苗成活。在组培苗移栽至基质中 40 d 后，以正常二倍体植株为对照，比较多倍体与正常二倍体植株的生长势、叶色、株高、单株质量、葱白长度、葱白直径、最大管状叶长度、最大管状叶直径等性状差异。

1.5 叶面气孔观察

用镊子撕取大葱植株基部向上第 3 叶片的外表皮置于载玻片上，滴上蒸馏水，于 40 倍显微镜下观察气孔的大小和数量。

1.6 倍性鉴定

染色体数的鉴定采用宗红（2007）的方法，每株取根数总量的 1/2 为观察试材，进行根尖染色体鉴定。叶细胞 DNA 相对含量测定采用 Endang 和 Yosuke（2003）的方法，用 PA 流式细胞仪测定变异植株和正常二倍体植株细胞 DNA 的相对含量。

2 结果与分析

2.1 秋水仙素浸泡大葱种子的诱导效果

以植株粗壮，叶色浓绿，生长缓慢为形态变异标准，统计形态变异株数及形态变异株率。由表 1 可以看出，随着秋水仙素浓度的升高和处理时间的延长，种子的发芽率呈现下降趋势。从多倍体诱变效果看，0.4%~1.0%的秋水仙素对大葱种子的诱导均有效；相同浓度下处理时间越长诱导率越高；处理 24 h 时，随着秋水仙素浓度的升高诱导率也呈现上升趋势；处理 48 h 时，秋水仙素浓度在 0.2%~0.8%时随浓度升高诱导率上升，当浓度达到 1.0%时，诱导率反而下降。在 12 个处理组合中，以秋水仙素浓度 0.8%处理 48 h 的形态变异株率（22%）最高，与其他处理有极显著的差异，为本试验最佳组合。

表 1 秋水仙素不同浓度和处理时间对大葱种子的诱变效应  
Table 1 The induction effect of colchicine concentration and duration on welsh onion seeds

秋水仙素浓度/% Concentration of colchicine	处理时间/h Time of treatment	处理种子数 Number of treated seeds	发芽数 Number of germination	发芽率/% Germination rate	形态变异株数 Number of variant	形态变异株率/% Percentage of variant plants
0.2	24	100	100	100aA	0	0gF
0.4	24	100	90	90cC	12	12fE
0.6	24	100	88	88dC	12	12fE
0.8	24	100	96	96bB	18	18cC
1.0	24	100	96	96bB	20	20bB
0	24	100	100	100aA	0	0gF
0.2	48	100	68	68eD	0	0gF
0.4	48	100	58	58fE	14	14eE
0.6	48	100	48	48hF	16	16dD
0.8	48	100	50	50gF	22	22aA
1.0	48	100	50	50gF	18	18cC
0	48	100	96	96bB	0	0gF

注：不同处理间差异显著性检验采用邓肯氏新复极差法。小写字母表示 0.05 水平，大写字母表示 0.01 水平。下同。  
Note: The data of different treatment tested with Duncan’s method. The small letters indicate 0.05 level, the capital letters indicate 0.01 level. The same below.

2.2 多倍体植株的获得

以全部形态明显变异幼苗的绿色胚轴作为外植体，进行去玻璃化组织培养，得到正常生长的葱苗 47 株。经倍性鉴定，有 3 株为四倍体 ( $2n = 4x = 32$ )，44 株为二倍体 ( $2n = 2x = 16$ )，并且 3 株四倍体均由经 0.8%秋水仙素处理 48 h 所得变异株组织培养后获得。

2.3 四倍体与二倍体植株的形态特征比较

四倍体植株生长健壮，叶色深。由表 2 可见，四倍体植株最大管叶直径和葱白直径均大于二倍体植株；四倍体株高、单株质量、葱白长度、最大管叶长度与二倍体植株之间的差异达极显著水平。

表 2 二倍体与四倍体形态特征比较  
Table 2 Comparison of morphological traits between diploid and tetraploid plants

倍性 Ploidy	株高/cm Plant height	单株质量/g Plant weight	葱白长度/cm Welsh onion stalk length	葱白直径/cm Welsh onion diameter	最大管叶长度/cm The biggest tubular leaf length	最大管叶直径/cm The biggest tubular leaf diameter
二倍体 Diploid	41.6bB	6.16bB	15.0bB	1.0aA	26.6bB	0.8aA
四倍体 Tetraploid	47.3aA	8.39aA	20.1aA	1.1aA	36.2aA	0.9aA

2.4 叶面气孔的观察

于 40 倍显微镜下观察气孔的大小和数量。经叶面外表皮气孔检测，气孔大小、气孔密度都有十分明显的变化。由图 2，a、b 可见，四倍体植株气孔变大，同一视野中气孔数减少，均符合多倍体特征。

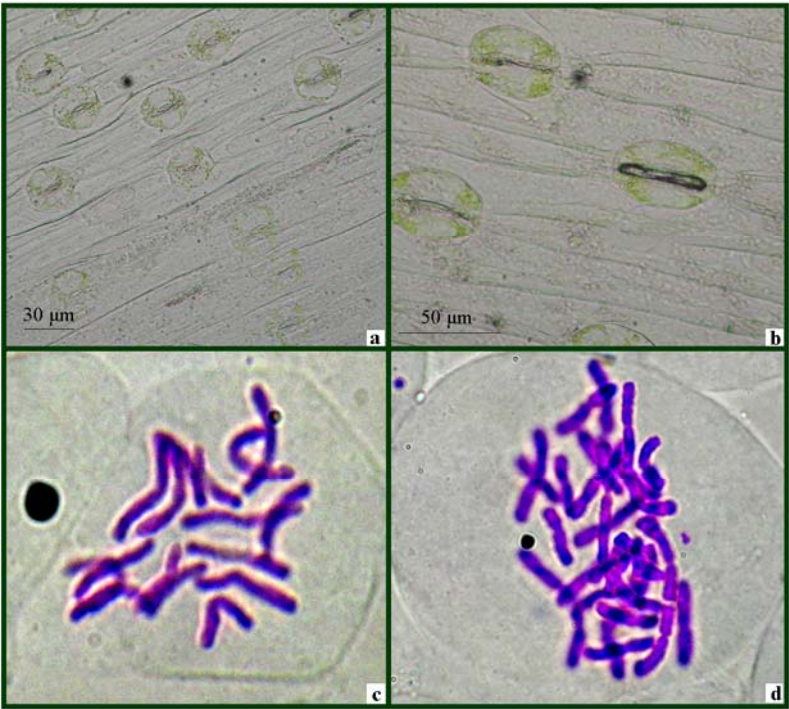


图 2 二倍体和四倍体大葱表皮气孔数量、大小及根尖染色体数量比较  
a、c：二倍体；b、d：四倍体。

Fig. 2 Comparison of stomata size on epidermis and chromosome number in root tip between diploid and tetraploid  
a, c: Diploid; b, d: Tetraploid.

## 2.5 染色体数鉴定

采用根尖压片对四倍体和二倍体植株分别进行染色体数鉴定。结果表明，二倍体植株的染色体数为  $2n = 2x = 16$ （图 2，c），四倍体植株染色体数为  $2n = 4x = 32$ （图 2，d）。

## 2.6 DNA 相对含量测定

利用流式细胞仪对四倍体与二倍体植株进行鉴定，结果表明，二倍体植株仅在相对荧光强度约为 100 的位置出现一个单峰（图 3，a），而四倍体在相对荧光强度约为 200 的位置出现一个单峰（图 3，b），后者约为前者的 2 倍，这表明后者的 DNA 含量增加了一倍，由此判定变异植株为四倍体植株。

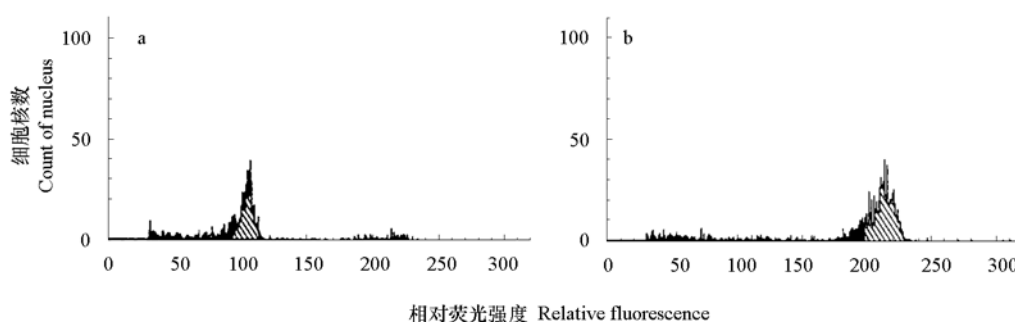


图 3 大葱二倍体、四倍体植株 DNA 含量分布图

a: 二倍体植株; b: 四倍体植株。

Fig. 3 The DNA distribution of diploid and tetraploid plants

a: Diploid plant; b: Tetraploid plant.

## 3 讨论

秋水仙素是常用的人工诱导剂之一，使用诱导剂诱变产生多倍体时，不同材料所用秋水仙素浓度和时间不尽相同，因此确定特定植物、组织、器官的最佳秋水仙素浓度及处理时间，需要不断摸索（崔广荣 等，2009a，2009b）。郑宝强等（2009）以春石斛丛生苗为材料诱导多倍体时发现，0.06%秋水仙素处理 12 h 诱变效果最佳；张海凤等（2008）在处理杜仲籽苗时认为 0.1%秋水仙素处理生长点 12 h 变异株率及四倍体株率最高；童俊等（2009）在研究秋水仙素对紫薇幼苗的加倍效果时发现，0.5%秋水仙素处理紫薇 72 h 变异率最高。本试验中利用秋水仙素浸泡大葱种子，得到秋水仙素处理大葱种子的最佳组合为：0.8%秋水仙素处理 48 h。

本研究中以经秋水仙素诱导形态变异植株的幼胚轴为外植体，经组织培养所得 47 株植株中仅有 3 株为多倍体；当以形态未发生变异植株的幼胚轴为外植体时，组织培养后未发现多倍体。由此可见，经秋水仙素诱导发生形态变异的植株，其染色体数并不一定完全加倍；发生形态变异是产生多倍体的前提，但是发生形态变异的植株并不均为多倍体。在选择外植体时不仅要从形态上进行判定，而且应对其 DNA 相对含量进行分析，确定为四倍体后再进行组织培养，以提高四倍体获得率。

秋水仙素诱导多倍体时经常会出现嵌合体，嵌合体的出现使多倍体的诱导率降低，遗传稳定性差。宗红（2007）以大葱愈伤组织为材料，秋水仙素为诱导剂得到两种嵌合体植株，一种为同时具有三倍体和二倍体细胞的植株，另一种为同时具有四倍体和二倍体细胞的植株，所得植株遗传稳定性差。本研究中以大葱种子为材料，经秋水仙素诱导以及组织培养所得植株未发现嵌合体。由此可见，在利用秋水仙素诱导加倍时试验材料的选择非常重要，处理种子要比处理愈伤组织所得植株稳

定性高,这可能与愈伤组织及其再生苗的遗传稳定性较差有关,与黄晓梅等(2005)研究组织培养中大葱染色体倍性变异所得结论一致。

## References

- Cui Guang-rong, Shangguan Ling-fei, Zhang Zi-xue, Hu Neng-bing, Zhang Cong-yu, Hou Xi-lin. 2009a. Colchicines chemical induction during propagation of protocorm-like bodies of *Oncidium* in liquid culture. *Acta Horticulturae Sinica*, 36 (9): 1385 – 1389. (in Chinese)
- 崔广荣, 上官凌飞, 张子学, 胡能兵, 张从宇, 侯喜林. 2009a. 文心兰类原球茎液体增殖过程中秋水仙素化学诱变. *园艺学报*, 36 (9): 1385 – 1389.
- Cui Guang-rong, Zhang Zi-xue, Zhang Cong-yu, Hu Neng-bing, Sui Yi-hu, Li Jie-qin. 2009b. Colchicine chemical induction during somatic embryogenesis from leaf segments of *Phalaenopsis* test tube plantlets. *Scientia Agricultura Sinica*, 42 (9): 3368 – 3373. (in Chinese)
- 崔广荣, 张子学, 张从宇, 胡能兵, 隋益虎, 李杰勤. 2009b. 秋水仙素对蝴蝶兰试管苗叶切片胚状体发生期的化学诱变. *中国农业科学*, 42 (9): 3368 – 3373.
- Endang Sulistyaningsih, Yosuke Tashiro. 2003. Determination of ploidy levels of shallot and Japanese bunching onion by flow cytometry. *Ilmu Pertanian*, 10 (1): 9 – 15.
- Huang Xiao-mei, Li Gui-ying, Liang Yan, Chen Dian. 2005. Study on the variation of welsh onion chromosome ploidy *in vitro* culture. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 21 (1): 50 – 52. (in Chinese)
- 黄晓梅, 李桂英, 梁 艳, 陈 典. 2005. 组织培养中大葱染色体倍性变异研究. *中国农学通报*, 21 (1): 50 – 52.
- Juðkevičienė D, Stanys V, Bobinas Ė. 2005. Gynogenesis peculiarities of *Allium* L. vegetables grow in Lithuania. *Biologija*, 3: 6 – 9.
- Keller J. 1990. Culture of unpollinated ovules, ovaries, and flower buds in some species of the genus *Allium* and haploid induction via gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.). *Euphytica*, 47: 241 – 247.
- Tong Jun, Ye Yao-mei, Feng Biao, Yuan Wei. 2009. Colchicines induced polyploid plants and their identification in three species of *Lagerstroemia indica*. *Acta Horticulturae Sinica*, 36 (1): 127 – 132. (in Chinese)
- 童 俊, 叶要妹, 冯 彪, 袁 玮. 2009. 秋水仙素诱导三种紫薇多倍体的研究. *园艺学报*, 36 (1): 127 – 132.
- Xie Zhi-xin. 2004. A study of vitrification on Chinese onion (*Allium fistulosum* L.) *in vitro* and polyploid induction [M. D. Dissertation]. Tai'an: Shandong Agricultural University. (in Chinese)
- 谢芝馨. 2004. 大葱试管苗玻璃化研究及多倍体诱导[硕士论文]. 泰安: 山东农业大学.
- Zhang Guo-jin, Wang Guang-yin, Wang Wen-jie, Zhao Cai-xia. 2010. A new welsh onion cultivar 'Xincong 2'. *Acta Horticulturae Sinica*, 37 (3): 513 – 514. (in Chinese)
- 张国进, 王广印, 王文洁, 赵彩霞. 2010. 大葱新品种 '新葱 2 号'. *园艺学报*, 37 (3): 513 – 514.
- Zhang Hai-feng, Guo Bao-lin, Zhang Cheng-he, Yang Jun-xia, Guo Jing, Chen Xin-hua. 2008. Induction and identification of tetraploids in *Eucommia ulmoides* Oliv. *Acta Horticulturae Sinica*, 35 (7): 1047 – 1052. (in Chinese)
- 张海凤, 郭宝林, 张成合, 杨俊霞, 郭 婧, 陈新华. 2008. 杜仲四倍体的诱导与鉴定. *园艺学报*, 35 (7): 1047 – 1052.
- Zheng Bao-qiang, Zhang Ying, Wang Yan, Li Zhen-jian, Zhu Xiang-tao, Lü Chun-yan. 2009. Polyploid induction of nobile-type *Dendrobium*. *Acta Horticulturae Sinica*, 36 (9): 1381 – 1384. (in Chinese)
- 郑宝强, 张 莹, 王 雁, 李振坚, 朱向涛, 律春燕. 2009. 春石斛的多倍体诱导. *园艺学报*, 36 (9): 1381 – 1384.
- Zong Hong. 2007. Tissue culture and primary studies on polyploid induction of welsh onion [M. D. Dissertation]. Tai'an: Shandong Agricultural University. (in Chinese)
- 宗 红. 2007. 大葱组织培养及其多倍体诱导的初步研究[硕士论文]. 泰安: 山东农业大学.