

## 秋水仙素诱导细叶百合多倍体研究

杨英杰 葛蓓宇 魏倩 高俊平 洪波\*

(中国农业大学 农学与生物技术学院,北京 100193)

**摘要** 为获得具有优良观赏性状和农艺性状的细叶百合四倍体植株,并为百合的新品种选育提供性状优良的杂交亲本,以细叶百合种子( $2n=2x=24$ )为试验材料,通过秋水仙素浸泡种子的方法,研究了不同秋水仙素浓度和处理时间对细叶百合染色体加倍的诱导效果。结果表明:以0.1%秋水仙素处理24 h诱导效果最佳,变异率最高,达30%。经根尖染色体鉴定,四倍体植株染色体数目为 $2n=4x=48$ 。四倍体植株气孔密度减少,气孔增大;前期生长势缓慢,叶片缩短增宽,叶色加深;后期生长健壮,叶片增大明显。通过对经秋水仙素诱导获得的变异植株形态、气孔的观察测定以及染色体倍性鉴定,成功获得了细叶百合的多倍体植株。

**关键词** 细叶百合;秋水仙素;染色体;多倍体

中图分类号 S 682.2

文章编号 1007-4333(2013)01-0128-06

文献标志码 A

## Colchicines-induced polyploid plants and identification in *Lilium pumilum* DC

YANG Ying-jie, GE Bei-bei, WEI Qian, GAO Jun-ping, HONG Bo\*

(College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

**Abstract** This work was aimed to obtain tetraploid *Lilium pumilum* DC with excellent ornamental traits and agronomic characters, and provide better cross parent for breeding of new *Lilium* variety. The seeds of *Lilium pumilum* DC ( $2n=2x=24$ ) were treated with different concentrations of colchicine solution at different hours in order to figure out a proper method and obtain polyploids. The results indicated that the most effective induction was obtained by 0.1% colchicine treatment for 24 hours with 30% mutation rate. By chromosome observation of root tip, the tetraploid plants were successfully obtained with the chromosome number  $2n=4x=48$ . The tetraploid plants showed obvious characteristics of low stoma density, large stoma, slow growth, thick and wide leaves and dark leaf color at the initial stage, but quick growth and large leaves at later stage. The results indicated that the polyploid plants were identified by phenotype, stomas and chromosome number observation.

**Key words** *Lilium pumilum* DC; colchicine; chromosome; polyploid

细叶百合(*Lilium pumilum* DC),俗称“山丹花”,为百合科百合属草本植物,在我国东北、华北及西北等地均有分布。细叶百合株型美观,花色艳丽,花朵娇小,花下垂,花瓣反卷,有光泽且清香,具有较好的观赏特性。细叶百合适应性较强,是优良的园林绿化植物,且具有较强的抗病、抗热及耐盐碱能力,是百合抗性育种的重要亲本,常被作为遗传媒介

进行新品种杂交选育<sup>[1-2]</sup>。

诱变育种具有变异频率高,变异范围广,缩短选育周期,克服远缘杂交不育性,育种技术简单等特点,有利于选育出新的种质资源<sup>[3-4]</sup>。多倍体植株生长硕壮,观赏性提高,适应性增强,对新品种选育有重要意义。我国百合多倍体育种自20世纪80年代开始,曾对铁炮百合<sup>[5]</sup>、兰州百合<sup>[6-7]</sup>、龙牙百合<sup>[8]</sup>、

收稿日期:2012-04-17

基金项目:国家公益性行业(农业)科研专项经费(200903020)

第一作者:杨英杰,博士研究生,E-mail:wuhuaguoyj@163.com

通讯作者:洪波,教授,博士,主要从事园林植物与观赏园艺专业研究,E-mail:hongbo1203@cau.edu.cn

东方百合<sup>[9-12]</sup>及青岛百合<sup>[13]</sup>等百合品种进行了多倍体诱导,并成功获得四倍体植株,但细叶百合多倍体诱导研究鲜见报道<sup>[14]</sup>。本研究利用具有特殊花型的细叶百合种子为材料,以秋水仙素为诱导剂,研究了秋水仙素诱导细叶百合染色体加倍的最佳处理浓度与处理时间,通过获得细叶百合四倍体植株以提高其观赏性和抗逆性,进而创制百合新种质,旨在为百合多倍体育种提供技术支持和材料储备。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

以引种自黑龙江省张广才岭的细叶百合为试验材料,选取翌年经人工授粉获得的生长饱满的优质种子作为供试材料。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 多倍体的诱导

以无菌水处理作为对照,将种子用 0.05%、0.1%和 0.2%的秋水仙素溶液分别浸泡处理 24、48 及 72 h 后,用 0.1%的升汞浸泡 10 min,无菌水冲洗 4 次,再接种到无激素的 MS 培养基上。在温度 25 ℃,光照强度为 72  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ ,光照时间 12 h 的条件下培养萌发。每个处理为 40 粒种子。

#### 1.2.2 多倍体的筛选及鉴定

外部形态的鉴定:在种子萌发后开始对植株的形态进行初步鉴定,观察种子萌发和小植株长势情况,进行的筛选并统计形态变异率。形态变异率 = 形态发生变异的植株数/处理数  $\times 100\%$ 。

染色体鉴定:切取约 2 mm 长形态变异植株的根尖,洗净后用冰水混合物处理 24 h,卡诺氏固定液(无水乙醇:冰醋酸 = 3:1)在 4 ℃冰箱中固定 24 h,无菌水漂洗 5 次,室温条件下 1 mol/L 盐酸解离 11 min,再用无菌水漂洗 5 次,然后用希夫试剂染色后压片,压片方法参照常染色体压片法<sup>[15]</sup>。Nikon YS2 显微镜下进行镜检拍照,根据染色体数确定其倍性。统计染色体变异率,染色体变异率 = 染色体发生变异的植株数/处理数  $\times 100\%$ 。

#### 1.2.3 四倍体与二倍体植株的观察比较

形态观察:切取经过染色体鉴定筛选的四倍体

植株的小鳞茎,接种在 MS + 1.5 mg/L BA + 0.2 mg/L NAA 的培养基上进行扩繁,重新鉴定染色体数。当试管苗达 5~6 cm 时进行炼苗移栽,观察植株形态,比较四倍体与正常二倍体植株的生长势、叶片形状及大小并进行统计,其中,叶形指数 = 叶长/叶宽。最终确定四倍体植株的形态特征。

气孔鉴定:撕取植株叶片的下表皮制片,使用日立 S-3400 型扫描电子显微镜,对气孔的大小、密度等性状进行观察测定,气孔大小鉴定参照张凌媛等<sup>[16]</sup>的方法。用二倍体植株叶片气孔作为对照,观察细叶百合的气孔与倍性的关系,明确气孔是否作为多倍体快速鉴定的一个重要指标。

## 2 结果与分析

### 2.1 秋水仙素对细叶百合无菌种子的诱导效果

不同浓度秋水仙素处理对种子的诱导结果见表 1。经秋水仙素浸泡处理的细叶百合无菌种子 7 d 左右开始萌发,不能发芽的种子逐渐失水干瘪死亡。随着秋水仙素处理浓度的升高和时间的延长,死亡率随之增加,0.2%的秋水仙素处理 48 h 种子全部死亡。以植株粗壮,叶色浓绿,生长缓慢为形态变异标准,统计形态变异株数与形态变异率;以根尖压片法对形态变异植株进行核型分析,统计染色体变异率,如表 1 所示,在低浓度情况下,延长处理时间,形态和染色体变异率均随之增加;在高浓度情况下,延长处理时间,形态和染色体变异率反而会下降。0.1%秋水仙素处理变异率相对较高,其中,处理 24 h 可引起 12 粒种子的变异,形态和染色体变异率均为 30%,死亡率也只有 10%,诱导效果最佳。由于外部形态发生变异的植株大部分都发生染色体倍性变化。所以利用秋水仙素诱导细叶百合种子时植株的形态变异可以作为多倍体植株的初步鉴定指标。

另外,在相同浓度秋水仙素处理下,种子的外部形态随着时间的延长,呈现缩短变粗的现象;在相同处理时间,不同浓度亦是如此(图 1)。可见,延长处理时间和增加秋水仙素浓度,都对细叶百合早期生长的形态变化产生重要的影响。

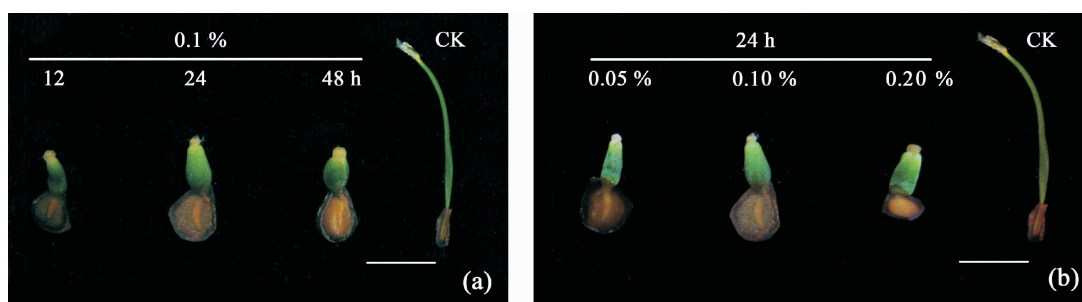
表 1 不同秋水仙素浓度和处理时间对细叶百合无菌种子的诱导效果

Table 1 Induction effects of colchicine concentrations and treatment times on seeds of *Lilium pumilum* DC

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	死亡数 Number of death	死亡率/% Percentage of death
0	0	40.0	0	0
0.05	12.0	40.0	0	0
	24.0	40.0	2.0	5.0
	48.0	40.0	3.0	7.5
0.10	12.0	40.0	0	0
	24.0	40.0	4.0	10.0
	48.0	40.0	6.0	15.0
0.20	12.0	40.0	28.0	70.0
	24.0	40.0	34.0	85.0
	48.0	40.0	40.0	100.0

形态变异数 Number of variance	形态变异率/% Percentage of variance	染色体变异数 Number of chromosome variance	染色体变异率/% Percentage of chromosome variance
0	0	0	0
0	0	0	0
5.0	12.0	4.0	10.0
7.0	17.5	6.0	15.0
9.0	22.5	9.0	22.5
12.0	30.0	12.0	30.0
10.0	25.0	10.0	25.0
4.0	10.0	4.0	10.0
2.0	5.0	2.0	5.0
0	0	0	0



0.05%、0.10%和0.20%，秋水仙素浓度；12、24和48 h，秋水仙素处理时间；CK 未经秋水仙素处理的二倍体植株；标尺指示1 cm。

0.05%, 0.10% and 0.20% indicate the concentrations of colchicine; 12, 24 and 48 h indicate the treatment times by colchicine; CK indicates diploid plant without treatment by colchicine; the scale indicates 1 cm.

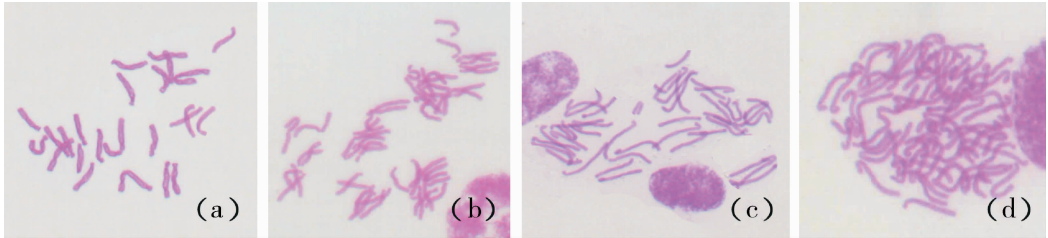
图 1 秋水仙素对细叶百合种子变异的诱导效果

Fig. 1 Induction effects of colchicines on seeds variation of *Lilium pumilum* DC

## 2.2 变异植株染色体鉴定

将二倍体和全部形态变异明显的细叶百合幼苗根尖利用压片法进行染色体核型分析,统计染色体变异率(表 1)。结果显示,形态变异植株的染色体数量大多会发生倍性的改变,在形态变异的 49 株中

有 47 株经鉴定染色体发生了变异,且成功获得 6 个四倍体植株。如图 2 所示,细叶百合正常二倍体的染色体数为  $2n=2x=24$ (图 2(a)),四倍体植株的染色体数为  $2n=4x=48$ (图 2(b)),此外,还发现了三倍体  $2n=3x=36$  和一些染色体数目少于或多于 48 条



(a)二倍体植株染色体数目( $2n=4x=24$ );(b)四倍体植株染色体数目;(c)和(d)变异植株染色体数目不足 48 条或多于 48 条。

(a) Chromosome number of diploid plants( $2n=4x=24$ );(b) Chromosome number of tetraploid plants( $2n=4x=48$ ); (c) and(d),Chromosome number of variation plant less or more than 48.

图 2 细叶百合二倍体,四倍体及非整倍性变化的染色体数目

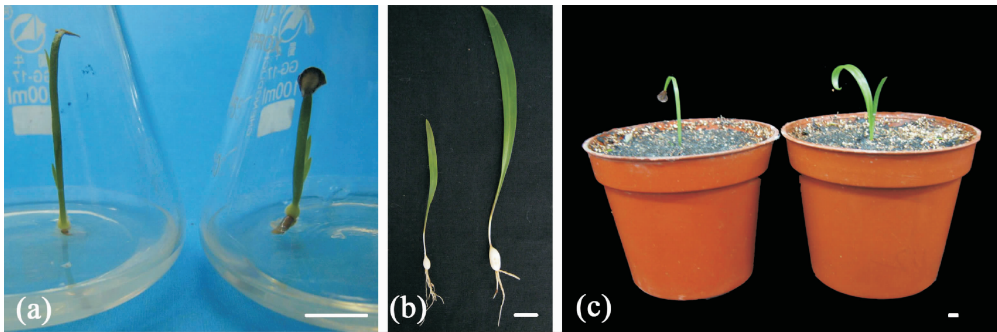
Fig. 2 Chromosome number of diploid,tetraploid and aneuploid sex changed *Lilium pumilum* DC

的变异植株(图 2(c)和(d))。

## 2.3 四倍体与二倍体植株形态比较

将经鉴定后确认为四倍体的植株,在离体条件下进行扩繁和生根培养,炼苗移栽后观察植株形态变化。图 3 显示四倍体植株的形态变化。与二倍体植株相比,虽然早期生长过程中四倍体植株生长发育迟缓,叶片变粗,叶色加深,叶片表面出现轻微皱折,小鳞茎明显增大(图 1)。但培养 20 d 后,四倍体植株生长开始加速(图 3(a)),叶片的生长势增强,

30 d 后叶片明显增大,植株生长健壮。30 d 四倍体与二倍体植株叶片的特征比较见表 2。四倍体植株叶片宽度是二倍体植株的 1.74 倍,叶片长度是二倍体植株的 1.49 倍。40 d 时四倍体植株无论是叶片的长度,宽度还是鳞茎的大小均大于二倍体植株(图 3(b))。50 d 大小的移栽四倍体植株已经萌发第二片叶子,且叶子的长度和宽度均显著大于二倍体植株(图 3(c)),这些均体现了多倍体植株器官增大的特性。



(a) 种子萌发 20 d;(b) 种子萌发 40 d;(c) 种子萌发 50 d 的移栽植株生长情况;左侧为二倍体植株,右侧为四倍体植株;标尺指示 1 cm。

(a) 20 d after seeds germination;(b) 40 d after seeds germination;(c) The growth condition of transplanted plants at 50 d after seeds germination;left is diploid plant, and right is tetraploid plant;the scale indicated 1 cm.

图 3 细叶百合四倍体与二倍体植株的形态比较

Fig. 3 Comparison of morphological traits between tetraploid and diploid *Lilium pumilum* DC

表2 四倍体与二倍体植株叶片的特征比较

Table 2 Comparison of leaves morphological traits between diploid and variation plants of *Lilium pumilum* DC

植株 Plants	叶宽/cm Width of leaves	叶长/cm Length of leaves	叶形指数 Leaf index
二倍体植株 Diploid plants	0.350±0.075	4.960±0.790	14.170
四倍体植株 Tetraploid plants	0.610±0.100	7.380±1.490	12.090

注:样本数量  $n=6$ 。

## 2.4 四倍体与二倍体植株叶片气孔数量及气孔大小比较

与二倍体植株相比,四倍体植株单位面积的气孔数量明显减少,气孔明显增大(图4)。二倍体植株气孔为  $74.5 \mu\text{m} \times 34.45 \mu\text{m}$ ,四倍体植株气孔为  $92.32 \mu\text{m} \times 56.35 \mu\text{m}$ ,气孔长径和短径分别比对照增加 23.92%和 63.57%(表3)。由此,气孔的变化也可以作为多倍体快速鉴定的一个重要指标。

表3 四倍体与二倍体植株气孔差异比较

Table 3 Differences of stoma size between tetraploid and diploid *Lilium pumilum* DC

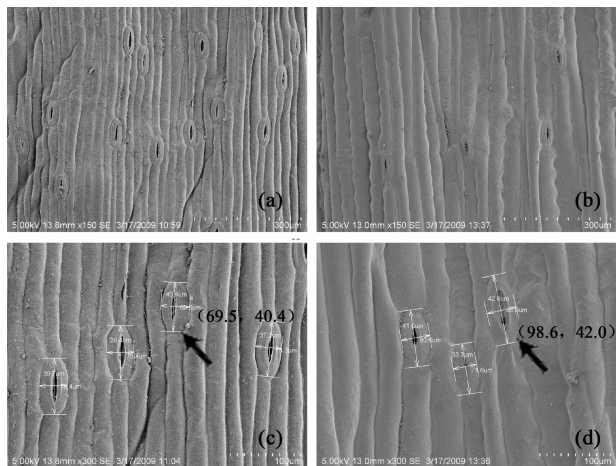
处理 Plants	气孔口长/ $\mu\text{m}$ Length of stoma mouth	气孔口宽/ $\mu\text{m}$ Width of stoma mouth	气孔器长/ $\mu\text{m}$ Length of stoma	气孔器宽/ $\mu\text{m}$ Width of stoma
二倍体植株 Diploid plants	37.5±2.56	16.39±1.94	74.5±1.86	34.45±3.56
四倍体植株 Tetraploid plants	47.61±3.52	24.14±2.57	92.32±5.92	56.35±3.89

## 3 讨论

百合花冠较大,花筒长,花被多为平展型。而细叶百合则花朵娇小,花下垂,花瓣反卷,花姿玲珑可爱,是具有很好开发前景的野生花卉植物资源。以细叶百合为材料诱导多倍体旨在培育更加挺拔健壮,花姿优美,花朵增大的百合新材料。

秋水仙素诱导在多倍体育种中应用较为广泛,效果较显著<sup>[16-17]</sup>。秋水仙素浓度及处理时间是影响诱导多倍体的关键因素,且诱导材料的品种及类型的不同极大地影响多倍体的诱导率<sup>[18-21]</sup>。本研究以野生细叶百合为材料,采用 0.1%秋水仙素处理 24 h 诱导效果最佳,变异数量最多,变异率达 30%。

在百合的多倍体诱导研究中多采用鳞片、愈伤组织或者丛生芽为材料<sup>[8-10]</sup>。因秋水仙素有剧毒



(a)二倍体植株气孔形态(150×);(b)四倍体植株气孔形态(150×);(c)二倍体植株气孔形态(300×);(d)四倍体植株气孔形态(300×)。  
(a) stoma shape of diploid plants(150×);(b) stoma shape of tetraploid plants(150×);(c) stoma shape of diploid plants(300×);(d) stoma shape of tetraploid plants(300×)。

图4 四倍体与二倍体植株气孔大小及数量比较

Fig. 4 Comparison of stoma size and number between tetraploid and diploid *Lilium pumilum* DC

性,在处理过程中对组织培养中的外植体毒害作用较大,抑制外植体不定芽的分化甚至导致褐化死亡。使用种子进行多倍体诱导尽管也会影响到种子的发芽率,但具有对种子毒害小、获得多倍体植株的周期短、植株健壮,成活率高等优点。

采用秋水仙素诱导多倍体时往往会有嵌合体出现,本研究中检测到 1 株嵌合体植株,电镜分析显示部分气孔出现畸形,气孔变大近圆形。嵌合体的出现多影响多倍体的诱导率和遗传稳定性<sup>[22-23]</sup>。

本研究中获得的 49 株形态变异植株经染色体倍性鉴定,有 47 株为染色体倍性发生变化的变异植株,其中有 6 株为四倍体,1 株为三倍体,其他为染色体非整倍性变异的植株。经秋水仙素处理后发生变异的细叶百合在前期的发育过程中,植株叶片变宽、变短、粗壮;叶色深绿;叶片表面有皱折,生长缓

慢;但生长 20 d 后的四倍体植株生长速度加快,个体迅速增大,叶片较宽大,明显大于二倍体植株。此种生长情况与兰州百合多倍体诱导的研究结果一致<sup>[6]</sup>。将获得的四倍体植株炼苗移栽后,进一步在田间对其性状进行观察,以期筛选出具植株健壮、抗病性强、大花等优良商品性状的百合品系,获得具有自主知识产权的百合新品种。

### 参 考 文 献

- [1] 杨利平. 高寒地区百合的栽培与繁育[M]. 哈尔滨:东北林业大学出版社,2001
- [2] 杨利平,刘桂芳,张彦妮. 百合抗性品系的培育[J]. 东北林业大学学报,2003,31(6):33-35
- [3] 李守丽,石雷,张金政,等. 百合育种研究进展[J]. 园艺学报,2006,33(1):203-210
- [4] Blakesley D, Allen A, Pellny T K, et al. Natural and induced polyploidy in *Acacia dealbata* Link. and *Acacia mangium* Willd [J]. *Annals of Botany*,2002,90(3):391-398
- [5] 黄济明. 百合的组织培养和试管内诱发多倍体试验[J]. 园艺学报,1983,10(2):125-127
- [6] 连雪斌. 兰州百合多倍体诱导试验报告[J]. 甘肃农业科技,1995,6:14-15
- [7] 王艳丽,荆瑞勇. 秋水仙碱诱导兰州百合四倍体[J]. 核农学报,2008,22(5):581-584
- [8] 刘选明,周朴华,何立珍,等. 应用细胞工程技术选育四倍体龙牙百合的研究[J]. 生物工程学报,1996,12(增刊):197-203
- [9] 郑思乡,章海龙,董志渊,等. 东方百合多倍体诱导及种球繁育的研究[J]. 西南农业大学学报,2004,26(3):260-263
- [10] 何林,张洁,郭启高,等. 东方百合 Tiber 多倍体诱导及其快繁研究[J]. 西南农业大学学报,2006,28(6):945-949
- [11] Wu H Z, Zheng S X. Diploid female gametes induced by colchicine in Oriental lilies[J]. *Scientia Horticulturae*,2007,114:50-53
- [12] 池坚,席梦利,张静,等. 东方百合 Siberia 多倍体诱导及细胞学鉴定[J]. 分子植物育种,2008,6(2):291-296
- [13] 张俊芳,刘庆华,王奎玲,等. 秋水仙素诱导青岛百合四倍体研究[J]. 核农学报,2009,23(3):454-457
- [14] 段超. 几种百合组织培养及多倍体育种技术的研究[D]. 北京:北京林业大学,2009
- [15] 李懋学,张敦方. 植物染色体研究技术[M]. 哈尔滨:东北林业大学出版社,1991
- [16] 张凌媛,郭启高,李晓林,等. 枇杷气孔保卫细胞叶绿体数目与倍性相关性研究[J]. 果树学报,2005,22(3):229-233
- [17] Kunitake H, Nakashima T, Mori K, et al. Somaclonal and chromosomal effects of genotype, ploidy and culture duration in *Asparagus officinalis* L [J]. *Euphytica*,1998,102:309-316
- [18] Kermani M J, Sarasan V, Roberts A V, et al. Oryzalin-induced chromosome doubling in *Rosa* and its effect on plant morphology and pollen viability [J]. *TAG Theoretical and Applied Genetics*,2003,07(7):195-200
- [19] 宗红,陈云起,王秀峰,等. 蔬菜多倍体研究进展[J]. 山东农业科学,2007,1:17-21
- [20] 沈河溪,梁国鲁,韩素英,等. 秋水仙素诱导中间锦鸡儿多倍体的研究[J]. 园艺学报,2011,38(8):1595-1600
- [21] 王冲,雷家军,邢桂梅,等. 君子兰未成熟胚四倍体诱导及染色体数鉴定[J]. 园艺学报,2011,38(7):1371-1376
- [22] 李涵,鄢波,张婷,等. 切花非洲菊多倍体诱变初报[J]. 园艺学报,2009,36(4):605-610
- [23] 董飞,陈运起,刘世琦,等. 秋水仙素诱导大葱多倍体的研究[J]. 园艺学报,2011,38(12):2381-2386

责任编辑:王燕华