

# 秋水仙素诱导菊花变异的研究

祝朋芳, 肖 丽

(沈阳农业大学 林学院, 辽宁 沈阳 110161)

**摘 要:**以菊花干种子、萌动种子和双子叶期幼苗为材料,以秋水仙素浓度和处理时间为因子对菊花诱变进行了研究。通过统计成活率、诱变率研究了临界剂量和半致死剂量;通过观测气孔、花粉、株高、叶片、头状花序等形态特征以及染色体镜检,鉴定了诱变植株。结果表明:干种子、萌动种子和双子叶期顶端生长点的最佳处理浓度分别为 0.5%、0.2%、1.0%,分别处理 2、3、3 d 时,变异率达到峰值,分别为 77.1%、78.3%、66.3%。干种子、萌动种子和双子叶期幼苗的临界剂量分别为 0.1%处理 1 d、0.1%处理 0.5 d 及 0.2%处理 3 d,半致死剂量分别为 0.2%处理 1 d、0.2%处理 0.5 d 及 2%处理 6 d。对照植株体细胞染色体数目为  $4x+2$ ,经 2%秋水仙素处理 12 h 后,获得的典型表型变异单株体细胞染色体数目为  $7x-1$ 。

**关键词:**菊花;多倍体;非整倍体;秋水仙素

中图分类号:S682.110.352      文献标志码:A      文章编号:1001-7461(2010)03-0080-04

## Colchicine Induced Mutation of *Dendranthema morifolium*

ZHU Peng-fang, XIAO Li

(College of Forestry, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110161, China)

**Abstract:** Dry chrysanthemum seeds, sprouting seeds and dicotyledonous seedlings were treated with colchicine to find optimal concentration and treatment time on the mutation of chrysanthemum. The critical and semi-lethal doses were observed through survival and mutation rate. Mutants were identified through morphological features as pollen, plant height, leaf, flower, stoma, guard cell and chromosome numbers of root cells. The results showed that the optimal treatment concentration of colchicine to dry seeds, sprouting seeds and dicotyledonous seedlings were 0.5%, 0.2% and 1.0% respectively. The optimal treatments were 2, 3 and 3 days respectively with peak mutation rates of 77.1%, 78.3% and 66.3% respectively. The critical doses of colchicine on dry seeds, sprouting seeds and dicotyledonous seedlings were as follows: 1 day 0.1%, 0.5 days 0.1% and 3 days 0.2% respectively, and semi-lethal doses were 1 day 0.2%, 0.5 days 0.2% and 6 days 2% respectively. The chromosome number of the control plants were  $4x+2$ . We observed 62 chromosomes in a significant mutant and with an aneuploid of  $7x-1$ .

**Key words:** *Dendranthema morifolium*; polyploid; aneuploid; colchicine

菊花(*Dendranthema morifolium*)是我国十大传统名花和世界四大切花之一,具有观赏、食用以及药用等多种价值。我国是栽培菊花的起源中心和菊属植物的分布中心,菊属 40 余种中,在我国分布的有 20 余种,栽培品种达 3 000 余种<sup>[1]</sup>。利用秋水仙素诱导方法创新菊花资源的研究仅见陈发棣等<sup>[2]</sup>获得了菊花脑四倍体及二倍体与四倍体的嵌合体。因

此,利用秋水仙素对不同类型菊花材料进行加倍处理,有利于培育出更多抗性强及高观赏性的菊花新品种,为菊花多倍体育种提供理论和实践依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

试验材料为自主选育的地被菊 MT926 自交种

收稿日期:2009-09-25    修回日期:2009-11-26

基金项目:国家科技支撑计划“主要商品花卉优质高产新品种选育”(2006BAD01A18)

作者简介:祝朋芳,女,博士,副教授,从事花卉遗传育种研究。E-mail:pengfangzhu@yahoo.com.cn。

子。试验在沈阳农业大学菊花种质资源圃进行。

1.2 方法

1.2.1 萌动种子制备及双子叶苗培养  在培养皿上铺双层滤纸,用纯净水浸湿,每皿放置 50 粒干种子,共制备 10 皿,25℃恒温箱黑暗培养 3 d 左右露白,待用。以消毒后的原田土为基质,穴盘播种,出苗后至双子叶期待用。

1.2.2 秋水仙素处理  对于种子和萌动后的种子进行秋水仙素处理,秋水仙素浓度梯度为 0.05%、0.1%、0.2%、0.5%、1.0%、2.0%,处理时间梯度为 0.5、1、2、3、4、5 d,共 36 个处理组合。将浸满秋水仙素溶液的脱脂棉覆盖于双子叶期苗顶端生长点上,处理浓度同上,处理时间为 3 d 和 6 d。每组合设置 30 个样本,并设置空白对照,重复 3 次。

1.2.3 主要 DUS 形态性状观测  各处理及对照实生苗约 60 d 时移至田间,根据农业部 2002 版菊花《中华人民共和国植物新品种特异性、一致性和稳定性的测试指南》试行稿,调查 7 个主要 DUS 数值性状,以及叶色、花色 2 个非数值性状。

1.2.4 叶片气孔和花粉形态观察  以 DUS 形态观测初步筛选出的植株为观测对象,于晴天 9:00—10:00 取植株中部叶片,用镊子取下表皮,置于载玻片上,滴少许蒸馏水,在 Botonic400 数码显微镜下观测。每个植株取 10 片叶,随机观测 30 个气孔及保卫细胞,利用目镜测微尺测量气孔和保卫细胞的长、宽,3 次重复,取平均值;并计算气孔密度,每片叶观察 5 个视野,气孔密度 =  $M/[3.14 \times (D/2)^2]$  ( $M$  为视野内气孔数,  $D$  为视野直径)<sup>[3]</sup>。取被测植

株花粉,抖入载玻片上的蒸馏水中,测量花粉粒的大小,每次测量 50 个,3 次重复<sup>[4-5]</sup>。

1.2.5 实生苗成活率、变异率调查  统计实生苗成活率;根据主要 DUS 性状、气孔、花粉形态观测结果,初步确定变异植株,统计变异率,采用 DPS3.01 软件进行成活率及变异率差异显著性分析;根据统计结果,得出临界剂量和半致死剂量。临界剂量指植株死亡率达到 60%时的秋水仙素浓度,半致死剂量指植株死亡率达到 50%时的秋水仙素浓度。

成活率 = 成活株数 / 播种总数 × 100%

变异率 = 具备明显变异性状植株的株数 / 成活株数 × 100%

1.3 染色体观察计数

空白对照和具有明显变异特征的植株,取其茎段在 MS+6-BA 2.0 mg · L<sup>-1</sup> + NAA 0.1 mg · L<sup>-1</sup> 培养基诱导丛生芽,在 MS+NAA 0.01 mg · L<sup>-1</sup> 培养基上诱导生根,后取其再生根制片<sup>[6]</sup>,Botonic400 数码显微镜下观察计数染色体。

2 结果与分析

2.1 不同试材处理后的成活率和变异率

研究表明,随着处理时间的延长,处理后的干种子、萌动种子和双子叶期顶端生长点成活率总体呈下降趋势(表 1)。各秋水仙素浓度处理干种子和萌动种子 0.5 d 时,成活率与对照基本相同,表明处理时间较短时,秋水仙素作用较小;处理 2~3 d 时,各处理浓度的成活率急剧下降。萌动种子处理至 5 d 时,各处理浓度下成活率全部为 0,表明萌动种子对

表 1  秋水仙素处理对菊花不同试材的诱导效果<sup>①</sup>  
Table 1  Effect of colchicine treatment on *D. morifolium*

材料	时间 /d	浓度/%											
		0.05		0.1		0.2		0.5		1.0		2.0	
		成活率 /%	变异率 /%	成活率 /%	变异率 /%	成活率 /%	变异率 /%	成活率 /%	变异率 /%	成活率 /%	变异率 /%	成活率 /%	变异率 /%
干种子	0.5	80.0aA	0.0eE	70.0aA	2.8eE	67.0aA	13.6eE	76.0aA	34.7eE	70.0aA	42.6eE	67.0aA	51.8dD
	1	30.0bB	3.9dD	37.0bB	5.2dD	43.0bB	25.4dD	60.0bB	57.3cC	26.0bB	58.0bB	17.0bB	62.2cC
	2	6.0cC	8.8aA	17.0cC	19.1aA	26.0cC	49.7aA	30.0cC	72aA	23.0cC	76.3aA	6.0cC	77.1aA
	3	3.0dCD	6.7bB	6.0dD	16.9bB	17.0dD	37.4bB	23.0dD	68.6bB	13.0dD	74.3cC	3.0dD	75.4bB
	4	3.0dCD	4.2cC	3.0eDE	8.4cC	3.0eE	36.1cC	6.0eE	46.6dD	3.0eE	52.9dD	0.0eE	0.0eE
	5	0.0eE	0.0eE	0.0fF	0.0fF	3.0eE	11.3fF	6.0eE	32.7fF	0.0fF	0.0fF	0.0eE	0.0eE
萌动种子	0.5	43.0aA	1.2eE	37.0aA	3.1dD	47.0aA	14.2eE	43.0aA	22.3dD	30.0aA	31.8dD	26.0aA	53.0cC
	1	23.0bB	3.6CC	23.0BB	23.8cC	37.0bB	36.9cC	26.0bB	46.2cC	17.0bB	44.2cC	10.0bB	63.4bB
	2	13.0cC	7.2bB	17.0cC	27.6bB	23.0cC	38.9bB	13.0cC	47.7bB	6.0cC	66.5bB	3.0cC	78.3aA
	3	3.0dD	7.8aA	6.0dD	39.4aA	10.0dD	23.2aA	6.0dD	31.0aA	6.0cC	72.8aA	0.0dD	0.0dD
	4	3.0dD	2.3dD	3.0eE	22.4eE	6.0eE	14.7dD	0.0eE	0.0eE	0.0dD	0.0eE	0.0dD	0.0dD
	5	0.0eE	0.0fF	0.0fF	0.0fF	0.0fF	0.0fF	0.0eE	0.0eE	0.0dD	0.0eE	0.0dD	0.0dD
双子叶 期苗	3	6.7aA	7.2 aA	10.0 aA	37.9 aA	40.0 aA	40.4 aA	60.0 aA	12.7 aA	66.7 aA	10.7 aA	56.7 aA	66.3 aA
	6	6.7 bB	5.1 bB	10.0 bB	36.3 bB	20.0 bB	36.8 bB	36.7 bB	12.2 bB	40.0 bB	7.9 bB	53.3 bB	55.1 bB

①表中相同材料中,同列不同小写字母表示差异显著( $p<0.05$ ),不同大写字母表示差异极显著( $p<0.01$ )。

秋水仙素更加敏感。随着秋水仙素浓度的增加,成活率呈先上升后下降的趋势。当浓度分别达到0.5%、0.2%、1.0%时,干种子、萌动种子和双子叶苗成活率均达到最高值,随后开始下降。

随着处理浓度和处理时间的增加,变异率增大,干种子、萌动种子和双子叶苗的变异率最大值分别为77.1%、78.3%、66.3%,临界剂量分别为0.1%处理1 d、0.1%处理0.5 d及0.2%处理3 d,半致死剂量分别为0.2%处理1 d、0.2%处理0.5 d及2.0%处理6 d。

### 2.2 处理后外部形态特征

干种子经秋水仙素处理后,萌动后出现了3子叶现象(图1、图2),植株变低矮(表2),主茎变粗,叶片大且厚,叶色加深(图3、图4),花径增大,舌状花轮数增多,重瓣性增强(图5、图6)。此外,植株整

体长势缓慢,较对照株生长延后10~15 d,开花期延后13~18 d。

### 2.3 处理后气孔和花粉特征

观察空白对照植株与处理后具有明显变异特征植株的气孔和花粉,发现具备明显变异特征的植株气孔和保卫细胞增长增宽(图7、图8、表3),气孔密度下降,花粉直径明显变大(图9、图10),主要是由于秋水仙素处理后,花粉分裂异常<sup>[5-7]</sup>。

### 2.4 染色体数目

镜检了10株未经秋水仙素处理的对照植株,染色体数目为 $2n=36=4x$ ,或 $2n=38=4x+2$ ,其中 $2n=4x$ 的7株,占70%; $2n=4x+2$ 的3株,占30%。干种子经2%秋水仙素处理12 h后获得的形态明显变异植株(MT926-18)离体再生苗根尖细胞的染色体数目为 $2n=62=7x-1$ 。

表2 对照与变异株主要 DUS 性状比较<sup>①</sup>

Table 2 Comparison of the main DUS characters

项目	株高/cm	茎粗/cm	叶长/cm	叶宽/cm	叶片厚度/mm	花序直径/cm	舌状花轮数
对照	43.0 aA	0.5 bB	5.0 bB	3.3 bB	0.9 bB	4.5 bB	3.2 bB
变异株	21.0 bB	0.8 aA	7.0 aA	4.9 aA	1.2 aA	5.7 aA	5.4 aA

①表中同列不同小写字母表示差异显著( $p<0.05$ ),不同大写字母表示差异极显著( $p<0.01$ )。下表同。

表3 对照与变异植株的叶片气孔和花粉形态比较

Table 3 Comparison of stoma and pollen morphology

项目	气孔		保卫细胞		气孔密度 (个·mm <sup>-1</sup> )	花粉直径 /μm
	长/μm	宽/μm	长/μm	宽/μm		
对照	15.6 bB	3.5 bB	8.6 bB	5.9 bB	31.6 aA	6.2 bB
变异株	27.1 aA	5.0 aA	13.1 aA	7.3 aA	15.6 bB	7.7 aA

## 3 结论与讨论

采用高浓度秋水仙素处理菊花虽然变异率高,但成活率低随着处理浓度增大,秋水仙素对细胞的伤害越大,细胞死亡率增加,浓度在0.05%~1.0%时,处理菊花种子2~3 d达到了较理想的效果。这与对虞美人<sup>[8]</sup>、青岛百合<sup>[9]</sup>、菊花脑<sup>[2]</sup>多倍体研究中得出的结论一致。此外,在2.0%秋水仙素处理双子叶期苗6 d时,也得到了少数成活的变异植株。

形态学鉴定是植物多倍体鉴定的有效方法之一,气孔大小及密度可靠性较大<sup>[10]</sup>。根据综合诱变后植株的主要DUS外部形态、气孔等内部形态以及根尖细胞染色体计数,认为外部形态、内部形态及细胞学特征综合鉴定可作为菊花多倍体鉴定的有效方法。试验中获得的地被菊多倍体植株具有明显的巨大性,气孔、保卫细胞和花粉均明显增大,叶片肥厚,枝干粗壮,叶色浓绿,花径增大,重瓣性增强,并且植株更加低矮,覆地性增强,提高了观赏价值。

李懋学等<sup>[7]</sup>报道了我国3个盆栽小菊品种染色体数为53和54,Endo N<sup>[11-12]</sup>报道了日本小菊品种

染色体数为36和51~57,其中染色体数目为 $54\pm1$ 的品种占92%,还发现1个四倍体( $2n=36$ )切花小菊品种;李畅<sup>[13]</sup>发现栽培小菊品种呈现以六倍体( $2n=54$ )为基础的非整倍性变异,染色体数目变动范围为49~57,以51~55出现频率最高,品种内染色体变动幅度大,前后相差8条染色体,且多为六倍体以下的变动,认为小菊品种普遍存在单个染色体或染色体对缺失现象。本试验在对照植株存在30%比率非整倍体4倍体的情况下,经2.0%秋水仙素处理12 h后,获得了形态明显变异株,经鉴定其染色体数目由原来的4倍体或非整倍4倍体诱变成了非整倍7倍体。由于试验材料本身存在非整倍体,在秋水仙素处理过程中很可能存在染色体缺失、易位等现象,造成染色体数目加倍不完全,且在不同诱导条件下染色体数目加倍程度可能不同,导致单株加倍结果存在差异,进一步的研究工作还需进行,如对获得的表型、气孔等形态特征明显加倍的优良单株逐一进行染色体镜检,以便为采用秋水仙素诱导菊花变异提供更丰富的理论和实践依据。

参考文献：

[1] 李辛雷,陈发棣.菊花种质资源与遗传改良研究进展[J].植物学通报,2004,21(4):392-401.  
LI X L, CHEN F D. Advances of genetic improvement and germplasm resources for chrysanthemum[J]. Chinese Bulletin of Botany,2004,21(4):392-401.

[2] 陈发棣,蒋甲福,房伟民.秋水仙素诱导菊花脑多倍体的研究[J].上海农业学报,2002,18(1):46-50.  
CHEN F D, JIANG J F, FANG W M. Study on induction of polyploidy[J]. Shanghai Agriculture Journal,2002,18(1):46-50.

[3] 赵燕,洪亚辉,刘清波,等.菊花辐射后代部分器官维管束与气孔的解剖观察[J].湖南农业大学学报:自然科学版,2003,29(6):128-132.  
ZHAO Y, HONG Y H, LIU Q B, *et al.* Anatomical observation of the vascular bundle and the stomata in some organ of the irradiated chrysanthemum offspring[J]. Journal of Hunan Agricultural University: Natural Science Edition,2003,29(6):128-132.

[4] 杨际双,李占军,王丽霞.菊花花粉生活力及瓶插授粉研究[J].河南农业科学,2007(12):83-86.  
YANG G S, LI Z J, WANG L X. Studies on pollen viability and vase fertilization of chrysanthemum[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences,2007(12):83-86.

[5] 遠藤元庸,稲田委久子.栽培菊の核型について[J].日本園芸学会雑誌,1992,61(2):413-420.

[6] 张贵友.普通遗传学实验指导[M].北京:清华大学出版社,2003.1-11.

[7] 李懋学,张方,陈俊愉.我国某些野生和栽培菊花的细胞学研究[J].园艺学报,1983,10(3):199-205.

[8] 马新才,戴建民,李培环,虞美人多倍体化学诱变研究初报[J].莱阳农学院学报,2003,20(3):172-174.

[9] 张俊芳,刘庆华,王奎玲,等.水仙素诱导青岛百合四倍体研究[J].核农学报,2009,23(3):454-457.  
ZHANG J F, LIU Q H, WANG K L, *et al.* Tetraploid induction of *Lilium tsingtauense* by colchicine [J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences,2009,23(3):454-457.

[10] 张焕玲,李俊红,李周岐.秋水仙素处理杜仲种子诱导多倍体的研究[J].西北林学院学报,2008,23(1):78-81.  
ZHANG H L, LI J H, LI Z Q. Studies on polyploid induction in vitro of *Eucommia ulmoides* Oliv. [J]. Journal of Northwest Forestry University,2008,23(1):78-81.

[11] ENDO N. The chromosome survey on the cultivated Chrysanthemums, *Chrysanthemum morifolium* Ramat. I. On the chromosome numbers of cultivated Chrysanthemums [J]. Japan Soc. Horc. Sci., 1969a, 38(3):267-274.

[12] ENDO N. The chromosome survey on the cultivated Chrysanthemums, *Chrysanthemum morifolium* Ramat I. On the chromosome numbers of cultivated chrysanthemums [J]. Japan Soc. Horc. Sci., 1969b, 38(4):343-349.

[13] 李畅.部分菊花品种的细胞遗传学研究[D].南京:南京农业大学,2008.5.  
LI C. Cytogenetical studies on some chrysanthemum cultivars [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2008. 5.

图版 1 菊花处理前后的形态特征及染色体数目变化比较

Plate 1 The comparison of morphological characteristics and chromosome number of chrysanthemum before and after treatment

1. 处理后出现 3 子叶(处理浓度 1%,处理时间 24 h.下同);2. 对照株的双子叶;3. 变异株 MT926-18 与对照株叶片长度对比;4. MT926-18 与对照株叶片宽度对比;5. 对照花序;6. MT926-18 花序;7. 对照气孔;8. MT926-18 气孔;9. MT926-18 花粉;10. 对照花粉;11. 对照株染色体( $2n=4x=36+2$ );12. MT926-18 染色体( $2n=6x=54+8$ )