

杜仲种子无菌苗的获得及染色体加倍技术研究

周 玮¹, 李周岐¹, 李 煜¹, 孙 勇²

(1. 西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨陵 712100; 2. 宝鸡职业技术学院 生物工程系, 陕西 宝鸡 712013)

摘 要:研究了杜仲种子试管苗萌发和无菌苗培育技术,以及种子染色体加倍技术,提出了以种子为材料通过试管萌发进行染色体加倍的技术方法:杜仲成熟种子剥去种皮,用清水反复冲洗,经 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的赤霉素浸泡24 h后,置于浓度为0.3%的秋水仙素中浸泡48 h,再于70%酒精消毒30 s, $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{HgCl}_2$ 表面消毒12 min,无菌水冲洗3~4次,切去少许胚芽和胚根端胚乳后胚根向下接入无激素的MS培养基中培养。在组织培养条件下,种子的萌发率最高可达100%,且无菌苗生长良好;多倍体诱变率最高达到76.09%。本试验最终获得多倍体变异植株424株。

关键词:杜仲;种子;无菌苗;染色体加倍;多倍体

中图分类号:S722.37

文献标志码:A

文章编号:1001-7461(2011)04-0132-05

Achievement of Tube-cultured Plantlets from Seeds and Technique of Chromosome Doubling of *Eucommia ulmoides*

ZHOU Wei¹, LI Zhou-qi^{1*}, LI Yu¹, SUN Yong²

(1. College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2. College of Forestry, Baoji Vocational Technology College, Baoji, Shaanxi 712013)

Abstract: Based on the germination and breeding of tube-cultured plantlets of *Eucommia ulmoides*, the technology of chromosome doubling of seeds was conducted. The methodology of in vitro chromosome doubling using seeds was as follows: stripping the mature husk of *E. ulmoides*, rinsing repeatedly with tap water, immersing in $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ gibberellin for 24 h, then soaking seeds for 48 h in 0.3% colchicine solution. The disinfection time was 30 s with 70% alcohol and 12 mins with $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{HgCl}_2$. After rinsed three to four times with sterile water, truncated endosperms were placed into hormone-free Ms medium. The highest germination rate from seeds was up to 100% in tissue culture, with the superior quality as well; the highest rate of the polyploid induction was 76.09%. Introduced polyploid plants with a number of 424 were obtained finally.

Key words: *Eucommia ulmoides* Oliv.; seed; aseptic plant; chromosome doubling; polyploid

杜仲(*Eucommia ulmoides*)为杜仲科杜仲属植物,是我国特有的古生树种^[1],也是具有极大开发利用价值的药用胶用植物^[2]。植物多倍体育种的成功经验表明,杜仲采用多倍体育种技术,通过染色体加倍后带来的形态和生理生化方面的巨大变化,是提高杜仲叶片含胶量以及植株产叶量的有效途径。目前,关于杜仲染色体加倍技术的研究虽已有开

展^[3-5],但能够用于生产实践的杜仲多倍体优良品种尚未见报道。杜仲的播种育苗出苗率不高,不利于植株的大量繁育。应用组织培养的方法进行杜仲无菌苗的培育,可以提高出苗率,在短时间内获得大量植株。因此,本试验在建立杜仲无菌苗组织培养繁育体系的基础上,对秋水仙素诱导杜仲种子染色体加倍技术进行了研究,旨在为杜仲良种繁育和高产、

收稿日期:2010-06-16 修回日期:2010-08-18

基金项目:西安市科技计划项目(NC08009);陕西省科技攻关项目(2005K01-G14-04)

作者简介:周玮,女,硕士研究生,主要从事林木遗传育种研究。

*通讯作者:李周岐,男,博士,教授,博士生导师,主要从事林木遗传育种教学与研究。E-mail: lzhouqi@yahoo.com.cn

优质、抗性强的优良品种选育工作提供理论和实践依据。

1 材料与方法

1.1 材料及其预处理

种子于2008年10月中旬采集于西北农林科技大学博览园杜仲优树种质资源圃,阴凉通风处阴干,除去杂质,放在布袋储存于4℃冰箱内备用。

1.2 研究方法

1.2.1 种子无菌苗的获得 试验选取4因素4水平正交试验^[6],4因素为赤霉素(GA₃)的浸泡时间(A)、浓度(B)、1 g·L⁻¹ HgCl₂表面消毒时间(C)和切去胚乳程度(D),每因素4水平。选用正交表L₁₆(4⁵),不考虑交互作用(表1)。种子在相应浓度的赤霉素溶液中浸泡不同时间后,用70%酒精消毒30 s,1 g·L⁻¹ HgCl₂消毒不同时间,无菌水冲洗3~4次,按照设计切去少许胚芽或胚根端胚乳后接入无激素的MS培养基中,每个处理接种40瓶,每瓶2颗种子,2次重复。30 d后统计萌发成苗数,计算萌发率。

萌发率(%)=(全部正常出苗种子数/供试种子数)×100

表1 无菌苗繁育体系正交试验L₁₆(4⁵)表头设计

Table 1 Orthogonal design L₁₆(4⁵) of aseptic seedlings breeding system

水平	因素			
	(A) GA ₃ 浸泡 时间/h	(B) GA ₃ 浓度 /mg·L ⁻¹	(C)1 g·L ⁻¹ HgCl ₂ 表面消毒 时间/min	(D) 切去 胚乳程度
1	24	0	6	不切
2	36	100	8	切胚根端胚乳
3	48	300	10	切胚芽端胚乳
4	60	500	12	两端都切

1.2.2 种子诱导多倍体植株 将供试的杜仲成熟种子用1.2.1中确定的赤霉素浓度及浸泡时间处理后,选择不同的秋水仙素浓度(0.05%、0.1%、0.2%和0.3%)和不同的秋水仙素浸种时间(12 h、24 h、36 h、48 h)2个因素,各4个水平组成16个处理进行多倍体诱导。每个处理分别选取饱满种子300粒,3次重复,每个重复100粒。之后,按照1.2.1中确定的1 g·L⁻¹ HgCl₂表面消毒时间和切去胚乳程度处理种子,接入无激素的MS培养基中培养。30 d后统计萌发成苗数,计算萌发率;60 d后统计变异植株数,计算诱导率。本试验采用形态鉴定法,以杜仲种子萌发成苗过程中植株生长缓慢,茎端膨大变形、茎粗壮而短、叶片加厚,叶色变深等特点为标准进行多倍体植株的鉴定^[7-9]。

诱导率(%)=(变异植株数/总植株数)×100

1.2.3 炼苗和移栽 当组培苗根长为2 cm时,打开瓶口炼苗,3 d后,移栽至花盆中,温室内培养。基质为:沙子:珍珠岩:腐殖质=1:2:1,覆盖地膜,3 d后开始逐渐延长透气时间,最终去掉地膜。每种基质移栽30盆,每盆2株。

1.2.4 数据统计与处理 试验数据采用SPSS统计分析软件(v13.0)分析。分析前对成苗率及诱导率进行反正弦转换。

1.2.5 培养条件 试验采用的MS培养基含蔗糖30 g·L⁻¹、琼脂6 g·L⁻¹、pH调整为6.0~6.2,分装后于121℃,1.1 kg·cm⁻²的压力下灭菌30 min。培养室温度为25℃±1℃,每日光照14 h,光照强度1 500~2 000 lx。

2 结果与分析

2.1 种子无菌苗的获得

表2看出,在组织培养条件下,杜仲种子的萌发率最高可达100%,且无菌苗生长良好(图版1)。

因素内水平极差(R)的大小,说明了该因素对实验结果的影响程度。表3表示,参试4因素对杜仲种子萌发成苗影响的主次关系依次是D,B,C,A。同时,根据各因素水平均值(\bar{K}_i)的大小,可以看出各因素影响下萌发率的大小依次为:GA₃浸种时间A(60,24,48,36),GA₃浓度B(500,300,100,0),1 g·L⁻¹ HgCl₂表面消毒时间C(12,10,8,6),切去胚乳程度D(两端都切,切胚根端胚乳,切胚芽端胚乳,不切)。由此可以看出,最优组合为:A₄B₄C₄D₄。各因素对试验结果影响的显著程度及各因素水平之间的差异的显著程度,需通过方差分析和多重比较进行分析。

表2 正交设计L₁₆(4⁵)试验结果

Table 2 Experimental results of orthogonal design L₁₆(4⁵)

处理号	接种数	重复 I		重复 II	
		萌发数	萌发率/%	萌发数	萌发率/%
1	80	0	0.00	1	1.25
2	80	58	72.50	56	70.00
3	80	6	7.50	7	8.75
4	80	79	98.75	80	100.00
5	80	6	7.50	5	6.25
6	80	50	62.50	52	65.00
7	80	10	12.50	9	11.25
8	80	70	87.50	72	90.00
9	80	48	60.00	49	61.25
10	80	12	15.00	11	13.75
11	80	70	87.50	72	90.00
12	80	5	6.25	7	8.75
13	80	57	71.25	59	73.75
14	80	12	15.00	11	13.75
15	80	67	83.75	68	85.00
16	80	14	17.50	13	16.25

表 3 $L_{16}(4^5)$ 试验结果的直观分析
Table 3 Visual analysis of experimental results

因素	(A) GA ₃ 浸泡时间/h	(B)GA ₃ 浓度/(mg · L ⁻¹)	(C)1 g/LHgCl ₂ 表面消毒时间/min	(D)切去胚乳 程度	误差空列
\bar{K}_1	41.032 5ab	31.977 5a	37.720 0a	15.371 3a	30.043 8
\bar{K}_2	39.688 8a	38.781 3b	38.832 5ab	64.207 5c	48.896 3
\bar{K}_3	39.923 8a	43.461 3c	40.100 0b	19.566 3b	35.940 0
\bar{K}_4	42.907 5b	49.330 0d	46.900 0c	64.407 5c	48.672 5
R(极差)	3.218 7	17.352 5	9.180 0	49.036 2	18.852 5

方差分析结果表明,四个因素 GA₃ 浸泡时间(A)、GA₃ 浓度(B)、1 g/LHgCl₂ 表面消毒时间(C)和切去胚乳程度(D)对试验结果的影响均达到极显著水平($p < 0.01$),有必要进一步对四个因素 A、B、C、D 的均值进行多重比较。

由多重比较结果(表 3)可以看出,A₄ 水平(浸泡 60 h)使杜仲种子的萌发率显著提高,但对于杜仲种子的萌发来说,赤霉素浸泡时间不是越长越好。A₄ 和 A₁ 之间不存在显著差异,所以因素 A 可以取 A₁ 水平,即赤霉素浸泡时间为 24 h。这样既可以节省时间,又不会显著的降低杜仲种子的萌发率。

通过以上分析可以看出,利用杜仲种子繁育无茵苗的方法为:A₁B₄C₄D₄,即将成熟的杜仲种子,剥去种皮,用清水反复冲洗干净,500 mg · L⁻¹ 的赤霉素(GA₃)浸泡 24 h 后,70%酒精消毒 30 s,1g · L⁻¹

HgCl₂ 表面消毒 12 min,无菌水冲洗 3~4 次,切去少许胚芽和胚根端胚乳后,胚根向下接入无激素的 MS 培养基中。30 d 后萌发成苗。

2.2 杜仲种子诱导多倍体植株

经过不同浓度秋水仙素浸泡处理后,杜仲种子萌发的幼苗表现出不同程度的多倍体形态特征(图 1, E~H),同时,杜仲种子的萌发率有所下降,但仍保持在 70%以上(表 4)。由因素内水平极差(R)的大小可以看出(表 5),秋水仙素浸泡时间对杜仲种子诱导率和萌发率的影响较大。根据各因素水平均值(\bar{K}_i)的大小,可以看出各因素影响下诱导率由大到小依次为:秋水仙素浓度(0.3%、0.2%、0.1%、0.05%),秋水仙素浸泡时间(12、24、36、48 h);萌发率大小依次为:秋水仙素浓度(0.3%、0.2%、0.1%、0.05%),秋水仙素浸泡时间(24、48、36、12 h)。

表 4 秋水仙素不同浓度和处理时间的诱导效果

Table 4 The inductive effect of colchicines with different concentration and processes time

试验号	秋水仙素浓度 /%	秋水仙素处理 时间/h	接种数	萌发数 /株	萌发率 /%	变异株数 /株	诱导率 /%
1	0.05	12	300	237	79	21	8.86
2	0.10	12	300	225	75	33	14.67
3	0.20	12	300	249	83	75	30.12
4	0.30	12	300	240	80	75	31.25
5	0.05	24	300	264	88	75	28.41
6	0.10	24	300	270	90	117	43.33
7	0.20	24	300	261	87	123	47.13
8	0.30	24	300	267	89	120	44.94
9	0.05	36	300	213	71	51	23.94
10	0.10	36	300	234	78	132	56.41
11	0.20	36	300	240	80	127	53.75
12	0.30	36	300	267	89	192	71.91
13	0.05	48	300	237	79	129	54.43
14	0.1	48	300	270	90	159	58.89
15	0.2	48	300	267	89	177	66.29
16	0.3	48	300	276	92	210	76.09

方差分析结果表明,秋水仙素浓度对诱导率的影响达到了极显著水平,而对萌发率的影响不显著。同时,秋水仙素浸泡时间对杜仲种子萌发率和诱导率的影响均达到极显著水平。

表5 试验结果的直观分析

Table 5 Visual analysis of experimental results

因素	秋水仙素浓度/%		秋水仙素浸泡时间/h	
	萌发率/%	诱导率/%	萌发率/%	诱导率/%
\bar{K}_1	63.150 0	31.592 5a	62.952 5a	26.780 0a
\bar{K}_2	66.289 5	40.622 5b	70.198 2b	39.707 5b
\bar{K}_3	67.145 2	44.575 0b	63.377 6a	45.780 0b
\bar{K}_4	69.566 4	48.700 0b	69.622 7b	53.222 5c
极差 R	6.416 4	17.107 5	7.245 7	26.442 5

进一步进行多重比较分析(表5),可以看出:在诱导率方面,秋水仙素浸泡时间为48 h时,种子的诱导率显著高于秋水仙素浸泡时间为12、24、36 h,所以秋水仙素浸泡时间取48 h效果最佳。秋水仙

素浓度为0.1%、0.2%、0.3%时的诱导率显著高于0.05%浓度水平,且随着秋水仙素浓度的提高,多倍体诱导率也在不断提高。因此,对于秋水仙素浓度这一因素选择0.3%水平为最佳。在萌发率方面,秋水仙素浸种48和24 h分别与秋水仙素浸种12和36 h的样本均数之间存在显著差异。结果表明,秋水仙素浸种24 h时种子的萌发率最高。但是,杜仲种子经浓度为0.3%的秋水仙素浸泡48 h后诱导率最高。而且,秋水仙素浸种48和24 h对萌发率的影响差异不显著,萌发率均较高。另外,本试验的研究目的是最大数量的获得杜仲多倍体植株,因此选择0.3%的秋水仙素浸种48 h作为多倍体植株的最佳处理,这样既可以保持较高的诱导率,又不影响萌发率。本试验最终获得多倍体变异植株424株。

2.3 炼苗和移栽

当根长2 cm时,将瓶口打开炼苗,幼苗叶色逐渐加深,以沙子、珍珠岩、腐殖质按1:2:1为基质移栽成活率较高,约80%。(图1I~J)。

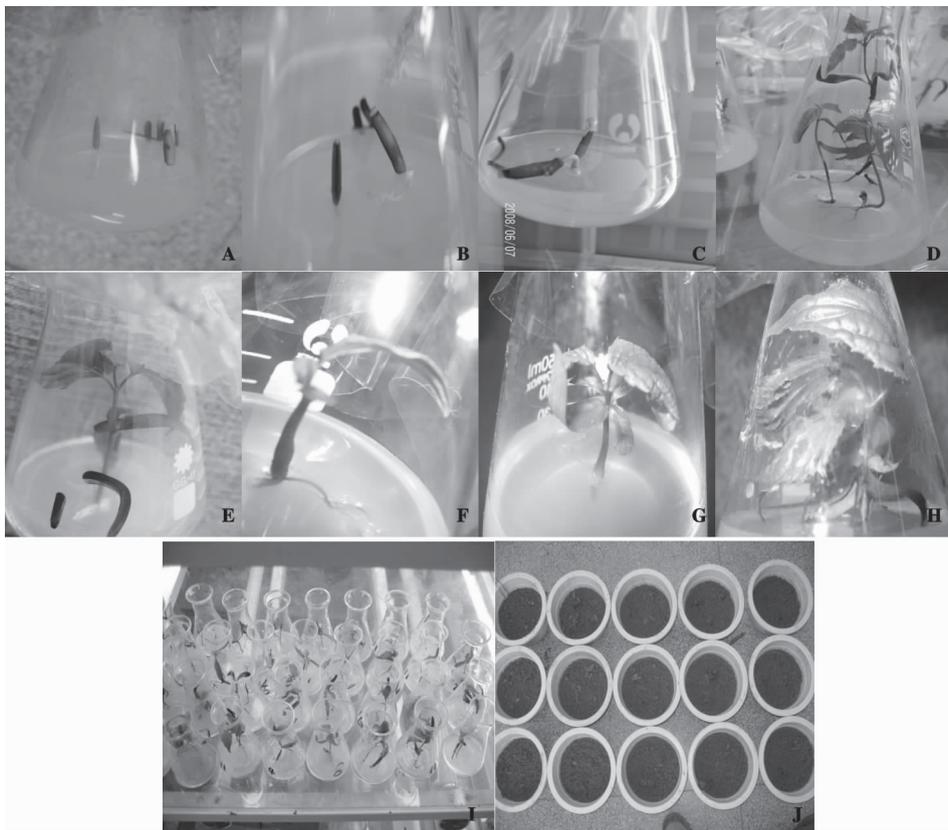


图1 杜仲种子无菌苗的获得及染色体加倍技术研究

Fig. 1 Achievement of plantlets from seeds and technology of chromosome doubling of *E. ulmoides*

A~D: 杜仲无菌苗繁育体系(A:吸胀;B:露白;C:发芽;D:成苗);E~H: 杜仲多倍体植株的诱导(E:杜仲正常生长的植株;F~G: 杜仲多倍体变异植株茎端膨大变形;H: 杜仲多倍体变异植株叶片加厚、叶色变深);I~J: 炼苗和移栽(I: 炼苗;J: 移栽)。

3 结论与讨论

本试验在建立杜仲种子无菌苗繁育体系的基础

上,对杜仲种子染色体加倍技术进行了研究,试验结果表明,无菌苗繁育体系为:将成熟杜仲种子剥去种皮,用清水反复冲洗干净,500 mg · L⁻¹的赤霉素

(GA₃)浸泡 24 h 后,70%酒精消毒 30 s,1 g·L⁻¹ HgCl₂ 表面消毒 12 min,无菌水冲洗 3~4 次,切去少许胚芽和胚根端胚乳后胚根向下接入无激素的 MS 培养基中。30 d 后萌发成苗,萌发率最高可达 100%,且无菌苗生长良好。诱导杜仲种子染色体加倍的秋水仙素浓度和浸种时间最佳组合为:浓度为 0.3%的秋水仙素浸种 48 h,诱导率最高达到 76.09%。因此,以杜仲种子为材料诱导多倍体植株的方法为:杜仲成熟种子剥去种皮,用清水反复冲洗,经 500 ppm 的赤霉素(GA₃)浸泡 24 h 后,置于浓度为 0.3%的秋水仙素中浸泡 48 h,再于 70%酒精消毒 30 s,1 g·L⁻¹ HgCl₂ 表面消毒 12 min,无菌水冲洗 3~4 次,切去少许胚芽和胚根端胚乳后胚根向下接入无激素的 MS 培养基中培养。30 d 后萌发成苗。该方法既可以保持较高的诱导率,又不影响萌发率。试验最终获得多倍体变异植株 424 株。

与传统的播种育苗相比,利用组织培养方法培育无菌苗可以显著地提高杜仲种子的萌发率。杜仲种子通过沙藏,播种于泥土中成苗率不足 50%^[1]。在组培条件下,杜仲的萌发率最高可以达到 100% (表 2),且无菌苗生长良好。杜仲无菌苗快速繁殖体系的成功建立,大大提高了试验效率,缩短了育种时间,为杜仲的研究奠定了材料基础。

在杜仲染色体加倍技术的研究中,张海凤等^[10]采用秋水仙素溶液处理杜仲籽苗生长点的方法,获得了变异的杜仲四倍体植株;高鹏等^[11]以杜仲雄花芽为材料,在掌握小孢子母细胞减数分裂过程的基础上,对人工诱导花粉染色体加倍的有效处理时期、秋水仙素浓度以及秋水仙素处理时间等进行了研究,试验获得的杜仲 2n 花粉比率最高可达 49.5%;毕春侠等^[3]利用⁶⁰Co 射线辐射处理萌动的杜仲种子进行杜仲多倍体植株诱导技术的研究,虽获得了变异植株,但其存活率较低。本试验则以成熟杜仲种子为材料,采用秋水仙素浸泡法对杜仲种子染色体加倍技术进行了研究,试验获得变异植株 424 株,且经炼苗移栽后得以保存。

在多倍体植株的鉴定方面,本试验仅以杜仲种子成苗过程中植株生长缓慢,茎端膨大变形、茎粗壮而短、叶片加厚,叶色变深等形态指标进行了初步的表观鉴定。为确定多倍体植株是否存在嵌合性,在今后的幼苗培育中还应结合染色体计数法和分子生物学水平方法的鉴定技术进一步对其进行验证,以

期获得性状优良的杜仲多倍体植株。

参考文献:

- [1] 张康健. 杜仲[M]. 北京:中国林业出版社,1990.
- [2] 张康健,苏印泉,张檀,等. 中国杜仲优良品种选育[M]. 陕西杨陵:西北农林科技大学出版社,2002.
- [3] 毕春霞,张存旭,郭军战,等. 杜仲多倍体的诱导[J]. 河北林果研究,1999,14(2):148-150.
BI C X, ZHANG C X, GUO J Z, *et al.* The induction of polyploid in *Eucommia ulmoides* Oliv. [J]. Hebei Journal of Forestry and Orchard Research, 1999,14(2): 148-150.
- [4] 王彩霞. 杜仲多倍体诱变育种的研究[J]. 内蒙古林业调查设计,2009,32(1):104-106.
WANG C X. Studies on polyploid induced breeding of *Eucommia ulmoides* [J]. InnerMongolia Forestry Investigation and Design, 2009, 32(1): 104-106.
- [5] 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.
- [6] 袁志发,周静芋. 试验设计与分析[M]. 北京:高等教育出版社,2000:1-17.
- [7] 乔永刚,马璐琳,赵晓明,等. 秋水仙素诱导党参四倍体[J]. 核农学报,1991,22(5):224-227.
QIAO Y G, MA L L, ZHAO X M, *et al.* Tetraploidy induction of *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf. by colchicine. [J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 1991, 22(5): 224-227.
- [8] 石荫坪,王强生,周广芳,等. 苹果试管染色体组工程育种[J]. 落叶果树,1993(4):1-5.
SHI Y P, WANG Q S, ZHOU G F, *et al.* Genome engineering breeding of apple in vitro. [J]. Deciduous Fruits, 1993, (4):1-5.
- [9] 郑思乡,李利良,甘红霞,等. 芦笋多倍体诱导及其离体培养的研究[J]. 湖南农业科学,1996(1):22-23.
ZHENG S X, LI L L, GAN H X, *et al.* The induction of polyploid and Culture in vitro in Asparagus. [J]. Journal of Hunan Agricultural Sciences, 1996,(1):22-23.
- [10] 张海凤,郭宝林,张成合,等. 杜仲四倍体的诱导与鉴定[J]. 园艺学报,2008,35(7):1047-1052.
ZHANG H F, GUO B L, ZHANG C H, *et al.* Induction and Identification of Tetraploids in *Eucommia ulmoides* Oliv. [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2008, 35(7):1047-1052.
- [11] 高鹏,林威,康向阳. 秋水仙碱诱导杜仲花粉染色体加倍的研究[J]. 北京林业大学学报,2004,26(4):39-43.
GAO P, LIN W, KANG X Y. Pollen chromosome doubling of *Eucommia ulmoides* induced by colchicine. [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2004, 26(4):39-43.