

氟乐灵对萱草多倍体的诱导

李永平, 李 丽, 梁 峥, 贾民隆, 曹冬梅

(山西省农业科学院园艺研究所, 山西 太原 030031)

摘 要:采用浸泡和混培 2 种方法对萱草的愈伤组织和不定芽进行多倍体诱导探索。结果表明 2 种试材在 2 种诱导方法下均能够获得多倍体;以愈伤组织作为外植体时,多倍体的诱导以氟乐灵浓度 0.007%混培处理 5 d 的效果最好,成活率可达 50%,诱导率达到 35.74%;以不定芽作为外植体时,萱草多倍体的诱导以氟乐灵浓度 0.01%浸泡处理 6 h 的诱导率最高,可达 21.75%,成活率为 26.67%。氟乐灵可以取代秋水仙素作为萱草多倍体诱导的有效试剂。

关键词:萱草, 氟乐灵, 多倍体

中图分类号: S682.1⁺9

文献标识码: A

文章编号: 1002-2481(2018)12-1997-04

Study on the Induction of Polyploid of *Hemerocallis fulva* by Trifluridine

LI Yongping, LI Li, LIANG Zheng, JIA Minlong, CAO Dongmei

(Institute of Horticulture, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030031, China)

Abstract: The callus and adventitious buds of *Hemerocallis fulva* were used to induce polyploid by soaking and mixed culture. The results showed that polyploid could be obtained by soaking method and mixed culture method, whether callus or adventitious bud. If callus was used as explant, the best effect of polyploid induction was treated with 0.007% trifluridine for mixed culture 5 d, the survival rate was 50% and the induction rate was 35.74%. If adventitious buds were used as explants, the highest induction rate of polyploid of *Hemerocallis fulva* could reach 21.75% and the survival rate was 26.67%, when the polyploid of *Hemerocallis fulva* was induced by 0.01% trifluridine for soaking 6 h. Therefore, trifluridine can replace colchicine as an effective reagent for polyploid induction of *Hemerocallis fulva*.

Key words: *Hemerocallis fulva*; trifluridine; polyploid

多倍体育种是培育植物新品种的一个重要途径^[1-6]。多倍体植物一般具有营养器官的巨大性^[7]、植株抗性强、生长率高的优点,而这些特点恰好都符合人们对观赏植物的育种方向,因而多倍体育种在观赏植物育种领域很受欢迎。

秋水仙素是一种常规的、应用广泛的多倍体育种诱变剂^[8-10],它对染色体结构以及变异的影响很小^[9],同时能够在细胞分裂中期阻碍纺锤丝形成,进而中断有丝分裂的过程^[4]。然而,秋水仙素对植物材料和试验者的毒害作用是不容忽视的,寻找新型、廉价、低毒的的化学试剂或其他诱导方法替代秋水仙素是目前急需解决的问题。

大花萱草属百合科萱草属多年生宿根花卉,具有适应性强、花大艳丽等优点,具有很高的观赏价值。目前,萱草育种以杂交手段为主,受季节限制一年只能进行一次,杂交后代的繁殖量也很难迅速提升。山西省农科院园艺研究所观赏植物课题组曾采用

秋水仙素作为诱导剂,成功地获得了四倍体萱草^[11]。

本试验在先前试验的基础上,以萱草愈伤组织和不定芽为试材,氟乐灵为诱变剂,通过浸泡法和混培法探索萱草多倍体的诱导条件,旨在为萱草多倍体育种提供更多的可能性。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试材料为山西省农业科学院园艺研究所观赏植物研究室培育的萱草杂交品种 10-154(*Hemerocallis fulva* 10-154)组培苗。该品种为二倍体(2X=22)。

1.2 试验方法

选择生长健壮、带有绿色芽点、组织紧密的愈伤组织,切取边长 0.5 cm 左右的立方体小块供试;选择和分离生长健壮、长势一致的不定芽供试。将 2 种材料分别用氟乐灵溶液处理,诱导方法包括浸

收稿日期:2018-10-09

基金项目:山西省农业科学院攻关项目(YGG1604);山西省科技成果转化引导专项二批(201604D132045)

作者简介:李永平(1973-),女,山西太原人,助理研究员,主要从事观赏植物生物技术研究工作。曹冬梅为通信作者。

泡和混培 2 种。

1.2.1 浸泡法 无菌条件下,将愈伤块或不定芽浸入不同浓度(0.002%、0.006%、0.01%、0.03%)的氟乐灵溶液中,置于摇床上振荡培养,转速为 80~100 r/min,分别于 6、12、24 h 时取出材料置于无菌操作台上,用无菌蒸馏水冲洗 4 次,每次清洗 5 min,待吸水纸吸干材料表面水分后置于分化培养基上继续培养(分化培养基为 MS+6-BA 0.1 mg/L+KT 0.1 mg/L+NAA 0.05 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 5.3 g/L,培养温度为(25±2)℃,光照为 5 000 lx,光照时间为 16 h/d)。

每组处理包括愈伤组织 30 块,不定芽 40 个,重复 3 次。25 d 后分别统计愈伤组织存活率及其上芽的生长系数、不定芽的存活率和增殖系数。将成活植株转入生根培养基(1/2 MS+NAA 0.5 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 5.3 g/L)中,20 d 后统计诱变率。

1.2.2 混培法 将愈伤块或不定芽材料分别接种至添加了不同浓度(0.001%、0.004%、0.007%、0.01%)氟乐灵的培养基上,3、5、7 d 后转入不添加氟乐灵的正常分化培养基(MS+6-BA 0.1 mg/L+KT 0.1 mg/L+NAA 0.05 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 5.3 g/L)中继续培养(培养温度为(25±2)℃,光照 5 000 lx,光照时间 16 h/d)。

每组处理包括愈伤组织 30 块,不定芽 40 个,重复 3 次。25 d 后分别统计愈伤组织的存活率及其上芽的生长系数、不定芽的存活率和增殖系数。将成活植株转入生根培养基(1/2 MS+NAA 0.5 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 5.3 g/L)中,20 d 后统计诱变率。

1.3 测定项目及方法

诱导所得材料的倍性鉴定采用染色体制片法^[2]。切取再生植株的幼嫩根尖,放入对二氯苯饱和溶液中预处理 5 h,蒸馏水清洗后在 4℃ 的新鲜卡诺固定液处理 22 h,然后进行水洗,并转入 70%乙醇中备用。压片前取出备用根尖,于 60℃,1 mol/L 盐酸中解离 8 min,卡宝品红染色 15 min,常规压片, Nikon 显微镜观察、计数并照相。每处理统计 15 个细胞,以具有一致的染色体数作为该植株的染色体数目。

1.4 数据分析

采用 SPSS 22.0 进行数据统计分析,所有数据均经邓肯氏新复极差测验。

存活率 = 存活的外植体数 / 接种的外植体数 × 100% (1)

增殖系数 = 新增不定芽的数目 / 原外植体数 (2)

诱导率 = 染色体发生变异的株数(染色体数大于 22 条的株数) / (原外植体数 + 新增不定芽数) × 100% (3)

2 结果与分析

2.1 浸泡法处理对愈伤组织诱导的影响

浸泡法处理对愈伤组织诱导的影响结果表明(表 1),不同浓度的氟乐灵浸泡处理后,愈伤组织随氟乐灵浓度的增大和处理时间的延长,存活率逐渐降低,不定芽增殖系数也随氟乐灵浓度增大和处理时间的延长而呈降低的趋势。当氟乐灵浓度为 0.002% 时,愈伤组织的存活率在 50.00%~94.44%,愈伤块上不定芽的增殖系数受处理时间的影响不明显,在 1.86~2.10;当氟乐灵浓度为 0.006% 时,愈伤组织的存活率明显降低至 25.00%~66.67%,其上不定芽的增殖系数与 0.002% 处理组差异不大;当氟乐灵溶液浓度增大至 0.01%~0.03% 时,愈伤组织的存活率明显下降,0.03% 浓度处理 24 h 时,氟乐灵的毒害作用使存活率降至最低点(2.78%),同时愈伤组织分化不定芽的数量迅速减少,6 h 时芽增殖系数仅为 0.39,随着时间的延长,出芽数量降至 0。低浓度氟乐灵溶液的处理组合诱变率很低,0.002% 浓度处理组诱导率均低于 10%,随着浓度的升高和处理时间的延长,诱变率逐渐提高,0.01% 处理 12 h 的诱导率升至 22.22%;但高浓度、长时间的处理组合又使愈伤组织的不定芽分化数减少,继而导致诱变率处于低水平。最优组合需要在获得较高诱导率的同时保持较高的成活率,因此综合考虑,浸泡法诱导愈伤组织染色体加倍试验的最佳处理组合为 0.01% 氟乐灵处理 12 h,此时成活率为 41.67%,诱变率为 22.22%。

表 1 氟乐灵浸泡处理对萱草愈伤组织诱导多倍体的影响

浓度 /%	时间 /h	存活率 /%	不定芽增殖系数	诱导率 /%
0.002	6	94.44	1.86	1.75
	12	58.33	1.91	2.08
	24	50.00	2.10	9.42
0.006	6	66.67	1.88	10.47
	12	75.00	1.79	8.33
	24	25.00	2.38	13.10
0.01	6	58.33	0.98	15.56
	12	41.67	0.79	22.22
	24	16.67	0	0
0.03	6	41.67	0.39	11.11
	12	16.67	0	0
	24	2.78	0	0
CK	24	97.22	2.91	0

2.2 浸泡法处理对不定芽诱导的影响

用不同浓度氟乐灵溶液浸泡处理萱草不定芽的试验结果表明(表2),不定芽存活率随着氟乐灵浓度的增大和处理时间的延长逐渐降低。当氟乐灵的浓度为0.002%时,存活率为40.00%~66.67%,不定芽增殖系数为1.65~2.13;当氟乐灵浓度上升到0.006%时,不定芽的增殖系数为1.25~1.73,当处理时间为24 h时,存活率仅为20%;当氟乐灵浓度增至0.01%~0.03%时,氟乐灵的毒害作用显著抑制不定芽的存活率,此时存活率降至0~33.33%。低浓度氟乐灵溶液的处理组合的诱导率很低,0.002%浓度时诱导率为1.11%~8.47%,随着浓度的升高和处理时间的延长,多倍体诱导率明显提高,在0.01%的浓度处理6 h后,诱导率达到21.75%;但高浓度、时间长的处理容易降低诱导率,当氟乐灵浓度0.03%处理24 h时,其诱导率为0。综合考虑,氟乐灵浸泡诱导不定芽染色体加倍试验以0.01%处理6 h组合效果较好,此时诱导率最高,为21.75%,成活率为26.67%。

表2 氟乐灵浸泡处理对萱草不定芽增殖的影响

浓度 /%	时间 /h	存活率 /%	不定芽增殖系数	诱导率 /%
0.002	6	66.67	2.13	1.11
	12	60.00	1.91	3.81
	24	40.00	1.65	8.47
0.006	6	53.33	1.73	5.96
	12	60.00	1.42	11.06
	24	20.00	1.25	20.63
0.01	6	26.67	1.39	21.75
	12	33.33	0.73	17.78
	24	0	0	0
0.03	6	20.00	0.83	5.56
	12	2.22	0.33	0
	24	0	-1.77	0
CK	24	97.98	0	0

2.3 混培法处理对愈伤组织诱导的影响

混培法处理对萱草愈伤组织的诱导结果表明(表3),随着氟乐灵浓度的增大和处理时间的延长,萱草愈伤组织的存活率逐渐降低。当氟乐灵的浓度为0.001%时,愈伤组织的存活率在60%~80%,其上不定芽的增殖系数为1.12~1.79。此时的存活率波动幅度及其上不定芽的增殖系数波动都不大,说明较低浓度的氟乐灵对萱草愈伤组织生长状态的影响较小;当氟乐灵浓度为0.004%时,愈伤组织的存活率在50.00%~58.33%,其上不定芽的增殖系数在0.86~1.21;当氟乐灵浓度继续上升到0.007%时,混培处理7 d的存活率迅速下降到

30%,其上不定芽增殖系数也迅速减小至0.58;当氟乐灵浓度达到0.01%、混培处理7 d时,氟乐灵的毒害作用加剧,使愈伤组织的存活率降至最低26.67%,其上不定芽的增殖系数为0.60。结果显示,低浓度氟乐灵的处理组合对萱草愈伤组织的诱变作用很小,0.001%浓度处理组的诱导率仅为0~7.65%,随着浓度的升高和处理时间的延长,诱导率明显提高,0.007%浓度处理5 d的诱导率可达35.74%,同时高浓度、长时间的氟乐灵处理会导致诱导率的降低,这可能是由愈伤组织存活率低、产生不定芽的数量少导致的。综上所述,氟乐灵混培法诱导愈伤组织染色体加倍试验的最优组合为:0.007%处理5 d,此时愈伤组织成活率为50%,诱导率为35.74%。

表3 氟乐灵混培处理对萱草愈伤组织诱导的影响

浓度 /%	时间 /d	存活率 /%	不定芽增殖系数	诱导率 /%
0.001	3	80.00	1.79	0
	5	65.00	1.53	7.22
	7	60.00	1.12	7.65
0.004	3	56.67	1.21	9.72
	5	58.33	0.99	11.18
	7	50.00	0.86	19.89
0.007	3	45.00	0.85	9.72
	5	50.00	1.04	35.74
	7	30.00	0.58	16.67
0.01	3	50.00	0.78	18.89
	5	30.00	0.52	8.33
	7	26.67	0.60	13.33
CK	7	100.00	2.17	0

2.4 混培法处理对不定芽诱导的影响

试验结果表明(表4),随着氟乐灵浓度的增大和处理时间的延长,萱草的不定芽存活率逐渐降低。当氟乐灵浓度为0.001%时,存活率从3 d的87.5%下降到7 d的65.0%,不定芽的增殖系数从2.10下降到0.95;当氟乐灵浓度在0.004%时,不定芽的存活率在60.0%~72.5%,其增殖系数也呈现大幅下降的趋势;当氟乐灵浓度增大至0.007%时,不定芽的存活率为35.0%~67.5%;当氟乐灵浓度为0.01%时,不定芽存活率为35.8%~50.0%,不定芽的增殖系数为0.41~0.61。低浓度氟乐灵的诱导率很低,本试验氟乐灵浓度为0.001%~0.004%的处理组合诱导率均低于10%,随着浓度的升高和处理时间的延长,诱导率明显提高,至氟乐灵浓度0.007%、处理时间7 d时,诱导率升高至13%。较高浓度较长时间的处理组合,存活率和诱导率均处于比较低的水平,氟乐灵浓度为0.01%时,不定芽诱

导率为 3.04%~5.31%。综上所述,氟乐灵混培诱导愈伤组织染色体加倍的最佳处理浓度为 0.007%,最佳处理时间为 7 d,此条件下,不定芽成活率为 35%,诱导率为 13%。

表 4 氟乐灵混培处理对萱草不定芽增殖的影响

浓度 /%	时间 /d	存活率 /%	不定芽增殖系数	诱导率 /%
0.001	3	87.5	2.10	1.39
	5	75.0	1.84	2.23
	7	65.0	0.95	4.13
0.004	3	70.0	1.65	1.82
	5	72.5	1.13	3.81
	7	60.0	0.83	5.61
0.007	3	67.5	0.70	4.74
	5	50.0	0.49	8.50
	7	35.0	0.55	13.00
0.01	3	50.0	0.61	5.13
	5	35.8	0.44	3.25
	7	40.0	0.41	3.04
CK	7	95.0	1.23	0

3 结论与讨论

氟乐灵作为一种多倍体诱变剂,由于其毒性弱、价格低廉、诱导效果好,已在多种园艺植物上得到广泛应用。本试验中,若以愈伤组织作为外植体,萱草多倍体的诱导以氟乐灵浓度 0.007%混培处理 5 d 的效果最好,成活率可达 50%,诱导率达到 35.74%;若以不定芽作为外植体,萱草多倍体的诱导以氟乐灵浓度 0.01%浸泡处理 6 h 的诱变率最高,可达 21.75%。前人的研究表明^[13],当氟乐灵浓度为 180 $\mu\text{mol/L}$ 时,对南瓜幼嫩小苗的诱导率最高,完全可以代替诱导剂秋水仙素来诱导植株加倍。这与山西省农业科学院园艺研究所观赏植物课题组前期用秋水仙素混培处理萱草愈伤组织相比较,诱导率差异不大,但存活率明显提高,从诱导时间上来看,氟乐灵诱导多倍体所需时间明显低于秋水仙素处理时间^[11]。秋水仙素在多倍体诱导过程中易造成染色体缺失,形成嵌合体^[14-15]。因此,结合诱导率与死亡率、试验成本、对植物的伤害、周围环境、人体健康多方面考虑,氟乐灵作为萱草多倍体诱导的有效试剂更为合适。

在本试验中,采用浸泡法和混培法诱导萱草多

倍体植株,不同的诱导方法诱导率也不同。在试验过程中发现,采用氟乐灵作为诱导剂,选用混培法对外植体的伤害小,诱导率高,此结果与前人的研究结果略有不同^[16-17],这可能是由于材料不同、诱导部位不同,其还有待于进一步试验验证。

参考文献:

- [1] 张巍巍,刘富强,轩淑欣,等.四倍体黑芥的获得与鉴定[J].园艺学报,2015,42(12):2505-2511.
- [2] 王军玲,汪卫星,郭启高,等.鸡冠花离体快繁及多倍体诱导[J].分子植物育种,2008,6(1):187-192.
- [3] 郑云飞,徐维杰,廖飞雄.秋水仙素处理白掌组培苗的效应与多倍体诱导[J].现代园艺,2018(9):16-17,19.
- [4] 孙红梅,付麟岚,王志平,等.基于体细胞胚发生的细叶百合和兰州百合多倍体诱导及鉴定[J].园艺学报,2018,45(6):1136-1146.
- [5] 张虹,刘祥,虎娟,等.甜叶菊多倍体诱导[J].分子植物育种,2017,15(3):1010-1013.
- [6] 张锡庆,汪莲娟,曹钦政,等.有斑百合多倍体诱导及鉴定[J].北京林业大学学报,2017,39(7):96-102.
- [7] ABEL S, BECKER H C. The effect of autopolyploidy on biomass production in homozygous lines of *Brassica rapa* and *Brassica oleracea*[J]. Plant Breeding, 2007, 126(6):642-643.
- [8] 崔广荣,张子学,张从宇,等.文心兰多倍体诱导及其鉴定[J].草业学报,2010,19(1):184-190.
- [9] 周香君,程智慧.蒜瓣茎尖注射秋水仙素的诱变效果和诱变方法的建立[J].西北农业学报,2008,17(5):267-271.
- [10] DHOOGHE E, VAN LAERE K, EECKHAUT T, et al. Mitotic chromosome doubling of plant tissues *in vitro*[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2011, 104(3):359-373.
- [11] 武江,李丽,曹冬梅,等.萱草多倍体诱导及其鉴定[J].山西农业科学,2018,46(5):687-691,700.
- [12] 冯海生,龔全文,王海庆,等.植物染色体核型分析常用方法概述[J].贵州农业科学,2006,34(1):98-102.
- [13] 章鹏,孙守如,陈解放,等.氟乐灵诱导南瓜染色体加倍初步研究[J].河南农业大学学报,2011,45(1):42-45.
- [14] 赵巧,刘文革,郭金丽,等.除草剂在植物离体染色体加倍上的应用[J].长江蔬菜,2008(1):30-33.
- [15] 董飞,陈运起,刘世巧,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.
- [16] 崔素萍,熊丽,莫锡君,等.香石竹的多倍体诱导及其变异研究[J].西南农业大学学报(自然科学版),2004(5):609-612.
- [17] 贾美丽,王飞,贾爱平,等.秋水仙素诱导葡萄风信子多倍体的研究[J].西北农业学报,2011(1):114-118.