

# 木薯同源四倍体的离体诱导及鉴定

周慧文<sup>1,2</sup> 肖亮<sup>1,2</sup> 曾文丹<sup>1,2</sup> 严华兵<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup>广西农业科学院经济作物研究所,广西 南宁 530007;<sup>2</sup>广西作物遗传改良生物技术重点开放实验室,广西 南宁 530007)

**摘要:**为获得木薯新品种四倍体种质资源,以木薯主栽品种南植199组培苗单芽茎段为试验材料,利用秋水仙素诱导同源四倍体,统计不同浓度秋水仙素对外植体成活率和诱导效果的影响,并对二倍体与同源四倍体进行形态学、解剖学和生理生化方面的比较。结果表明,外植体成活率随秋水仙素浓度升高而降低,0.05~0.10 g·L<sup>-1</sup>是秋水仙素诱导木薯同源四倍体的适宜浓度范围。本研究获得了10个同源四倍体株系和1个嵌合体株系。与二倍体木薯相比,四倍体木薯叶片增厚,叶型变宽,保卫细胞增大,叶绿素含量增加。本研究拓宽了木薯种质资源,并为诱导鉴定木薯四倍体提供了一套高效的技术方法。

**关键词:**木薯; 同源四倍体; 秋水仙素; 鉴定

DOI: 10.11869/j.issn.100-8551.2019.04.0647

木薯(*Manihot esculenta* Grantz, 2n=36)为大戟科(Euphorbiaceae)木薯属(*Manihot*)植物,耐旱抗贫瘠,广泛种植于美洲、亚洲、非洲等地区<sup>[1]</sup>。木薯块根食用价值较高,是热带及亚热带地区的主粮之一,此外,木薯可榨取酒精和淀粉,也是重要的工业原料<sup>[2]</sup>。木薯也是我国仅有的几种重点发展生物质能源作物之一,受到了人们广泛的关注<sup>[3]</sup>。但目前木薯优质品种缺乏,良种覆盖率较低,已无法满足国内生产发展的需要,因此,选育高产稳产的特色优质品种至关重要<sup>[2]</sup>。

多倍体育种是改善植物性状和选育经济性状优良新品种的有效方法之一<sup>[4]</sup>。植物多倍化后在表型、生理生化等方面会发生改变,如叶片增厚,花冠、叶色等色泽加深,花冠、果实等器官呈现“巨大性”<sup>[5]</sup>,植株生长旺盛、抗逆性增强等<sup>[6]</sup>。目前已有利用多倍体育种手段进行木薯育种的研究报道,如Sree Harsha三倍体木薯块根产量更高,淀粉含量增多,适应性增强,并于1996年在印度通过了品种审定,但三倍体木薯的获得需经大田杂交工作,较为费时费力<sup>[7]</sup>;黄慧德<sup>[8]</sup>研究发现6068四倍体木薯植株的抗病性、长势、淀粉和总糖含量均高于二倍体,但

报道中未详细介绍获得6068木薯四倍体的具体方法。此外,也有利用秋水仙素加倍木薯的研究报道<sup>[9-11]</sup>,但均仅对诱导鉴定技术进行探讨,未对同源四倍体木薯进行系统的鉴定比较。

本研究以秋水仙素作为诱导木薯四倍体的化学诱变剂,并结合组织培养技术进行木薯优良品种南植199的四倍体资源创制,并对四倍体及其二倍体亲本进行形态学、解剖学和生理生化方面的比较,系统地研究多倍化对木薯的影响,以期对木薯四倍体育种和挖掘木薯优质种质资源提供技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

木薯品种南植199由广西农业科学院经济作物研究所提供,并以组织培养技术获得的无菌健康组培苗为试验材料。

### 1.2 方法

1.2.1 木薯同源四倍体离体诱导 在超净工作台上将木薯组培苗剪切成长度约1.5 cm,带单个腋芽的茎段(以下简称单芽茎段),将单芽茎段浸泡于含有液体

收稿日期: 2017-11-27 接受日期: 2018-02-02

基金项目: 广西壮族自治区“亚热带作物分子育种”八桂学者专项经费[桂人才通字(2011)4号], 2016年广西作物遗传改良生物技术重点开放实验室建设项目(16-380-64), 广西农业科学院基本科研业务专项团队项目(桂农科2015YT61)

作者简介: 周慧文,女,研究实习员,主要从事木薯生物技术育种研究。E-mail: 164862154@qq.com

\* 通讯作者: 严华兵,男,研究员,主要从事木薯生物技术育种与良种繁育技术研究。E-mail: h.b.yan@hotmail.com

MS培养基的不同浓度的秋水仙素溶液中,秋水仙素溶液浓度分别为0(CK)、0.05、0.1、0.25、0.5、0.75  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。每个浓度设3次重复,每个重复接种5瓶。将浸泡于秋水仙素溶液中的单芽茎段放置于振荡仪上避光震荡培养( $90\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $27^{\circ}\text{C}$ )。48 h后将单芽茎段取出,用无菌水冲洗3遍,滤纸吸干水分,接种至MS+0.05  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA+0.02  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA+20  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  蔗糖+6.3  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  琼脂的继代培养基上培养。培养条件为温度 $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,光照强度2000 lx,光周期为光照12 h光照/12 h黑暗。45 d后统计各个浓度下的木薯茎段存活率。

$$\text{存活率} = \text{存活茎段数} / \text{接种数} \times 100\% \quad (1)$$

1.2.2 株系倍性鉴定 通过形态学初步观察,筛选具有四倍体形态学特性的植株株系,参照张俊娥等<sup>[12]</sup>的方法进行倍性检测。以木薯品种南植199二倍体为对照,取待测株系幼嫩叶片0.1 g置于培养皿中,加入400  $\mu\text{L}$  细胞裂解液(Partec HR-A)并用刀片切碎叶片,静置30 s后将培养皿中的液体用30  $\mu\text{m}$  滤网过滤至样品管中。向样品管加入1600  $\mu\text{L}$  DNA染色液(Partec HR-B),染色30 s。最后用Ploidy Analyser-I流式细胞仪(Partec,德国)检测具有四倍体形态学特性的植株株系倍性。

1.2.3 二倍体与四倍体植株形态观察与比较 将鉴定为四倍体的木薯组培苗与二倍体对照接种至生根培养基(配方为MS+0.02  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA+35  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  蔗糖+6.3  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  琼脂)中。待组培苗在培养基中生长30 d后,将四倍体和二倍体组培苗炼苗移栽至大棚中,生长60 d后观察不同倍性植株形态差异,然后将植株转移至大田,观察不同倍性植株大田中生长150 d后的形态。

选取二倍体与四倍体木薯植株成熟叶片,将叶片下表皮朝上放置。用镊子撕取叶片下表皮置于载玻片上,滴1滴0.5%碘-碘化钾溶液染色30~60 s,然后覆上盖玻片,采用Olympus BH-2型4×40×物镜光学显微镜(Olympus,日本)观察并拍照,测量保卫细胞长、宽,对保卫细胞内叶绿体数目进行计数,并对一个视野内保卫细胞个数进行计数。每个倍性统计5株,每株观察测量30个保卫细胞。

采用常规石蜡切片方法观察木薯二倍体及同源四倍体的叶片横截面,具体操作步骤参照周慧文<sup>[13]</sup>的方法。切片经番红染色,中性树胶封片后,采用Olympus BH-2型4×10×物镜光学显微镜观察并拍照,测量叶片横截面、栅栏组织和海绵组织厚度。每个倍性统计5株,每株观察测量3个横截面。

叶绿素含量测定采用95%乙醇直接提取法<sup>[14]</sup>,每个倍性测量来源于不同植株的5片叶片。

### 1.3 数据分析

采用Microsoft Excel 2007和SPSS 18.0软件对数据进行统计和差异显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 木薯四倍体诱导和鉴定结果

由表1可知,随着秋水仙素浓度的升高,木薯单芽茎段的存活率降低。未经秋水仙素浸泡的单芽茎段(CK)存活率为100%;当秋水仙素浓度为0.25  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,单芽茎段存活率仅为1.11%;浓度升至0.5  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,单芽茎段存活率为0。死亡的单芽茎段腋芽处有褐化现象发生,说明秋水仙素对木薯植株有强烈的毒害作用。

表1 不同浓度秋水仙素对木薯品种南植199组培苗腋芽茎段的诱导效应

Table 1 Effects of different colchicine concentration on the stem with buds of cassava (cv. Nanzhi 199)

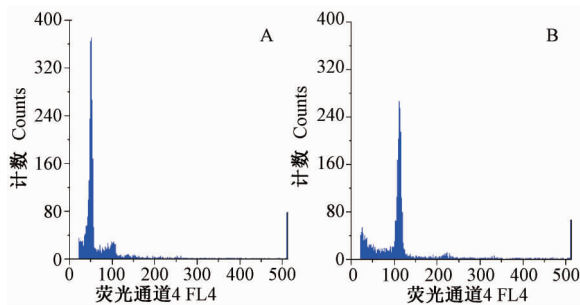
秋水仙素浓度 Colchicine concentration/( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	接种单芽茎段数量 Number of explants/个	存活数 Survival explants/个	存活率 Survival rate/%
0(CK)	30	30.00	100.00±0a
0.05	30	20.67	68.89±5.09b
0.10	30	8.33	27.78±3.85c
0.25	30	0.33	1.11±1.92d
0.50	30	0	0d
0.75	30	0	0d

注:同列不同小写字母表示在0.05水平上差异显著。下同。

Note: Different lowercase letters in the same line mean significant difference at 0.05 level. The same as following.

由图 1 可知,以二倍体木薯材料的 DNA 含量为参照,四倍体木薯的 DNA 含量峰值出现在 100 的位置,而二倍体木薯 DNA 含量峰值出现在 50 的位置;说明四倍体木薯的 DNA 含量为二倍体的 2 倍,即可证明被鉴定植株材料为二倍体。

本试验先筛选出带有四倍体特征的组培苗株系,然后通过组织培养技术进行连续继代。继代 4 次后,通过初步形态观察,筛选出 14 个疑似四倍体的不同株系的组培苗,其中有 11 个株系经鉴定发生了倍性突变,其中有 10 个株系被鉴定为同源四倍体,有 1 个株系为嵌合体,即纯合同源四倍体占变异株系的 90.90%,突变株系占被检测株系的 78.57%,占 87 个存活株系的 12.51%,即整体的突变率为 12.51%。本次诱导的变异株系大部分为纯合四倍体,只有 1 个嵌合体株系,表明利用组织培养技术连续对疑似变异植株进行切割腋芽分离,可以将变异植株的倍性进行纯化,从而分离出较多的纯合同源四倍体。



注: A: 二倍体; B: 四倍体。

Note: A: Diploid. B: Tetraploid.

图 1 流式细胞仪鉴定木薯倍性结果

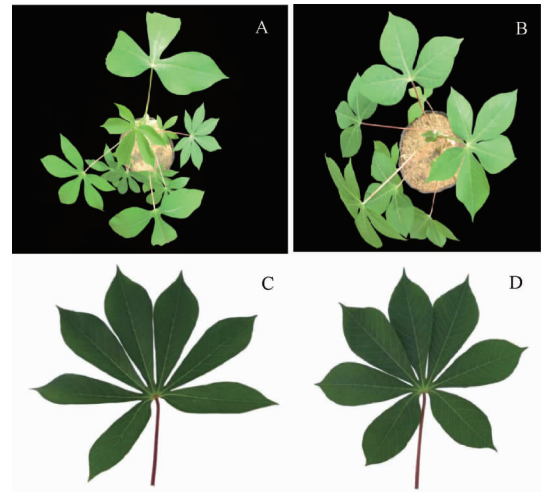
Fig.1 The results of detecting ploidy-level of cassava by FCM

## 2.2 木薯二倍体与四倍体形态差异观察

由图 2 可知,四倍体植株叶片增厚,颜色加深,叶片形态较宽较圆,叶脉明显,茎秆节间距变短。此外,四倍体植株生长缓慢,较二倍体植株更矮。

## 2.3 木薯二倍体与四倍体叶片解剖结果比较

木薯同源四倍体的保卫细胞形态与二倍体的形态差异较大,四倍体的保卫细胞较二倍体显著增大(图 3-A、B),且四倍体的保卫细胞长、保卫细胞宽和叶绿体数目分别较二倍体显著增加了 38.34%、40.40% 和 73.89%,四倍体的气孔密度较二倍体显著降低 38.91%;四倍体叶片厚度、栅栏组织厚度和海绵组织厚度分别较二倍体增加了 48.38%、62.69% 和 35.70%。叶片横截面观察结果表明(图 3-C、D),染色



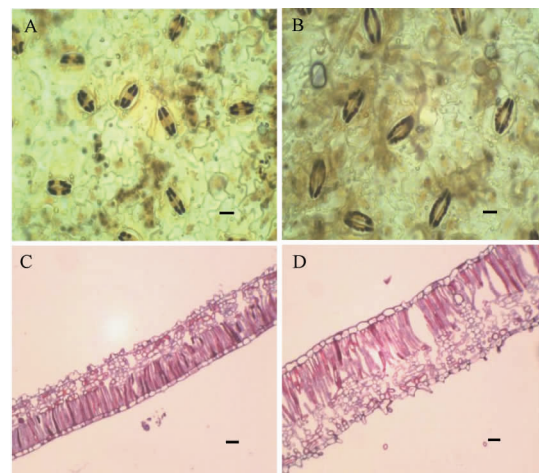
注: A: 二倍体移栽苗; B: 四倍体移栽苗; C: 二倍体叶片; D: 四倍体叶片。

Note: A: Transplants morphology of cassava diploid. B: Transplants morphology of cassava tetraploid. C: Leaf morphology of cassava diploid. D: Leaf morphology of cassava tetraploid.

图 2 木薯二倍体与四倍体的移栽苗形态与叶片形态

Fig.2 Leaf morphology and transplants morphology of the original diploid and tetraploid cassava

体加倍后植株叶厚也相应增加,且四倍体栅栏组织与海绵组织厚度之比高于二倍体(表 2)。



注: A: 二倍体保卫细胞; B: 四倍体保卫细胞; C: 二倍体叶片横截面; D: 四倍体叶片横截面。比例尺=30 μm。

Note: A: The guard cell of diploid. B: The guard cell of tetraploid. C: The transverse sections of the diploid leaves. D: The transverse sections of the tetraploid leaves. Bar=30 μm.

图 3 木薯二倍体与四倍体的叶片解剖形态  
Fig.3 The leave anatomical morphology of cassava diploid and tetraploid

表 2 木薯二倍体与四倍体叶片解剖结果

Table 2 The result of leaf anatomy of cassava diploid and tetraploid

倍性 Ploidy-level	保卫细胞 Guard cells			叶片横截面 Transverse sections of leaves				
	保卫细胞长 Length of guard cells/ $\mu\text{m}$	保卫细胞宽 Width of guard cells/30 $\mu\text{m}$	叶绿体数目/ 保卫细胞 Number of chloroplasts /guard cell	气孔密度 Stomata density	栅栏组织厚度 Palisade tissue/ $\mu\text{m}$	海绵组织厚度 Spongy tissue/ $\mu\text{m}$	叶厚 Leaf thickness / $\mu\text{m}$	栅栏组织厚度/ 海绵组织厚度 The ratio of palisade tissue and spongy tissue
2X	18.36 $\pm$ 0.50b	4.85 $\pm$ 0.16b	4.75 $\pm$ 0.04b	9.92 $\pm$ 1.23a	62.74 $\pm$ 3.31b	49.47 $\pm$ 5.56b	128.44 $\pm$ 5.91b	1.23 $\pm$ 0.12b
4X	25.40 $\pm$ 0.33a	6.81 $\pm$ 0.61a	8.26 $\pm$ 0.12a	6.06 $\pm$ 0.75b	102.07 $\pm$ 8.83a	67.13 $\pm$ 13.89a	189.30 $\pm$ 29.42a	1.53 $\pm$ 0.18a

## 2.4 木薯二倍体与四倍体叶绿素含量比较

由表 3 可知,木薯四倍体植株叶绿素含量较二倍体显著增加。木薯四倍体植株的叶绿素 a、叶绿素 b

和总叶绿素含量分别较二倍体植株显著增加了 19.73%、16.04%和 18.90%。

表 3 木薯二倍体与四倍体叶绿素含量比较

Table 3 The comparison of the content of chlorophyll between the diploid and tetraploid cassava /( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ )

倍性 Ploidy-level	叶绿素 a 含量 Chlorophyll a content	叶绿素 b 含量 Chlorophyll b content	总叶绿素含量 Total chlorophyll content
2X	2.99 $\pm$ 0.13b	0.81 $\pm$ 0.02b	3.81 $\pm$ 0.15b
4X	3.58 $\pm$ 0.14a	0.94 $\pm$ 0.06a	4.53 $\pm$ 0.25a

## 3 讨论

本研究结果表明,当秋水仙素浓度为 0.05~0.10  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,木薯外植体存活率较高,当浓度高于 0.10  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,木薯外植体的存活率降低,表明高浓度秋水仙素对木薯植株有较强的毒害作用,这与 Zhou 等<sup>[9]</sup>和张健<sup>[10]</sup>的结果一致,因此 0.05~0.10  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 可作为离体诱导木薯四倍体的适宜浓度范围。聂扬眉等<sup>[11]</sup>利用秋水仙素离体诱导南植 199 四倍体,倍性鉴定结果表明嵌合体与二倍体较多,但仅获得了 3 株同源四倍体植株,推测其原因可能是未经组织切割分离嵌合体即进行倍性鉴定。本研究利用组织培养技术继代分离 4 次木薯变异植株,通过形态观察筛选出形态疑似突变体的组培苗后再进行流式细胞仪鉴定,这样不仅提高了纯合四倍体数量,还减少了检测植株样本数,极大降低了流式细胞仪鉴定倍性的成本。

目前最为精准的倍性鉴定方法为染色体计数法,但该方法较为费时费力<sup>[15]</sup>。应用流式细胞仪虽然可以在短时间内大规模检测样品倍性<sup>[16]</sup>,但流式细胞仪价格较贵,鉴定成本过高。大量研究表明,倍性的差异可以导致气孔尺寸、密度和保卫细胞叶绿体数目的显

著差异<sup>[17-22]</sup>。因此,专家学者通过保卫细胞性状鉴定杨树<sup>[23]</sup>、何首乌<sup>[24]</sup>和燕麦<sup>[25]</sup>倍性,该方法较为简便、快捷、准确率可靠,且允许在植株苗期时鉴定倍性<sup>[15]</sup>。本研究结果也发现,木薯四倍体与二倍体保卫细胞形态差异较大,叶绿体数目也有显著差别,这为今后利用保卫细胞性状鉴定木薯倍性提供了技术参考。

前人研究表明,植物多倍化后与亲本表型有较大差异,如苦荞同源四倍体在叶片数、花冠数、种子数等方面均较二倍体增加<sup>[26]</sup>。同源四倍体胡杨<sup>[27]</sup>、黄毛草莓<sup>[28]</sup>叶片较二倍体增大增厚、颜色加深。本研究中,经秋水仙素诱导产生的南植 199 同源四倍体木薯同样产生了显著的表型变异,如叶片变圆、叶色深绿、叶片加厚等现象,推测原因可能是因为基因组加倍后受基因“剂量效应”的影响<sup>[29]</sup>。

除了表型会受基因“剂量效应”的影响,生理生化指标也会受到不同程度的影响,如同源四倍体亚麻种的鬼臼毒素含量较二倍体有所增加,因为染色体加倍后,与生物合成的路径的相关基因和酶表达上调<sup>[30]</sup>;紫雏菊四倍体株系的菊苷酸含量较二倍体高,生物学产量也有所增加<sup>[31]</sup>。木薯品种华南 8 号的同源四倍体与其二倍体亲本相比,参与碳代谢及能量代谢、光合作用等途径的相关蛋白质的表达水平有所上调<sup>[32]</sup>。

而八倍体黑果枸杞叶片叶绿素含量显著低于二倍体和四倍体<sup>[33]</sup>。本研究中同源四倍体木薯的叶绿素含量均高于二倍体,原因可能是“剂量效应”在高倍性植株上表现不明显,而较多的染色体组易发生功能紊乱、代谢失调的现象<sup>[33]</sup>。在今后的研究中应充分研究基因“剂量效应”对木薯四倍体的影响,挖掘四倍体木薯优良性状,为木薯多倍体育种提供物质基础和理论基础。

## 4 结论

本研究结果表明,秋水仙素离体诱导木薯南植 199 的适宜浓度为 0.05~0.10 g·L<sup>-1</sup>,经诱导共获得了 10 个同源四倍体株系和 1 个嵌合体株系。与二倍体木薯相比,四倍体木薯表型发生较大变化,如叶片增厚,叶型变宽变圆。解剖结果表明,四倍体的保卫细胞较二倍体显著增大,内含叶绿体数目增加,叶片增厚。四倍体的叶绿素 a、叶绿素 b 和总叶绿素含量较二倍体也有所增加。本研究成功创制了木薯同源四倍体,丰富了木薯种质资源,为木薯多倍体育种提供了一定的技术支撑和理论依据。

### 参考文献:

- [1] El-Sharkawy M A. Cassava biology and physiology [J]. *Plant Molecular Biology*, 2004, 56(4): 481-501
- [2] 严华兵,叶剑秋,李开绵. 中国木薯育种研究进展[J]. *中国农学通报*, 2015, 31(15): 63-70
- [3] 凡杰. 木薯多倍体的倍性鉴定及蛋白组学研究[D]. 海口: 海南大学, 2012
- [4] Bagheri M, Mansouri H. Effect of induced polyploidy on somebiochemical parameters in *Cannabis sativa* L. [J]. *Applied Biochemistry & Biotechnology*, 2015, 175(5): 2366-237
- [5] 周慧文,冯斗,严华兵. 秋水仙素离体诱导多倍体研究进展[J]. *核农学报*, 2015, 29(7): 1307-1315
- [6] 石庆华,刘平,刘孟军. 果树倍性育种研究进展[J]. *园艺学报*, 2012, 39(9): 1639-1654
- [7] Sreekumari M T, Jos J S, Nair S G. 'Sree Harsha': a superior triploid hybrid in cassava [J]. *Euphytica*, 1999, 106(1): 1-6
- [8] 黄慧德. 木薯多倍体突变体新品种[J]. *中国农学通报*, 1985(5): 20
- [9] Zhou H W, Zeng W D, Yan H B. *In vitro* induction of tetraploids in cassavavariety 'Xinxuan 048' using colchicine [J]. *Plant Cell and Organ Culture*, 2017, 128(3): 723-729
- [10] 张健. 木薯离体培养诱导多倍体育种技术研究[D]. 海口: 海南大学, 2012
- [11] 聂扬眉,文峰,郭文武. 秋水仙素诱导获得 5 个木薯品种的同源四倍体植株[J]. *华中农业大学学报*, 2013, 32(6): 8-12
- [12] 张俊娥,刘继红,邓秀新. 采用倍性分析仪鉴定柑橘愈伤组织的遗传变异[J]. *遗传学报*, 2003, 30(2): 169-174
- [13] 周慧文. 木薯四倍体离体诱导与诱变材料评价研究[D]. 南宁: 广西大学, 2016
- [14] 孔祥生. 植物生理学实验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2008
- [15] Guo L Q, Xu W T, Zhang Y, Zhang J F, Wei Z H. Inducing triploids and tetraploids with high temperatures in *Populus sect. Tacamahaca* [J]. *Plant Cell Reports*, 2017, 36(2): 313-326
- [16] Leus L, Van Laere K, Dewitte A, Van Huylenbroeck J. Flow cytometry for plant breeding [J]. *Acta Horticulturae*, 2009, 836(836): 221-226
- [17] 邵冰洁,万思琦,刘江森,许建新,赵惠恩. 黑果枸杞和宁夏枸杞的多倍体诱导和鉴定[J]. *分子植物育种*, 2018, 16(8): 2593-2599
- [18] 张源源,郭涵,袁红章,王祥军,黄肖,李媛,李维国. 橡胶树不同倍性的气孔性状差异研究[J]. *热带作物学报*, 2017, 38(3): 389-394
- [19] 熊梅,伊风艳,石凤翎,高霞,高翠萍. 苜蓿花培植株倍性的初步鉴定[J]. *种子*, 2015, 34(5): 13-16
- [20] 谢利,刘芳,易懋升,曾瑞珍,夏晴,黎杨辉,张志胜. 蝴蝶兰倍性与叶部和花部性状的相关性[J]. *华南农业大学学报*, 2014, 35(5): 82-87
- [21] 马艳芝,客绍英. 菘蓝四倍体株系细胞形态学和流式细胞术鉴定[J]. *中药材*, 2014, 37(5): 736-740
- [22] 卢璇. 非洲菊组织培养及未受精胚珠苗的倍性鉴定[D]. 广州: 华南农业大学, 2016
- [23] Wang J, Shi L, Song S Y, Tian J, Kang X Y. Tetraploid production through zygotic chromosome doubling in *Populus* [J]. *Silva Fennica*, 2013, 47(2): 1-12
- [24] 姚焱,李岩松,王艺霖,黎雨芯,赵树进, Yan Cui-jun. 利用何首乌叶片气孔保卫细胞叶绿体数目鉴定植株倍性[J]. *中药材*, 2014, 37(6): 939-942
- [25] 闫艳华,杜京旗,高晓丽,李毛毛. 燕麦不同品种染色体倍性的检测[J]. *种子*, 2017, 36(6): 42-44
- [26] Wang L J, Sheng M Y, Wen P C, Du J Y. Morphological, physiological, cytological and phytochemical studies in diploid and colchicine induced tetraploid plants of *Fagopyrum tataricum* (L.) [J]. *Botanical Studies*, 2017, 58(2): 1-12
- [27] Xu C P, Huang Z, Liao T, Li Y, Kang X Y. *In vitro* tetraploid plants regeneration from leaf explants of multiple genotypes in *Populus* [J]. *Plant Cell and Organ Culture*, 2016, 125(1): 1-9
- [28] 刘玲,葛春峰,王涛,陈孟龙,乔玉山. 黄毛草莓叶片离体再生及其同源四倍体的诱导[J]. *核农学报*, 2017, 31(1): 51-58
- [29] 邱芬,辛亚龙,唐军荣,李斌,何承忠,许程,辛培尧. 不同倍性滇杨叶片解剖结构差异分析[J]. *中南林业科技大学学报*, 2017, 37(6): 56-59, 69
- [30] Javadian N, Karimzadeh G, Sharifi M, Moieni A, Behmanesh M. *In vitro* polyploidy induction: changes in morphology, podophyllotoxin biosynthesis, and expression of the related genes in *Linum album* (Linaceae) [J]. *Planta*, 2017, 245(6): 1165-1178
- [31] Chen R, Jiang W Z, Li Q L, Li X L, Chen X L, Yang Y S, Wu H. Comparison of seven colchicine-induced tetraploid clones with their original diploid clones in purple coneflower (*Echinacea purpurea* L.)

- [J]. *Euphytica*, 2016, 207(2): 387-399
- [32] 安飞飞, 凡杰, 李庚虎, 简纯平, 李开绵. 华南8号木薯及其四倍体诱导株系叶片蛋白质组及叶绿素荧光差异分析[J]. 中国农业科学, 2013, 46(19): 3978-3987
- [33] 张虹, 龙宏周, 路国栋, 陈任. 黑果枸杞多倍体诱导及鉴定[J]. 核农学报, 2017, 31(1): 59-65

## ***In Vitro* Induction and Identification of Autotetraploid Cassava**

ZHOU Huiwen<sup>1,2</sup> XIAO Liang<sup>1,2</sup> ZENG Wendan<sup>1,2</sup> YAN Huabing<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup> *Cash Crops Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning, Guangxi 530007;*

<sup>2</sup> *Guangxi Crop Genetic Improvement and Biotechnology Key Lab, Nanning, Guangxi 530007)*

**Abstract:** To obtain the tetraploid germplasm resources of cassava new variety, *in vitro* single-node axillary buds of cassava (cv. Nanzhi 199) were taken as explants to induced the autotetraploid. The effects of various concentration of colchicine on the survival rate and variation rate were investigated and the morphological characters, anatomical characters and chlorophyll content of normal and variant plants were also analyzed. The results showed that the survival rate of explants decreased with the increase of colchicine concentrations. Concentration range of 0.05~0.1 g·L<sup>-1</sup> was suitable for inducing autotetraploid cassava. Identification of ploidy levels by flow cytometry (FCM) showed that 10 autotetraploid and one chimeras were obtained. Compared to the original diploid plants, the tetraploid plants showed significantly difference in color, thickness and surface of leaves. Moreover, the tetraploid plants had bigger guard cells and higher chlorophyll content.

**Keywords:** *Manihot esculenta* Grantz, autotetraploid, colchicine, identification