

秋水仙素诱导马铃薯野生种 *S.acaule* 多倍体的初步研究

张艳萍 蒲秀琴

(青海省农林科学院 / 教育部青藏高原生物技术重点实验室, 西宁 810016)

摘要: 马铃薯野生种需通过人工诱导染色体加倍后才能与栽培种进行杂交。本试验以马铃薯野生种 *S.acaule* 无菌苗带腋芽茎段为材料, 采用浸泡法和混合培养法研究了秋水仙素诱导马铃薯野生种 *S.acaule* 产生多倍体的诱导效果。结果表明: 在继代增殖培养基中添加浓度为 0.3% 的秋水仙素, 共同培养时间为 14d 时获得诱导变异率最大, 为 31.6%; 获得的 87 株变异株有 2 株为多倍体植株。

关键词: 马铃薯野生种 *S.acaule*; 秋水仙素; 茎段; 多倍体

种质资源是作物遗传改良的基础, 马铃薯在其起源中心有着丰富的野生种和马铃薯原始栽培种, 是改良现有品种的宝贵资源。马铃薯野生种因其长期生长在野外, 对不良环境具有较强的适应能力和抵御能力, 含有多种逆境抗性基因, 具有优良的抗病虫害能力, 对病毒病有较高抗性甚或免疫^[1]; 许多野生种具有普通栽培种缺乏的优良品质性状^[2-4]。野生马铃薯特异性状的发掘和研究, 对于从中获得优良品质性状和抗性基因, 持续改良现有栽培种具有十分重要的意义。

马铃薯野生种因大部分为二倍体种而很难与为四倍体的普通栽培种进行杂交, 要解决这一障碍, 一种方法是诱导普通栽培种产生双单倍体, 另一种方法是通过人工诱导而使野生种染色体加倍, 从而可以与普通栽培种进行杂交。利用秋水仙素加倍马铃薯染色体的方法, 常用的是幼芽液滴涂抹法^[5], 而建立在完整的植物再生体系基础上的离体诱导具有诱导环境更容易控制, 试验结果易于重复的优势, 而且试验所得到的多倍体植株更易于筛选和保存。雷家军等^[6]用不同浓度的秋水仙素处理组培苗的茎尖, 建立了草莓茎尖加倍的技术体系; 杨丽娟等^[7]在离体培养条件下, 以大花蕙兰原球茎为材料, 利用秋水仙素诱导大花蕙兰产生多倍体。

马铃薯野生种 *S.acaule* (无茎薯) 是改良马铃薯耐冻性的重要基因资源^[8], 原产于南美, 为四倍体种, 但其胚乳平衡数为 2, 只能与二倍体种杂交, 与

栽培种杂交时必须先将染色体加倍。本试验以马铃薯野生种 *S.acaule* 无菌苗带腋芽茎段为诱导材料, 就秋水仙素诱导浓度及处理时间对多倍体诱导结果加以分析, 以期建立秋水仙素诱导马铃薯茎段染色体加倍的离体诱导体系, 为野生马铃薯资源的充分利用创造条件。

1 材料与方法

1.1 试验材料 马铃薯野生种 *S.acaule* 扩繁 20d 后幼苗带腋芽茎段, 诱导培养基为马铃薯茎段扦插扩繁培养基, 光照强度 2000Lx, 光照时长 16h/d, 温度 20~25℃。

1.2 试验方法

1.2.1 浸泡法 将野生种 *S.acaule* 带腋芽茎段转移到已灭菌处理, 浓度分别为 0.1%、0.3% 和 0.5% 的秋水仙素溶液中, 浸泡 12h、24h 和 36h, 以无菌水为对照, 共 10 个处理, 每个处理 20 株, 3 次重复。处理后用无菌水清洗, 接种到扩繁培养基上, 光照培养。20d 后观察茎段生根成苗情况, 统计存活率; 待根长约 1.5cm 时取根尖进行倍性鉴定, 计算变异率。

1.2.2 混合培养法 将野生种 *S.acaule* 带腋芽茎段转接到分别添加了 0.1%、0.3% 和 0.5% 的秋水仙素溶液的继代培养基上, 培养 7d、14d 和 21d, 以普通继代培养基为对照, 共 10 个处理, 每个处理 20 株, 3 次重复。处理后转入普通继代培养基继续培养。20d 后观察茎段生根成苗情况, 统计存活率; 待根长约 1.5cm 时取根尖进行倍性鉴定, 计算变异率。

1.2.3 染色体倍性鉴定 采用根尖细胞染色镜检的方法, 剪取诱导生成的组培苗幼嫩根尖 0.3~0.5cm,

用 0.002mol/L 的 8- 羟基喹啉预处理 3h ;将预处理后的材料用清水洗 2 遍,然后放入卡诺氏固定液(无水乙醇:冰乙酸=3:1)中,4℃下固定 24h ;弃去固定液,将根尖置于 60℃恒温水浴中,用 1mol/L 盐酸酸解 10min,然后用蒸馏水洗 3 次;制片前用 45% 醋酸软化根尖 1min 左右,用改良碳酸品红染色 5min 后进行压片,镜检。

2 结果与分析

2.1 秋水仙素浓度及处理时间对马铃薯野生种茎段多倍体诱导的影响

2.1.1 浸泡法 从表 1 可以看出,诱导茎段在不同浓度秋水仙素溶液中浸泡规定时间后转入继代培养基,都有一定比例茎段发根成苗。随着秋水仙素浓度的增加和处理时间的延长,存活率呈降低趋势,但变异率呈先增大后减小趋势。在秋水仙素浓度为 0.3%、浸泡 36h 时茎段的变异率最高,为 15.0% ;在秋水仙素浓度为 0.1% 时,浸泡 12h 与 24h 变异率均为 0。

表 1 秋水仙素溶液浸泡对茎段诱导加倍的效果

处理浓度 (%)	处理时间 (h)	处理茎段数 (株)	存活数 (株)	存活率 (%)	变异数 (株)	变异率 (%)
0	0	60	60	100	0	0
0.1%	12	60	58	96.7	0	0
	24	60	56	93.3	0	0
	36	60	53	88.3	1	1.7
0.3%	12	60	48	80.0	1	1.7
	24	60	43	71.7	5	8.3
	36	60	40	66.7	9	15.0
0.5%	12	60	44	73.3	7	11.7
	24	60	38	63.3	7	11.7
	36	60	35	58.3	4	6.7

经秋水仙素浸泡的带腋芽茎段在转入继代培养基后生长较对照缓慢,大约 15d 后才开始生根,浸泡浓度越高,生长越缓慢。可见,秋水仙素对茎段存在一定的毒害作用,且浓度越高、处理时间越长毒害作用越大,对腋芽的发根成苗具有一定的抑制作用。

2.1.2 混合培养法 从表 2 可看出,在继代培养基中添加不同浓度的秋水仙素溶液共同培养,随着秋水仙素浓度的增加和共同培养时间的延长,存活率呈下降趋势;但变异率呈现先增大后减小趋势,并在秋水仙素浓度为 0.3%、共培养时间为 14d 时变异率最大为 31.6%。当秋水仙素浓度为 0.5% 时,随着培

养时间的延长,存活率明显降低,变异率也在降低。由此可见,要想获得较高的变异率必须是适宜的秋水仙素浓度与处理时间结合起来。

表 2 秋水仙素溶液混合培养对茎段诱导加倍的效果

处理浓度 (%)	处理时间 (d)	处理茎段数 (株)	存活数 (株)	存活率 (%)	变异数 (株)	变异率 (%)
0	0	60	60	100	0	0
0.1%	7	60	57	95.0	0	0
	14	60	54	90.0	0	0
	21	60	51	85.0	2	3.3
0.3%	7	60	46	76.7	6	10.0
	14	60	38	63.3	19	31.6
	21	60	30	50.0	13	21.7
0.5%	7	60	13	21.7	7	11.7
	14	60	9	15.0	5	8.3
	21	60	5	8.3	2	3.3

混合培养法中茎段处理后转入继代培养基成苗存活率较浸泡法低,表明在继代培养基中添加秋水仙素共同培养对茎段的毒害作用较浸泡法大,但变异率较浸泡法的高。

2.2 多倍体鉴定 形态鉴定初步筛选组培苗叶片变厚、茎变粗、节间变短的植株为变异株,单株切取带腋芽茎段转入继代培养基 25d 后进行染色体鉴定,分别切取四倍体野生种 *S.acaule* 和形态鉴定为变异株的根尖 2~3mm 进行染色体制片,并在荧光显微镜下镜检。观察显示,四倍体的染色体数目为 $2n=4x=48$,变异株染色体观察中发现,大部分变异株为嵌合体,即细胞中既有四倍体细胞,也有六倍体细胞,还有八倍体细胞,87 株变异株通过镜检获得 2 株八倍体植株。

3 结论与讨论

秋水仙素的作用是抑制细胞分裂中期纺锤丝的合成,染色体虽然纵裂,但细胞不分裂,不能形成 2 个子细胞,因而使染色体加倍。自 1937 年 A.F.Blakeslee 等人利用秋水仙素处理曼陀罗获得多倍体后,秋水仙素就被公认为是最好的诱导植物多倍体的化学药剂^[9],广泛应用于细胞学、遗传学和植物育种的工作。但秋水仙素对外植体的毒害作用大,并与处理浓度和处理时间成正比,过高的浓度反而会降低诱导变异率。在试验中获得的变异植株在继代增殖过程中也有白化死亡现象发生。

甘蓝型冬油菜在甘肃中东部干旱山区适应性研究

张建学 王亚宏 范提平 裴国平 张亚宏 雷建明

(甘肃省天水市农业科学研究所, 天水 741001)

摘要:为筛选适宜甘肃省天水干旱山区种植的甘蓝型冬油菜品种,2017年在水市秦州区中梁镇选择天油 2266、天油 2255、HY24、HY25、HY26、甘杂 1 号 6 个甘蓝型油菜品种(系)进行了适应性试验研究。结果表明:天油 2255、天油 2266 和甘杂 1 号 3 个品种抗寒性较强,越冬率都在 90% 以上,每 667m² 产量分别为 318.38kg、290.81kg 和 284.59kg,可在水干旱地区大面积推广种植;而 HY25、HY24、HY26 等 3 个品系越冬率分别只有 62.2%、60.5% 和 48.8%,抗寒性较差,产量较低,效益差,不建议在本地区种植。

关键词:甘蓝型油菜;冬油菜;干旱山区;丰产性;适应性

冬油菜是甘肃省主要的油料作物,年播种面积 10 多万 hm²,约占全省油料作物总面积的 1/3,在当地农业生产和经济发展中具有重要作用^[1-2]。甘肃省冬油菜区分布在中东部地区,主要以白菜型油菜为主,该类型油菜抗冻耐旱、丰产稳产、抗病,但与甘蓝型油菜相比产量低、品质差^[3-5]。因此,为提高当地油菜产量,增加农民收入,特开展了强冬性甘蓝型

冬油菜品种的选育研究,经过多年努力,成功选育出天油 9 号、天油 0510 和 200383 等甘蓝型冬油菜品种(系),这些品种(系)表现为抗寒、丰产,取得了较好的社会效益。通过对不同甘蓝型冬油菜品种在甘肃天水干旱山区适应性试验研究,筛选出适宜该地区种植的强冬性甘蓝型油菜品种,提高产量,改善品质,为当地甘蓝型冬油菜品种的更新换代提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料和地点 参试材料:天油 2266、天油

基金项目:陇东南强冬性优质甘蓝型油菜新品种选育及示范 (1604NKCA066)

本试验中以马铃薯野生种 *S.acaule* 无菌苗带腋芽茎段为诱导材料,采用秋水仙素溶液浸泡法和混合培养法 2 种处理方式均可获得倍性变异植株,同一浓度时,混合培养法较浸泡法能获得较高的变异率。在诱导材料和诱导方法确定时,筛选秋水仙素溶液最适诱导浓度和处理时间的组合是获得高变异率的关键。试验结果表明在继代增殖培养基中添加浓度为 0.3% 的秋水仙素,共同培养时间为 14d 时获得诱导变异率最大为 31.6%。

嵌合体是秋水仙素诱导多倍体研究中普遍发生的现象,不经分离稳定会产生回复突变,如何有效地筛选及分离嵌合体还需进一步开展研究。马铃薯同源多倍体的开花结实性状也有待进一步探讨。

参考文献

[1] Vallejo R L, Collins W W, Schiavone R D, et al. Extreme resistance to

infection by potato virus Y and potato virus X in an advanced hybrid *Solanum phureja*—*S. Stenotomum* diploid potato population[J]. Am Potato J, 1994, 71 (10): 617-628

[2] 赵明辉,白雅梅,邱彩玲,等. 马铃薯二倍体和四倍体栽培种主要品质性状的差异 [J]. 中国马铃薯, 2004, 18 (6): 333-337

[3] 金黎平,屈冬玉,谢开云,等. 我国马铃薯种质资源和育种技术研究进展 [J]. 种子, 2003 (5): 98-100

[4] 金黎平. 二倍体马铃薯加工品质及重要农艺性状的遗传分析 [D]. 北京:中国农业科学院, 2006

[5] 孙慧生. 马铃薯育种学 [M]. 北京:中国农业出版社, 2003

[6] 雷家军,吴禄平,代汉萍,等. 草莓茎尖染色体加倍研究 [J]. 园艺学报, 1999, 26 (1): 13-18

[7] 杨丽娟,高素萍,邹宗兰. 秋水仙素离体诱导大花蕙兰多倍体试验 [J]. 中国种业, 2009 (6): 51-53

[8] 李飞. 野生马铃薯植株苗期耐冻性鉴定及耐冻机理研究 [D]. 北京:中国农业科学院, 2008

[9] 乔永刚,赵晓明. 药用植物的多倍体育种 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2007, 9 (5): 77-82 (修回日期: 2018-04-17)