

# 秋水仙素对草莓离体叶片再生和多倍体诱导的影响

张计育<sup>1</sup>, 李国平<sup>2</sup>, 乔玉山<sup>1</sup>, 王萌<sup>1</sup>, 李金凤<sup>2</sup>, 章镇<sup>1,①</sup>

(1. 南京农业大学园艺学院, 江苏 南京 210095; 2. 江苏省丘陵地区镇江农业科学研究所, 江苏 句容 212400)

**摘要:** 以草莓 (*Fragaria × ananassa* Duch.) 栽培品种‘雪蜜’ ( $2n=8X=56$ ) 的离体叶片为外植体, 研究了不同浓度秋水仙素对愈伤组织诱导率、不定芽再生率以及多倍体植株诱导的影响, 并采用流式细胞仪对多倍体植株的倍性进行鉴定。结果显示, 用质量体积分数 0.1%、0.3%、0.5% 和 0.7% 的秋水仙素浸泡 2、4 和 6 d, 草莓离体叶片均能诱导出愈伤组织和不定芽, 但随秋水仙素浓度的提高和处理时间的延长, 愈伤组织诱导率和不定芽再生率均显著下降。用不同浓度秋水仙素处理均能产生多倍体植株, 倍性为 9X、10X、11X、12X、14X 和 16X; 随秋水仙素浓度的提高, 多倍体诱导率呈现先上升后下降的变化趋势。用质量体积分数 0.3% 秋水仙素浸泡处理 4 d 是最佳的草莓离体叶片诱导方法, 不定芽再生率达到 40.5%, 多倍体诱导率为 100.0%, 并且诱导产生出 16X 的植株。

**关键词:** 草莓; 秋水仙素; 离体叶片; 诱导率; 再生率; 多倍体

中图分类号: S668.403; Q343.2+45 文献标志码: A 文章编号: 1004-0978(2009)03-0069-05

**Effects of colchicine on regeneration and polyploid induction from leaf *in vitro* of strawberry (*Fragaria × ananassa*)** ZHANG Ji-yu<sup>1</sup>, LI Guo-ping<sup>2</sup>, QIAO Yu-shan<sup>1</sup>, WANG Meng<sup>1</sup>, LI Jin-feng<sup>2</sup>, ZHANG Zhen<sup>1,①</sup> (1. College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Zhenjiang Institute of Agricultural Sciences of the Hilly District, Jurong 212400, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2009, 18(3): 69-73

**Abstract:** Taking leaf *in vitro* of strawberry (*Fragaria × ananassa* ‘Xuemi’,  $2n=8X=56$ ) as explant, effects of different concentrations (0.1%, 0.3%, 0.5% and 0.7%) of colchicine on callus induction rate and regeneration rate of adventitious bud as well as polyploid induction from leaf *in vitro* were studied, and the ploidy determination of polyploid was carried by means of flow cytometer. The results show that callus and adventitious bud can be induced from leaf *in vitro* treated with 0.1%, 0.3%, 0.5% and 0.7% colchicine for 2, 4 and 6 d, and with colchicine concentration rising and treatment time prolonging, the callus induction rate and regeneration rate of adventitious bud decrease obviously. The polyploid can be induced by using different concentrations of colchicine, and chromosome ploidy of regeneration plantlets are 9X, 10X, 11X, 12X, 14X and 16X. Induction rate of polyploid appears the trend of first increasing then decreasing with colchicine concentration rising. The best method of inducing polyploid of strawberry is that leaf *in vitro* is treated by using 0.3% colchicine for 4 d. Using this method, the regeneration rate of adventitious bud and induction rate of polyploid reach 40.5% and 100.0%, respectively, and 16X plantlets can be obtained.

**Key words:** strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.); colchicine; leaf *in vitro*; induction rate; regeneration rate; polyploid

草莓 (*Fragaria × ananassa* Duch.) 属蔷薇科 (Rosaceae) 草莓属 (*Fragaria* L.) 多年生草本植物, 是经济价值较高的园艺作物之一, 在全球的小浆果

中一直处于首要地位<sup>[1]</sup>, 目前广泛栽培的是染色体数为  $2n=8X=56$  的风梨草莓<sup>[2]</sup>。Sjulin 等<sup>[3]</sup>通过对草莓品种的系谱和遗传多样性分析, 认为目前栽

收稿日期: 2009-03-27

基金项目: 江苏省科技支撑计划项目 (BE2008373); 镇江市科技计划项目 (NY2008040)

作者简介: 张计育 (1982-), 男, 山西沁县人, 博士研究生, 主要从事果树遗传育种和分子生物学研究。

①通信作者 E-mail: zhangzh@njau.edu.cn

培的草莓品种的遗传背景狭窄、遗传多样性较低、草莓植株对病虫害和逆境的抗性较弱,新品种的选育也受到一定限制。

多倍体作物一般具有生长旺盛、果实大且少籽或无籽、产量高、适应性和抗逆性强等特点,因此,作物多倍体的育种研究倍受人们的关注。自1937年Blakeslee和Avery用秋水仙素诱导曼陀罗(*Datura stramonium* L.)四倍体成功后,国内外许多研究者开展了多倍体诱导的实验研究<sup>[4-5]</sup>,倍性育种也逐渐成为植物育种的重要途径之一。目前,关于草莓多倍体的诱导,国内外的学者也做了一些研究<sup>[6-7]</sup>,雷家军等<sup>[7]</sup>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,获得了加倍株系和混倍体株系。而利用离体叶片进行草莓多倍体诱导的研究还未见报道。

作者用不同浓度秋水仙素处理草莓的离体叶片,分析了不同浓度秋水仙素对草莓叶片愈伤组织诱导及不定芽再生的影响,并使用流式细胞仪对多倍体植株的染色体倍性进行鉴定,初步建立了通过离体叶片再生培养诱导草莓多倍体的技术体系,以期对草莓的倍性育种研究奠定技术基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试材料为南京农业大学园艺学院果树生物技术实验室保存的由草莓品种‘雪蜜’花药培养获得的组培苗,染色体数为 $2n=8X=56$ ,为八倍体。

### 1.2 方法

1.2.1 多倍体诱导及培养方法 选取继代3周以后的幼嫩草莓组培苗叶片,剪成约 $0.5\text{ cm}^2$ 的小片,并剪去四周叶缘,分别浸入质量体积分数0.1%、0.3%、0.5%和0.7%的秋水仙素水溶液中处理2、4和6 d,对照则浸入无菌水中处理2 d。然后用无菌水冲洗叶片3次,吸水纸吸干水分后,接种到再生培养基<sup>[8]</sup>(含 $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  TDZ、 $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  IBA、 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  蔗糖和 $6.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  琼脂的MS培养基,pH 5.8)上,置于 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下暗培养14 d后,再于光照度 $1\ 500\text{ lx}$ 、光照时间 $16\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ 、室温 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 的条件下进行培养。每个处理3瓶,每瓶10个外植体,各3次重复。光照培养45 d后统计愈伤组织诱导率和不定芽再生率,将再生植株分成单株,转接至

增殖培养基(含 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA、 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA、 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  蔗糖和 $6.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  琼脂,pH 5.8)上,置于上述光照培养条件下进行增殖培养。

1.2.2 多倍体的倍性鉴定 再生株系染色体倍性的鉴定参考李赞等<sup>[9]</sup>的方法并进行了部分改进。选取新鲜幼嫩的草莓再生植株叶片(面积约 $1\text{ cm}^2$ )置于培养皿中,加入 $1.0\text{ mL}$ 核提取缓冲液[含 $15\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-HCl(pH 7.5)、 $80\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  KCl、 $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl、 $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  EDTA- $\text{Na}_2$ 、 $15\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\beta$ -巯基乙醇和体积分数0.1%的Triton X-100],用手术刀将叶片切碎后,室温孵育5 min,然后用300目滤网过滤,得到细胞核悬浮液。

取 $0.5\text{ mL}$ 细胞核悬浮液,加入 $1\text{ mL}$ 染色液(含 $3\ 000\text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$ 的RNA酶A和 $60\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 碘化丙锭),置于黑暗处常温染色30 min,随即置于FAC Scan流式细胞仪(美国BECKMAN公司生产)上进行倍性检测,并计算多倍体诱导率。流式细胞仪的激发光源为 $15\text{ mW}$ 氩离子,激发波长为 $488\text{ nm}$ 。以未诱导的草莓组培苗‘雪蜜’( $2n=8X=56$ )为对照,每测定10个样品测定1次对照。

1.2.3 多倍体植株的生根、炼苗与移栽 将草莓多倍体植株转移到生根培养基(含 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA、 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  蔗糖和 $6.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  琼脂的 $1/2\text{ MS}$ 培养基,pH 5.8)上,3周后进行炼苗和移栽。以未诱导的‘雪蜜’( $2n=8X=56$ )植株为对照,观察多倍体植株的形态变化。

### 1.3 数据处理

按以下公式计算愈伤组织的诱导率、不定芽再生率和多倍体诱导率:愈伤组织诱导率=(产生愈伤组织的外植体数/接种外植体数) $\times 100\%$ ;不定芽再生率=(产生不定芽的外植体数/接种外植体数) $\times 100\%$ ;多倍体诱导率=(多倍体变异植株数/被检测的植株数) $\times 100\%$ 。采用SPSS 16.0软件对实验数据进行分析。

## 2 结果和分析

### 2.1 秋水仙素对草莓离体叶片愈伤组织诱导及不定芽再生的影响

经过不同浓度秋水仙素处理不同时间后,草莓品种‘雪蜜’离体叶片的愈伤组织诱导率及不定芽再生率见表1。由表1可以看出,经过质量体积分数

0.1%~0.7%的秋水仙素溶液浸泡后,草莓离体叶片仍然可以形成愈伤组织,并且在适当的培养条件下可以再生出植株。用不同浓度的秋水仙素浸泡处理同样的时间,随着秋水仙素浓度的增加,愈伤组织

的诱导率和不定芽再生率均显著下降。用同浓度秋水仙素浸泡处理不同的时间,随处理时间的延长,愈伤组织诱导率和不定芽再生率也均显著下降,特别是用质量体积分数0.7%秋水仙素处理4和6d,不定芽的再生率均为0.0%,说明高浓度秋水仙素对草莓离体叶片有一定的毒害作用。实验结果显示,随着秋水仙素浓度和处理时间的增加,离体叶片的愈伤组织诱导率和不定芽再生率显著下降,用秋水仙素浸泡处理对草莓离体叶片愈伤组织诱导和不定芽的再生均有一定的抑制作用。

表1 不同浓度秋水仙素对草莓离体叶片愈伤组织诱导和不定芽再生的影响<sup>1)</sup>  
Table 1 Effect of different concentrations of colchicine on callus induction and adventitious bud regeneration from leaf *in vitro* of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.)<sup>1)</sup>

浓度/% Conc.	处理时间/d Treatment time	愈伤组织诱导率/% Callus induction rate	不定芽再生率/% Regeneration rate of adventitious bud
0.0(CK)	2	100.0a	76.7a
0.1	2	100.0a	64.5b
	4	100.0a	59.4c
	6	100.0a	40.0f
0.3	2	100.0a	51.6d
	4	100.0a	40.5e
	6	87.8d	40.0f
0.5	2	94.1b	32.4g
	4	90.0c	27.5i
	6	82.2e	17.8g
0.7	2	78.1f	31.3h
	4	6.7g	0.0k
	6	5.0h	0.0k

<sup>1)</sup>同列中不同的小写字母表示在0.05水平上差异显著 The different small letters in the same column indicate the significant difference at 0.05 level.

### 2.2 秋水仙素对草莓离体叶片多倍体植株的诱导效应

经过质量体积分数0.1%~0.7%的秋水仙素处理不同时间后,草莓品种‘雪蜜’离体叶片均能诱导出多倍体植株,实验结果见表2。由表2可以看出,随秋水仙素浓度的增加,多倍体诱导率呈现先上升后下降的变化趋势。用质量体积分数0.3%的秋水仙素溶液处理4d或用质量体积分数0.5%的秋水仙素溶液处理2d,草莓再生植株的多倍体诱导率均为100.0%,并且诱导出16X植株;用质量体积分数0.1%的秋水仙素处理草莓离体叶片,多倍体诱导率为77.8%~90.0%,且没有诱导出16X植株,以12X植株的诱导率最高。

表2 不同浓度秋水仙素对草莓离体叶片多倍体植株诱导的影响<sup>1)</sup>  
Table 2 Effect of different concentrations of colchicine on induction of polyploid plantlet from leaf *in vitro* of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.)<sup>1)</sup>

浓度/% Conc.	处理时间/d Treatment time	不同倍性植株数 Number of different ploidy plantlets							多倍体植株数 Polyploid number	植株总数 Total number of plantlet	多倍体诱导率/% Induction rate of polyploid
		8X	9X	10X	11X	12X	14X	16X			
0.0(CK)	2	10	0	0	0	0	0	0	0	10	0.0g
0.1	2	2	0	2	0	4	1	0	7	9	77.8e
	4	1	1	0	2	4	2	0	9	10	90.0b
	6	1	0	2	0	5	0	0	7	8	87.5d
0.3	2	0	2	4	1	2	1	0	10	10	100.0a
	4	0	1	1	0	3	0	1	6	6	100.0a
	6	1	3	3	0	1	1	0	8	9	88.9c
0.5	2	0	1	2	2	2	3	1	11	11	100.0a
	4	1	0	1	0	4	2	0	7	8	87.5d
	6	1	0	0	0	2	0	0	2	3	66.7f
0.7	2	1	0	0	0	2	0	0	2	3	66.7f
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0g
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0g

<sup>1)</sup>同列中不同的小写字母表示在0.05水平上差异显著 The different small letters in the same column indicate the significant difference at 0.05 level.

综合考虑多倍体诱导和不定芽再生情况,可以初步确定草莓离体叶片多倍体诱导的最佳处理方法为:用质量体积分数0.3%的秋水仙素溶液浸泡处理4 d。

### 2.3 多倍体植株染色体倍性分析及植株形态变化

以草莓品种‘雪蜜’(2n = 8X = 56)植株作为对照,利用流式细胞仪对再生植株进行倍性分析,结果显示(表2),用不同浓度秋水仙素处理草莓叶片,可以诱导出9X、10X、11X、12X、14X和16X等多倍体植株,其中用质量体积分数0.3%秋水仙素溶液处理4 d或用质量体积分数0.5%秋水仙素溶液处理2 d,均能诱导产生16X植株。

经炼苗和移栽后,从田间形态上可以看出,与8X植株相比,16X植株的叶片较厚、叶柄较短且植株出现矮化现象,而其他倍性的植株在形态上与8X植株差别不明显。

## 3 讨论和结论

秋水仙素是诱导植物体细胞染色体加倍的有效化学诱变剂,是微管特异性药物。一定浓度的秋水仙素可以破坏纺锤丝的形成,使细胞分裂时染色体不能分向两极,从而使新生细胞的染色体加倍。虽然利用秋水仙素可以诱导染色体变异,但由于秋水仙素是一种有毒化合物,对其使用剂量就有一定的限制,使用浓度过高,将对植物造成毒害,导致植物细胞死亡。在本实验中,当用质量体积分数0.7%的秋水仙素处理4和6 d时,草莓离体叶片愈伤组织的诱导率分别为6.7%和5.0%,不定芽再生率均为0.0%,表明质量体积分数0.7%秋水仙素对草莓离体叶片产生了一定的毒害作用。另外,在实验过程中还发现,利用较高浓度的秋水仙素进行处理或处理时间较长,即使形成了不定芽,在生长过程中不定芽也会由黄变白慢慢死亡。

目前,关于染色体加倍的离体诱导方法主要有2种:一是用含有秋水仙素的培养基将材料培养一段时间后,诱发突变,再由变异株分化出植株。Novak<sup>[10]</sup>用质量体积分数3%秋水仙素附加体积分数4%的DMSO处理大蒜(*Allium sativum* L.)茎尖,多倍体诱导率为24.32%;王娜等<sup>[11]</sup>用50 mg·L<sup>-1</sup>秋水仙素处理冬枣(*Ziziphus jujuba* Mill.)和酸枣(*Z. acidujujuba* C. Y. Cheng et M. J. Liu)丛芽40 d,二

者的多倍体诱导率分别达26.67%和36.37%,并且诱导产生了四倍体植株。二是在组织培养过程中,用秋水仙素直接处理培养材料,如无菌苗的茎尖、茎段、叶片或愈伤组织<sup>[12-13]</sup>。在草莓多倍体诱导研究中,雷家军等<sup>[7]</sup>采用前一种方法,在培养基中加入一定浓度的秋水仙素,利用茎尖培养诱导染色体加倍,虽然得到了加倍植株,但由于不同植株对秋水仙素的耐性不同,随着秋水仙素浓度的增加,存活率急剧下降。在本实验中,作者利用不同浓度秋水仙素浸泡处理不同的时间,通过草莓离体叶片再生途径诱导多倍体,虽然随着秋水仙素浓度和处理时间的增加,愈伤组织诱导率和不定芽再生率都显著下降,但是各处理均产生了染色体变异植株,并且用较低浓度的秋水仙素处理较短的时间即可使草莓染色体发生变异。综合考虑不定芽再生率和多倍体诱导率等指标,用质量体积分数0.3%秋水仙素处理4 d,为草莓离体叶片多倍体诱导的最佳方法。

另外,在本实验中利用不同浓度秋水仙素诱导产生了介于8X和16X之间的各种倍性的多倍体植株,如9X、10X、11X、12X、14X和16X植株,可见,利用秋水仙素处理草莓离体叶片,通过离体叶片再生培养诱导多倍体是诱导草莓染色体变异的有效方法,同时为进一步培育适应性强、综合性状优良的草莓品种奠定了种质基础。在本实验中诱导产生了介于8X和16X之间的各种倍性的草莓多倍体植株,其原因和影响尚需要进一步的研究和分析。

植物倍性鉴定方法有染色体计数法、气孔大小与保卫细胞叶绿体数目鉴定法等<sup>[14]</sup>。染色体计数法是最可靠的鉴定方法<sup>[15]</sup>,但草莓染色体数较多(2n = 8X = 56),很难准确计数,而且草莓试管苗相对较小,很难从形态上看出是否发生变异。流式细胞术(flow cytometry)是一项现代化的DNA倍性分析技术,样品处理简单,实验材料需求量少,且不受染色体数目多少的限制,是一种较为便捷的鉴定方法,特别是对大量待测样品变异状况的早期鉴定非常实用,从而可以有目的地筛选出有利用价值的株系。

### 参考文献:

- [1] 郁俊谊, 杨吉安, 刘冬梅, 等. 草莓新品种红太后和丽达的生物学特性研究[J]. 西北林学院学报, 2002, 17(4): 41-43.
- [2] 张玉星. 果树栽培学各论[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2003: 414.

- [3] Sjulín T M, Dale A. Genetic diversity of North American strawberry cultivars [J]. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 1987, 112(2): 375-385.
- [4] 谢燕,高山林,曾杨,等.太子参快繁技术的优化及同源四倍体的诱导与鉴定[J].*植物资源与环境学报*, 2006, 15(2): 50-54.
- [5] 张夏楠,高山林.何首乌同源四倍体的诱导及生理指标的测定[J].*植物资源与环境学报*, 2006, 15(4): 33-37.
- [6] Dermen H, Darrow G M. Colchicines induced tetraploid and 16-ploid strawberries [J]. *Proceedings of the American Society of Horticulture Science*, 1938, 35: 300-301.
- [7] 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.
- [8] 王媛花,佟兆国,乔玉山,等.雪蜜草莓不定芽离体再生技术[J].*江苏农业学报*, 2008, 24(3): 372-374.
- [9] 李赞,束怀瑞,石荫坪,等.流式细胞光度术用于草莓倍性鉴定的研究[J].*西北农业大学学报*, 1998, 26(4): 45-48.
- [10] Novak F J. Production of garlic (*Allium sativum* L.) tetraploids in shoot-tip *in vitro* culture [J]. *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung*, 1983, 91(4): 329-333.
- [11] 王娜,刘孟军,代丽,等.秋水仙素离体诱导冬枣和酸枣四倍体[J].*园艺学报*, 2005, 32(6): 1008-1012.
- [12] 胡玉林,谢江辉,郭启高,等.秋水仙素诱导 GCTCV-119 香蕉多倍体[J].*果树学报*, 2006, 23(3): 462-464.
- [13] 吴红芝,张锡庆,郑思乡,等.彩色马蹄莲多倍体的诱导[J].*园艺学报*, 2008, 35(3): 443-446.
- [14] 朱惠琴,张宪银,薛庆中.烟草染色体倍性快速鉴定方法[J].*农业生物技术学报*, 2006, 14(2): 255-258.
- [15] 杜胜利,韩毅科,魏爱民,等.黄瓜倍性鉴定方法的研究[J].*园艺学报*, 2002, 29(3): 280-281.

## 欢迎订阅 2010 年《植物资源与环境学报》

中国科技核心期刊 中国科学引文数据库核心期刊  
“中国期刊方阵”双效期刊 “江苏期刊方阵”优秀期刊

季刊, 单价 15 元, 邮发代号: 28-213, 国内统一连续出版物号: CN32-1339/S

《植物资源与环境学报》系江苏省·中国科学院植物研究所、江苏省植物学会及中国环境科学学会植物园保护分会联合主办的学术刊物, 国内外公开发行。本刊为 BA、CA、CAB、Elsevier's、中国生物学文摘、中国环境科学文摘、中国科学引文数据库、万方数据——数字化期刊群、中国学术期刊(光盘版)和中文科技期刊数据库等国内外著名刊库收摘。本刊围绕植物资源与环境两个中心命题, 报道我国植物资源的考察、开发利用和植物物种多样性保护, 自然保护区与植物园的建设和管理, 植物在保护和美化环境中的作用, 环境对植物的影响以及与植物资源和植物环境有关学科领域的原始研究论文、研究简报和综述等。凡从事植物学、生态学、自然地理学以及农、林、园艺、医药、食品、轻化工和环境保护等领域的科研、教学、技术人员及决策者, 可以从本刊获得相关学科领域的研究进展和信息。从 2009 年起本刊每期页码增加至 96 页, 定价改为每期 15 元。

本刊为季刊, 大 16 开本, 96 页。全国各地邮局发行, 每期定价 15 元, 全年价 60 元。若错过征订时间或需补齐 1992 年至 2009 年各期者, 请直接与编辑部联系邮购, 1992 年至 1994 年每年 8 元, 1994 年至 2000 年每年 16 元, 2001 年至 2005 年每年 24 元, 2006 年至 2008 年每年 40 元, 2009 年至 2010 年每年 60 元(均含邮资), 如需挂号另付邮挂费。

编辑部地址: 江苏省南京市中山门外 江苏省·中国科学院植物研究所内(邮编 210014); 电话: 025-84347016; 传真: 025-84432074; E-mail: nbjgxx@jlonline.com 或 zwzy@mail.cnbg.net。

欢迎订阅! 欢迎投稿!