

网络出版时间:2017-11-29 09:24

DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2018.01.014

网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.s.20171129.0924.028.html

秋水仙素对金达苜蓿染色体加倍效果的影响

吉仁花¹, 于林清², 白淑兰¹

(1 内蒙古农业大学 林学院, 内蒙古 呼和浩特 010019; 2 中国农业科学院草原研究所, 内蒙古 呼和浩特 010010)

【摘 要】【目的】获得金达苜蓿四倍体的纯合体, 为不同倍性苜蓿遗传特性研究及不同倍性间实现基因的流动奠定基础。【方法】以金达苜蓿(*Medicago sativa* L. cv. Jinda)种子($2n=16$)为材料, 利用秋水仙素结合组织培养, 研究了秋水仙素不同质量浓度(0.02, 0.07, 0.12 mg/mL)、不同处理时间(1, 3, 7 d)对金达苜蓿愈伤组织诱导效果及染色体加倍效果的影响, 并从形态学和根尖染色体观察对变异株进行倍性鉴定。【结果】秋水仙素质量浓度和处理时间 2 个因素对金达苜蓿诱变效果均有一定程度的影响, 随着秋水仙素质量浓度的升高、处理时间的延长, 愈伤组织的诱导率和分化率均下降, 成苗率则规律不明显, 其中 0.07 mg/mL 秋水仙素处理 3 d 的诱导效果最好, 愈伤组织的诱导率达到 60.5%, 愈伤组织分化率为 33.63%, 诱变幼苗成苗率为 24.1%。倍性鉴定结果表明, 获得的变异植株为四倍体与二倍体的混倍体。【结论】0.07 mg/mL 秋水仙素处理 3 d 是获得多倍体变异幼苗的最佳条件, 获得了四倍体和二倍体的混倍体。

【关键词】金达苜蓿; 离体组织; 秋水仙素; 混倍体; 染色体加倍

【中图分类号】S551⁺.703.52

【文献标志码】A

【文章编号】1671-9387(2018)01-0103-08

Effects of colchicine on chromosome doubling of *Medicago sativa* L. cv. Jinda

Ji Renhua¹, Yu Linqing², Bai Shulan¹

(1 Forestry College, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia 010019, China;

2 Grassland Research Institute of Chinese Agricultural Sciences, Hohhot, Inner Mongolia 010010, China)

Abstract:【Objective】This study obtained pure alfalfa tetraploid to provide basis for studying different genetic features of alfalfa and realizing the gene flow between ploidy. 【Method】Using colchicine in combination with tissue culturing, the effects of colchicine concentration (0.02, 0.07, and 0.12 mg/mL) and treatment time (1, 3, and 7 d) on callus induction and chromosome doubling effect of *Medicago sativa* L. cv. Jinda were studied. The ploidy was also identified from morphology and apical chromosomes. 【Result】The concentration of colchicine and treatment time had certain effects on mutation of *Medicago sativa* L. cv. Jinda. The callus induction rate and regeneration frequency decreased as the increase of concentration of colchicine and treatment time. The treatment of 0.07 mg/mL colchicine for 3 d was best for polyploidy induction with callus induction rate, regeneration frequency and regeneration rate of 60.5%, 33.63% and 24.1%, respectively. The ploidy identification showed that the obtained mutant plants were mixoploid. 【Conclusion】The treatment with 0.07 mg/mL colchicine for 3 d was most effective on polyploidy induc-

【收稿日期】2016-11-03

【基金项目】国家科技支撑计划项目“干旱、半干旱地区抗旱牧草新品种选育及产业化示范”; 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2008BADB3B06)

【作者简介】吉仁花(1986—), 女(蒙古族), 内蒙古鄂尔多斯人, 在读博士, 主要从事林木生物技术研究。

E-mail: jirenhua449@126.com

【通信作者】白淑兰(1960—), 女(蒙古族), 内蒙古通辽人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事生物技术在干旱区植被恢复中的应用研究。E-mail: baishulan2004@163.com

tion, and the mutagenic plant chromosome number was mixoploid including tetraploid and diploid.

Key words: *Medicago sativa* L. cv. Jinda; *in vitro*; colchicine; mixoploid; chromosome doubling

金达苜蓿(*Medicago sativa* L. cv. Jinda)是由来自伊朗、伊拉克、西班牙和高加索地区的大量育种材料选育而成的一个新品种,其枝条匍匐生长,分枝密集,抗寒能力强,叶片、花和种子均比一般紫花苜蓿小,是唯一一种草坪型紫花苜蓿,在我国西北、华北、东北、华东地区均可种植,用于公路护坡、果园绿化、葡萄园美化以及广场绿地。

金达苜蓿染色体加倍育种的主要目的是获得四倍体的纯合体,研究不同倍性苜蓿的遗传特性,在不同倍性间实现基因的流动。紫花苜蓿是天然同源四倍体,虽然其纯合个体不表现出优良的农艺性状,但不同种质间的杂交表现出较好的杂交优势,且其杂种优势随亲本遗传差异的增大而增加^[1]。所以将金达苜蓿纯合个体应用于杂交育种,可以最大限度地提高紫花苜蓿的杂合性,从而增强其抗性,提高产草量,培育出优良品质的苜蓿品种。

随着生物技术的迅速发展,利用秋水仙素人工诱导多倍体的报道较多^[2-6]。采用浸种法,利用秋水仙素诱导直立型扁蓿豆、扁蓿豆新品系 90-36、清水苜蓿均获得了多倍体植株^[7-9]。但苜蓿离体状态下秋水仙素诱导染色体加倍的研究尚较欠缺^[10]。本试验以金达苜蓿种子为材料,利用秋水仙素结合组织培养,以获得金达苜蓿四倍体的纯合体,为不同倍性苜蓿的遗传特性研究及不同倍性间实现基因的流动奠定基础,也为苜蓿遗传转化研究提供坚实的科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

金达苜蓿种子由中国农业科学院草原研究所育种实验室提供,经鉴定均为二倍体($2n=16$)。

1.2 培养基配方及培养条件

1.2.1 培养基配方 愈伤组织诱导培养基:SH (Schenk and Hildebrandt medium)+30 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂+0.5 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L 6-BA;愈伤组织分化培养基:MSO(MS 大量、微量元素、铁盐+B5 有机)+30 g/L 蔗糖+6 g/L 琼脂;生根培养基:1/2MS+30 g/L 蔗糖+7.5 g/L 琼脂。灭菌前先各培养基的 pH 值调至 5.8,121 °C 高压灭菌 20 min。

1.2.2 培养条件 光周期为 16 h/d,光照强度

12 500~50 000 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,昼夜温度 24 °C/18 °C。

1.3 离体组织染色体加倍试验方法

1.3.1 种子消毒及无菌苗的培养 选取饱满的成熟金达苜蓿种子,用砂纸打磨后置于盛有体积分数 70%酒精的三角瓶中消毒 45 s,用无菌水冲洗 4 次,放入 2%次氯酸钠溶液浸泡 30 min,不断摇动三角瓶以充分消毒灭菌,然后置于超净工作台内,在超净工作台倒掉消毒液,用无菌水冲洗 5 次,最后用灭菌的滤纸吸干种子表面的液体,接种到生根培养基上。

1.3.2 外植体的准备 采用孔舒颖^[8]的方法,将生长 6~8 d 的无菌苗置于已灭菌的滤纸上,用小刀切取幼嫩的子叶,切成 3~4 mm 的小方块。将这些小方块作为外植体分别接种在含 0.02, 0.07, 0.12 mg/mL 秋水仙素溶液的愈伤组织诱导培养基上培养,以接种不添加秋水仙素的相同培养基为对照。每个处理接种 6 个培养皿,每个培养皿接种 10 个外植体,3 次重复。

1.3.3 愈伤组织的诱导 将经过不同时间(1, 3, 7 d)培养的外植体接入不添加秋水仙素的同一培养基继续诱导,60 d 后转入分化培养基,观察记录生长状态并统计愈伤组织数,计算愈伤组织诱导率。

1.3.4 诱导愈伤组织分化 将诱导出的正常愈伤组织接入分化培养基中进行诱导,15 d 后根据愈伤组织块的大小将愈伤组织再切块进行继代培养,期间根据愈伤分化情况多次继代,培养 45 d 后统计胚状体的分化率。

1.3.5 生根培养 将诱导分化出芽的愈伤组织分别转入生根培养基中,15 d 换 1 次培养基,继续生根。诱导生根培养基上培养 20 d 后即可出现根的突起,35 d 左右即可长出短根,以后逐渐形成正常根,直到 50 d 统计其成苗率。

1.3.6 炼苗与移栽 诱导分化出的再生无菌苗根系充分发达,在诱导生根培养基上培养的第 55~60 天可以炼苗。先在培养箱内将三角瓶口打开,2 d 后置于光照下培养。在此过程中逐渐通风、增加光照,5 d 后从三角瓶中取出幼苗,将根系上的培养基冲洗干净,再移栽到装有 1/3 培养基质(m (蛭石): m (土)为 1:1)的 100 mL 塑料小杯中,用保鲜膜保湿,以提高再生植株移栽成活率。因移栽后的幼苗生长发育需要大量营养,仅靠基质中的养分不能满

足幼苗生长的需要,因此必须用人工方法在基质中添加完全营养液 20 mL/杯,补充幼苗生长所需矿质营养,以保证再生小植株生长良好。当幼苗长到 50 cm 大小移入大花盆内,统计移栽成活率。

1.3.7 再生植株的倍性鉴定 形态学鉴定:观察秋水仙素处理金达苜蓿幼苗的地径、叶片形态和叶色等外部形态特征,筛选出茎粗、叶片宽且肥厚、叶色浓绿、叶表粗糙的处理幼苗初步鉴定为加倍成功植株。

根尖细胞染色体观察:移栽幼苗开始分蘖时,取出整个植株,将根系洗净。从根系中取出新鲜、光滑、白色透明的长度约 1.5 cm 的根尖,放入 8-羟基喹啉中预处理 3 h,然后用卡诺固定液(V(体积分数 95%乙醇):V(冰醋酸)=3:1)固定 24 h,1 mol/L HCl 解离 4 min 后,用石炭酸-品红溶液染色 2 h,压片、镜检,观察染色体,选取分散相好的压片用 O-lympus 显微摄影仪照相。每种处理下的加倍再生植株幼苗各取 5 枚根尖进行压片观察。

2 结果与分析

2.1 秋水仙素对金达苜蓿愈伤组织形态特征及生长的影响

观察发现,金达苜蓿外植体诱导的愈伤组织形态结构受材料本身和秋水仙素的影响。经秋水仙素处理后的愈伤组织生长缓慢,易褐化,且呈不规则膨大,随着秋水仙素质量浓度的升高、处理时间的递增,愈伤组织生长更缓慢,褐化也加重,该类型的愈伤组织在后期长势也非常弱。根据本研究情况,秋水仙素处理的愈伤组织形态结构大致可以分为 4 大类型:I 类型为深绿色,结构坚硬,生长缓慢;II 类型为亮黄色,内外有很多绿色颗粒,结构松软,黏稠状,生长较快;III 类型为乳白色或黄色,糨糊状,无颗粒结构,生长较慢;IV 类型为褐色,结构致密,生长缓慢(图 1)。

对照的外植体诱导出的愈伤组织多数为类型 II,生长到后期时还出现较少比例的类型 I 和类型 IV。经不同质量浓度秋水仙素处理不同时间的愈伤组织中少部分为类型 II,多数为类型 III 和 I,而且在愈伤组织分化时类型 IV 占有较大比例。4 种类型的愈伤组织中 II 类型的愈伤组织先在叶片边缘切口处形成浅绿色颗粒状的愈伤组织,之后逐步扩展到整个切口及全叶,培养到 35 d 左右,愈伤组织呈亮黄色,直径可达 1.3 cm,多数为生长状态良好、健康的愈伤组织,比其他 3 种类型的愈伤组织较少出现褐

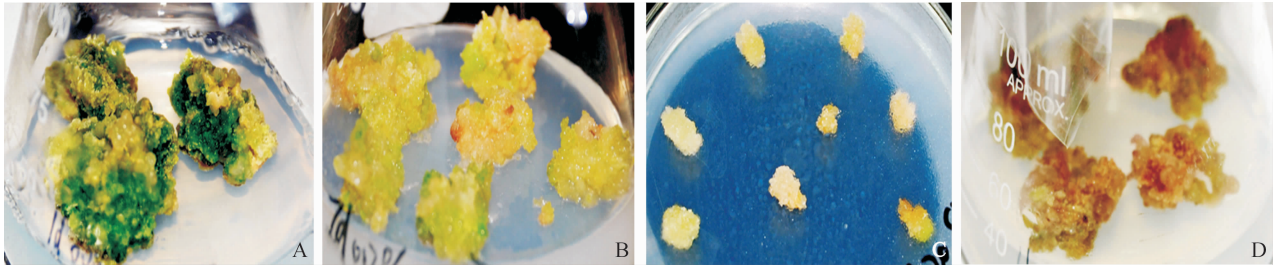
化现象,为继代增殖和分化培养的最佳愈伤组织。III 类型的愈伤组织刚形成时为黄绿色,在后期生长较慢,多数为黏性,含水率高且个别出现褐化现象,可再增殖和分化的利用率比 II 类型的愈伤组织低。II 类型及 III 类型的愈伤组织均能在 MSO 培养基内分化出绿色的芽点,但 III 类型的愈伤组织分化时间较长,其愈伤组织在分化培养基 MSO 中连续继代 14 次仍未分化产生绿色芽点。I 类型的愈伤组织也可以连续继代培养,但随着继代次数的增加愈伤组织呈不规则膨大,最终无胚状体和分化苗的产生;IV 类型的愈伤组织生长后期多数出现褐化现象,丧失分化能力。

2.2 秋水仙素对金达苜蓿愈伤组织诱变效果的影响

当采用诱变剂处理植物细胞时,诱变剂的质量浓度和处理时间 2 个因素都会很大程度地影响加倍效果,因此为获得较高的诱导率又保持较高的成活率,选择适当的诱变剂质量浓度和处理时间组合十分重要^[11]。从表 1 可以看出,秋水仙素质量浓度及处理时间对金达苜蓿愈伤组织的形成影响较大,随着秋水仙素质量浓度的升高和处理时间的递增,愈伤组织的形成受抑制程度明显加大。当秋水仙素质量浓度为 0.12 mg/mL、处理时间为 7 d 时仅有 39.5% 的愈伤组织能保持正常生长;而当秋水仙素质量浓度为 0.02 mg/mL、处理时间为 1 d 时,愈伤化程度最高,愈伤组织诱导率为 63.5%。多种处理条件下的多数愈伤组织虽被转入不含秋水仙素的培养基中,但随着生长时间的延长呈不规则膨大或者慢慢褐化,最后失去生活力。

本研究参考 Saunders 等^[12]的方法,选择诱导愈伤组织分化培养基为不添加任何激素的 MSO 培养基。将诱导出的亮黄色、松软、较大的愈伤组织转入 MSO 培养基中进行诱导分化培养。分化结果可分为两大类型:① 秋水仙素各处理组合的少数愈伤组织在 MSO 培养基内继续生长一段时间后分化形成绿色芽点。此类型的分化愈伤组织在生长后期利于生根,为最佳分化愈伤组织。② 秋水仙素各处理组合的绝大多数愈伤组织在 MSO 培养基内表面呈白色毛状根,布满白色粉末状物或变黄,最终无绿色芽点的分化(图 2)。从表 1 可以看出,随着秋水仙素质量浓度的升高和处理时间的延长,金达苜蓿愈伤组织分化率表现为逐步降低的趋势。秋水仙素质量浓度为 0.12 mg/mL、处理时间为 7 d 时,愈伤组织分化率仅达到 14.71%;秋水仙素质量浓度为

0.02 mg/mL、处理时间为 1 d 时,愈伤组织分化率 为最高,达到 39.17%。



A. 类型Ⅰ;B. 类型Ⅱ;C. 类型Ⅲ;D. 类型Ⅳ A. TypeⅠ;B. TypeⅡ;C. TypeⅢ;D. TypeⅣ

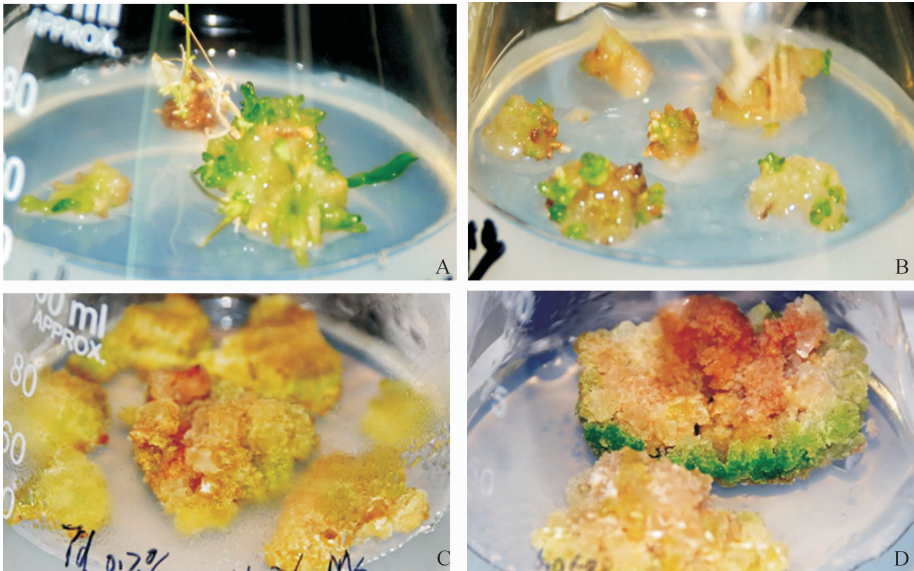
图 1 秋水仙素处理后的金达苜蓿愈伤组织类型

Fig. 1 Callus types of *Medicago sativa* L. cv. Jinda after colchicine treatment

表 1 秋水仙素对金达苜蓿愈伤组织的诱导分化及成苗率的影响

Table 1 Effects of colchicine on callus induction differentiation and seedling ratio of *Medicago sativa* L. cv. Jinda

秋水仙素质量浓度/ (mg·mL ⁻¹) Colchicine quality concentration	处理时间/d Treatment time	愈伤组织诱导率/% Callus induction rate	愈伤组织分化率/% Callus regeneration frequency	成苗率/% Regeneration rate
0.02	1	63.5	39.17	17.5
0.07	1	62.0	28.21	25.0
0.12	1	58.0	28.71	19.0
0.02	3	61.5	32.20	12.9
0.07	3	60.5	33.63	24.1
0.12	3	49.5	23.33	6.7
0.02	7	57.5	28.04	8.7
0.07	7	54.5	18.17	37.5
0.12	7	39.5	14.71	11.1
CK		79.0	54.28	46.7



A~B. 秋水仙素处理后的愈伤组织分化形成绿色芽点;

C~D. 秋水仙素处理后的愈伤组织表面呈白色毛状根,布满白色粉末状物或变黄,最终无绿色芽点的分化

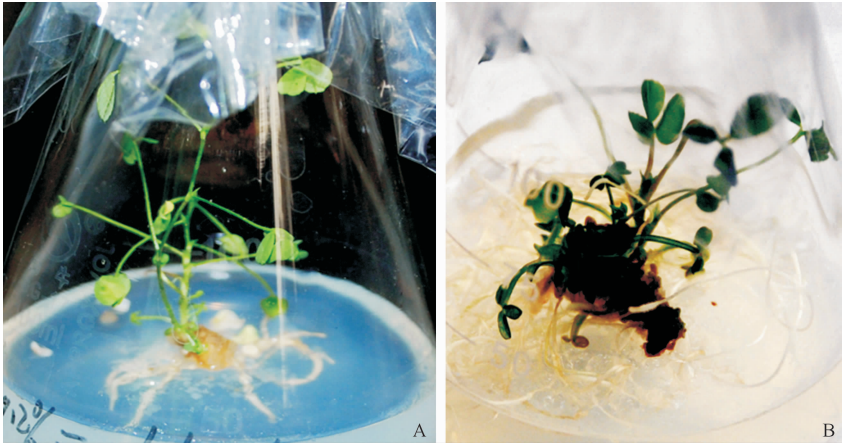
A—B. Callus differentiation after colchicine treatment forms green buds;C—D. Colchicine treatment of callus surface white hairy roots, covered with white powder or yellowing,and ultimately no differentiation of green buds

图 2 秋水仙素处理金达苜蓿愈伤组织分化

Fig. 2 Callus differentiation of *Medicago sativa* L. cv. Jinda treated with colchicine

观察发现,由于秋水仙素的影响,最终仅有极少数带有绿色芽点的愈伤组织能够继续生长,且生长缓慢。在诱导生根培养基上培养 20 d 后出现根的突起,35 d 左右可长出短根,以后逐渐形成正常根

(图 3)。从表 1 可以看出,经秋水仙素处理的愈伤组织,其再生苗的形成受到不同程度的影响,表现为当秋水仙素质量浓度为 0.07 mg/mL、处理时间分别为 1,3,7 d 时成苗率为 25.0%,24.1%,37.5%。



A. 在诱导生根培养基上培养 20 d 后出现根的突起,35 d 左右可长出短根;B. 在诱导生根培养基上逐渐形成正常根
A. In the induction of rooting medium for 20 days root protrusions appears and for about 35 d short roots grow out;
B. In the induction of rooting medium a normal root gradually forms

图 3 秋水仙素处理金达苜蓿愈伤组织分化成苗结果

Fig. 3 Effect of colchicine on plant regeneration from *Medicago sativa* L. cv. Jinda callus

2.3 秋水仙素处理金达苜蓿变异株的倍性鉴定

无论采用何种方法诱导多倍体产生,并不是所有被处理的组织、器官或细胞都能成为 2 倍于原来的染色体,有的细胞染色体可能未加倍,有的可能重复加倍,形成的一般是混倍体或嵌合体。所以采用形态鉴定和细胞鉴定相结合的方法进行倍性鉴定,以筛选出真正的多倍体植株。

化与基因剂量有关,即随着基因拷贝数的增加,基因转录产物量发生变化,性状发生相应变化^[13]。经秋水仙素诱导处理的金达苜蓿愈伤组织分化总体表现为,植株明显较对照高大,分枝数较多,叶片肥厚且变大,叶片表面粗糙,茎间变长,幼根尖端膨大、幼苗生长缓慢、匍匐性变弱(图 4)。根据这些表型性状初步鉴定出变异植株。

形态学鉴定:一般认为,植物营养器官性状的变



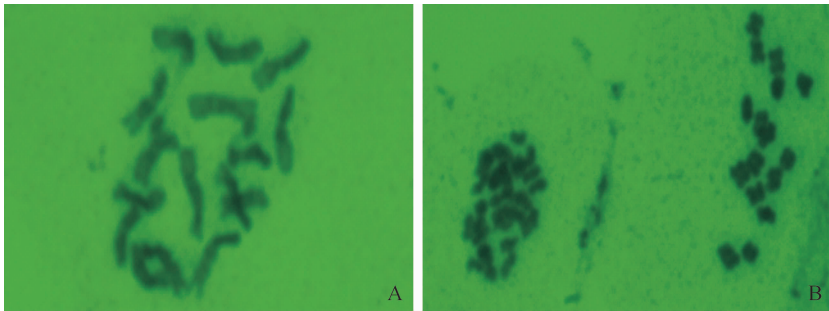
A. 植株;左边是二倍体植株,右边是变异植株;B. 叶片;左边是二倍体植株叶片,右边是变异植株叶片
A. Plants; The left is diploid plants, the right is the variation plants; B. Leaves; Leaves on the left side of the diploid plants, the right is the leaves of the variation plants

图 4 秋水仙素处理金达苜蓿的形态特征

Fig. 4 Morphological characteristics of *Medicago sativa* L. cv. Jinda treated with colchicine

根尖染色体的观察:经形态特征鉴定后挑选出的再生植株进行细胞染色体数目检测。检测结果显示,经过离体组织细胞染色体加倍方法获得的变异植株为四倍体与二倍体的混倍体,即根尖细胞中

$2n=16$ 、 $2n=32$ 共存。在对照再生植株移栽幼苗根尖的倍性观察中均未发现有四倍体($2n=32$)的植株(图 5)。



A. 二倍体植株根尖细胞染色体;B. 混倍体植株根尖细胞染色体
A. Chromosomes of root tip cells with diploid plant;B. Chromosomes of root tip cells with mixoploid plant

图 5 不同倍性金达苜蓿根尖细胞染色体

Fig. 5 Chromosomes of root tip cells with different ploidy of *Medicago sativa* L. cv. Jinda

3 讨 论

3.1 加倍植株染色体的混倍性

经秋水仙素处理的愈伤组织单细胞分化芽点再生长成幼苗,理论上所诱导形成的再生植株为四倍体的纯合体,从而可避免混倍体的出现^[14]。本研究通过秋水仙素处理获得金达苜蓿加倍植株为二倍体与四倍体的混倍体。前人用秋水仙素处理鸭茅、杉木、朝鲜百合和唇形科青兰属植物 *Dracocephalum kotschyi* 种子或愈伤组织,获得的也均为二倍体和四倍体的混倍体植株^[15-18],说明在秋水仙素诱导多倍体加倍过程中只是部分细胞得到了加倍。这可能是由于本研究以金达苜蓿叶片为载体,秋水仙素处理愈伤组织的同时不可避免地对叶片也进行了处理,所获得的再生幼苗有可能是从金达苜蓿叶片直接发育出来的,即诱导获得的多倍体再生植株是混倍体。另外,秋水仙素混培法获得的少量幼苗生长缓慢,随着再生幼苗的生长发育,混倍体中多倍体细胞所占比例越来越小,甚至在生长后期一部分含较多多倍体细胞的混倍体恢复成了二倍体^[11],这可能是造成加倍结果不易获得纯合体,而大量得到混倍体的主要原因。在植株多倍体育种实践中,还需要在混倍体植株间授粉,经过几代选择、鉴定,才能获得真正纯合的四倍体株系^[19-21]。

3.2 诱导幼苗的移栽成活率

经秋水仙素处理获得的幼苗往往移栽成活率很低,可能是以下 3 方面因素造成的:首先,大部分再

生植株由于根部畸形无法从土壤吸收生长所需的营养,从而停滞生长未能成苗而导致最终死亡^[22]。其次,秋水仙素是一种有毒物质,再生植株受其毒害作用,不能正常生长发育。最后,本研究采用的是离体组织染色体加倍技术,处理后的材料进行炼苗、移植,在此过程中诱导幼苗不适应新的培养环境、移栽操作不恰当等环境和人为因素的影响,损失一部分。提高诱导幼苗的移栽成活率可考虑用更高效、更安全、毒性较低的除草剂取代秋水仙素。

3.3 秋水仙素质量浓度与处理时间对愈伤组织诱导的影响

不同材料对秋水仙素的耐受力、敏感度不同。对同一种材料而言,随秋水仙素质量浓度的增大染色体加倍率也会提高^[23]。但秋水仙素对细胞的毒害作用也加大,因此秋水仙素质量浓度和效果之间并不成正比^[24]。本研究中,不同处理组合对金达苜蓿愈伤组织诱导效果差异明显,随着秋水仙素质量浓度和处理时间的递增,秋水仙素对愈伤组织的毒害作用加大,愈伤组织产生迟、生长慢,表现明显的生长抑制现象,从而诱导出形态结构不同类型的愈伤组织,而且愈伤组织的生长状态直接影响其分化出芽。原因可能是,结构致密、硬团状的愈伤组织,通气、透水、透光性较差,其生长以及分化受到抑制;而内外有很多绿色颗粒、结构松软、黏稠状的愈伤组织,通光、透水及透气性较强,有利于分化形成多个芽点,诱导形成丛生芽的几率较大。Mori 等^[25]对二倍体小星辰花(*Limonium bellidi folium*)加倍,用

0.05%秋水仙素处理 72 h 时,最高频率的四倍体和混倍体发生。

秋水仙素质量浓度及处理时间是直接影响处理效果的 2 个因素^[9]。用秋水仙素水溶液处理外植体时,有关质量浓度和处理时间的组合问题研究结论不一。李洁等^[26]研究结果显示,用 0.1%秋水仙素和 1%助渗剂 DMSO 诱导直立型扁蓿豆染色体加倍效果较好。张颖^[27]研究结果显示,0.03%秋水仙素处理 72 h 诱导羊草与灰色赖草杂种 F₁ 染色体加倍效果较好。本研究结果显示,采用 0.07 mg/mL 的秋水仙素处理 3 d 染色体加倍效果较好。本研究结果与上述 2 种结果不同的原因可能是,利用秋水仙素诱导金达苜蓿染色体加倍与秋水仙素质量浓度和处理时间不呈正比关系;秋水仙素质量浓度过低,处理时间越短,不能产生染色体加倍效应;浓度过高,处理时间越长,则对外植体有毒害作用,从而抑制植物材料的生长甚至死亡。另外,经秋水仙素处理后的金达苜蓿愈伤组织,难免受到诱变方法、基因型以及处理温度等因素的影响,其中任何一项因素的改变,都可能会影响染色体加倍效果。

4 结 论

利用秋水仙素染色体加倍研究表明,随着秋水仙素质量浓度的升高、处理时间的延长毒害作用随之增强,0.07 mg/mL 秋水仙素处理 3 d 是获得多倍体变异苗的最佳条件,愈伤组织的诱导率达到 60.5%,愈伤组织分化率为 33.63%,诱变幼苗成苗率为 24.1%,并且诱导产生混倍体植株,要获得纯合的金达苜蓿四倍体植株,还需进一步深入研究。

志谢:本研究得到了白淑兰教授、于林清研究员的指导,在此表示感谢。

[参考文献]

- [1] 刘卢生,王友国,玉永雄,等.紫花苜蓿倍性研究进展 [J]. 草业科学,2006,23(2):9-14.
Liu L S, Wang Y G, Yu Y X, et al. Advances in alfalfa ploidy studies [J]. Pratacultural Science, 2006, 23(2): 9-14.
- [2] 云 岚,云锦凤,李俊琴,等.新麦草愈伤组织多倍体诱导与倍性鉴定 [J]. 草业学报,2010,19(6):126-131.
Yun L, Yun J F, Li J Q, et al. Callus polyploidy induction and identification of Russian wild ryegrass [J]. Acta Pratacultural Sinica, 2010, 19(6): 126-131.
- [3] Yang Z, Shen Z, Tetreault H, et al. Production of autopolyploid lowland switchgrass lines through *in vitro* chromosome doubling [J]. Bioenergy Research, 2014, 7(1): 232-242.
- [4] Dong Y, Zhao W, Li X, et al. Androgenesis, gynogenesis, and

- parthenogenesis haploids in cucurbit species [J]. Plant Cell Reports, 2016, 35(10): 1991-2019.
- [5] Gomes S S L, Saldanha C W, Neves C S, et al. Karyotype, genome size, and *in vitro* chromosome doubling of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2014, 118(1): 45-56.
- [6] Würschum T, Tucker M R, Reif J C, et al. Improved efficiency of doubled haploid generation in hexaploid triticale by *in vitro* chromosome doubling [J]. BMC Plant Biology, 2012, 12(1): 109.
- [7] 王 璐.秋水仙素对直立型扁蓿豆诱变效应的研究 [D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学,2014.
Wang L. Study on inductive effects of *Medicago ruthenica* (L.) sojak, cv. 'Zhilixing' by colchicine induction [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2014.
- [8] 孔舒颖.扁蓿豆新品系的多倍体诱导研究 [D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学,2010.
Kong S Y. Studies on polyploid induction of *Melilotoides ruthenica* strains [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2010.
- [9] 李 悦,师尚礼.秋水仙素处理清水苜蓿胚根对染色体倍性与叶表皮细胞的诱变效应 [J]. 草业学报,2016,25(2):141-149.
Li Y, Shi S L. The mutagenic effects of colchicine treatment on chromosome ploidy and the leaf epidermal cells of radicles of *Medicago sativa* cv. Qingshui [J]. Acta Pratacultural Sinica, 2016, 25(2): 141-149.
- [10] 赵海明,谢 楠,李 源,等.秋水仙素对染色体加倍研究及在牧草育种上的应用 [C]//中国草学会.中国草学会青年工作委员会学术研讨会论文集.[出版地不详]:中国草学会,2007.
Zhao H M, Xie N, Li Y, et al. Colchicine for chromosome doubling research and application in forage breeding [C]//Chinese Society of Grassland. The Chinese society of grass academic symposium on youth work committee. [S. l.]: Chinese Society of Grassland, 2007.
- [11] 宋 策,陈 典,梁 誉,等.秋水仙素离体诱导分蘖洋葱茎尖多倍体的研究 [J]. 吉林农业大学学报,2016,38(6):675-680.
Song C, Chen D, Liang Y, et al. *In vitro* induction of polyploid by colchicine in shoot tips of tillered-onion [J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2016, 38(6): 675-680.
- [12] Saunders J W, Bingham E T. Production of alfalfa plants from tissue culture [J]. Crop Science, 1972(12): 804-808.
- [13] 李鹏飞.西瓜多倍体诱导及其分子生物学基础 [D]. 河北保定:河北农业大学,2013.
Li P F. Studies on the polyploid watermelon induction and the foundations of molecular biology [D]. Baoding, Hebei: Hebei Agricultural University, 2013.
- [14] 宁 强.枣愈伤组织的诱导及多倍体诱变研究 [D]. 河北保定:河北农业大学,2006.
Ning Q. Research on callus induction and poly ploid mutagenesis in *Ziziphus jujube* Mill. [D]. Baoding, Hebei: Hebei Agricultural University, 2006.
- [15] 钟 声,黄梅芬,段新慧.野生二倍体鸭茅染色体加倍及杂交

- 利用研究 [J]. 热带农业工程, 2009, 33(3): 40-43.
- Zhong S, Huang M F, Duan X H. Chromosome doubling and crossing of wild diploid *Dactylis glomerata* [J]. Tropical Agricultural Engineering, 2009, 33(3): 40-43.
- [16] 胡瑞阳, 段红静, 林华忠, 等. 杉木多倍体变异苗诱导及倍性鉴定 [J]. 核农学报, 2016, 30(8): 1491-1497.
- Hu R Y, Duan H J, Li H Z, et al. Polyploid mutant seedlings induction and ploidy identification of Chinese fir [J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2016, 30(8): 1491-1497.
- [17] 刘 洋, 杨利平. 朝鲜百合离体多倍体诱导 [J]. 河北农业大学学报, 2015, 38(3): 30-33.
- Liu Y, Yang L P. Polyploidy induction of *Lilium amabile* in vitro [J]. Journal of Agricultural University of Hebei, 2015, 38(3): 30-33.
- [18] Zahedi A A, Hosseini B, Fattahi M, et al. Overproduction of valuable methoxylated flavones in induced tetraploid plants of *Dracocephalum kotschy* [J]. Botanical Studies, 2014, 55(1): 1-10.
- [19] 郝 峰, 刘翠玲, 郝水源. 蒙古冰草与航道冰草杂交 F_1 代染色体加倍植株过氧化物同工酶分析 [J]. 河套大学学报, 2010, 30(4): 1-3.
- Hao F, Liu C L, Hao S Y. An analysis of reciprocal hybrids F_1 between agropyron mongolicum and *A. Cristatum* cv. Fairway and its chromosome doubling plant isozyme [J]. Journal of Heilongjiang University, 2010, 30(4): 1-3.
- [20] 刘 辉. 马铃薯花药培养及双单倍体植株的鉴定 [D]. 黑龙江哈尔滨: 东北农业大学, 2009.
- Liu H. Anthetr culture and identification of regenerated plants in potato [D]. Harbin, Heilongjiang: The Northeast Agricultural University, 2009.
- [21] 秦素平, 陈于和, 林小虎, 等. 秋水仙素处理对黑麦根尖细胞有丝分裂的影响 [J]. 麦类作物学报, 2006, 26(4): 142-144.
- Qin S P, Chen Y H, Lin X H, et al. Effect of colchicine on mitosis in root tip cell of rye (*Secale cereal*) [J]. Journal of Triticeae Crops, 2006, 26(4): 142-144.
- [22] 刘 倩. 6 种苜蓿属植物多倍体诱导及倍性鉴定研究 [D]. 江苏扬州: 扬州大学, 2014.
- Liu Q. Polyploidy induction and ploidy identification of 6 *Medicago* spp. Germplasms [D]. Yangzhou, Jiangsu: Yangzhou University, 2014.
- [23] 程金水. 园林植物遗传育种学 [M]. 北京: 中国林业出版社, 2000.
- Cheng J S. Garden plant genetic breeding [M]. Beijing: China Forestry Press, 2000.
- [24] 房永雨, 谢 锐, 于肖夏, 等. 秋水仙素处理高丹草杂种 F_1 种子诱变效果分析 [J]. 中国草地学报, 2013, 35(6): 40-45.
- Fang Y Y, Xie R, Yu X X, et al. Analysis of mutagenic effect of colchicines on seeds of sorghum-sudangrass hybrid F_1 [J]. Chinese Journal of Grassland, 2013, 35(6): 40-45.
- [25] Mori S, Yamane T, Yahata M, et al. Chromosome doubling in *Limonium bellidifolium* (Gouan) Dumort. by colchicine treatment of seeds [J]. The Horticulture Journal, 2016, doi: 10.2503/hortj.MI-117.
- [26] 李 洁, 石凤翎, 卞晓燕, 等. 秋水仙素诱导直立型扁蓿豆多倍体的研究 [C]//中国草学会牧草育种委员会. 中国草学会牧草育种委员会第七届代表大会论文集. [出版地不详]: 中国草学会牧草育种委员会, 2009.
- Li J, Shi F L, Bian X Y, et al. Polyploidy induction of *Melilotoides ruthenicus* (L.) Sojak cv. Zhilixing by colchicines [C]//China Grass Society Pasture Breeding Committee. The Chinese society of grass forage breeding committee proceedings of the seventh congress. [S. l.]: China Grass Society Pasture Breeding Committee, 2009.
- [27] 张 颖. 羊草与灰色赖草杂种 F_1 再生体系建立及染色体加倍的研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2007.
- Zhang Y. Studies on system of plant regeneration and chromosome doubling of the hybrid between *Leymus chinensis* and *Leymus cinereus* [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2007.