

人工诱变芦荟多倍体的初步研究

任清¹, 李守勉², 姚彬¹, 王潇潇¹

(1. 北京工商大学植物资源研究开发重点实验室, 北京 100037; 2. 河北农业大学园艺学院, 河北保定 071001)

摘要: 以秋水仙素为诱变剂, 利用茎段浸泡和秋水仙素培养基 2 种方法对库拉索芦荟进行诱变, 结果表明, 茎段浸泡秋水仙素法诱导四倍体葡萄的效果优于秋水仙素培养基法, 0.2% 的秋水仙素处理 4 d 变异效果最好, 诱变率达到最高值 41.5%。变异株叶片肥厚, 叶色深绿, 叶片表皮气孔保卫细胞中叶绿体数增多。

关键词: 芦荟; 秋水仙素; 多倍体

中图分类号: S682.01 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2007)增刊-0136-03

Studies on Induction of Autotetraploid of *Aloe vera* L.

REN Qing¹, LI Shou-mian², YAO Bin¹, WANG Xiao-xiao¹

(1. Beijing Key Laboratory of Plant Resources Research and Development, Beijing Technology and Business University, Beijing 100037, China; 2. College of Horticulture, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

Abstract: Tetraploids were induced from in vitro *Aloe vera* L by soaking shoot segments in colchicine solution and adding colchicine in the culture medium. The results showed that the adding colchicine in the culture medium increased the efficiency of induced tetraploids than one of soaking treatment. The optimal conditions for inducing tetraploids were adding colchicine in the culture medium for 3 to 4 d with colchicine at a concentration of 2 000 mg/L. The rate of induction was 41.5%. Compared with the diploids, the appearance of variations is distinct including plumper leaves and more chloroplasts in stomatal guard cells.

Key words: *Aloe vera* L.; Colchicines; Multiploid

大多数同源多倍体植物具有器官巨型化的特征, 表现在茎粗、叶大而厚、花和果实增大增重, 可以大幅度提高产量, 因此, 许多植物如甜菜、萝卜、葡萄、西瓜等已经成功诱变为多倍体^[1-3], 并应用到农业生产上, 创造了巨大的经济效益。

芦荟(*Aloe vera* L.) 为百合科芦荟属多年生常绿肉质草本植物, 芦荟的叶中含有多种活性物质, 具有医疗、美容、保健、食用、观赏等多种功能^[4,5]。因此, 如果将芦荟诱变为同源四倍体, 可望大幅度提高芦荟产量及有效成分的含量, 提高其观赏价值和经济价值。然而, 关于诱变芦荟多倍体研究的报道非常少, 仅有刘俊等^[6]作过该项研究, 使用的方法是用蘸有秋水仙素溶液的棉花覆盖外植体。在植物组织培养基中添加秋水仙素进行诱变是非常安全有效的一种方法, 本研究采用该方法在芦荟组织培养基中

添加秋水仙素对芦荟进行诱变, 以期获得生理性状和经济性状俱佳的四倍体芦荟。

1 材料和方法

1.1 材料

库拉索芦荟(*Aloe vera* L.) 由北京工商大学植物资源研究与开发重点实验室栽培。

1.2 方法

1.2.1 库拉索芦荟组织培养 选取无病虫害的健壮芦荟植株, 剥去外围的老叶, 选取基部幼茎, 用清水冲洗、灭菌、消毒, 接种于 MS+ 6-BA 3 mg/L+ NAA 0.2 mg/L 的新鲜培养基上培养, 培养条件: 温度 26℃, 光照强度为 3 000 lx 左右, 每天连续光照 14 h。3 周后, 继代快繁。

1.2.2 库拉索芦荟多倍体的诱变 方法 1: 组织培

收稿日期: 2007-03-25

作者简介: 任清(1969-), 男, 河北康保人, 讲师, 博士, 主要从事植物资源研究开发工作

通讯作者: 李守勉(1978-), 女, 河北泊头人, 助教, 硕士, 主要从事食用菌教学与研究工。

养法, 选取叶片长为 3~4 cm 的芦荟无菌苗, 转接到含有秋水仙素的培养基上 (MS+ 6-BA 3 mg/L+ NAA 0.2 mg/L), 秋水仙素的浓度分别为 0.1%, 0.2%, 0.3%, 培养条件不变, 分别诱变培养 2, 4, 8 和 12 d, 诱变处理结束后, 将经诱变处理的芦荟无菌苗转接到普通培养基上继续培养, 每天观察幼苗生长情况, 待变异株完全成活后, 统计变异株的数量, 计算变异株成活率, 变异株成活率= 成活变异株数/ 处理苗数。

方法 2: 茎部浸泡法, 选取叶片长为 3~4 cm 的芦荟无菌苗, 分别用浓度为 0.1%, 0.2%, 0.3% 的秋水仙素溶液浸泡基部幼茎 12, 24, 48 和 96 h, 处理结束后, 将芦荟苗洗净, 灭菌消毒, 接种于普通培养基上继续培养, 每天观察幼苗生长情况, 待变异株完全成活后, 统计变异株的数量, 计算变异率, 变异率= 成活变异株数/ 处理苗数。

以出现外形变异的植株为材料作气孔观察, 取芦荟二倍体和变异体单位面积下的 20 个气孔, 计气孔保卫细胞中叶绿体数, 并进行方差分析。

1.2.3 变异株的初步鉴定

1.2.3.1 变异株的形态变化 选取发育时间相同的普通二倍体芦荟和变异株材料各 10 株, 分别测量其叶片长、宽和厚度, 比较普通二倍体芦荟和变异株形态变化。

1.2.3.2 变异株的细胞学鉴定 选取普通二倍体芦荟和变异株材料, 从叶表面撕下表皮, 放在载玻片上滴一滴清水, 在显微镜下观察气孔保卫细胞大小, 并对气孔保卫细胞中叶绿体计数。

2 结果与分析

2.1 不同诱变方法对植株的影响

在培养基培养法中, 经诱变处理的芦荟苗生长受到抑制, 由诱变培养基转到普通培养基, 生长速度明显变慢, 7 d 后, 经诱变处理的芦荟苗形态特征发生变化, 变异植株新生叶片变粗变壮, 部分芦荟苗叶片呈半透明水渍状, 随后出现褐色坏死斑, 随着坏死斑的逐渐扩大, 这些幼苗逐渐死亡, 幼苗的死亡率与秋水仙素浓度和处理时间直接相关 (表 1), 同浓度的秋水仙素, 随着处理时间的延长, 死亡率升高, 相同的处理时间, 随着浓度的提高, 死亡率亦快速升高。成活的变异植株叶片肥厚, 叶色深绿, 秋水仙素浓度为 0.1% 时, 随着处理时间的延长, 诱变率提高, 诱变 6 d 时诱变率达到最高值 36%, 诱变 8 d 时, 诱变率下降为 29.5%, 这是由于处理时间长而导致大量幼苗死亡造成的; 当秋水仙素浓度为 0.2% 时,

诱变 4 d 时诱变率达到最高值 41.5%; 同样, 秋水仙素浓度为 0.3% 时, 诱变 4 d 时诱变率达到最高值 41.5%, 综合各处理条件, 以 0.2% 的秋水仙素处理 4 d 变异效果最为理想。

表 1 组织培养法诱变处理库拉索芦荟的死亡率和变异率

Tab 1 The rates of death and variation of *Aloe vera* L by adding colchicines in the culture medium

秋水仙素浓度 / % Concentration of colchicines	处理时间 / d Time of treatment	死亡率 / % Rate of death	变异率 / % Rate of variation
0.1	2	5.0	18.5
	4	15.8	35.0
	6	22.0	36.0
	8	34.7	29.5
0.2	2	10.0	21.5
	4	18.2	41.5
	6	28.0	38.5
	8	38.5	26.5
0.3	2	15.5	25.5
	4	23.6	30.5
	6	33.4	29.5
	8	48.0	17.3

在茎部浸泡法中, 诱变处理对芦荟苗造成的伤害非常明显, 由诱变培养基转到普通培养基, 生长速度明显变慢, 5 d 后, 经诱变处理的芦荟苗形态特征发生变化, 大部分变异植株出现病变, 新生叶片出现褐色坏死斑, 根部溃烂, 随着病变加重, 这些幼苗逐渐死亡, 幼苗的死亡率与秋水仙素浓度和处理时间直接相关 (表 2), 秋水仙素浓度越高, 处理时间越长, 死亡率越高。由于处理苗死亡率较高, 因而处理苗的变异率较低, 相对来说, 以 0.2% 的秋水仙素处理 64 d 变异效率最高, 达到 20.8%, 仅是组织培养法最高变异率的一半。

表 2 茎部浸泡法诱变处理库拉索芦荟的死亡率和变异率

Tab 2 The rates of death and variation of *Aloe vera* L by adding colchicines in the culture medium

秋水仙素浓度 / % Concentration of colchicines	处理时间 / h Time of treatment	死亡率 / % Rate of death	变异率 / % Rate of variation
0.1	12	55.0	10.5
	24	58.5	13.6
	48	78.0	17.8
	96	83.5	15.5
0.2	12	65.5	11.5
	24	70.5	16.5
	48	79.2	20.8
	96	88.4	10.5
0.3	12	75.5	10.5
	24	83.6	16.5
	48	100	0
	96	100	0

2.2 变异株的初步鉴定

2.2.1 变异株的形态变化 与普通二倍体植株相比较, 变异株形态发生了明显的变化(表3和图1), 株型离散, 叶片外展, 叶片肥厚粗壮, 叶片宽度和厚度显著大于普通二倍体植株叶片, 叶色深绿。这些形态特征体现了多倍体植株的巨大性, 与其他植物多倍体的特性相一致。

表3 变异株与二倍体植株的外部形态比较

Tab 3 Comparison of characters between diploid and mutant plants

材料 Materials	叶长/cm Length of leaf	叶宽/cm Width of leaf	叶厚/cm Thickness of leaf
变异株 Mutant plant	3.30	0.92	0.27
对照株 Diploid plant	2.82	0.45	0.15

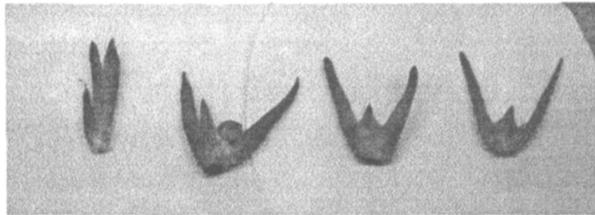


图1 变异株与普通二倍体植株

Fig 1 Diploid and mutant plants

表4 变异株与二倍体植株的保卫细胞中叶绿体数目比较

Tab 4 Comparison of chloroplast numbers in guard cells between diploid and mutant plants

材料 Materials	保卫细胞中 叶绿体数 Chloroplast numbers in guard cells	方差 Variance	显著性测验 Significant test
变异株 Mutant plant	60.3	1.23	A
对照株 Diploid plant	26.5	1.06	B

2.2.2 变异株的细胞学鉴定 与普通二倍体芦荟相比较, 变异株叶片表皮气孔保卫细胞大小没有发生明显变化, 但是, 保卫细胞中叶绿体数明显增多(表4, 图2和图3), 差异达极显著水平。叶片表皮气孔保卫细胞变大和保卫细胞中叶绿体数增多是植物同源多倍体的普遍特征, 也是多倍体鉴定的重要方法。然而, 本试验中经诱变处理的芦荟变异株只是保卫细胞中叶绿体数明显增多而保卫细胞大小没有发生明显变化, 这些现象是多倍体芦荟特有的特征, 还是芦荟变异株为嵌合体造成的, 需要进一步研究确证。

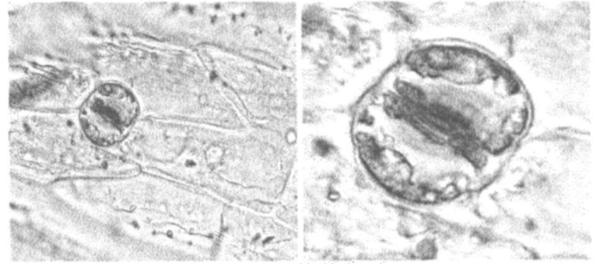


图2 二倍体气孔

Fig 2 Stomatal of diploid plant

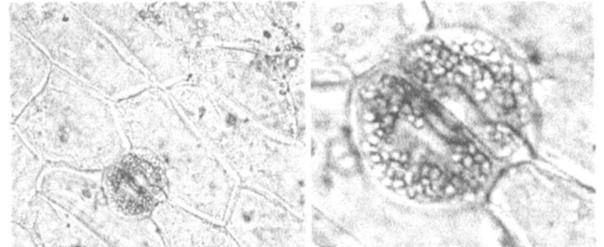


图3 变异体气孔

Fig 3 Stomatal of mutant plant

3 结论

总结试验结果, 秋水仙素诱变处理对芦荟苗造成的伤害非常明显, 而且浓度越大, 处理时间越长, 幼苗受到的伤害越大; 就诱变效果来说, 组织培养法优于茎部浸泡法, 以0.2%的秋水仙素处理4d变异效果最好, 变异株形态表现巨大性, 叶片表皮气孔保卫细胞变大而保卫细胞中叶绿体数增多, 变异株是否是多倍体, 以及多倍体的倍性结构如何, 需要通过分生组织细胞染色体数等方法进一步鉴定。

参考文献:

- [1] 巴拉诺夫(鲍文奎译). 植物多倍体[M]. 北京: 科学出版社, 1959.
- [2] 梁风山, 罗耀武. 多倍体及其在农业生产中的应用[J]. 国外农学—杂粮作物, 1999, 19(2): 20-30.
- [3] 常金华, 任清, 罗耀武. 人工诱变四倍体玫瑰香葡萄的倍性鉴定[J]. 核农学报, 2003, 17(3): 221-224.
- [4] 李文亭. 芦荟研究新进展[J]. 深圳中西医结合杂志, 1998, 8(1): 41-48.
- [5] 刘芬. 芦荟的组培与快繁技术的研究[J]. 甘肃农业科学, 2001, 7: 46-47.
- [6] 刘俊, 卢向阳, 刘选明, 等. 同源四倍体芦荟的诱导研究[J]. 湖南大学学报, 2002, 29(1): 8-12.