

### 3 种桑品种多倍体诱导初步研究

高丽霞 (河池学院化学与生物工程学院, 广西宜州 546300)

**摘要** [目的]建立广西常见桑树品种的多倍体诱导体系。[方法]采用不同浓度秋水仙素对3个品种的桑树进行处理,研究3种品种桑树的多倍体诱导体系;并在染色体数目鉴定的基础上,对多倍体桑幼苗性状进行描述。[结果]浓度0.3%的秋水仙素浓度处理效果最好。3种桑品种中,桂桑优62诱导率最高。四倍体植株的气孔大小和气孔数量均与二倍体植株有显著差异( $P < 0.05$ ),可辅助鉴定桑树倍性。[结论]该方法建立了广西常见桑树品种的多倍体诱导体系,为桑树的进一步开发利用提供了依据。

**关键词** 广西;桑树;多倍体

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2013)32-12557-03

#### Primary Study on Polyploid Induction of Three Kinds of Mulberry

GAO Li-xia (School of Chemical and Biological Engineering, Hechi University, Yizhou, Guangxi 546300)

**Abstract** [Objective] To establish polyploidy induction system of common mulberry variety in Guangxi. [Method] Three kinds of mulberry were treated by different concentration of colchicine, the polyploidy induction system was studied; on the basis of chromosome number identification, the traits of polyploidy mulberry seedlings were described. [Result] 0.3% colchicine has the best effect. The induction rate of Guisangyou 62 is the highest. The stomatal size and stomatal number of tetraploid plants has significant difference ( $P < 0.05$ ) with diploid plants. [Conclusion] Polyploidy induction system of common mulberry variety in Guangxi was established, which will provide a basis for further development and utilization of mulberry.

**Key words** Guangxi; Mulberry; Polyploid

桑树是重要的多年生木本经济作物,是发展蚕业生产的重要物质基础。因为其生物学产量主要来自于营养体,所以多倍体诱导在桑树育种中占有重要地位。多倍体较二倍体有一定的优势,主要表现在形态特征、组织结构、细胞结构和生理生化等方面。日本、前苏联、印度等从事桑多倍体的研究较早,且先后育成了一批优质高产的人工三倍体。日本在20世纪初叶,查明了桑树染色体组为 $2n = 28$ ,同时发现了许多天然多倍体的存在,前苏联、印度等也都相继开展了桑品种资源普查和育种研究。由于桑的三倍体、四倍体有较好的经济性状,因而人工多倍体诱导与培育的研究,引起了国内外学者的密切关注<sup>[1-2]</sup>。

目前,运用比较普遍的诱导桑多倍体的方法分为物理诱导和化学诱导。在物理诱导法中,主要包括温度激变和物理辐射等2种途径,最常用的是用 $^{60}\text{Co} \sim \gamma$ 射线辐照早春萌芽前无性繁殖的良种苗木或穗条的动压或略膨芽;而化学因素则是利用秋水仙碱,异生长素、萘腈乙烷等化学药剂处理正在分裂的细胞,以诱导染色体加倍<sup>[3]</sup>。其中,利用秋水仙碱使植物细胞染色体加倍,在实验室条件下,以浓度0.1%~0.4%的秋水仙碱溶液,处理无性繁殖的苗木或幼树的刚萌动的冬芽或新梢生长点,处理有性的种子或实生幼苗的生长点,均能诱导出多倍体植株。但是利用广西常见品种进行系统的桑树多倍体诱导研究鲜有报道。笔者利用不同浓度的秋水仙碱处理不同品种的桑种子及其实生苗,分析其处理效果,以期建立桑的多倍体诱导体系。

#### 1 材料与与方法

##### 1.1 材料 桂桑优62、粤桑11号和沙2×伦109 3个桑树

**基金项目** 广西教育厅面上项目(200911MS216);广西自然科学基金青年基金(2010GXNSFB 013045)。

**作者简介** 高丽霞(1980-),女,山东泰安人,副教授,从事桑树种质资源创新方面的研究。

**收稿日期** 2013-10-21

品种的种子。

#### 1.2 方法

**1.2.1 桑品种萌发率的测定**<sup>[4]</sup>。桑种均保藏在4℃、干燥低氧的冰箱中,由于长时间置于低温干燥环境,在进行诱导多倍体试验前,需对其进行萌发活力的测定。

**1.2.2 秋水仙碱处理桑种及其实生苗。**①取1g/L秋水仙碱溶液分别配制成浓度分别为0.1%、0.2%、0.3%和0.4%的秋水仙碱溶液。浸渍法将充分洗净的桑种分别加入4种不同浓度秋水仙碱溶液中,置于26℃恒温培养箱,静置24h。后清水清洗3~4次,分别置入培养皿,培养皿,置于26℃恒温培养箱,静置,观察并记录。②桑种萌发后,待幼苗子叶展开期用浓度0.1%~0.4%秋水仙碱溶液,滴于生长点,尽量使药液置留于生长点处(可使用小棉球浸润辅助,阴天时浓度稍高),每天1~2次,连续4~7d<sup>[5-6]</sup>。

**1.2.3 染色体观察与叶片气孔情况观察。**对于桑染色体标本的制备,采用的是酸解去壁低渗法<sup>[7]</sup>对桑根尖分生区组织和成活实生苗的幼叶及嫩芽进行处理,改良苯酚品红染色压片观察。由于染色体计数相对复杂,分别对四倍体和二倍体进行叶片气孔观察,以建立倍性的快速检验方法。

#### 2 结果与分析

**2.1 3种桑品种萌发活力鉴定结果** 桂桑优62的萌发所需的时间短,萌发率高且稳定,粤桑的萌发时间为6~8d,萌发率较前2种略低,但萌发后生长速度较快,沙2×伦109萌发所需要的时间是最长的,萌发率相对较低。

表1 实验室条件下桑品种萌发情况

品种	颗粒数	萌发数	萌发率//%	萌发时间//d
桂桑优62	120	109	91	4
粤桑11号	120	108	90	6
沙2×伦109	120	98	82	8

注:均在试验环境条件(26℃,恒温常压)下,测定时间2012年3月。

**2.2 秋水仙碱诱导桑多倍体** 试验结果表明,采用4种不同浓度的秋水仙碱进行诱导后,桑种都出现了不同程度的萌发时间延长,生长抑制、滞缓甚至死亡。浸渍法处理后的桑种,其萌发时间延缓,萌发率降低;滴液法处理桑实生苗生长点,其生长枝往往出现节间缩短,芽序紊乱,枝叶畸形;但随时间推移,枝叶形态及生长逐渐恢复常态。秋水仙碱处理后,发芽率情况如表2所示,发芽率均大幅度下降,萌发时间也相应推后。品种之间,对秋水仙碱的抗性差异较大,桂桑优62较其他2种发芽率下降较少。用滴液法处理生长点后带来的畸形情况见表3。

表2 不同浓度秋水仙碱处理桑种的萌发情况

品种	处理浓度 %	颗粒数	萌发率		萌发时间 d
			萌发数	%	
桂桑优62	0.1	200	46	29.5	5~7
	0.2	200	59	29.0	5~6
	0.3	200	47	23.5	5~6
	0.4	200	58	23.0	5~7
沙2×伦109	0.1	200	11	9.5	6~8
	0.2	200	19	8.5	5~7
	0.3	200	17	6.0	5~6
	0.4	200	12	5.5	6~7
粤桑11号	0.1	200	15	11.5	7~9
	0.2	200	18	9.0	8~9
	0.3	200	23	7.5	8~10
	0.4	200	13	6.5	9~10

表3 不同浓度秋水仙碱处理实生苗的生长情况

品种	处理浓度 %	颗粒数	大小叶	子叶未展开		畸形率 %
				展开	%	
桂桑优62	0.1	200	13	6	10	
	0.2	200	23	4	14	
	0.3	200	15	7	11	
	0.4	200	9	13	11	
沙2×伦109	0.1	200	10	6	8	
	0.2	200	17	3	10	
	0.3	200	8	5	7	
	0.4	200	11	9	10	
粤桑11号	0.1	200	8	3	6	
	0.2	200	10	7	9	
	0.3	200	9	6	8	
	0.4	200	7	12	10	

**2.3 不同秋水仙素浓度对桂桑优62诱导率的影响** 通过发芽率测定得知,秋水仙素对桂桑优62发芽率影响相对较小,因此试验统计了不同浓度秋水仙素对桂桑优62诱导率的影响,结果见表4。在处理浓度为0.3%时,其诱导率最高,达33.3%;而浓度0.1%时诱导率仅为10.0%。结果表明,提高处理浓度可以提高诱导率。

表4 不同处理浓度对诱导率的影响

处理浓度//%	样本数	倍体		诱导率//%
		2倍体 (2n=28)	4倍体 (2n=56)	
0.1	30	27	3	10.0
0.2	30	24	6	20.0
0.3	30	20	10	33.3
0.4	30	21	9	30.0

**2.4 不同品种间诱导率比较** 选取浓度0.3%秋水仙碱对3个品种的种子进行处理观察,倍性情况见表5,诱导率在13.3%~33.3%。采用4种秋水仙素浓度对3个品种进行处理发现,3个品种中以桂桑优62的诱导率最高。

表5 不同桑品种的染色体数

品种	样本数	倍体		诱导率//%
		2倍体 (2n=28)	4倍体 (2n=56)	
桂桑优62	30	20	10	33.3
沙2×伦109	30	23	7	23.3
粤桑11号	30	26	4	13.3

**2.5 不同倍性材料间气孔情况比较** 由于染色体计数比较麻烦,在染色体鉴定的基础上,对多倍体的形态性状进行了描述,并参照杨今后取实生苗幼叶对其气孔大小和数目进行了制片观察<sup>[6]</sup>。由表6可知,不同倍数性桑叶气孔保卫细胞内叶绿体之间有极显著的差异( $P < 0.01$ ),而同一倍数体内的品种间却不存在显著差异( $P < 0.05$ )。同时,气孔的大小以倍数性高的为大,单位叶面积内的气孔数以倍数性高的较少。然而,用叶片气孔计数测定染色体内的倍数性,与直接压片或切片观察染色体不一样,其是系统统计结果的比较,至于是否能得出某一倍数性品种叶片气孔的平均数,还需要大量材料的调查和统计。

表6 不同桑品种叶片气孔大小及其密度

品种	样本数	处理浓度 %	气孔平均		单位叶面积内 气孔数//个/mm <sup>2</sup>
			大小 μm	大小 μm	
桂桑优62	30	-	10.6×9.8		(187.6±13.6)
	30	0.3	12.6×11.3		(178.3±14.2)
沙2×伦109	30	-	12.3×11.5		(143.8±10.5)
	30	0.3	15.1×14.6		(139.1±12.7)
粤桑11号	30	-	10.9×11.4		(167.9±9.3)
	30	0.3	13.7×12.4		(153.5±9.7)

### 3 讨论

**3.1 不同处理部位对诱导率的影响** 试验还调查了种子处理和滴液处理的诱导率情况,单从根尖染色体情况统计,种子处理诱导率高于滴液处理。但是,滴液处理后,容易出现诱变的枝条,可以作为今后扦插的材料,所以2种方法均可用于多倍体诱导。幼苗经试验处理后,生长受抑制,开叶生长缓慢。初开叶片皱缩变形,叶色浓绿,叶肉厚。经2周后才逐渐有部分株长出正形叶片。桑诱变后,首先出现一系列形态方面的变化。如果诱变的是芽, V<sub>1</sub>代新生枝就会变现为致死,发芽迟缓,发芽后枯萎,成熟芽生长迟缓等。典型枝上有3段明显不同的区段。基部8~10叶畸形(畸叶枝段);中部4~12个芽形态不整,几乎不长叶或只有托叶或畸形小叶(无叶枝段);上部逐渐表现正常(正常枝段),γ射线辐射和秋水仙碱诱变后有类似的表现。其中,畸叶枝段变异率最高。

据前人研究发现,在试验的药液浓度与滴药天数的范围内,浓度越大,滴药次数越多,持续时越长,对幼苗的影响越大,成活率越低。其中药液浓度的影响大于处理时间<sup>[2,6]</sup>。试验结果表明,在所设置的浓度范围内,秋水仙素对种子的

发芽率及幼苗畸形率的影响跟前人研究相似。

**3.2 多倍体与二倍体之间的性状差异** 研究多倍体与二倍体之间的差异,能有效辅助多倍体植株的鉴别,并能有效解决染色体鉴别效率低的问题。两者差异归纳起来有以下几个方面:①形态特征方面。四倍体较二倍体叶片变大增厚,叶色加深,片叶重和单位叶面积重均增加,枝条数减少,矮壮,皮木粗糙,叶序不规则等。三倍体的外形介于四倍体、二倍体之间,但枝条数量和生长高度较二者旺盛,枝条直立性与伸长性能好,芽再发性能强,发根性也好,叶片大于亲本二倍体,营养生长旺盛,有交大增产潜力。②组织结构方面。四倍体叶片海面组织显著增厚,栅栏组织和好眼组织薄壁细胞巨大而排列疏松,叶脉维管束厚壁细胞巨大,叶脉粗壮。桑叶气孔的大小随倍数性的增加而变大,单位面积的气孔数量随倍数性的增加而减少。但单位面积的气孔口近似面积,

(上接第 12541 页)

离出来,经适当清洗后,在高 pH 和低盐溶液中脱附即得到纯化核酸。王雅凡等采用溶剂热方法合成  $Fe_3O_4$  磁性微球,在其表面进行硅包覆,将其应用于蓖麻叶染色体 DNA 提取<sup>[11]</sup>。具体方法为:利用透射电子显微镜(TEM),红外光谱仪(FT-IR),振动磁强计(VSM)对合成的磁性微球进行表征,用磁性固相提取法和氯仿-异戊醇抽提法对比,提取蓖麻叶染色体 DNA,最后分别测定 DNA 在 260 和 280 nm 下的吸光度,得到  $A_{260}/A_{280}$ ,并对 2 种方法提取 DNA 的纯度及产率进行了比较。结果表明,合成的硅包覆的磁性微球粒径均匀、具有超顺磁性和高饱和磁含量。对蓖麻叶染色体 DNA 提取发现,  $A_{260}/A_{280}$  达到 1.83,产率为 0.556 mg/g。与传统氯仿-异戊醇抽提法相比,基于硅包覆磁微球的磁固相提取 DNA 方法具有操作简便,周期短,提取率高,不需要有毒的化学试剂,产品纯度高等优点。

**1.4 DNA 提取试剂盒法优化** 黄凤兰等利用 DNA 提取试剂盒提取蓖麻叶片 DNA 并对其过程进行改良优化,在原试剂盒的操作基础上,对乙醇进行冰预冷,消化时间改为 50 min、采用 60  $\mu$ l 洗脱液用量、材料用量改为 100 mg 等 4 项改良处理,并对所提取的基因组 DNA 的浓度和纯度进行了检测,优化后的方法提取到了较高质量的蓖麻基因组 DNA<sup>[12]</sup>。

**1.5 酚-氯仿法及其优化** 酚-氯仿法原理是首先酚使蛋白质变性,同时抑制了 DNase 的降解作用,蛋白分子溶于酚相,而 DNA 溶于水相,氯仿有加速有机相与液相分层的作用,最后用氯仿抽提,去除核酸溶液中的微量酚。对于 SRAP-PCR 扩增效果对模板 DNA 的浓度不敏感,而对其完整性要求很高<sup>[13]</sup>。毕川等采用改良的酚-氯仿法提取蓖麻基因组 DNA,在提取剂中增加 PVP 和  $\beta$ -巯基乙醇的含量,裂解完毕后加入醋酸钠溶液以除去多糖,得到 DNA 的 OD 值为 1.8~2.0,经电泳检测显示条带明亮整齐,无拖尾现象,扩增效果理想,所提取 DNA 的纯度、浓度和完整性均符合 SRAP-

三倍体、四倍体、六倍体都比二倍体大。③细胞结构方面。多倍体细胞均比二倍体大,保卫细胞增大,所含叶绿体数量增加 23%~50%。

## 参考文献

- [1] 杨新华,杨今后,骆承军. 桑树多倍体育种的回顾与展望[J]. 浙江农业科学,2000(6):306-308.
- [2] 郭展雄,肖更生,苏大道. 秋水仙素处理桑树杂种实生苗诱导四倍体植株的研究[J]. 蚕业科学,1989,15(1):13-16.
- [3] 林强,朱方容,邱长玉,等. 广西四倍体桑种质资源研究进展[J]. 广西农业科学,2009,40(7):923-927.
- [4] 覃初贤,白景彰,黄贤帅,等. 桑种冷藏技术与效果分析[J]. 广西蚕业,2005,42(4):34-36.
- [5] 东成功. 桑树多倍体的研究及其应用[J]. JARQ,1985,18(3):222-228.
- [6] 杨今后. 桑树四倍体的诱导及其应用[J]. 蚕业科学,2004,30(1):6-10.
- [7] 潘一乐. 桑树根尖细胞染色体的检查技术[J]. 蚕业科学,1980,6(3):195-196.

PCR 扩增试验的要求<sup>[14]</sup>。

## 2 小结

随着蓖麻被更多的应用于生产及社会各个领域,对蓖麻进行品种鉴定、遗传分析、种质资源鉴定等研究也会更多更广<sup>[15]</sup>,各国在蓖麻资源综合开发方面的专利,正以每年 250 多项的速度增加,尤其在分子生物学方面进展极为迅速。对蓖麻 DNA 的提取纯度的要求也越来越高, DNA 提取方法的改进需求已然成为重要研究方向。

## 参考文献

- [1] 宋艳波,吴国良,牛洪斌. 改良 CTAB 法在核桃叶片基因组 DNA 提取中的应用研究[J]. 山西农业大学学报:自然科学版,2011,31(2):109-112.
- [2] 卢东柏,李晓方,刘志霞. 改良 SDS 法提取棉花基因组 DNA 研究[J]. 广东农业科学,2008(5):23-25.
- [3] 王爱迪,冉晓华,陈磊,等. 超强磁性微球提取深加工转基因食品 DNA [J]. 食品科学,2013,34(10):130-133.
- [4] 周旋,王丽,夏曙华,等. 全血 DNA 提取试剂盒改良法[J]. 检验医学与临床,2005(4):168-169.
- [5] 马洪雨,郭金峰,岳永生. 用改进的酚-氯仿法提取鱼类基因组 DNA 效果的分析[J]. 家畜生态学,2006,27(2):85-87.
- [6] BOSTEIN D, WHITE R L, SKOLNICK M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism [J]. Genet, 1980, 32:314-331.
- [7] 樊锦春,黄海涛. 蓖麻的开发利用与栽培技术[J]. 上海农业科技,2003(1):90-92.
- [8] 蒋细旺,包满珠,李智崎,等. 菊花 DNA 提纯方法的优化[J]. 江汉大学学报,2002,19(3):42.
- [9] 王亚. 蓖麻单雌性状的 ISSR 分析[D]. 太原:山西大学,2010.
- [10] 黄文霞,何觉民,朱宏波. 一种适于 PCR 扩增的蓖麻基因组 DNA 提取方法[J]. 中国农学通报,2007,23(11):61-63.
- [11] 王雅凡,黄艳凤,杨华,等. 制备硅包覆的磁性微球用于蓖麻叶 DNA 的提取[J]. 现代生物医学进展,2010,17(10):3205-3208.
- [12] 黄凤兰,郭志强,孟凡娟,等. 试剂盒法提取蓖麻基因组 DNA 的条件优化[J]. 内蒙古民族大学,2010,25(1):29-33.
- [13] 黄文霞,何觉民,朱宏波. 一种适于 PCR 扩增的蓖麻基因组 DNA 提取方法[J]. 中国农学通报,2007,23(11):61-63.
- [14] 毕川,刘思洁,余晓琴,等. 蓖麻纯合骨干亲本的亲缘关系分析[J]. 广东农业科学,2010(8):191-193.
- [15] 任玉,王得无,张银东. 相关序列扩增多态性(SRAP)——一种新的分子标记[J]. 中国农学通报,2004,20(6):11-13.