

植物多倍体诱导方法研究进展

汤迪霏^{1,2*}, 袁晓伟^{1,2#}, 郭仰东^{2#}, 李兴盛¹

¹山东省华盛农业股份有限公司, 山东 青州

²中国农业大学园艺学院, 北京

Email: 18390872971@163.com, #yuanxiaowei@huashengseed.com, #yaguo@cau.edu.cn

收稿日期: 2021年3月15日; 录用日期: 2021年5月13日; 发布日期: 2021年5月24日

摘要

植物染色体多倍化在育种、生产中有非常重要的意义。本文综述了诱导植物多倍体的主要方法, 有物理诱导法、化学诱导法以及其他方法。有望为今后多倍体技术的研究及应用提供理论依据。

关键词

植物多倍体, 诱导, 研究进展

Advances in Plant Polyploid Induction

Difei Tang^{1,2*}, Xiaowei Yuan^{1,2#}, Yangdong Guo^{2#}, Xingsheng Li¹

¹Shandong Huasheng Agriculture Co., Ltd., Qingzhou Shandong

²College of Horticulture, China Agricultural University, Beijing

Email: 18390872971@163.com, #yuanxiaowei@huashengseed.com, #yaguo@cau.edu.cn

Received: Mar. 15th, 2021; accepted: May 13th, 2021; published: May 24th, 2021

Abstract

Plant polyploidy is of great significance in breeding and production. In this paper, the main methods of inducing plant polyploids are reviewed, including physical induction, chemical induction and other methods. It is expected to provide theoretical basis for the research and application of polyploid technology in the future.

Keywords

Plant Polyploidy, Induction, Research Progress

*第一作者。

#通讯作者。



1. 引言

植物体细胞中含有三套或三套以上染色体组被称为多倍体。自然界中常见的植物以二倍体居多，研究发现了一些天然多倍体，其染色体数目增多，生长健壮、器官增大、营养物质含量增高，抗逆性增强，是理想的育种材料。通过对同源四倍体水稻的研究发现四倍体植株出现分蘖增多，有短芒，剑叶长、宽度显著增加，谷粒变长等性状，可提高水稻产量[1]。魏望指出在低温、高温、干旱、盐碱、病害条件下，多倍体植物通过调整细胞的大小和结构、调节生物膜系统、增强抗氧化系统活性、增加基因表达等方式增强了抗逆性[2]。

天然形成的多倍体发生频率低，难以被发掘。在育种、生产工作中我们可以通过人工诱导的方式获得多倍体。目前，诱导多倍体的研究已在很多方面取得进展。如多倍体植物的“巨大性”在观赏植物中就得到了广泛的应用[3]，观赏植株多倍体的花冠大且厚实，颜色深，花瓣多，茎较粗壮，耐倒伏，适应性强，光合作用强，育种家已在 30 多个科中育成具有高观赏价值的花卉品种[4]。植物多倍体在大田作物生产上也得到了应用，大面积种植的小麦是异源六倍体[5]，四倍体花生栽培种($2n = 40$, AABB)是世界上重要的油料和经济作物之一[6]，三倍体西瓜细胞分裂时染色体联会紊乱表现为无籽[7]等。

现如今，社会发展越来越快，人民对农作物的品质要求越来越高，诱导植物多倍体在农业发展上是一条切实可行的办法。寻找快速、稳定的生产多倍体植物的方法显得尤为重要。本研究综述了目前人工诱导多倍体植物的方法，可为多倍体在育种、生产中的应用提供理论依据。

2. 物理诱导多倍体

极端温度、温度激变、射线等方法都可以获得多倍体。通过模拟自然界中的极端温度可成功获得多倍体植株。在极端温度处理白杨雌花芽实验中[8]，三种白杨毛新杨、银毛杨和银腺杨均能诱导出三倍体植株，其中高温处理以 40°C 诱导率最高，低温处理以 -2°C 效果最佳。有研究表明，温度激变也可以筛选出植物多倍体，王凤宝[9]以低温 $1^{\circ}\text{C}\sim 3^{\circ}\text{C}$ 和高温 $30^{\circ}\text{C}\sim 35^{\circ}\text{C}$ 激变条件处理豌豆初期现蕾植株，发现有 $14.1\%\sim 18.2\%$ 的 $2n$ 花粉粒产生；在棚室低温 $0^{\circ}\text{C}\sim 3^{\circ}\text{C}$ 和高温 $30^{\circ}\text{C}\sim 35^{\circ}\text{C}$ 激变条件处理时，豌豆植株多倍体率有 $0.8\%\sim 1.6\%$ 。他认为这种方法相对于其他物理方法更加安全，但是适用的植物很有限。此外，射线处理也是一种诱导多倍体的方法。孙清荣[10]用 γ -射线照射梨试管苗，照射后对其叶片、顶芽、侧芽 3 种外植体分别接种，继代和筛选后获得了变异无性系，经染色体倍性鉴定，发现既有三倍体也有四倍体。

目前物理诱导植物多倍体还有很多不确定因素，以及射线照射幼苗危险性大等缺点。通过模拟自然界极端温度环境筛选多倍体植物虽然安全，但是诱导频率低，成本高，成功案例少。其他方法也都存在诱导率低、操作复杂、嵌合率高等问题，所以物理诱导方法尚在实验当中，在实际生产中应用有限。

3. 化学诱导多倍体

化学方法诱导多倍体即使用化学试剂处理植株使其染色体加倍，是目前为止最常用的方法。影响化学诱导效率的因素有很多，如诱导剂的选择、诱导方式的不同、诱导剂的浓度和处理时间等等。

3.1. 诱导剂的选择

秋水仙素是最常用的诱导染色体加倍的试剂。早在 1937 年 Avery, A. G [11]等就用秋水仙素处理并获

得四倍体曼陀罗，从此开启了秋水仙素诱导多倍体实验的热潮。它的作用原理是在细胞分裂时与微管蛋白二聚体结合，抑制纺锤体的形成，从而使细胞染色体加倍。但秋水仙素有剧毒且价格昂贵，研究人员一直在寻找其他诱变剂代替它。近年来研究发现除草剂安磺灵(Oryzalin)、氟乐灵(Trifluralin)、甲基胺草磷(APM)、戊炔草胺(Propyzamide)等也有诱导染色体加倍的能力，诱导原理和秋水仙素相似，毒性小且价格低廉。周玲云[12]研究发现用除草剂氟乐灵、二甲戊灵处理泸定百合的不定芽，均能够获得四倍体泸定百合。她认为和秋水仙素处理相比，除草剂的处理时间更短，材料死亡减少，变异率较高，且对人畜伤害小，成本低廉。除此之外，在诱导剂中添加辅助剂、渗透剂结合震荡等方式处理，亦可促进诱导剂效果。常用的渗透剂有二甲基亚砷(DMSO)、氮酮等。韩超[13]秋水仙素诱导尾巨核研究的结果表明：在添加渗透剂氮酮并使用摇床的情况下可使植株诱导率达到最大为 56%。A. Kato [14]用氧化亚氮气体处理单倍体玉米幼苗，结果发现处理后染色体加倍率达到 44%，而对照组中只有 11%单倍体自发染色体加倍。

3.2. 诱导方式

3.2.1. 体内诱导植物多倍体

诱变剂体内诱导植物多倍体应处理植物细胞分裂旺盛的部位。常用的方法有浸种、浸芽、滴苗、涂抹生长点等。在诱导西瓜四倍体的实验当中，施先锋[15]用 0.1%秋水仙素浸泡西瓜种子 24 h 诱导率最高为 4%。以 0.1%秋水仙素浸芽 12 h 时，三种基因型西瓜的变异率分别是 2.4%、3.6%和 2.7%。滴苗就是在幼苗子叶完全展开之前用诱导剂溶液滴浸幼苗生长点。在秋水仙素对直立型扁蓊豆的诱变效应研究[16]中，王璐用棉花球包裹生长点浸滴法和浸种浸芽法处理直立豌豆，发现浸滴法比浸种浸芽法植株成活率高，最佳的浸滴处理是 0.1%的秋水仙素和 1.0%的二甲基亚砷 24 h。阮玉娟[17]在诱导茉莉多倍体实验中发现滴液法的诱变效果优于涂抹法和浸泡法，但获得的变异株多为嵌合体，其中以 0.4%秋水仙素滴生长点法处理 3 d 和 5 d 时的诱变率最高，是 6.67%。

3.2.2. 体外诱导植物多倍体

近年来，随着组织培养技术的逐渐成熟，多倍体诱导与组培相结合的方法应用越来越多。与体内诱导相比，体外诱导效率高，试验条件容易控制，可尽早分离嵌合体[18]。A. T. Roy [19]在诱导蛇麻花(*Humulus lupulus* L.)四倍体实验中对新生叶片用流式细胞术方法检测倍性，检测得到加倍芽后再离体培养，既获得单纯的四倍体又缩短了育种的时间。

体外诱导中选择合适的材料很关键，丛生芽、愈伤组织、种子、子叶等均可作为诱导植物多倍体的材料。张晓曼[20]以田埂报春丛生芽为材料离体诱导多倍体，结果发现 0.08%的秋水仙素处理 48h 效果最佳，诱导率为 56%。张数鑫[21]用不同浓度秋水仙素处理大葱的愈伤组织，发现以 0.06%的秋水仙素处理 72 h 诱导率最佳，且不对愈伤组织产生严重伤害。莫官站[22]的研究则用秋水仙素处理甘菊种子获得甘菊多倍体。在西瓜组织培养过程中，张兴平[23]认为，子叶不同部位的组织再生不定芽的能力显著不同($p < 0.05$)，近胚轴端中心叶脉处的子叶组织再生能力最强。相反，远离胚轴的子叶边缘组织再生能力较差。袁建民[24]以子叶近胚轴、子叶远胚轴、茎段和根尖为外植体诱导不定芽，实验发现以子叶近胚轴为外植体诱导不定芽的诱导率为 92.0%，子叶远胚轴的诱导率只有 6.0%，而以茎段和根尖为外植体不能诱导出不定芽。

离体诱导的处理方法主要有浸泡法和混培法。目前浸泡法是最简便常用的方法，浸泡处理可以使外植体全面接触诱导剂，促进诱导，但是对材料毒害效果也比较大。考虑到浸泡法对外植体的毒害作用，混培法越来越受到人们的青睐。火龙果诱导体系的优化实验中，程志号[25]用浸渍法和混培法处理火龙果

无茵苗, 结果显示混培法诱导火龙果多倍体效率优于浸渍法, 最佳处理为 50 mg/L 秋水仙素混培 5 d。

3.3. 诱变剂的浓度和处理时间

不同作物不同基因型对诱变剂的敏感度是不同的。诱变剂浓度过低, 诱变效率低; 浓度过高, 植物细胞畸形或死亡所以诱变剂浓度应适中且处理时间不宜过长。在探究新型除草剂 Oryzalin 的浓度和处理时间对诱导彩色马蹄莲多倍体的影响实验中, 张锡庆[26]发现安磺灵浓度 0.0016% 时处理 36 h 效果最好, 植株变异率高达 34%。在秋水仙素水溶液和不同浓度胺磺灵除草剂滴苗处理诱导小型西瓜四倍体实验中, 赵胜杰[27]发现秋水仙素处理, 诱变频率基因型间差异较大, 高的可以达到 26.3%, 低的仅有 1.4%。张全美[28]实验发现离体诱导四倍体果型西瓜最佳的条件 200 mg/L 秋水仙素处理子叶 12 h, 诱导率有 57.1%。

综上所述, 化学方法诱导多倍体因操作简便、诱导率高在实际生产中应用较多。其中, 体内诱导多倍体操作相对简便, 但其诱导率低、诱导剂对植株伤害很大, 易受环境条件影响。体外诱导具有操作更好控制、诱导频率更高, 可以更早鉴定倍性等优点, 但其操作成本和操作难度比体内诱导高。

4. 其他方法诱导多倍体

4.1. 体细胞融合法

体细胞融合法是用纤维素酶和果胶酶处理植物细胞, 得到大量原生质体, 再通过聚乙二醇(PEG)或电融合法融合, 培养一段时间后诱导分化出的植株是多倍体。赵小强利用 PEG 成功融合了草地早熟禾新格莱德和午夜 2 号的原生质体, 获得了体细胞杂种愈伤组织[29]。该技术的发展是建立在组织培养和原生质体培养的基础上, 将倍性育种与杂交育种结合起来, 具有独特的优势。但是杂种细胞的融合率低, 使得这项技术在生产上的应用难以发挥。

4.2. 胚乳培养法

大多数被子植物的胚乳是胚囊的两个极核和一个精子融合的产物, 是三倍体组织, 所以通过胚乳培养可以获得三倍体植株。1982 年中国农科院郑州果树所第一次报道了可通过培养猕猴桃胚乳获得三倍体猕猴桃[30]。赵丹丹[31]对胚乳培养猕猴桃的条件进行了一系列实验, 研究了植物生长调节剂、暗培养、继代时间、秋水仙碱等对胚乳培养过程中染色体倍性的影响。结果发现: 在添加 0.2 $\mu\text{m/L}$ NAA + 5 $\mu\text{m/L}$ 6-BA 的培养基上可以获得更多的 3C 愈伤组织。但是胚乳培养法的胚乳是程序性退化组织, 分化难度较大, 胚乳愈伤组织继代培养中染色体数目不稳定, 其再生植株多为非整倍体, 目前很难应用到生产中去。

4.3. 农杆菌介导法

Tsayoshi Imai [32]等以 17 个二倍体株系马铃薯块茎为材料, 接种农杆菌。转化后发现其中四倍体占比 67%。在没有参与农杆菌转化的 78 株马铃薯中, 只有 27 株是四倍体, 诱导率仅 35%。他认为, 在马铃薯农杆菌转化过程中伴随着染色体的加倍。此法后续鲜少报道, 对实际生产意义甚微。

5. 展望

目前人工诱导多倍体方法已有很多, 但是可用于规模生产上的方法比较有限, 诱导染色体加倍时仍存在发生频率低、嵌合率高等问题。不同的农作物, 不同的基因型诱导方法都有差异, 还需要大量地重复试验。另外, 快速精准地筛选出诱导成功的植株可大大缩短育种时间, 所以有必要尽早鉴定植物倍性。

人类社会不断发展, 伴随着农作物生长季节气候多变, 提高作物抗胁迫能力一直是育种家所期望的, 而植物多倍体较二倍体染色体量多, 器官大, 营养物质含量高, 抵抗逆境能力强, 正是理想材料。多倍

体还可以克服远缘杂交的障碍。在提高作物品质方面,无籽西瓜的需求量也越来越大。总之,探索植物多倍体的研究将对农业创新发展有重要意义。

基金项目

泰山产业领军人才项目(LJNY201812)。

参考文献

- [1] 杨祥波,刘湘竹,曾宪伟,等.同源四倍体水稻的诱导研究[J].北方水稻,2019,49(6):27-29.
- [2] 魏望,施富超,王东玮,等.多倍体植物抗逆性研究进展[J].西北植物学报,2016,36(4):846-856.
- [3] 张红亮,朱永琴,李霞,姚先玲.植物多倍体育种的探讨[J].种子科技,2013,31(7):40-42.
- [4] 雷家军,王冲.观赏植物多倍体诱导研究进展[J].东北农业大学学报,2012,43(1):18-24.
- [5] 赵娜,亓宝,董芊里,等.普通小麦相关研究进展在遗传学理论教学中的应用[J].遗传,2020,42(9):916-925.
- [6] 贺梁琼,熊发前,高忠奎,等.花生属种间杂种及其早期多倍体世代生理特性变化研究[J].热带作物学报,2015,36(3):493-498.
- [7] 周谟兵,林友毫,彭金光,等.利用秋水仙素组培技术诱导四倍体西瓜的研究[J].长江蔬菜,2007(9):43-44.
- [8] 李云,朱之悌,田砚亭,张志毅,康向阳.极端温度处理白杨雌花芽培育三倍体植株的研究[J].北京林业大学学报,2000(5):7-12.
- [9] 王凤宝,付金锋,董立峰.低温-高温激变诱导豌豆多倍体研究[J].种子,2010,29(10):24-27,31.
- [10] 孙清荣,孙洪雁,祝恩元,等. γ -射线照射梨试管苗诱导产生多倍体变异[J].园艺学报,2009,36(2):257-260.
- [11] Blakeslee, A.F. and Avery, A.G. (1937) Methods of Inducing Doubling of Chromosomes in Plants by Treatment with Colchicine. *Journal of Heredity*, **28**, 393-411. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a104294>
- [12] 周玲云,邓敏,高素萍.离体条件下2种除草剂诱导泸定百合多倍体的比较研究[J].西北植物学报,2015,35(7):1470-1475.
- [13] 韩超,徐建民,陆钊华,李光友,陈儒香,曾炳山.秋水仙素诱导尾巨桉多倍体的研究[J].中国农学通报,2010,26(15):149-153.
- [14] Kato, A. and Geiger, H.H. (2002) Chromosome Doubling of Haploid Maize Seedlings Using Nitrous Oxide Gas at the Flower Primordial Stage. *Plant Breeding*, **121**, 370-377. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2002.743321.x>
- [15] 施先锋.西瓜多倍体诱导及倍性鉴定的研究[D]:[硕士学位论文].武汉:华中农业大学,2007.
- [16] 王璐.秋水仙素对直立型扁蓊豆诱变效应的研究[D]:[硕士学位论文].呼和浩特:内蒙古农业大学,2014.
- [17] 阮玉娟.秋水仙素诱导茉莉多倍体的研究[D]:[硕士学位论文].重庆:西南大学,2014.
- [18] 陈细清,樊燕,关亚丽.离体条件下诱导植物多倍体的研究进展[J].海南师范大学学报(自然科学版),2014(4):420-422.
- [19] Roy, A., Leggett, G. and Koutoulis, A. (2001) *In Vitro* Tetraploid Induction and Generation of Tetraploids from Mixoploids in Hop (*Humulus lupulus* L.). *Plant Cell Reports*, **20**, 489-495. <https://doi.org/10.1007/s002990100364>
- [20] 张晓曼,孙晓光,杨建民.田埂报春多倍体诱导及其形态学研究[J].植物遗传资源学报,2011,11(6):789-792.
- [21] 张数鑫,谢芝馨,于文杰,等.秋水仙素结合组织培养技术诱导大葱多倍体的研究[J].生物技术,2005,15(4):67-70.
- [22] 莫官站,张启翔,潘会堂,孙明.秋水仙素诱导甘菊多倍体研究[J].核农学报,2010,24(3):527-531.
- [23] Zhang, X.P., Rhodes, B.B. and Adelberg, J.W. (1994) Shoot Regeneration from Immature Cotyledons of Watermelon. *Cucurbit Genetics Cooperative*, **17**, 111-115.
- [24] 袁建民.小果型西瓜离体培养关键技术及四倍体诱导研究[D]:[硕士学位论文].海口:海南大学,2010.
- [25] 程志号,孙长君,孙佩光,等.火龙果多倍体诱导体系的优化[J].果树学报,2020,37(7):1089-1097.
- [26] 张锡庆,吴红芝,周涤,等.新型除草剂 Oryzalin 的浓度和处理时间对诱导彩色马蹄莲多倍体的影响[J].云南农业大学学报,2008,23(6):806-810.
- [27] 赵胜杰,刘文革,阎志红,等.秋水仙素和胺磺灵除草剂诱导小型西瓜四倍体研究[J].长江蔬菜,2010(8):12-13.

- [28] 张全美. 西瓜高效植株再生体系建立及四倍体离体诱导研究[D]: [硕士学位论文]. 杭州: 浙江大学, 2004.
- [29] 赵小强. 草地早熟禾原生质体培养及体细胞杂交[D]: [硕士学位论文]. 兰州: 甘肃农业大学, 2009.
- [30] 黄贞光, 皇甫幼丽, 徐乐茵. 猕猴桃胚乳培养获得三倍体植株[J]. 科学通报, 1982, 27(4): 247-250.
- [31] 赵丹丹. 猕猴桃胚乳培养与倍性变异的研究[D]: [硕士学位论文]. 杭州: 浙江大学, 2011.
- [32] Imai, T., Aida, R. and Ishige, T. (1993) High Frequency of Tetraploidy in Agrobacterium-Mediated Transformants Regenerated from Tuber Discs of Diploid Potato Lines. *Plant Cell Reports*, **12**, 299-302.
<https://doi.org/10.1007/BF00237422>