

秋水仙碱诱导狭叶薰衣草多倍体形成条件的研究

王美妮¹, 杨佳利¹, 文 斌¹, 谷 焱¹, 缪天琳²

(1. 佳木斯大学 农业与环境生物技术研究所, 黑龙江 佳木斯 154007; 2. 佳木斯大学 生命科学学院, 黑龙江 佳木斯 154007)

摘要:为培育性状优良的薰衣草多倍体植株, 利用正交法和单因素分析法, 进行薰衣草多倍体优良性状筛选试验, 探究秋水仙碱诱导染色体加倍的最适浓度和处理时间, 聚乙二醇诱导原生质体融合的分子量、工作浓度和诱导时间的最适条件。结果表明: 采用秋水仙碱法联合 PEG 法进行薰衣草多倍体诱导, 筛选出具有优良性状的多倍体植株, 其中分子量为 6 000 Da 的 PEG 在浓度为 40% 的条件下诱导 25 min 时, 获得的原生质体融合率较高, 达到 19.6%; 薰衣草外植体在浓度为 0.2% 的秋水仙碱 MS 诱导培养基中处理 48 h 诱变频率达 60%。运用薰衣草多倍体诱导的试验方法, 可快速实现薰衣草多倍体品种的选育, 缩短育种周期。

关键词:薰衣草; 诱变率; 融合率; 多倍体植株

中图分类号: S573.9; Q813.1⁺2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-2767(2017)12-0021-04 DOI: 10.11942/j.issn1002-2767.2017.12.0021

狭叶薰衣草 (*Lavandula angustifolia*) 是一种唇形科薰衣草属草本, 原产于地中海西部; 其花汁液为有效的皮脂调节剂, 提取的精油具有镇定安神、抗抑郁、抑制细菌生长等作用。近年来薰衣草作为园林观赏植物受到广泛关注, 市场前景广

阔^[1-3]。目前我国栽培的薰衣草品种主要依靠国外引种, 由于环境以及地理位置等因素的限制, 逐渐凸显出狭叶薰衣草种子萌芽率低、薰衣草精油品质下降等问题, 制约了薰衣草产业链的快速发展^[4-6]。寻找薰衣草高效快速且可推广性强的研究方法势在必行。倍性育种方式, 可以改良植物的遗传性状, 拓展其遗传资源^[7]。本试验以狭叶薰衣草为材料, 进行薰衣草多倍体诱导, 研究秋水仙碱浓度、处理时间对诱导多倍体变异率的影响^[7-8], 以此培育具有优良性状的多倍体植株, 进而提高薰衣草精油产量, 为缓解黑龙江省替代传统农作物种植品种短缺的现状提供基础研究。

收稿日期: 2017-10-27

基金项目: 黑龙江省大学生创新创业训练计划资助项目(201710222059)

第一作者简介: 王美妮(1996-), 女, 黑龙江省绥滨县人, 在读学士, 从事环境生物学相关研究。E-mail: 664526498@qq.com。

通讯作者: 缪天琳(1985-), 女, 黑龙江省佳木斯市人, 硕士, 高级实验师, 从事生物学相关研究。E-mail: miaotlin@126.com。

Expression Profiling Analysis of *CpCBF* Gene from *Chimonanthus praecox* Under Abiotic Stress

LIU Xiao-dan, WANG Xia, YANG Xiang-bo

(School of Biological Engineering, Jilin Agricultural Science and Technology University, Jilin, Jilin 132101)

Abstract: In order to explore the mechanism of *CpCBF* gene from *Chimonanthus praecox* in response to abiotic stress, the seedlings were treated with low temperature, drought, NaCl and ABA, respectively, the expression of *CpCBF* gene were detected using quantitative real-time PCR. The results showed that *CpCBF* gene was induced immediately in response to low temperature, drought, salt and ABA, among them, the response to low temperature and drought was more significant and lasting. At 4 °C for 12 h, the expression reached its peak. For drought stress treatment, the expression level reached the maximum after 6 h. It is preliminarily speculated that *CpCBF* gene may play an important role in resistance to abiotic stress such as low temperature, drought and salt stress.

Keywords: *Chimonanthus praecox*; *CpCBF* gene; abiotic stress; expression profiling

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料主要是继代后的愈伤组织和狭叶薰衣草生长旺盛的组培苗,将无菌苗剪成含有两个茎节的茎段,愈伤组织用镊子压碎至 1 mm^3 大小。

主要试剂有MS固体培养基、MS液体培养基、 0.1% MES、 $0.6\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘露醇。

1.2 方法

1.2.1 原生质体纯化 秋水仙碱诱导剂配制:以 $8.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 为溶剂,配制成 0.01% 、 0.05% 、 0.10% 、 0.20% 、 0.30% 、 0.40% 和 0.50% 浓度的秋水仙碱诱导剂,置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱遮光保存备用。

聚乙二醇融合剂配制: $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖、 $0.16\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KH_2PO_4 、 $15.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $10\%\sim 50\%$ PEGX(W:V, X=4 000, 6 000 Da)、 15% DMSO、pH 为 $5.3\sim 5.8$ 。

高 Ca^{2+} 、高pH溶液: $300\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖、 $60\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $60\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液pH=10.5。

CPW洗液的配制: $0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和 0.1% MES。

酶液的配制:CPW溶液中加入 1.0% 果胶酶、 1.5% 纤维素酶以及 $0.6\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘露醇,pH=5.7。酶液混匀后,在低温离心机上 $1\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心20 min。用无菌注射器抽取上清液, $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 无菌滤膜过滤至无菌瓶,封口备用。

原生质体制备:在无菌超净工作台中将挑选的愈伤组织用无菌的镊子压碎至 1 mm^3 大小,然后将准备好的试验材料以1:10的比例放入装有酶解液的无菌三角瓶中,将三角瓶置于转速为 $160\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床中黑暗震荡酶解12 h以游离原生质体。

原生质体纯化:酶解后的混合酶液在超净工作台经200目的不锈钢筛网过滤去残渣,冰浴条件下, $1\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心20 min,下层沉淀即为原生质体粗提物。向薰衣草原生质体粗提物中加入CPW洗液至10 mL, $1\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心20 min,弃上清液,以上步骤重复3次,用原生质体培养液洗涤1次,离心后下层沉淀即为纯化后的原生质体。

1.2.2 秋水仙碱诱导法 多倍体制备:将狭叶薰衣草组培苗,剪取粗细均匀且带有两个茎节的茎段,接种至含不同浓度的秋水仙碱多倍体诱导培

养基(MS+ $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA+ 2.0% DMSO)中,每个处理15个茎段,分别处理24、48和72 h后转接到继代培养基(MS+ $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA+ $0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IAA)上继续培养。培养30 d后,再转接到继代培养基上继续培养,反复培养多次,培养纯合体,去除嵌合体,得到纯化的多倍体幼苗,从中选择变异明显的稳定植株进行鉴定。

1.2.3 PEG结合高 Ca^{2+} 、pH融合法 融合细胞制备:无菌环境下,取纯化后的原生质体悬浮液1 mL于10 mL离心管中,静置8 min待形成原生质体薄层后,加入等量PEG溶液,2 mL高 Ca^{2+} 、高pH溶液,分别处理5、10、15、20、25和30 min后添加CPW洗涤液至10 mL,洗涤离心3次($1\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 20 min),再用培养液洗涤1次,最后用培养液将融合体悬浮,取2 mL悬液于培养皿中进行液体浅层培养。

融合细胞的鉴定与计数:取 $20\text{ }\mu\text{L}$ 融合后原生质体滴在细胞计数板上,显微观察。依据TTC进入原生质体后与线粒体内的琥珀酸脱氢酶反应,生成红色的甲臍,而死细胞内由于脱氢酶活性下降,不会产生颜色变化的原理来鉴定有活力的原生质体,分别计数原生质体总数和有活力的原生质体数,所有数据均用SPSS 16.60处理;计算其融合率。

$$\text{融合率} = \frac{\text{杂总细胞}}{\text{细胞总数}} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 秋水仙碱对诱导薰衣草变异效果的影响

结果表明,变异率随着秋水仙碱浓度及处理时间的变化而变化,随着秋水仙碱浓度提高、处理时间延长,加倍率随之增加,但薰衣草外植体的致死率也相对提高。 $0.20\%\sim 0.30\%$ 的秋水仙碱处理48~72 h产生变异的效果相对较好,而 0.20% 的秋水仙碱处理48 h的诱变率可达 60.00% , 0.50% 的秋水仙碱处理致死率过高,毒性作用明显,低于 0.05% 诱变率几乎为零,因此用 0.20% 的秋水仙碱处理48 h的薰衣草诱导效果显著(见表1)。

2.2 PEG对薰衣草原生质体融合的影响

PEG分子量为4 000 Da时,PEG浓度提高、培育时间延长,融合率逐渐提高,但较相同时间和浓度下PEG分子量为6 000 Da时融合率低,原生质体活力下降。PEG分子量为6 000 Da时,PEG浓度提高、培育时间延长,融合率逐渐提高,

各处理时间下的融合率均在 PEG 浓度为 40％时最高,融合率最高为 19.6％。处理 30 min 后观察到原生质体发生皱缩、体积变小和颜色变深,说明 PEG 分子量为 6 000 Da,浓度为 40％,处理时间为 25 min 融合效果较明显(见表 2)。

表 1 秋水仙碱的不同浓度和不同处理时间诱导多倍体植株变化

Table 1 Changes of polyploid plants induced by colchicine at different concentrations and different treatment times

秋水仙碱浓度/% Colchicine concentration	时间/h Time	样本数 Number of samples	死亡数 Number of deaths	致死率/% Mortality	变异数 Variation number	变异率/% Variation rate
0.01	24	15	0	0	0	0
	48	15	0	0	0	0
	72	15	2	13.33	0	0
0.05	24	15	0	0	0	0
	48	15	2	13.33	0	0
	72	15	1	6.67	1	6.67
0.10	24	15	1	6.67	0	0
	48	15	1	6.67	1	6.67
	72	15	2	13.33	0	0
0.20	24	15	1	6.67	2	13.33
	48	15	1	6.67	9	60.00
	72	15	2	13.33	6	40.00
0.30	24	15	1	6.67	2	13.33
	48	15	3	20.00	7	46.67
	72	15	4	26.67	7	46.67
0.40	24	15	3	20.00	3	20.00
	48	15	8	53.33	5	33.33
	72	15	13	86.67	2	13.33
0.50	24	15	9	60.00	5	33.33
	48	15	15	100.00	0	0
	72	15	15	100.00	0	0

表 2 不同 PEG 分子量、浓度和培育时间对薰衣草原生质体融合率影响

Table 2 Effects of different PEG molecular weight, concentration and incubation time on the fusion rate of lavender protoplasts

时间/h Time	融合率/% Fusion rate									
	4000 Da					6000 Da				
	10%	20%	30%	40%	50%	10%	20%	30%	40%	50%
5	2.5	3.5	5.2	6.9	8.2	3.6	4.5	5.8	7.9	7.6
10	3.4	5.2	6.8	7.8	9.4	4.2	5.7	7.3	9.2	8.9
15	4.2	6.7	9.4	10.6	11.6	5.7	7.2	9.8	12.4	11.4
20	6.3	7.9	10.2	11.4	12.2	7.3	8.3	10.4	18.8	13.6
25	7.5	8.4	10.8	12.3	12.9	8.1	8.9	11.3	19.6	14.2
30	8.2	9.3	11.4	12.8	13.4	8.8	9.6	12.6	17.8	14.8

3 结 论

用 0.2%~0.3% 的秋水仙碱对薰衣草组培苗进行诱导处理 48~72 h 均可产生多倍体, 0.20% 的秋水仙碱处理 48 h 诱变率可达 60.00%, 但许多诱导的多倍体都为嵌合体, 因而需要反复进行继代培养用以分离; 分子量为 6 000 Da 浓度为 40% 的 PEG 处理原生质体 25 min 的融合率可达 19.6%。采用秋水仙碱法联合 PEG 法进行薰衣草多倍体诱导, 从而筛选出具有优良性状的多倍体植株, 为薰衣草的进一步研究及工厂化生产高油抗寒多倍体植株提供理论依据和技术支持, 可缓解黑龙江省当地新的研究品种短缺的现状。但在培养过程中存在的褐化及幼苗玻璃化问题, 还需后续进一步研究。

参考文献:

[1] 周辉明, 陈燕, 罗庆国. 薰衣草的组织培养和快速繁殖[J].

三明农业科技, 2006(3): 12.

[2] 刘忠军, 刘虹, 热西达, 等. 薰衣草的引种栽培及应用研究[J]. 新疆农业技术, 2005(2): 44-45.

[3] 王远会, 项华, 何叶, 等. 薰衣草栽培管理技术[J]. 南方农业(园林花卉版), 2009(5): 24-25.

[4] 廖苏梅, 周巍, 徐程. 薰衣草的组织培养[J]. 植物生理学通讯, 2004, 40(3): 336-336.

[5] 许耀祖, 王晓军, 赵民安, 等. 薰衣草高频植株再生系统的建立[J]. 西南农业大学学报(自然科学版), 2005, 27(3): 344-349.

[6] 许耀祖, 王晓军, 赵民安, 等. 几种生物学因子对薰衣草胚性愈伤组织悬浮培养生长的影响[J]. 生物技术通讯, 2005, 16(1): 34-36.

[7] Sudria C, Pinol M T, Palazon J, et al. Influence of plant-growth regulators on the growth and essential oil content of cultured Lavandula dentate plantlets[J]. Plant Cell, Tissue- and Organ Culture, 1999, 58: 177-184.

[8] Jordan A M, Calvo M C. Micropropagation of adult Lavandula dentate plants[J]. Biotech, 1998, 73(1): 93-96.

Study on the Conditions of Polyploid Formation of Lavender Induced by Colchicine

WANG Mei-ni¹, YANG Jia-li¹, WEN Bin¹, GU Ye¹, MIU Tian-lin²

(1. Agriculture and Environmental Biotechnology Institute of Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154007; 2. College of Life Sciences, Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154007)

Abstract: In order to cultivate the excellent lavender polyploid plant, using orthogonal and single factor, the screening test of high quality characters of lavender polyploidy were carried out, the optimum concentration and treatment time of colchicine to induce chromosome doubling, the optimal conditions of polyethylene glycol-induced protoplast fusion molecular weight, working concentration and induction time were analyzed. The results showed that using colchicine method combined with PEG method for lavender polyploid induction, polyploid plants with excellent traits had been screened out. Among them, the protoplast fusion rate of PEG with a molecular weight of 6 000 Da was 19.6% after being induced at 40% for 25 min. Lavender explants were treated with colchicine MS induction medium at a concentration of 0.20% for 48 h and the mutagenicity frequency reached 60.00%. Therefore, the method of polyploid induction of lavender can quickly realize breeding of polyploid varieties of lavender and shorten the breeding cycle.

Keywords: lavender; mutation rate; fusion rate; polyploid plants

欢 迎 投 稿

欢 迎 刊 登 广 告