

研究报告

Research Report

## 人工诱导多倍体刺槐及其倍性鉴定

冯玥 任云辉 李秀宇 孙宇涵 李云\*

北京林业大学生物科学与技术学院, 林木育种国家工程实验室, 北京, 100083

\*通信作者, yunli63@163.com

**摘要** 试验以3个半同胞家系的刺槐(*Robinia pseudoacacia* L.)种子为材料, 以30 mg/L、40 mg/L和50 mg/L三种浓度梯度秋水仙素水溶液浸渍处理诱导得到多倍体刺槐植株并进行倍性鉴定, 探究了不同秋水仙素处理浓度对不同刺槐种子的成活及变异率的影响, 并利用流式细胞仪对所得变异苗在多次继代培养过程中进行了持续性的倍性检测以研究变异苗在继代过程中的倍性变化情况。结果表明: 以浓度为40 mg/L秋水仙素浸渍处理刺槐种子2 d, 诱导多倍体效率最高, 其成活率与成活苗变异率分别为70.4%与49.06%。诱变苗中经直接萌发所得植株占68.3%, 其中嵌合体所占比例约为28.1%; 经根萌所得植株占31.7%, 其中嵌合体所占比例约为5.1%。植株倍性在以30 d为周期继代两次后趋于稳定。四倍体植株相比二倍体具有叶面积增大, 叶形指数减小, 叶绿体数明显增多等特征。为四倍体刺槐诱导及培育过程中有效排除嵌合体干扰提供了手段, 为四倍体刺槐植株批量诱导后的变异苗初选及倍性初步鉴定工作提供了参考。

**关键词** 刺槐, 四倍体诱导, 倍性鉴定, 流式细胞仪检测

## Induction and Identification of Tetraploids in *Robinia pseudoacacia* L.

Feng Yue Ren Yunhui Li Xiuyu Sun Yuhan Li Yun\*

National Engineering Laboratory for Tree Breeding, College of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University, Beijing, 100083

\* Corresponding author, yunli63@163.com

**Abstract** In this experiment, *Robinia pseudoacacia* L. seeds from three half-sib families were used to induce polyploid plants by dipping in different concentrations of colchicine solution, and ploidy identification was carried out to investigate the effect of colchicine concentration on different *Robinia pseudoacacia* L. seeds survival rate and mutation rate. The obtained ploidy seedlings were continuously ploidy detected by flow cytometry in multiple subcultures to study the ploidy changes of the mutant seedlings in the process of subculture. The results showed that the polyploid was the most efficient in inducing polyploid with two concentrations of

---

基金项目: 本研究由国家自然科学基金项目(31570677)、国家重点研发项目(2017YFD0600500-03)和国家林业局科技发展中心项目(XPC-2015-3)共同资助

40mg/L colchicine soaking for two days. The survival rate and mutation rate were 70.4% and 49.06% respectively. 68.3% were obtained by direct germination in the mutagenic plants, of which the proportion of chimeras was about 28.1%. The plants obtained via root sprouting accounted for 31.7%, of which the proportion of chimeras was about 5.1%. Plant ploidy tended to stabilize after subculture twice in 30 days. Compared with diploid, the tetraploid plants had the characteristics of larger leaf area, smaller leaf index and more chloroplast number. It provides a method to effectively remove chimeras in induction and cultivation of *Robinia pseudoacacia* L. polyploid, and provides reference for primary selection and ploidy identification after induction.

**Keywords** *Robinia pseudoacacia* L., Tetraploid induction, Chromosome identification, Flow cytometry detection

刺槐(*Robinia pseudoacacia* L.), 属豆科蝶形花亚科刺槐属, 二倍体植物( $2n=2x=22$ ), 于 19 世纪末引入中国, 经引种驯化后现于国内各地广泛分布(王熙龙, 2010, 园林科技, (2): 11-13)。刺槐立地适应性强, 用途广泛, 目前已成为中国重要的多用途经济型和生态型树种(张亚玲等, 2009, 国土绿化, (2): 47-48)。四倍体刺槐品种首次见报道于韩国, 与传统刺槐相比, 四倍体刺槐具有速生, 抗逆性强, 生物量大, 营养价值高等优良特性(Ewald et al., 2009)。但目前引入中国的四倍体刺槐品种较少, 繁殖材料极其有限, 且因花粉败育等因素导致有性繁殖率低下, 品种质量不断退化。为满足国内对于饲料及生物质能源用材林的生产及消费需求, 迫切需要培育出更多优良四倍体刺槐无性系(任云辉等, 2015)。

秋水仙素是目前植物四倍体育种研究中应用最为广泛的化学诱变剂之一, 当下人工诱导四倍体刺槐相关的研究报道也多以秋水仙素浸渍法为主要诱变手段。罗晓丹(2009)以刺槐种子为材料, 结合秋水仙碱浸渍法与低温处理法, 得到四倍体刺槐最高诱导率为 25.71%, 但因诱导过程较为繁琐, 可重复性不强。姜丹(2012)曾通过 0.3%的秋水仙碱溶液浸泡初露白尖的刺槐种子得到四倍体刺槐, 最高变异率虽然高达 38%, 但因样本量过小, 诱导率并不稳定, 且并无四倍体刺槐无性系植株存活保留。而试验材料的差异对秋水仙碱诱导变异苗的影响, 种子诱导过程中所产生的大量嵌合体该如何鉴定, 诱导出的变异苗染色体倍性在后续生长过程中是否会发生改变等问题尚未完全得到解决。

试验选取 3 个半同胞家系的刺槐种子作为多倍体诱导材料, 对不同秋水仙素水溶液处理下不同刺槐种子的出苗率及变异率的差异变化进行探究, 通过对诱导得到的变异苗进行继代培养, 并于继代过程中利用流式细胞仪鉴定技术进行跟踪检测, 为四倍体刺槐诱导及培育过程中有效排除嵌合体干扰提供了手段, 通过观察对比四倍体刺槐苗与二倍体刺槐的叶片形态学差异及叶片保卫细胞数量等特征, 为四倍体刺槐植株批量诱导后的变异苗初选及倍性初步鉴定工作提供了参考。

## 1 结果与分析

### 1.1 秋水仙素处理对种子出苗及倍性变异的影响

通过测定 16 号、26 号和 28 号这 3 个系号的半同胞家系种子的千粒重可知，16 号种子的千粒重最大，为 24.42 g；26 号最小，为 20.05 g，与 16 号和 28 号差异显著，26 号种子在形态上的单个体积明显小于另外两个系号，而 16 号种子的形状偏大，在色泽上相比 26 号与 28 号偏浅(图 1)。

三个半同胞家系的刺槐种子在对照试验中的发芽率并无明显差异，但 28 号种子 90.66% 的成活率明显高于 16 号的 84.53%，26 号种子的成活率居于两者之间，与 16 号、28 号差异都不明显。种子经 30 mg/L、40 mg/L 和 50 mg/L 三个浓度梯度的秋水仙素处理后，其发芽率相比于对照组几乎无显著变化，仅在秋水仙素浓度为 50 mg/L 时，发芽率相比对照组显著降低。16 号种子的组培苗成活率随秋水仙素浓度梯度的影响最为明显，当秋水仙素浓度为 50 mg/L 时，其成活率最低，为 45.86%，而 26 号与 28 号种子的成活率在 30 mg/L 与 40 mg/L 的处理浓度下差异都不明显，但在 50 mg/L 的处理浓度下成活率有明显下降，分别为 61.20% 与 63.33% (表 1)。说明在同一秋水仙素浓度下，26 与 28 号种子相比于 16 号具有更强的耐受能力，所得刺槐苗成活率更高。28 号种子经浓度为 40 mg/L 的秋水仙碱处理后成活率为 70.4%，成活植株中变异率为 49.06%，该处理中诱导得到的变异苗数最多。虽然 26 号种子经浓度为 50 mg/L 的秋水仙碱溶液处理后变异率最高可达 53.33%，但因成活率相对较低，为 61.20%，多倍体组培苗诱导效率仍低于 28 号。三个系号的刺槐种子在 40 mg/L 的秋水仙素处理浓度下都表现出最高诱导效率。

三个半同胞家系的刺槐种子在各浓度秋水仙碱处理下，所得刺槐苗的变异率具有显著不同，但总体趋势仍随秋水仙碱浓度的升高而递增(表 1)。该实验结果证明，虽然通过高浓度秋水仙素处理刺槐种子可有较提高变异率，但秋水仙素对植物的毒害作用也会严重影响刺槐苗的成活率，降低诱导效率。通过秋水仙素水溶液浸渍处理法诱导刺槐种子加倍的最佳浓度为 40 mg/L。



图 1 三个半同胞家系刺槐种子的表型特征

Figure 1 Phenotypic characteristic of *Robinia pseudoacacia* seeds from different families of half-sib

表 1 不同系号刺槐种子在不同浓度秋水仙碱处理下的多倍体诱导率差异

Table 1 Differences in mutation rate of three sources of *Robinia pseudoacacia* seeds with different concentrations of colchicine

种子系号	秋水仙碱浓度(mg/L)	接种种子数	发芽率(%)	成活率(%)	变异率(%)
Seed number	Colchicine concentration (mg/L)	No. of inoculated seeds	Germination rate (%)	Survival rate (%)	Mutation rate (%)
16 号	0	250	98.53±0.58 d	84.53±0.58 f	0
No. 16	30	250	96.67±0.35 cd	62.40±1.89 c	38.93±0.71 a
	40	250	97.47±1.41 cd	55.06±0.93 b	47.60±0.46 c
	50	250	91.73±1.70 ab	45.86±1.70 a	49.60±1.62 cd
26 号	0	250	98.00±0.69 d	87.33±1.31 fg	0
No. 26	30	250	96.67±0.48 cd	71.20±0.83 de	43.06±0.71 b
	40	250	96.93±1.09 cd	68.93±0.48 d	50.40±1.55 cde
	50	250	93.73±1.27 abc	61.20±2.44 c	53.33±1.70 e
28 号	0	250	97.20±1.83 cd	90.66±0.87 g	0
No. 28	30	250	96.80±0.83 cd	73.20±1.06 e	40.93±0.96 ab
	40	250	94.67±1.04 bcd	70.40±1.15 de	49.06±0.81 cd
	50	250	90.27±2.28 a	63.33±0.69 c	51.86±0.96 de

注: 同一列数据后不同字母表示在 0.05 水平差异显著

Note: Different letters on the same column mean significant difference at 0.05 level

## 1.2 变异苗倍性的检测

三个半同胞家系的刺槐种子经秋水仙素水溶液浸泡处理 30 d 后, 诱导得到了诱变苗群体。根据诱变苗萌发方式的不同, 可将诱变苗分为种子直接萌发和根萌两种类型(图 2), 直接萌发方式是指刺槐种子经下胚轴伸长、子叶展开后直接长出真叶, 生长得到刺槐幼苗; 根萌是指刺槐种子经下胚轴伸长并长出根系后, 经由根部萌发并生芽长出刺槐幼苗。两种萌发方式得到的刺槐组培苗在外观形态上并无明显差异。本试验所有成活的刺槐诱变苗中, 经直接萌发得到的占 68.3%, 经根萌得到的占 31.7%。

通过对诱变苗进行的周期为 30 d 的四次继代并于继代前后用流式细胞仪对诱变苗的叶片、茎段、根部三个部位进行持续检测以鉴定其倍性(图 3)。研究发现经直接萌发得到的四倍体刺槐苗中, 最终共有 71.9% 的组培苗在四次继代过程中倍性未发生改变, 由此可判断嵌合体所占比例约为 28.1%。经根萌得到的四倍体刺槐苗, 在继代过程中倍性未发生改变的刺槐苗数量高达 94.9%, 嵌合体所占比例约为 5.1% (表 2)。经根萌得到的四倍体刺槐苗中嵌合体出现率远低于直接萌发。检测结果表明, 在继代过程中, 四倍体在第一次与第二次继代前后刺槐组培苗倍性变化最为明显, 第三次与第四次倍性变化趋于稳定; 但混倍体植株在继代过程中保持原有倍性的植株所占比例持续减少, 证明混倍体植株在继代过程中倍性保持困难。当各植株检测部位为叶片和茎段时, 倍性检测结果较为一致, 但根系的检测结果相对差异偏大(表 2)。



A

B

图 2 两种萌发方式获得的刺槐组培苗

注: A: 通过直接萌发方式得到的刺槐组培苗; B: 通过根萌方式得到的刺槐组培苗

Figure 2 *Robinia pseudoacacia* tissue culture seedlings from two methods of germination

Note: A: *Robinia pseudoacacia* tissue culture seedlings obtained by direct germination; B: *Robinia pseudoacacia* tissue culture seedlings obtained by root sucher

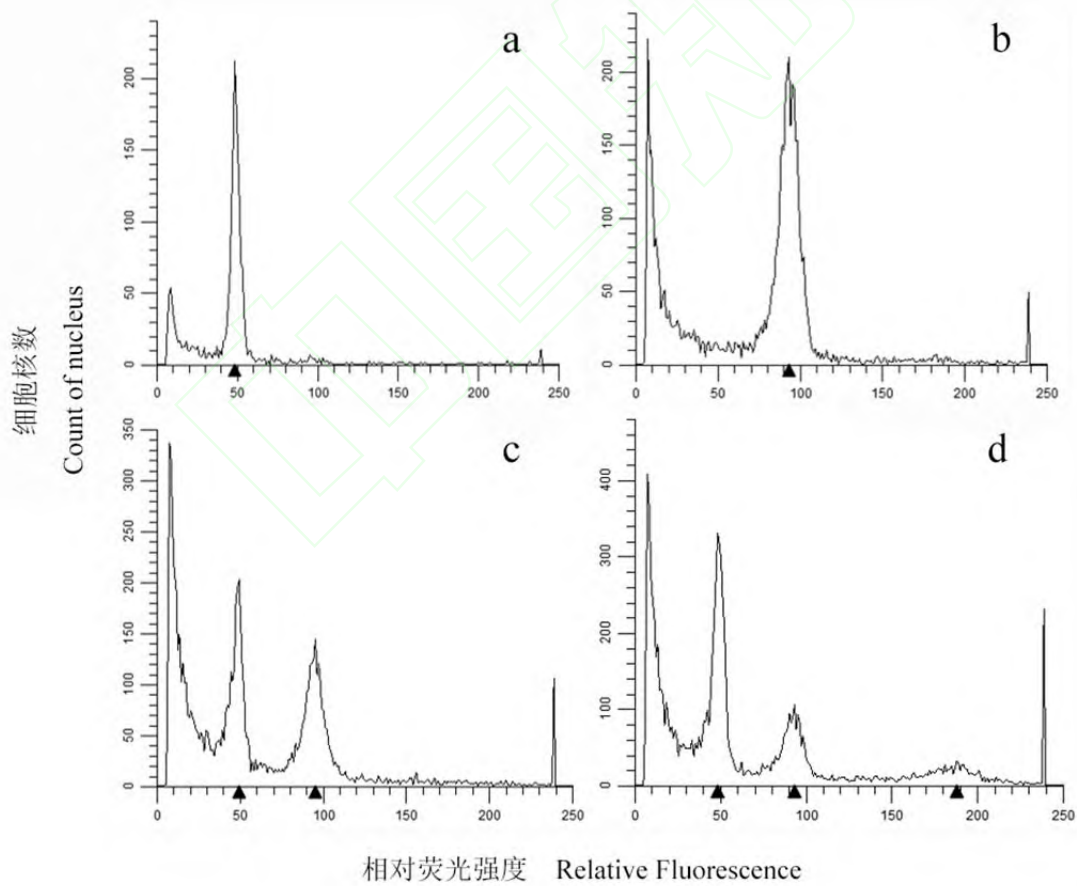


图 3 秋水仙碱处理刺槐种子所得苗变异的检测

注: A: 二倍体; B: 四倍体; C: 二倍体与四倍体刺槐苗混合检测; D: 混倍体

Figure 2 Variation of seedlings obtained from colchicine treated with colchicine

Note: A: Diploid; B: Tetraploid; C: Mixed detection of diploid and tetraploid samples; D: Mixploidy

表 2 不同萌发方式的多倍体刺槐组培苗在继代过程中倍性保持状况

Table 2 The polyploid black locust tissue culture seedlings with different germination patterns maintained their ploidy status during the subsequent generations

萌发方式 Germination	继代前初始倍性 Preliminary ploidy before subclasses	继代次数 The number of subclasses	经检测倍性未发生改变的样本所占比例(%) Rate of ploidy unchanged plants (%)				
			叶片 Leaf	茎 Stem	根 Root		
直接萌发 Direct germination	四倍体 Tetraploid	1	83.5	83.5	78.5		
		2	76.9	76.0	75.2		
		3	73.6	73.6	72.3		
		4	71.9	71.9	67.8		
	混倍体 Mixploidy	1	63.6	63.6	69.7		
		2	57.6	57.6	60.6		
		3	45.3	44.9	42.1		
		4	32.8	33.7	31.3		
		根萌 Root sucher	四倍体 Tetraploid	1	96.2	96.2	96.2
				2	94.9	94.9	94.9
3	94.9			94.9	94.9		
4	94.9			94.9	94.9		
混倍体 Mixploidy	1		79.3	79.3	72.4		
	2		68.9	68.9	62.1		
	3		65.5	65.5	62.1		
	4		58.6	58.6	58.6		

### 1.3 四倍体与二倍体刺槐组培苗的叶片特征差异

刺槐种子经秋水仙碱诱变处理后，其萌发所得幼苗的生长受到了一定抑制，种子经处理后在萌发过程中下胚轴伸长相对缓慢，子叶肥厚浓绿，茎尖生长相对迟缓。通过对成活植株的观察和比较，经诱变得到的四倍体刺槐组培苗相比于二倍体刺槐，其真叶具有叶形更圆，叶面积普遍更大、叶片色泽更深且叶片表面刚毛更为浓密等特征(图 4)。四倍体刺槐组培苗的叶长与叶宽的平均值分别为 15.64 mm 与 10.79 mm，显著高于二倍体的 12.50 mm 与 6.50 mm，而四倍体刺槐叶片的长宽值之比则显著小于二倍体刺槐。四倍体刺槐叶片表皮中保卫细胞所含的叶绿体数目明显高于二倍体，约为二倍体的 2 倍(图 5)。四倍体刺槐组培苗在幼苗阶段就显示出了四倍体植物相较于二倍体营养器官巨大化特性，其形态学特征差异同倍性检测结果基本一致。

本试验采用根尖压片法对所得植株进行染色体数目鉴定，取在生根培养基内生长 3~5 d 的幼嫩根尖为材料进行染色压片处理，于显微镜下观察并计算其染色体条数，二倍体刺槐染色体数目为 22 条，四倍体为 44 条(图 6)。植株的倍性与其叶片特征具有高度的一致性，故刺槐组培苗的形态学特征与其叶片保卫细

胞内的叶绿体数目，都可作为人工大量诱导刺槐多倍体植株时进行倍性鉴定的初步筛选标准。

表 3 四倍体与二倍体刺槐组培苗叶片的特征差异

Table 3 Differences of tissue culture seedling leaves between tetraploid and diploid locusts

倍性	叶长(mm)	叶宽(mm)	叶形指数	保卫细胞内叶绿体数
Ploidy	Leaf length (mm)	Leaf width (mm)	Leaf index	Number of chloroplasts per guard cell
二倍体 Diploid	12.50±0.29 a	6.50±0.44 a	1.92 a	12.02±1.43 A
四倍体 Tetraploid	15.64±0.91 b	10.79±0.75 b	1.45 b	23.19±1.74 B

注: 小写字母代表 0.05 水平下差异显著; 大写字母代表 0.10 水平下差异显著

Note: The lowercase letters represent significant differences at 0.05 level; The capital letters represent significant differences at 0.10 level

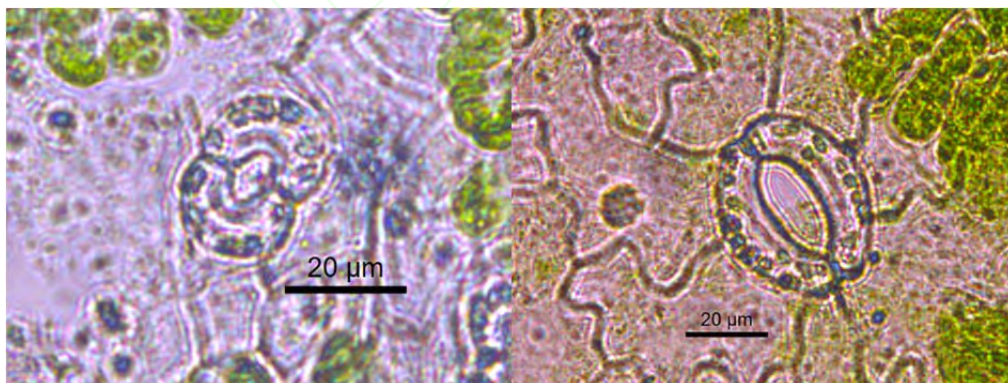


图 4 四倍体和二倍体刺槐叶片对比(Bar=4 mm)

注: 左: 四倍体刺槐叶片; 右: 二倍体刺槐叶片

Figure 4 The plant leaves comparison between tetraploid and diploid in *Robinia pseudoacacia*

Note: Left: Diploid ; Right: Tetraploid



A

B

图 5 二倍体与四倍体刺槐保卫细胞内叶绿体对比

注: A: 二倍体保卫细胞内叶绿体; B: 四倍体保卫细胞内叶绿体

Figure 5 Chloroplasts in leaf guard cells of diploid and tetraploid plants

Note: A: The chloroplast in the diploid guard cell; B:The chloroplast in the tetraploid guard cell

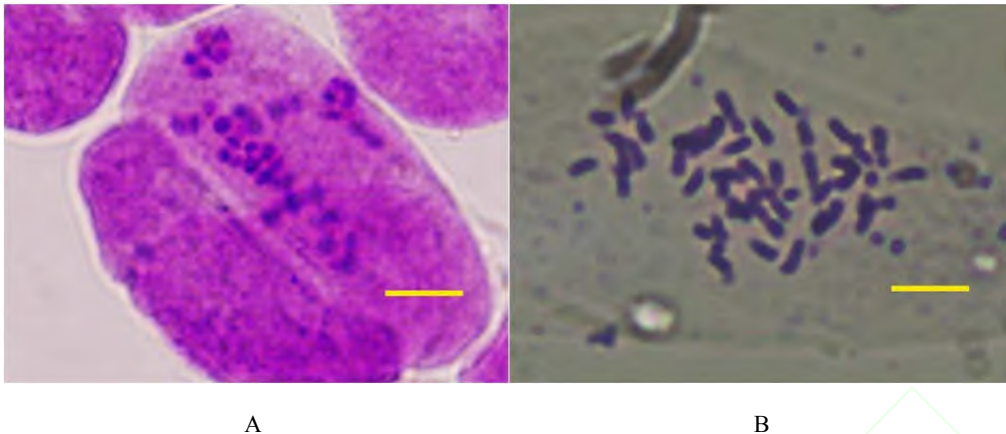


图 6 四倍体与二倍体刺槐染色体数目对比(bar=40 μm)

注: A: 二倍体刺槐染色体; B: 四倍体刺槐染色体

Figure 6 Chromosome numbers of diploid and tetraploid in *Robinia pseudoacacia*

Note: A: Chromosomes of diploid in *Robinia pseudoacacia*; B: Chromosomes of tetraploid in *Robinia pseudoacacia*

## 2 讨论

人工诱导四倍体是目前多倍体育种研究中的重要内容之一。迄今,在林木体外染色体加倍中应用最为广泛使用的有丝分裂抑制剂是秋水仙素(范国强等, 2009),其诱导方法包括浸种法,滴生长点法以及组织培养法等。因刺槐种子具有萌发容易,萌发时间较短的特点,试验选用刺槐种子作为四倍体植株的诱导材料,采用秋水仙素水溶液浸渍法处理初露白尖的种子并接种于 MS 培养基上,最终诱导得到多倍体刺槐组培苗。相比于浸种后播撒的田间试验,该诱导及培养方式具有不受气候环境限制,成活率高且成苗快等优点,操作简便且诱变效率较高。

由于秋水仙素对植物的毒害作用,经秋水仙素处理过的幼苗易表现出生长缓慢,子叶肥大,真叶皱缩乃至畸形叶等问题(Ewald et al., 2009)。故在秋水仙素诱导植物染色体加倍过程中,秋水仙素的处理时间和浓度是影响其成活率和变异率的重要因素。姜丹(2012)的研究结果表明,秋水仙素的处理浓度对刺槐种子成活率及诱变率的影响效应远高于处理时长。故本试验中对不同半同胞家系的刺槐种子诱导加倍过程中的秋水仙素最佳处理浓度进行了探究,试验结果表明,尽管不同刺槐种子经秋水仙素处理后存活率存在明显差异,但都在同一浓度梯度下(40 mg/L)表现出最高的多倍体诱变效率,证明秋水仙素的理想浓度处理方案在人工诱导刺槐四倍体的应用中具有较为广泛的普遍性和适应性。

由于细胞分裂的不同步性,人工诱导植物四倍体过程中产生的嵌合体是秋水仙素处理植物体细胞加倍过程中的最常见问题。因秋水仙素在处理多细胞组织时,不同部位细胞的染色体加倍过程并不完全均衡,因而时常会诱导得到混倍体植株(Dhooghe et al., 2009)。由于实现染色体加倍的细胞相对较少,其在增殖分裂过程中与二倍体细胞的竞争力较弱,随着多倍体细胞的减少并消失,多倍体植株极易在培养过程中恢复



为二倍体(张海凤等, 2008)。Zhou 等(2016)曾在木薯加倍实验中发现, 嵌合体植株在变异植株中所存在的比例主要与三个因素有关: 有丝分裂抑制剂的种类, 抑制剂诱变浓度以及诱变材料的类别。而前人已获得的刺槐多倍体材料也多因嵌合体严重、继代困难等原因而未能得到较好地保存和利用(罗晓丹, 2009; 姜丹, 2012)。本试验通过流式细胞仪倍性检测手段, 对诱导得到的变异苗在继代培养过程中的不同部位进行取样和持续性的倍性检验, 较为成功地排除了嵌合体对变异苗的干扰, 并发现经秋水仙素处理后的种子经不同萌发方式得到的刺槐植株, 其嵌合体所占比例也存在明显差异。其中通过根萌途径生长得到的变异苗中, 嵌合体存在几率远低于直接萌发所得。

目前多倍体诱导试验中常用的鉴定方式包括染色体计数法, 流式细胞仪分析法及形态学或细胞学特征鉴定法。传统的染色体计数法费时费力, 而流式细胞仪分析法对于所需仪器设备的要求较高(Dolezel et al., 2007)。故对于大批量诱导多倍体植株而言, 通过相对简单的方法对植株的倍性水平进行初选的过程是十分必要的。Abdoli 等(2013)在紫雏菊四倍体诱导试验中曾对植株叶片的保卫细胞内叶绿体数目进行统计, 并依此初步筛选出疑似的四倍体植株, 经流式细胞仪检测后确定, 所有疑似四倍体全部为四倍体植株, 证明了该方法具有一定的可靠性, 将气孔长宽和保卫细胞内叶绿体数目作为鉴定刺槐多倍性的指标, 这对于刺槐多倍体的早期鉴定具有重要的价值。

### 3 材料与方法

#### 3.1 试验材料

本试验采用刺槐成熟种子作为多倍体诱导材料, 该种子于 2016 年秋季采收自甘肃省清水县国家刺槐良种基地种子园, 为三株优良刺槐母树 16 号、26 号和 28 号经自由授粉得到的三个半同胞家系, 供试种子的千粒质量依次为 24.42 g、20.05 g、23.25 g。

#### 3.2 种子处理

于三个半同胞家系中选取粒大饱满的刺槐种子, 进行表面灭菌前先置于流水下冲洗 30 min, 之后以 70% 乙醇溶液浸泡种子 30 s, 浸泡完毕后以无菌水洗涤 3 次, 后将种子以 0.1% 的  $\text{HgCl}_2$  溶液浸泡 6 min (消毒过程中需震荡), 再以无菌水冲洗 6 次。消毒完成后用 90℃ 无菌水浸泡种子至室温, 并于室温下浸泡 24 h 以促进种子萌发。之后再以无菌水冲洗 3 次, 自然晾干 24 h 后得到因吸水膨胀且初露白尖的种子, 用无菌纸吸干种皮表面水分备用, 以上步骤需在超净工作台中完成。

于黑暗条件下, 将经过消毒及促萌处理的刺槐种子于秋水仙碱水溶液中浸泡处理 42 h, 秋水仙碱溶液共设置质量浓度为 0.3%、0.4%、0.5% 三个处理及一个对照组, 各处理及对照中三个系号的种子数量皆为 250 粒, 并设置 3 个重复。秋水仙碱诱导处理结束后, 将种子用无菌水震荡漂洗 3 次, 每次持续 3 min, 接种至 MS 基本培养基上。培养室环境温度( $25 \pm 2$ )℃、光照强度为 1 500~2 000 lx, 光照培养周期为(光/暗) 14 h/10 h。

### 3.3 数据处理及流式细胞仪倍性检测

种子接种于培养基上培养 15 d 后即可观察到发芽现象，观察并记录出苗状况。

发芽率(%)=(长出子叶的植株数/接种的刺槐种子数)×100%

成活率(%)=(长出真叶的植株数/接种的刺槐种子数)×100%

刺槐幼苗经培养 30 d 后，采用流式细胞仪(BD FRCS Calibur)分析法测定诱导得到的刺槐植株叶片单细胞核 DNA 相对含量，从而对植株进行初步倍性判定，并计算各系号刺槐种子的多倍体诱导率。

多倍体诱导率(%)=(诱导变异的植株数/成活植株数)×100%

之后依据初始倍性鉴定结果及植株的萌发方式(直接萌发，根萌)将所得植株分为直接萌发四倍体、直接萌发混倍体、根萌四倍体、根萌混倍体共四组。将所得植株进行继代培养，继代周期为每 30 d 一次，共继代 4 次。于继代前后取刺槐组培苗的叶片、茎段、根三个部位用流式细胞仪进行倍性检测，统计并计算倍性未发生改变的样品在该组中所占比例。

### 3.4 组培苗叶片形态学观察及叶绿体计数

根据流式细胞仪检测结果，随机抽取继代两次以上(苗龄为 60 d)的四倍体与作为对照的二倍体刺槐组培苗，选取其形态学上端的第二对叶片，用游标卡尺测量长和宽，并计算比值。三个半同胞家系中抽取二倍体和四倍体无性系各 10 个，每个无性系选取 5 株进行测定。

撕取带有少量叶肉细胞的刺槐下表皮叶片平铺于盖玻片上，置于 Olympus BX51 显微镜下，计量叶片保卫细胞内的叶绿体数目。三个半同胞家系中各抽取二倍体和四倍体无性系 10 个，每个无性系随机取 3 个植株，每个植株随机选取叶片 3 枚，并于每枚叶片上观察并记录至少 10 个保卫细胞的叶绿体数目。

### 3.5 染色体计数法鉴定植株倍性

于清晨 8:00~9:00 时段内，切取继代后 3~5 d 内变异苗的根尖，于遮光条件下浸泡于浓度为 0.2%的秋水仙碱溶液中，于 20℃条件下预处理 4 h，后用卡诺固定液于 4℃下固定材料 24 h 以上，后将其转入 1 N 的 HCl 中于 60℃的水浴锅中解离 10 min，采用常规压片法制片。使用 Olympus BX51 显微镜在 100×油镜下观察并统计染色体条数并拍照记录。

### 3.6 数据分析

本试验使用 Excel 2010 和 SPSS19.0 软件对所得数据进行分析及处理。

### 作者贡献

李云是项目的构思者及负责人，指导试验设计，数据分析，论文写作与修改；冯玥是本试验研究的执行人，参与试验设计，试验分析，完成数据分析及论文初稿的写作；任云辉和李秀宇是试验研究执行人，参与试验分析；孙宇涵参与论文初稿的修订和校对等工作。全体作者都阅读并同意最终的文本。

## 致谢

本研究由国家自然科学基金面上项目(31570677)、国家重点研发项目(2017YFD0600500-03)和国家林业局科技发展中心项目(XPC-2015-3)共同资助。

## 参考文献

- Abdoli M., Moieni A., and Badi H.N., 2013, Morphological, physiological, cytological and phytochemical studies in diploid and colchicine-induced tetraploid plants of *Echinacea purpurea* (L.), *Acta Physiologiae Plantarum*, 35(7): 2075-2083
- Dhooghe E., Grunewald W., Leus L., and Van Labeke M.C., 2009, *In vitro* polyploidisation of *Helleborus* species, *Euphytica*, 165(1): 89-95
- Dolezel J., Greilhuber J., and Suda J., 2007, Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry, *Nat Protoc*, 2(9): 2233-2244
- Ewald D., Ulrich K., Naujoks G., and Schröder M.B., 2009, Induction of tetraploid poplar and black locust plants using colchicine: chloroplast number as an early marker for selecting polyploids *in vitro*, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 99(3): 353-357
- Fan G.Q., Wei Z.Z., and Yang Z.Q., 2009, Induction of autotetraploid of *Paulownia australis* and its *in vitro* plantlet regeneration, *Xibei Nonglin Keji Daxue Xuebao (Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition))*, 37(10): 83-90 (范国强, 魏真真, 杨志清, 2009, 南方泡桐同源四倍体的诱导及其体外植株再生, *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 37(10): 83-90)
- Jiang D., 2012, Studies on adventitious bud regeneration and polyploid induction of black locust (*Robinia pseudoacacia* L.), Thesis for M.S., Beijing Forestry University, Supervisor: Li Y., pp.18-23 (姜丹, 2012, 刺槐子叶不定芽再生及多倍体诱导的研究, 硕士学位论文, 北京林业大学, 导师: 李云, pp.18-23)
- Luo X.D., 2009, Induction of tetraploid black locust and its *in vitro* plant regeneration, Thesis for M.S., Central South University of Forestry and Technology, Supervisor: Zhang R.Q., pp.45-51 (罗晓丹, 2009, 四倍体刺槐诱导及其体外植株再生的研究, 硕士学位论文, 中南林业科技大学, 导师: 张日清, pp.45-51)
- Ren Y.H., Chen M.R., Feng Y., Na J., Zhang Y., Deng Y.P., Fan Z.X., Zhu J.H., Wang X.P., Sun Y.H., and Li Y., 2015, Adventitious shoots induction and plant regeneration from *in vitro* cultured hypocotyl explants of *Robinia pseudoacacia* L., *Dongbei Linye Daxue Xuebao (Journal of Northeast Forestry University)*, 43(11): 9-13 (任云辉, 陈梦如, 冯玥, 纳静, 张越, 邓永平, 樊自新, 朱继红, 王小平, 孙宇涵, 李云, 2015, 刺槐下胚轴不定芽诱导及植株再生, *东北林业大学学报*, 43(11): 9-13)
- Zhang H.F., Guo B.L., Zhang C.H., Yang J.X., Guo J., and Chen X.H., 2008, Induction and Identification of Tetraploids in *Eucornmia ulrnoides* Oliv., *Yuanyi Xuebai (Acta Horticulturae Sinica)*, 35(7): 1047-1052 (张海凤, 郭宝林, 张成合, 杨俊霞, 郭靖, 陈新华, 2008, 杜仲四倍体的诱导与鉴定, *园艺学报*, 35(7): 1047-1052)
- Zhou H.W., Zeng W.D., and Yan H.B., 2016, *In vitro* induction of tetraploids in cassava variety 'Xinxuan 048' using colchicine, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 128(3): 723-729