

甜瓜属种间杂交中3种不同倍性资源的微繁

罗向东* 陈劲枫** 钱春桃

南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室, 园艺学院, 南京 210095

提要 以3种不同倍性的甜瓜属种间杂交资源(双二倍体 *Cucumis hytivus*、异源三倍体黄瓜和种间杂种 F_1) 无菌苗的顶芽或腋芽为试材, 比较它们再生能力的差异, 寻求各自增殖的最适培养基, 从而建立其离体繁殖体系。结果表明: 倍性越高, 增殖能力越小, 增殖速度也最小(双二倍体种转接的间隔时间比其它两种材料长1~2周)。双二倍体、异源三倍体黄瓜和种间杂种 F_1 的最大繁殖系数分别为4.6、7.1和8.4; 相对应的培养基分别为 $MS+0.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{TDZ}$ 、 $MS+2.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{6-BA}$ 和 $MS+0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{6-BA}$ 。3种材料的生根结果基本一致, 在 $1/2MS+0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{IBA}$ 上的生根率均能达84.5%, 驯化成活率达90%以上。同一材料的田间性状表现整齐一致, 没有发现变异。

关键词 种间杂交; 离体培养; 黄瓜; 倍性; 微繁

Micropropagation of Three Germplasms with Different Ploidies from Interspecific Hybridization in *Cucumis*

LUO Xiang-Dong*, CHEN Jin-Feng**, QIAN Chun-Tao

State Key Laboratory of Plant Genetics and Germplasm Enhancement, College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095

Abstract Shoot-tips of three germplasms with different ploidies from interspecific hybridization in *Cucumis* (amphidiploid, allotriploid and interspecific hybrid F_1) were *in vitro* multiplied on Murashige-Skoog basal medium (MS) to compare their proliferate ability, and to investigate the effects of concentration of 6-benzyladenine (6-BA) and TDZ on their regeneration. The results indicated that the regeneration rates and speed decreased as the ploidy level increased, e.g. it took 1~2 more week to subculture the amphidiploid than the others. The highest proliferation ratios obtained for the amphidiploid, allotriploid and the interspecific F_1 hybrid were 4.6, 7.1 and 8.4 respectively and the relevant media were $MS+0.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{TDZ}$, $MS+2.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{6-BA}$ and $MS+0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{6-BA}$, respectively. Over 84.5% shoots (0.5~1.0 cm) rooted on $1/2MS+0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{IBA}$ in 2 weeks for all germplasms, and more than 90% rooted shoots survived after acclimatization. There were not variation among these acclimatized plantlets based on morphological observation and chromosome counts.

Key words interspecific hybridization; culture *in vitro*; cucumber; ploidy; micropropagation

甜瓜属双二倍体 *Cucumis hytivus*^[1,2] 和异源三倍体黄瓜^[3]的合成是甜瓜属远缘杂交的重要进展。最近的研究证明 *C. hytivus* 和异源三倍体黄瓜也具有来自近源野生种 *C. hystrix* 的有用性状, 如耐低温弱光^[4,5]、抗霜霉病和枯萎病(未发表资料)等, 这为甜瓜属作物品种改良展示了良好的前景。

培育出优良的易位系是作物远缘杂交的重要目标之一^[6]。为了实现这一目标, 需要大量不同基因型的种间杂种 F_1 、双二倍体和异源三倍体黄瓜等中间材料, 用于开展远缘杂交的基础理论和应用研究。但种间杂种 F_1 和异源三倍体黄瓜高度不育, 只能无性繁殖保存; 刚合成的双二倍体种的育性也不高(花粉可染率约40%), 自交结籽率

低(约1~20颗·果⁻¹)^[2], 也需要通过无性繁殖扩大群体数量。本文以甜瓜属种间杂种 F_1 、异源三倍体黄瓜和双二倍体 *C. hytivus* 的无菌不定芽为试材, 分析甜瓜属不同倍性种间杂种繁殖能力的差异以及所需的最适培养基激素调控, 以期建立它们的离体繁殖体系以获得大量特异的种间资

收稿 2004-02-26 修定 2004-06-18

资助 国家自然科学基金(30170644)、国家“863”计划项目(2002AA241251、2002AA207012、2004AA241120)、教育部“跨世纪优秀人才培养计划”、教育部科学技术研究重点项目(重点01097)。

*E-mail: xdluolf@163.com, Tel: 025-84396279

** 通讯作者(E-mail: jfchen@njau.edu.cn, Tel: 025-84396279)。

源。

材料与方法

甜瓜属双二倍体 *Cucumis hytivus* ($2n=4x=38$, HHCC) 为我们实验室的自交一代种子^[2], 以 75% 酒精表面消毒 30 s 后用 0.1% 的升汞灭菌 3 min, 无菌水冲洗 5~6 次, 接种于 MS+30 g·L⁻¹ 蔗糖+8 g·L⁻¹ 琼脂培养基上获取无菌苗。异源三倍体黄瓜 *C. hytivus* × “二旱子” ($2n=3x=26$, HCC)^[3] 和种间杂种 F₁ “二旱子” × *C. hystrix* ($2n=2x=19$, CH) 是我们实验室合成并已被鉴定的无菌苗。3 种不定芽生长状态一致时用于试验。

诱导不定芽时, 切取顶芽或腋芽 (0.5~1.0 cm), 转接到各种培养基上培养 (表 1 和 2)。培养基 pH 为 5.8, 光照度为 2 000~2 500 lx, 温度为 (26±1) °C。每个处理 10 瓶, 每瓶接 3~4 个芽。2~4 周后统计芽的增殖系数、生长速度和生长状态。试验重复 2 次。

丛生不定芽在 MS+6-BA 0.2 mg·L⁻¹ 上伸长至约 1.0 cm 时, 取健壮、整齐一致的芽接种于 1/2MS+0、0.2、0.5、1.0 mg·L⁻¹ IBA (相应的培养基编号为 H₁、H₂、H₃ 和 H₄)。10~15 d 后统计生根率、株高和根系生长情况, 揭去瓶盖适应 1~2 d 后移栽入 72 孔的育苗穴盘, 然后将栽有苗的穴盘放入

小拱棚中驯化。湿度 70%~80%, 温度 20~25 °C, 基质为珍珠岩和营养土 (1:2)。5 d 后逐渐揭开棚膜, 7 d 后完全揭开。组培苗驯化 2 周后定植于本校园艺实验农场。

参照陈劲枫和钱春桃^[7]的卷须制片法, 随机检测再生植株的体细胞染色体数目, 并观察它们的叶色、叶形、分枝性、茎的直径等形态学性状, 以之确定离体繁殖体系的遗传稳定性。

实验结果

1 丛生不定芽的诱导

培养 3~4 周后, 所有接种的顶芽或腋芽都能正常分化, 并且 3 种不同材料在不同处理中的增殖情况呈现明显差异 (表 1, 图 1-a)。从表 1 可看出, 3 种不同倍性的种间杂交资源的最大增殖系数随倍性升高而降低, 各自所需的 6-BA 浓度也不同。在表 1 的各种处理中, 双二倍体 *C. hytivus* 的增殖系数相对较低 (最大为 3.9)。而种间杂种 F₁ 和异源三倍体黄瓜的增殖系数, 在只添加 6-BA 的培养基上就能达到最大, 分别为 8.4 和 7.1, 相应的 6-BA 的浓度为 0.5 和 2.2 mg·L⁻¹; 超过各自的最佳浓度时, 增殖系数和不定芽长势均呈下降趋

表 1 不同浓度的 6-BA 和 NAA 对 3 种种间资源丛生芽诱导的影响

Table 1 Effect of 6-BA and NAA of various concentrations on shoot induction of three interspecific germplasm

6-BA / mg·L ⁻¹	NAA / mg·L ⁻¹	芽的增殖系数*		
		种间杂种 F ₁	异源三倍体黄瓜	双二倍体
0	0	1.5d	1.2e	1.2cd
0.5	0	8.4a	2.0de	2.5abcd
1.0	0	7.6a	3.6cde	2.8abc
1.5	0	6.5ab	4.0bcd	3.1ab
2.2	0	6.4ab	7.1a	3.9a
2.2	0.1	4.4bc	4.2bcd	3.0ab
2.2	0.2	5.3bc	6.3ab	2.8abc
2.2	0.5	3.3cd	5.1abc	2.6abc
3.0	0	1.5d	2.8cde	2.1abcd
3.0	0.1	5.0bc	4.7abc	3.0abc
3.0	0.2	2.8d	4.5bcd	1.9bcd
3.0	0.5	2.6d	3.0cde	0.7d

*Tukey 显著性分析 ($P<0.05$), 相同字母表示没有显著性差异。

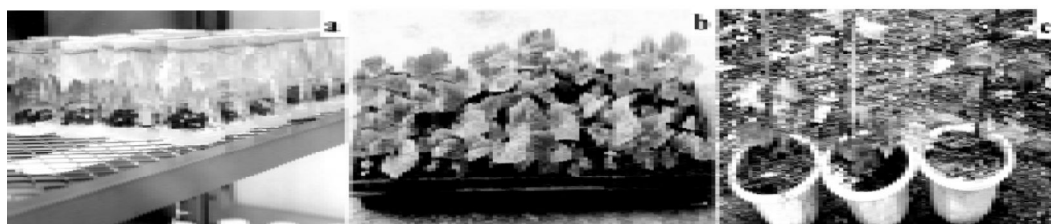


图1 甜瓜属种间材料再生植株、驯化苗及其田间表现

Fig. 1 Regenerative and acclimatized plants of interspecific germplasms in *Cucumis* and their growth vigor in field

a: 再生小植株; b: 驯化苗; c: 3种再生植株田间表现, 左为双二倍体, 中为异源三倍体, 右为杂种F₁。

势。6-BA 与 NAA 配合使用的各种培养基对本文中的 3 种材料的增殖效果均不如单独使用 6-BA 的最佳培养基, 种间杂种 F₁ 和异源三倍体黄瓜仅以 MS+2.2 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L⁻¹ NAA 较好, 而对双二倍体则无显著差异。

培养过程中还发现, 3 种材料的丛生不定芽在生长势上有明显差异。种间杂种 F₁ 和异源三倍体黄瓜更容易繁殖, 它们不仅繁殖系数远高于双二倍体, 而且培养 3 周后, 丛生不定芽颜色更绿, 更健壮, 芽长 1~2 cm, 清晰可见; 而双二倍体的丛生不定芽为 0.3~1.0 cm, 常由于有愈伤组织或老化的叶致使不定芽难以分辨。另外, 种间杂种 F₁ 和异源三倍体黄瓜一般 2~3 周就需转接一次, 其增殖速度快于双二倍体(通常每次 4 周)。

以 TDZ 替代 6-BA 用于双二倍体增殖的结果表明, 添加 0.05 mg·L⁻¹ TDZ 的培养基对 *C. hytivus* 丛生芽的诱导效果要优于不加 TDZ 的 MS (2.2 mg·L⁻¹ 6-BA), 增殖系数为 4.6, 增殖出呈墨绿色的健壮芽; 而在不加 TDZ 的培养基中, 芽的基部常产生较大的愈伤组织, 严重影响芽的分化(表 2)。但较高浓度的 TDZ (大于 0.2 mg·L⁻¹) 对双二倍

表2 不同浓度TDZ对双二倍体芽增殖的效应

Table 2 Effect of TDZ on shoot proliferation of amphidiploid *C. hytivus*

6-BA/mg·L ⁻¹	TDZ/mg·L ⁻¹	芽的增殖系数*	愈伤组织
2.2	0	3.9ab	+++
0	0.02	1.9c	+
0	0.05	4.6a	+
0	0.1	3.4b	++
0	0.2	1.5c	++

*Tukey 显著性分析 ($P < 0.05$), 相同字母表示没有显著性差异。“+”表示没有愈伤组织或很小; “++”愈伤组织小于 5 mm; “+++”愈伤组织直径为 5~10 mm。

体的不定芽生长有负作用, 不定芽接种 4~6 d 后就开始发黄, 最终不能分化而枯死。据此认为低浓度的 TDZ (0.05 mg·L⁻¹) 对双二倍体种 *C. hytivus* 增殖有效。

2 生根和驯化

3 种种间资源之间的生根结果无明显差异, 在无生长调节物质的 1/2MS 上的生根率较低, IBA 对生根有促进作用, 而且在生根率随 IBA 浓度的增加而升高(表 3)。但 IBA 浓度超过 0.5 mg·L⁻¹ 时, 根系生长快且数量多, 苗的基部会出现较多愈伤组织, 影响植株的生长, 进而影响驯化成活率。

表3 IBA对生根的影响

Table 3 Effect of IBA on rooting

培养基代号	IBA / mg·L ⁻¹	生根率* / %	株高*/cm	根系生长情况
H ₁	0	52.4	3.1 ± 0.5	粗、长
H ₂	0.2	84.5	2.5 ± 0.2	粗、长
H ₃	0.5	86.1	1.5 ± 0.3	细、长
H ₄	1	92.3	0.6 ± 0.1	细、长

*不定芽接种 15 d 后进行统计。

在 H₂ 培养基上生根, 根系健壮, 组培苗粗壮 (株高 2~4 cm), 其驯化成活率都在 90% 以上 (图 1-b)。而在 H₃ 和 H₄ 中的生根苗, 根系多但细长, 较高的 IBA 浓度影响了植株的生长。综合上述结果, 可以认为 1/2MS+0.2 mg·L⁻¹ IBA 是最佳生根培养基, 生根率高达 84.5%。

3 形态学观察和遗传稳定性

所有驯化成活的再生植株在田间都生长旺盛, 且均为多分枝 (图 1-c)。3 种不同倍性的种间杂交资源都分别具有各自特有的形态学特征, 彼此之间差异非常明显, 很容易区分。双二倍体种 *C. hystrix* 的叶为浅黄绿色, 叶缘呈波浪形皱褶; 异源三倍体叶为五角心状形, 呈墨绿色, 长势非常旺; 杂种 F₁ 的叶为戟形, 呈浅黄色, 茎的直径为 0.4~0.6 cm, 比另外两个材料的小 0.2~0.4 cm。

同种材料的再生植株群体形态表现整齐一致, 即使增殖多代后也没发现形态学性状上的变化。3 种再生植株均随机选取 5 株进行体细胞染色体鉴定, 每株都观察 30 个以上分散良好的卷须分生细胞, 结果所有体细胞染色体均为所期望的数目, 即种间杂种 F₁、异源三倍体黄瓜和双二倍体的体细胞染色体仍分别为 2n=19、26 和 38, 表明微繁的再生植株遗传稳定。

讨 论

3 种不同倍性的种间材料种间杂种 F₁ (CH)、异源三倍体 (HCC) 和双二倍体种 *C. hystrix* (HHCC), 在增殖能力 (增殖系数)、增殖速度以及增殖所需的最佳激素浓度上均存在很大的差异。这可能是由于它们的基因组拷贝数不同, 导致这 3 种材料本

身所具有的内源激素水平不同, 或者它们在新陈代谢和酶活性等都存在差异。

本文建立的 3 种不同倍性的种间资源的离体繁殖体系, 可为深入开展栽培黄瓜和近缘野生种 *C. hystrix* 间的种间杂交的基础研究和应用研究提供试验材料, 使得创制的甜瓜属种间资源能尽早进入品种选育程序, 从而能够利用已获得的种间材料和建立的技术体系培育出黄瓜-*C. hystrix* 单体异附加系^[8], 再经过进一步的回交、杂交或花药培养等方法获得优良的小片段易位系, 实现黄瓜的品种改良。

参考文献

- 1 Chen JF, Staub JE, Tashiro Y et al. Successful interspecific hybridization between *Cucumis sativus* L. and *C. hystrix* Chakr. *Euphytica*, 1997, 96: 413~419
- 2 Chen JF, Staub JE, Qian CT et al. Reproduction and cytogenetic characterization of interspecific hybrids from *Cucumis hystrix* Chakr. × *C. sativus* L. *Theor Appl Genet*, 2003, 106: 688~695
- 3 Chen JF, Luo XD, Staub JE et al. An allotriploid derived from a amphidiploid × diploid mating in *Cucumis* I: Production, micropropagation and verification. *Euphytica*, 2003, 131: 235~241
- 4 庄飞云, 陈劲枫, 钱春桃等. 甜瓜属种间杂交新种及其后代对低温的适应性反应. *南京农业大学学报*, 2002, 25: 27~30
- 5 钱春桃, 陈劲枫, 庄飞云等. 弱光条件下甜瓜属种间杂种的某些光合特性. *植物生理学通讯*, 2002, 38(4): 336~338
- 6 李洪杰, 郭北海, 张艳敏等. 利用组织培养和辐射诱变创造高频小麦与簇毛麦染色体易位. *遗传学报*, 2000, 27(6): 511~519
- 7 陈劲枫, 钱春桃. 利用几种园艺作物卷须制片鉴定染色体数目的研究. *园艺学报*, 2002, 29(4): 378~380
- 8 陈劲枫, 罗向东, 钱春桃等. 黄瓜单体异附加系的筛选与观察. *园艺学报*, 2003, 30(6): 725~727