

黄瓜多倍体育种中同源四倍体的合成和鉴定

陈劲枫* 雷春 钱春桃 罗向东 庄飞云

作物改良与种质创新国家重点实验室, 南京农业大学园艺学院, 南京 210095

提要 在室温条件下, 用0.2%、0.4%、0.8%的秋水仙素水溶液分别处理黄瓜“津绿四号”干种子和萌动种子。结果表明, 0.4%的秋水仙素浸萌动种子4h的染色体加倍效果最好, 加倍率可达26.7%。与原二倍体相比, 同源四倍体的侧枝数减少, 叶柄变短, 叶面积增大, 花器变大, 果型指数减小。四倍体花粉粒大小不一, 每一朵花中平均有2.3%的4孔花粉粒; 四倍体花粉的可染率和萌发率均显著降低。

关键词 黄瓜; 四倍体; 秋水仙素

Synthesis and Characterization of Autotetraploid in Cucumber Polyploid Breeding

CHEN Jin-Feng*, LEI Chun, QIAN Chun-Tao, LUO Xiang-Dong, ZHUANG Fei-Yun

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

Abstract The dry seeds and germinating seeds of the cultivar “Jinlv No.4” of *Cucumis sativus* were treated with 0.2%, 0.4% and 0.8% colchicines under room temperature, respectively. Results showed that treatment on germinating seeds with 0.4% colchicines for 4 h yielded the highest chromosome-doubled rates (26.7%). Prominent difference occurred between induced tetraploids and diploid controls in morphology. And the number of lateral branches of tetraploids was less, the length of petiole was shorter, the size of the leaves and flowers was larger, and fruit index was less. The size of tetraploid pollen grains varied and nearly 2.3% four-sized pollen grains were observed in each male flower. The staining ability and germination rates of tetraploid pollen grains decreased greatly compared with the controls.

Key words cucumber; tetraploid; colchicines

同源多倍体是遗传学和育种学中重要的中间材料。由于染色体倍数的增加, 它可被用来做亲本, 以提高远缘物种间的可杂交性^[1]。另外, 在同源多倍体与原二倍体杂交、回交后代中可以进行各种非整倍体的筛选^[2], 进而用于该物种的基因定位、连锁群分析和分子标记等研究^[3]。还有, 由于基因剂量的增加, 多倍体植物在产量、品质或抗性等方面优于二倍体。如同源四倍体白菜“南农矮脚黄”的产量比二倍体增加20%~30%, 抗病性、抗热性也均优于二倍体^[4]; 同源四倍体茄子“新茄1号”果实的维生素C、脂肪和蛋白质含量分别比二倍体品种增加74.38%、31.30%和34.22%^[5]。所有这些均说明研究同源四倍体是有意义的。

一般认为, 秋水仙素阻碍或破坏纺锤丝的形成, 使染色体停留在赤道板上, 不向两极移动, 细胞中间也不形成新的核膜, 以致分裂的染色体停留在一个细胞核中, 因而染色

体加倍。用秋水仙素合成同源多倍体, 在叶菜类^[4]、根菜类^[6]、茄果类^[5]和瓜类^[7~9]等蔬菜中都有成功报道。Mackiewicz和Malepszy^[7]用0.5%的秋水仙素水溶液处理6份二倍体黄瓜材料, 成功地得到同源四倍体黄瓜, 并对此种四倍体和以其创制的三倍体作了一系列定性研究^[8,9]。迄今国内对黄瓜同源四倍体的研究仍很少, 已有报道只对同源四倍体的合成条件作了初步说明^[10,11], 缺乏对形态特征、生育特性等方面的系统研究。本文探讨黄瓜同源四倍体的合成和鉴定。

收稿 2003-04-21 修订 2003-09-16

资助 国家高技术研究发展计划专项经费(2002AA241251, 2002AA207012)、国家自然科学基金(30170644)、教育部“跨世纪优秀人才培养计划”和教育部科技研究重点项目(01097)。

* E-mail: jfchen@njau.edu.cn, Tel: 025-4396279

材料与方法

试验于2002年8月中旬到11月上旬在本校园艺场进行。材料为华北型黄瓜(*Cucumis sativus*)品种“津绿4号”。

在预备试验的基础上,以4 h为处理时间,用0.2%、0.4%、0.8% 3种浓度梯度的秋水仙素水溶液分别浸泡黄瓜干种子各45粒和已露出0.5~1.0 cm胚根长的萌动种子各30粒,以蒸馏水处理为对照。处理后用自来水冲洗种子3遍并播入营养钵。幼苗长至两叶一心时,移入试验地定植。

植株长成后,观察记录每株的侧枝数和第一雌花节位,并测定第1、5、10、15、20节的节间长、茎粗、叶长、叶宽、叶柄长、叶柄粗等指标;每株分别取3朵当天开放的雌、雄花,测定花萼长、花瓣长和宽、子房长和直径;每株取3条商品瓜测瓜长、直径和果梗长。试验数据采用SPSS软件进行F测验。

在形态学初步筛选的基础上,参照前文^[12]的方法,取约1.5~3 mm长的卷须进行染色体计数。统计处理株、成活株、染色体数目变异株和加倍株的数目,计算成活率(成活株数/处理株数)、变异率(染色体数目发生变异的株数/处理株数)和加倍率(加倍株数/处理株数)。

于晴天上午8:00左右,取当天开放的雄花进行花粉粒大小、形状、可染性、萌发率的观察和统计。用1%的醋酸洋红滴染,每朵花任取30个花粉粒测量大小(长×宽);同时,每朵花任取30个视野统计四孔花粉率(具4个萌发孔的花粉粒数/该视野总花粉粒数)、花粉可染率(被醋酸洋红染色的花粉粒数/该视野总花粉粒数)。参照文献13的方法,用含10%蔗糖、0.02%硼酸和0.8%琼脂的培养基进行花粉离体萌发。花粉管长度超过花粉粒直径时,作为可萌发花粉粒。每朵花任取30个视野统计萌发率(萌发的花粉粒数/该视野总的花粉粒数)。镜检在光学显微镜OLYMPUS(BX-51)10×10镜下进行。试验数据采用SPSS软件进行F测验。

实验结果

1 不同处理诱导同源四倍体黄瓜的效果

从211株秋水仙素处理存活的幼苗中筛选到23株(占10.9%)同源四倍体($2n=4x=28$)植株(图1-a),浸萌动种子比浸干种子效果更好(表1),浸萌动种子的成活率比浸干种子的高。两种处理的成活率均随处理浓度的升高而先升后降,成活率均在90%以上,其中0.4%秋水仙素浸萌动种子4 h时的成活率最高,达100%。从变异率来说,浸

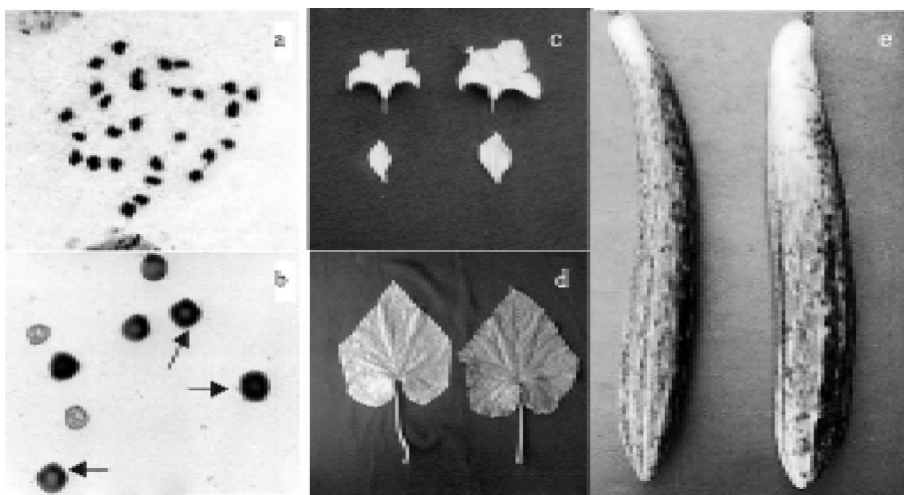


图1 同源四倍体黄瓜的体细胞染色体和部分形态学特征

Fig. 1 Somatic chromosome and some morphological characters of the tetraploid cucumber

a. 四倍体体细胞($2n=4x=28$); b. 四倍体花粉粒变异(箭头所示为4个萌发孔的花粉粒); c. 二倍体与四倍体雄花形态的比较(左为二倍体;右为四倍体); d. 二倍体与四倍体叶形比较(左为二倍体;右为四倍体); e. 二倍体与四倍体的果型比较(左为二倍体;右为四倍体)。

表1 秋水仙素诱导四倍体黄瓜的效应
Table 1 Effect of colchicines treatments on induction of tetraploid cucumber

处理	秋水仙素浓度/%	处理株数	成活率/%	变异率/%	加倍率/%
处理干种子	0.2	45	91.1	13.3	2.2
	0.4	45	95.6	11.1	8.7
	0.8	45	91.1	17.8	6.7
处理萌动种子	0.2	30	96.7	23.3	0
	0.4	30	100.0	46.7	26.7
	0.8	30	90.0	50.0	23.3

萌动种子的变异率明显比同一浓度秋水仙素浸干种子的高。两种处理方式的变异率均随处理浓度的升高而升高, 其中0.8%浸萌动种子的变异率最高, 达50%。就加倍率而言, 浸萌动种子的加倍

率显著高于浸干种子的。随着处理浓度的升高, 两种处理方式的加倍率均先升后降, 0.4%浓度的秋水仙素浸萌动种子加倍率最高, 达26.7%。

萌动的种子经秋水仙素处理后出苗减慢。而用0.8%秋水仙素处理的有些植株严重畸形, 所有植株开花均延后10~20 d。由此可见, 虽然较高的秋水仙素浓度能诱导较高的变异, 但由于其毒害过重而导致成活率下降, 加倍率也因之降低。

2 同源四倍体黄瓜的形态特征

四倍体与二倍体在形态上有很大差异(图1-c、d、e)。与原二倍体相比, 四倍体植株的侧枝数减少、叶片变厚、叶柄变短、叶面积增大、叶缘呈明显皱褶; 雄花花瓣变大, 萼片变长; 雌花花瓣变长, 果型指数减小28.3%; 幼果的果刺, 果棱, 果梗, 瓜柄均更显突出, 差异均很显著。但四倍体植株的节长、茎粗、叶柄粗、

表2 黄瓜同源四倍体与二倍体形态特征比较
Table 2 Comparison of morphological characters in tetraploid and diploid cucumbers

	茎						叶 雄花		
	节长/cm	茎粗/mm	侧枝数	叶柄长/cm	叶柄粗/mm	叶长/cm×叶宽/cm	花瓣长/cm	花瓣宽/cm	萼片长/cm
二倍体	10.4±2.3	6.9±0.6	2.8±1.3	14.2±2.9	6.4±0.9	20.0×16.3	1.5±0.3	1.1±0.3	0.7±0.4
四倍体	11.5±2.7	6.7±0.9	0.1±0.4**	11.9±2.2**	5.9±0.9	22.1×15.6**	2.2±0.3**	1.8±0.4**	1.0±0.3**
	雌花				果实				
	第一雌花节位	花瓣长/cm	花瓣宽/cm	萼片长/cm	子房长/cm×直径/cm	果梗长/cm	瓜长/cm×直径/cm	果形指数	
二倍体	8.0±2.5	1.7±0.5	1.3±0.3	1.8±0.4	4.9×0.7	2.9±0.5	33.9×3.9	8.7±1.5	
四倍体	9.4±2.4	2.1±0.3*	1.5±0.4	1.3±0.3	4.5×0.8	3.3±0.7	30.4×5.0	6.3±0.9*	

*表示在0.05水平上显著; **表示在0.01水平上显著。

第一雌花节位、雌花花瓣宽和萼片长、子房大小、商品瓜大小和果梗长均与二倍体植株无显著差异(表2)。

3 同源四倍体黄瓜花粉的形态和活力

同源四倍体黄瓜的花粉粒长度比原二倍体的长27%左右, 直径大22%左右, 差异极显著(表3)。原二倍体的花粉粒大小一致且均为3个萌发孔, 而四倍体黄瓜花粉粒大小不一致, 多皱缩、畸形, 其中2.3%的花粉粒具有4个萌发孔(图1-b)。四倍体花粉的可染率和萌发率仅为57%和

表3 同源四倍体黄瓜花粉的形态和活力
Table 3 Morphology and viability of pollen grains between diploid and tetraploid cucumber

	花粉长/mm×直径/mm	四孔花粉率/%	花粉可染率/%	花粉萌发率/%
二倍体	56.4×52.2	0	94.0±6.0	84.0±6.1
四倍体	71.6×63.9**	2.3±2.6**	57.0±22.0**	37.0±13.0**

**表示在0.01水平上显著。

37%, 而原二倍体的分别达到94%和84%, 差异极显著(表3)。

讨 论

本文用秋水仙素处理黄瓜种子共获得23株同源四倍体植株, 这为黄瓜非整倍体的创制奠定了基础。其中, 用0.4%秋水仙素浸黄瓜萌动的种子, 诱变加倍频率可达26.7%, 效果很好。其原因可能有二: (1)种子萌动阶段的细胞处于代谢及合成的旺盛时期, 体细胞易于突变; (2)我们的试验是在秋季进行的, 这时的温度条件(25℃左右)可能较有利于诱变的四倍体细胞保持良好的分裂生长, 没有出现低温阻碍细胞分裂和过高温度导致秋水仙素对细胞的损害增强等现象。

观察植株和花粉粒的形态可作为一种快速有效的黄瓜四倍体鉴定方法。本文结果显示: 每一朵四倍体黄瓜的雄花中均有一定频率(2.3%)的4孔花粉粒, 而二倍体的花粉粒均为3个萌发孔。这一现象在甜瓜多倍体中也有过报道^[14, 15]。另外, 我们还发现形态学筛选与染色体鉴定两者的符合程度可达85.7%, 这为大规模地开展同源四倍体植物的育种提供了技术基础。

参考文献

- 常金华, 罗耀武. 同源四倍体高粱与约翰逊草杂交及其后代表现. 草业学报, 2002, 11(1): 56~58
- 程祝宽, 李欣, 于恒秀等. 一套新的籼稻初级三体的选育和细胞学鉴定. 遗传学报, 1996, 23(5): 363~371
- KhushGS, SingRJ, SurSC et al. Primary trisomics of rice: origin, morphology, cytology and use in linkage mapping. *Genetics*, 1984, 107:141~163
- 刘惠吉, 曹寿椿, 王华等. 南农矮脚黄四倍体不结球白菜新品种的选育. 南京农业大学学报, 1990, 13(2): 33~40
- 李树贤, 吴志娟, 杨志刚等. 同源四倍体茄子品种新茄一号的选育. 中国农业科学, 2002, 35(6): 686~689
- Adaniya S, Shirai D. *In vitro* induction of tetraploid ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and its pollen fertility and germinability. *Sci Hort*, 2001, 88: 277~287
- Mackiewicz HO, Malepszy S. Obtaining and characterization of tetraploid forms in cucumber—*Cucumis sativus* L. var. *sativus* and var. *hardwickii* Alef. *Folia Hort*, 1996, 8(1): 3~10
- Sarreb DA, Mackiewicz HO, Malepszy S. Triploids in cucumber: V. The effect of the homo- and heterozygous states on some traits of triploids grown in the field and under cover. *Folia Hort*, 2000, 12: (1): 85~98
- Sarreb DA, Skapski-H, Mackiewicz HO. Triploids in cucumber: VI. Effect of triploidy level on yield and fruit quality. *Folia Hort*, 2001, 13(1): 45~53
- 韩毅科, 杜胜利, 王鸣等. 黄瓜染色体加倍研究. 天津农业科学, 2002, 8(2): 1~4
- 张成妹, 陆家安. 黄瓜组织培养与诱导四倍体再生植株. 上海农业学报, 1995, 11(3): 31~35
- 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
- 刘永庆. 葫芦科蔬菜花粉萌发特性的研究. 武汉植物学研究, 1994, 12(3): 213~216
- Fassuliots G, Nelson, B. Regeneration of tetraploid muskmelon from cotyledon and their morphological differences from two diploid muskmelon genotypes. *J Am Soc Hort Sci*, 1992, 117: 863~866
- Adelberg JW, Rhodes BB, Skorupska HT et al. Explant origin affects the frequency of tetraploid plants from tissue cultures of melon. *HortSci*, 1994, 29(6): 689~692