

秋水仙素在果树多倍体育种中的研究进展

刘璐璐, 柴明良

(浙江大学园艺系, 杭州 310029)

摘要: 对秋水仙素在果树多倍体育种中的应用进行了概述。主要包括利用秋水仙素诱变已经获得多倍体的果树种类及其品种; 诱变浓度及诱变特点; 诱导多倍体的途径及倍性鉴定方法, 并指出了目前所存在的问题与研究动向。

关键词: 果树; 秋水仙素; 多倍体育种

中图分类号: S66; S603.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2006)06-0048-02

果树具有童期长、自交不亲和及染色体组高度杂合等特点, 这给常规果树育种工作带来了操作繁琐, 耗时长等困难。在多倍体育种中, 人工诱导的研究开始于 20 世纪初, 当时采用的方法多数是物理方法, 诱变率低, 直到 1937 年 Blackeslee 和 Avery 利用秋水仙素诱导曼陀罗四倍体获得成功后, 人工诱导多倍体才进入新时代。秋水仙素通过阻碍纺锤丝的形成, 使中期染色体不能分配到两个子细胞中, 从而导致细胞中染色体数目的加倍。多倍体育种的优越性在于植株细胞染色体适当多倍化后所表现的“巨大性”。果树多倍体一般具有生长健壮, 枝粗, 叶厚, 果大, 少籽或无籽, 产量高, 细胞内许多有效成分如蛋白质、糖分含量都显著增加, 从而具有适应性强和抗逆性强等优点, 且这些优点可通过嫁接等无性繁殖得到保持, 在经济效益和育种理论研究上都有重要意义。

1 已经获得多倍体的果树种类及其品种

到目前为止, 已在苹果、梨、桃、葡萄、草莓、柑桔等果树中诱变成功。早在 50 年代, Dermen^[1]报道了在夏葡萄(*V. aestivalis*)、欧洲葡萄(*V. vinifera*)和圆叶葡萄(*V. rotundifolia*)中通过诱导获得了四倍体或嵌合体。用秋水仙素为诱变剂对二倍体葡萄进行处理, 已经分别在玫瑰香^[2]、瑰宝^[3]及京秀和红地球^[4]上获得了四倍体。Dermen 和 Darrow^[5]用秋水仙素诱导加倍得到 4X 的森林草莓(*Fragaria vesca*)和 16X 的风梨草莓(*F. ananassa*)。雷家军等^[6]用秋水仙素处理草莓茎尖, 得到了草莓野生种、种间杂种及品种共 27 个加倍株系和一些混倍体株系。石荫坪^[7]用不同浓度的秋水仙素处理苹果的杂种胚获得同质四倍体, 王长泉^[8]用秋水仙素处理苹果品种‘嘎拉’和‘千秋’离体营养器官, 获得了单细胞或少数细胞起源的不定芽, 既保持了原品种的优良性状, 又可获得高频同质四倍体。谷晓峰等^[9]以‘罗田甜柿’试管苗离体叶片为材料, 获得的倍性变异株为同质 12 倍体; 王娜等^[10]用秋水仙素诱导了二倍体的冬枣和酸枣得到了四倍体植株; Gu 等^[11]以沾化枣为材料诱导出了同质四倍体。梨在此方面的研究较困难, 成功报道相对较少, Kadota 和 Niimi^[12]在日本梨上用秋水仙素诱导出嵌合体, 而后用组培的方法筛选出四倍体芽。

在柑桔属果树上, Yahata 等^[13]用秋水仙素从柚品种‘Ban-peiyu’的单倍体上得到了(X+2X 和 2X+4X)嵌合芽, 经过嫁接后得到了整倍体枝条。Wu 等^[14]得到了柑桔品种‘Umatilla’的同质四倍体和‘Dweet’的混倍体。

2 秋水仙素的诱变浓度及诱变特点

秋水仙素需过滤灭菌后使用。对植株的诱变效果, 因其处理的材料、浓度和处理时间的不同而异, 一般浓度在 0.01%~1.00% 之间。其特点为: 在一定范围内, 变异率随秋水仙素浓度的增加和处理时间的延长而增加; 超过一定范围, 变异率与时间、浓度呈负相关, 这是由于秋水仙素毒害作用加重所致。通常的方法是使用临界范围内的高浓度和短时间处理法, 以诱发多倍体的百分率最高而致死和受害的数目最少时最理想。

3 秋水仙素诱导果树多倍体的途径

3.1 活体诱导

因秋水仙素作用于正在分裂的细胞, 一般处理植株生长旺盛的部位, 常选用萌发的种子, 幼苗, 嫩梢及芽为处理材料, 用一定浓度的秋水仙素对材料进行浸渍、涂抹、滴液、注射等处理进行诱变。

3.2 离体诱导

以叶片、带有腋芽的茎段、愈伤组织、胚或单个细胞为诱变材料, 再通过组织培养技术筛选分化再生植株, 获得同质的多倍体并提高诱变效果。这方面研究已在苹果、葡萄、草莓以及柑桔类果树上开展。王长泉等^[8]用过滤灭菌后的秋水仙素在无菌条件下浸泡苹果‘嘎拉’和‘千秋’叶片; 雷家军等^[6]将草莓组培苗新茎生长点接种于含秋水仙素的 MS 培养基中生长, 数天后转入不含秋水仙素的培养基中培养; 王敏勤^[15]等以葡萄品种‘胜利’夏梢花的花药、花丝诱导产生的愈伤组织为基础, 在分化培养基上分化的鱼雷状胚体及其长成约 2 cm 的正常幼苗为供试材料, 分别浸入装有各浓度秋水仙素溶液的培养皿中处理; 谷晓峰^[9]等取柿的组培苗叶片, 切成 4~6 小片, 置于含有不同浓度的秋水仙素溶液中进行处理。

4 多倍体的鉴定

4.1 形态学鉴定

染色体数目的变化导致了植株外部形态发生变化。“巨

大性”是多倍体植株的普遍表现。较明显的有花器官变大,花粉粒变大,果实变大,气孔数目减少而单个气孔变大。气孔的测定是用无色指甲油膜印叶背面的气孔,在显微镜下计数,并用目镜测微尺测量。Einset^[16]、Einset 和 Imhofe^[17]已报道了由于亲本染色体的加倍而出现了“大果”或“巨果”的苹果芽变,茎干粗壮。形态学鉴定是对多倍体进行初选的较好方法。

4.2 细胞学鉴定

染色体数目:取待测植株叶片,用“去壁低渗法”制片在显微镜观察染色体数目并对中期细胞拍照;核仁数目:细胞分裂间期取待测植株的幼叶、茎尖,用“去壁低渗法”制片,显微镜下统计每个细胞核仁数目;采用流式细胞仪测定诱变植株细胞的DNA含量;通过生化指标测定和分子标记来鉴定多倍体。

在许多染色体加倍的实验中,对经染色体数目鉴定为多倍体的植株及对照植株进行梢端组织学切片,观察比较梢端三个组织发生层(L₁、L₂、L₃)细胞的大小来筛选同质多倍体。在果树上,通过诱变获得的多倍体材料多为混倍体类型,因此为了解其倍性结构而做倍性结构鉴定也极有必要。在葡萄上,陈俊等^[3]共进行了三方面的研究:①因葡萄不定根起源于中柱鞘,为L₂层所衍生,由根尖细胞染色体数目观察,可推知L₂层的倍性;②花粉粒由L₃层衍生组织形成,其大小与倍性密切相关。花粉粒的巨大性和形状的不整齐是许多多倍体植物的特征。据此可间接说明L₃层的倍性变化;③气孔保卫细胞大小和其中叶绿体数可作为L₁层倍性鉴定指标。为推断L₁层倍性可测定和统计保卫细胞长、宽及其中的叶绿体数。

5 存在的问题与研究新动向

嵌合体问题一直以来困扰着多倍体育种,近年来随着组织培养技术与多倍体育种的结合使用,找到了筛选嵌合体的突破口。经过秋水仙素处理的器官和组织可被诱导产生不定芽获得整倍体。刘庆忠等^[18]以苹果叶片为材料诱导不定芽,采用低浓度长时间处理方法还发现:秋水仙素存在于叶片不定芽原基形成的全过程中,这也就最大程度地减少或排除了嵌合体形成的可能性。由于不定芽一般由一个或几个表皮细胞或亚表皮细胞发育而来,这部分细胞的倍性状况与形成的不定芽的倍性状况有直接的关系。组织培养中还有很多因素可影响不同倍性细胞的分化,如何利用这些条件,得到更简便的筛选嵌合体的方法,还有待于进一步的研究。

秋水仙素引起作物的非多倍体变异问题^[19],早在1945~1948年间K.捷列什克维丘克利用秋水仙素诱变番茄多倍体时就已经发现。之后,有许多科研工作者也从不同角度提出利用秋水仙素诱变多倍体时部分染色体在臂比、着丝粒位置等方面有明显的差异。因此,秋水仙素的作用机理及对诱变对象的影响需要进一步深入研究,以便更好地加以利用。

另外,秋水仙素加倍处理对植物本身是有害的,除非提高植株的杂合性,否则具有生产大果潜力的四倍体植株产量却

不会增加。要提高植株的杂合性,可以用遗传上较远的二倍体与之进行杂交,获得三倍体,或者将其与其它四倍体品种进行杂交以提高多倍体的杂合性,这就大大加重了育种工作量。另外,此过程中还存在杂交亲和性问题,因此需要我们做不懈的探索,以获得真正有实用价值的稳定的多倍体。

参考文献:

- [1] Demmen H. Colchicoidy in grapes[J]. The Journal of Hteredilib, 1954, 45(4): 159—172.
- [2] 罗耀武, 乔子靖, 朱子英, 等. 人工诱变获得四倍体玫瑰香葡萄的研究[J]. 园艺学报, 1997, 24(2): 125—128.
- [3] 陈俊, 李臀科, 李太宝, 等. 诱导葡萄多倍体研究[J]. 果树科学, 1995, 12(3): 151—155.
- [4] 马爱红, 范培格, 孙建设, 等. 四倍体葡萄诱导技术的研究[J]. 中国农业科学, 2005, 38(8): 1645—1651.
- [5] Dermen H, Darrow G.M. Colchicine induced tetraploid and 16—ploid strawberry[J]. Proc Amer Soc Hort Sci, 1938, 35: 300—301.
- [6] 雷家军, 吴禄平, 代汉萍, 等. 草莓茎尖染色体加倍研究[J]. 园艺学报, 1999, 26(1): 13—18.
- [7] 石荫坪, 王强生, 周光芳. 苹果试管苗染色体组工程育种[J]. 落叶果树, 1993, (4): 1—6.
- [8] 王长泉, 李雅古, 崔德才, 等. 苹果叶片离体培养中秋水仙素加倍效应的研究[J]. 核农学报, 1997, 11(1): 23—25.
- [9] 谷晓峰, 罗正荣. 秋水仙素处理“罗田甜柿”获得12倍体再生植株[J]. 园艺学报, 2003, 30(3): 325—327.
- [10] 王娜, 刘孟军, 代丽, 等. 秋水仙素离体诱导冬枣和酸枣四倍体[J]. 园艺学报, 2005, 32(6): 1008—1012.
- [11] Gu XF, Yang AF, Meng H, et al. In vitro induction of tetraploid plants from diploid *Zizyphusjujube* Mill. cv. Zhanhua[J]. Plant Cell Rep, 2005, 24: 671—676.
- [12] Kadota M, Niimi Y. In vitro induction of tetraploid plants from a diploid Japanese pear cultivar (*Pyrus pyrifolia* N. vc. Hosui)[J]. Plant Cell Rep 2002, 21: 282—286.
- [13] Yahata M, Kunitake H, Yahuya T, et al. Production of a doubled haploid from a haploid pummelo using colchicine treatment of axillary shoot buds[J]. J Amer Soc Hort Sci, 2005, 30(6): 899—903.
- [14] Wu JH, Mooney P. Autotetraploid tangor plant regeneration from in vitro Citrus somatic embryogenic callus treated with colchicines[J]. Plant Cell Tiss Org Cult, 2002, 70(1): 99—104.
- [15] 王敏勤, 鲍雪珍, 王晓红. 葡萄多倍体诱导的初步研究[J]. 山东农业科学, 2000, (1): 19—20.
- [16] Einset J. The spootaneous origin of polyploid apples[J]. Proc Amer Soc Hort Sci, 1945, 46: 91—43.
- [17] Eirtset J, Imhofe B. Chromosome numbers of apple varieties and sports 3[J]. Proc Amer Soc Hort Sci, 1951, 58: 103—108.
- [18] 刘庆忠, 赵红军, 刘鹏, 等. 秋水仙素处理离体叶片获得皇家嘎拉苹果四倍体植株[J]. 果树学报, 2001, 18(1): 7—10.
- [19] 赵彦华, 吴国良, 药文生. 果树多倍体育种研究进展[J]. 山西果树, 2004, (4): 35—36.