

黄瓜未授粉子房培养获得同源四倍体

刁卫平, 贾媛媛, 江彪, 鲍生有, 娄群峰, 陈劲枫*

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

摘要: 为获得稳定纯合的同源四倍体黄瓜材料, 采用多种分化培养基对黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) 未授粉子房培养形成的胚进行培养。结果共获得 33 个再生植株, 经染色体计数后发现 7 株为同源四倍体植株 ($2n = 4x = 28$)。利用 SSR 手段对获得的同源四倍体植株进行了同质性鉴定, 发现均为纯合子。利用形态学观察和染色体计数法对同源四倍体单株自交后代的遗传稳定性进行了研究, 结果表明自交后代倍性没有发生变异。对此类型同源四倍体植株和经秋水仙素诱导获得的同源四倍体植株分别进行了花粉可染率、花粉萌发率及自交结籽数的观察, 发现前者具有高的育性, 自交结籽数为 15 ~ 34 粒。上述结果表明, 黄瓜未授粉子房培养是获得同源四倍体的一条途径, 获得的稳定纯合且育性好的同源四倍体材料可作为特异资源用于黄瓜倍性育种。

关键词: 黄瓜; 子房培养; 同源四倍体

中图分类号: S 642.2 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2008) 12-1781-06

Induction of Autotetraploid Cucumbers by Unpollinated Ovary Culture and Their Characterization

DAO Wei-ping, JIA Yuan-yuan, JIANG Biao, BAO Sheng-you, LOU Qun-feng, and CHEN Jin-feng*

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

Abstract: Gynogenic embryos originating from unpollinated ovary culture were cultured on differentiation medium to induce homozygous autotetraploid cucumber. In total, thirty-three plantlets were regenerated, and seven were observed as autotetraploid ($2n = 4x = 28$) after chromosome counts. These autotetraploid plants were identified as homozygote after simple sequence repeat (SSR) analysis. Genetic stability of the progenies from self-crossing of these autotetraploid was studied, no ploidy variation occurred among these progenies after morphology and chromosome observation. Comparative studies were carried out between autotetraploid plants from ovary culture and autotetraploid plants from colchicines treatment, using parameters, stainability of pollen grains, viability of pollen grains and number of seeds per fruit. Higher pollen fertility and number of seeds per fruit were found in the gynogenic induced autotetraploid plants. These results indicate that it is a method to induce autotetraploid through unpollinated ovary culture, and the obtaining of homozygous autotetraploid with higher fertility will be quite useful in cucumber breeding programs.

Key words: cucumber; *Cucumis sativus* L.; ovary culture; autotetraploid

同源四倍体可以用作亲本来提高远缘物种间的可杂交性 (常金华和罗耀武, 2002), 与原二倍体杂交回交筛选各种非整倍体特异材料 (程祝宽等, 1996), 而且在产量、品质和抗性上可能有优于二倍体的表现 (李树贤等, 2002; Muhammad et al, 2005)。但目前黄瓜同源四倍体的诱导和利用

收稿日期: 2008 - 08 - 26; 修回日期: 2008 - 11 - 03

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目 (2006AA100108, 2006AA10Z108, 2008AA10Z150); 国家支撑计划项目 (2006BAD13B06, 2006BAD01A7-5-11); 江苏省高新技术研究计划项目 (BG2007301)

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: jfchen@njau.edu.cn)

中存在诱导方式单一, 获得的四倍体稳定性差、育性低且与二倍体植株正反交后均不能得到饱满种子等问题 (Mackiewicz & Malepszy, 1996; 韩毅科 等, 2002; 陈劲枫 等, 2004)。

已有大量的研究发现, 在诱导单倍体的组织培养过程中可以得到一定比例的同源四倍体植株 (Geoffriau & Kahane, 1997; Endang et al, 2006), 此类四倍体可能是来源于体细胞自发加倍或单倍体细胞经过两次加倍后的产物, 而两类产物在遗传学上分别定义为异质型和同质型 (Eduard & Richard, 2000)。Endang等 (2006) 在对葱的未授粉子房培养诱导单倍体过程中获得的四倍体进行核型分析后认为, 此四倍体是体细胞简单加倍的产物。目前对单倍体培养过程中所获得的同源四倍体植株的育性、遗传稳定性和同质性的研究甚少。

黄瓜未授粉子房培养已有少数的成功报道 (杜胜利 等, 2001; Gemes-Juhasz et al, 2002), 但在再生植株中未发现同源四倍体。作者在对黄瓜未授粉子房培养过程中形成的胚进行再生培养后, 获得了一批同源四倍体植株。这些同源四倍体材料具有纯合、稳定和育性好等优点, 这为今后黄瓜同源四倍体的获得提供了一条新途径, 并为黄瓜的多倍体育种奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

以二倍体黄瓜‘津绿四号’ (Jinlü4) 未授粉子房培养过程中获得的胚 (刁卫平等, 2008) 为试验材料进行芽的分化和植株的再生。将获得的经鉴定为同源四倍体且驯化成活的植株分别编号为 Tetra-1、Tetra-2、Tetra-3、Tetra-4、Tetra-5和 Tetra-6, 并将其作为试验材料。育性观察试验中所用二倍体材料为‘津绿四号’, 同源四倍体 Tetra-Jinlü由本实验室通过秋水仙素诱变二倍体‘津绿四号’获得 (陈劲枫 等, 2004)。

所用试材于 2007年秋种植在南京农业大学蔬菜实验地, 常规管理。

1.2 植株再生与倍性鉴定

将黄瓜未授粉子房培养获得的胚分别接种在添加 TDZ、6-BA、NAA和 KT的 MS培养基 (琼脂 0.8%, 蔗糖 3%, pH 5.8) 中进行分化培养。培养温度 (26 ± 1) ; 光照强度 2 000 ~ 2 500 lx, 光照时间 $16 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

每 3周更新一次培养基。将获得的再生苗不定芽接种在 $1/2 \text{ MS} + 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA培养基中进行生根培养, 培养基基本成分及培养条件与芽分化培养相同。

2周后将组培苗用自来水洗净后移栽入育苗穴盘, 置于小拱棚中驯化。相对湿度 80% ~ 90%, 温度 $20 \sim 25$ 。一周后揭开小拱棚, 2周后定植。

参照陈劲枫和钱春桃 (2002) 的方法对再生植株进行体细胞染色体计数, 确定其倍性。

1.3 再生四倍体植株的同质性分析

基于前人的报道结果 (Katzir et al, 1996), 由上海生工生物工程服务公司合成 16对 SSR引物。扩增反应体系总体积 $25 \mu\text{L}$ (其中 dNTPs $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 上下游引物各 $0.15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 模板 DNA 50 ng; Taq酶 1 unit)。扩增反应在 PTC-100 PCR仪中进行, 反应条件为: 94 预变性 5 min; 94 30 s, 55 30 s, 72 80 s, 35个循环; 72 延伸 5 min, 最后在 4 下保存。PCR产物在 9%聚丙烯酰胺上电泳, 采用改良的 Charters银染方法检测。

利用 SSR手段对获得的 7份四倍体材料中的 5份 (Tetra-1 ~ 5) 进行了同质性检测。根据再生植株和子房培养供体二倍体材料‘津绿四号’在某个基因位点有无扩增条带来进行同质性分析。

1.4 再生四倍体自交后代遗传稳定性和育性观察

对再生四倍体植株进行单株自交。对每个编号的自交后代分别与二倍体黄瓜‘津绿四号’进行种子、子叶、花蕾、花和叶片的形态学比较, 初步确定其自交后代倍性水平的稳定性, 同时对自交后

代植株进行体细胞染色体计数进一步确定其倍性, 再次验证其倍性的稳定性。

雄花盛开时对四倍体植株进行花粉可染率 (0.1%醋酸洋红染色) 的观察, 每朵花镜检 5 个视野, 3 次重复, 每视野至少观察 100 个花粉粒。参照刘永庆 (1994) 的方法进行花粉萌发试验, 每朵花镜检 10 个视野, 3 次重复, 每视野至少观察 50 个花粉粒。四倍体植株单株自交 2 个果实进行留种, 统计单果结籽数, 以饱满种子计数。以二倍体 '津绿四号' 和同源四倍体 Tetra-Jin1 作为对照。

2 结果与分析

2.1 植株再生和四倍体的获得

黄瓜未授粉子房培养获得的胚在添加 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDZ 和 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA 的培养基上生长良好, 在分化出植株前都能保持绿色, 而在其他几种培养基上的胚逐渐黄白化并逐步失去了活力。在 4 种培养基上总共获得了 33 个再生植株 (图 1, A~C; 表 1)。

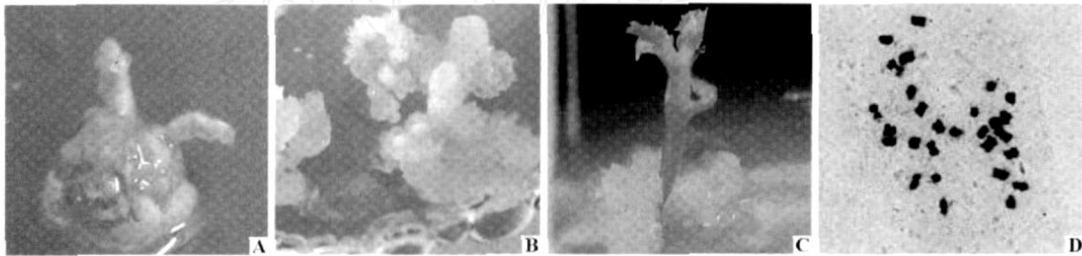


图 1 植株再生和四倍体获得

A. 黄瓜未授粉子房培养的胚; B. 胚的分化; C. 再生植株; D. 四倍体染色体 ($2n=4x=28$)。

Fig. 1 Plant regenerated and tetraploid obtanied

A. Embryo from cucumber unpollinated ovary culture; B. Embryo differentiation;
C. Regenerated plantlet; D. Tetraploid chromosome ($2n=4x=28$).

表 1 分化培养基的筛选及再生植株的获得

Table 1 Differentiation medium selected and regeneration plantlets obtanied

MS分化培养基 / ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) MS differentiation medium				接种胚数 Number of inoculation embryos	再生植株数 Number of regeneration plants	四倍体植株数 Number of tetraploid plants
TDZ	6-BA	NAA	KT			
0.5				180	7	2
1.0				90	4	1
2.0				60	0	0
	0.2			90	0	0
	0.2	0.05		120	20	4
	1.5			90	2	0
			2.0	90	0	0

利用根尖和卷须染色体制片技术对黄瓜未授粉子房培养诱导单倍体过程中获得的再生植株进行了倍性鉴定, 共鉴定出 7 株同源四倍体植株 ($2n=4x=28$) (图 1, D)。

由表 1 可知, 将胚培养在含高浓度细胞分裂素的基本培养基上有利于同源四倍体的获得, 而同源四倍体的获得可能是由于单倍体细胞在培养过程中发生了两次自然加倍的结果。

2.2 再生四倍体植株的同质性分析

从 16 对引物中筛选出了 1 对多态性引物, 其引物序列为 (5' to 3': TTGGGTGCAATGAGGAA, 5' to 3': ATATGATCTICCATTTICCA)。

如图 2 所示, 未授粉子房培养供体二倍体材料津绿四号在 300 ~ 400 bp 之间共扩增出 4 条带, 而再生同源四倍体植株一般只扩增出了 4 条带中的某两条带。

由于 SSR 是共显性标记, 因此可以得出所检测的这 5 份同源四倍体材料是由单倍体细胞经过两次加倍后的纯合植株。

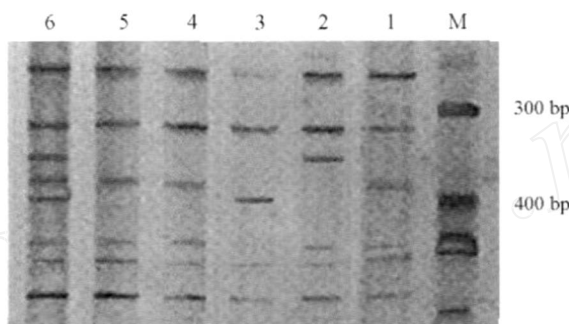


图 2 SSR 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测再生植株的同质性结果

1 ~ 5: 四倍体; 6: 子房培养供体; M: pBR322 DNA / *A_{lu}I* 分子量标准。

Fig. 2 The SSR PAGE electrophoresis results of homozygosity of regenerated plantlets

1 - 5: Tetraploid; 6: Donor plant of ovary culture; M: pBR322 DNA / *A_{lu}I* marker

2.3 再生四倍体植株自交后代的稳定性

四倍体单株自交后代的种子、子叶、花蕾及完全开放的雄花都比原二倍体植株大 (图 3, A ~ D); 同时叶片变厚, 叶面积增大, 叶片呈明显皱褶及叶色变深 (图 3, E), 花色变深, 整体矮壮。利用体细胞染色体计数方法观察其染色体数, 均为 28 条 ($2n=4x=28$) (图 3, F), 说明了所获得的再生四倍体植株自交后代在细胞遗传水平上的稳定性。

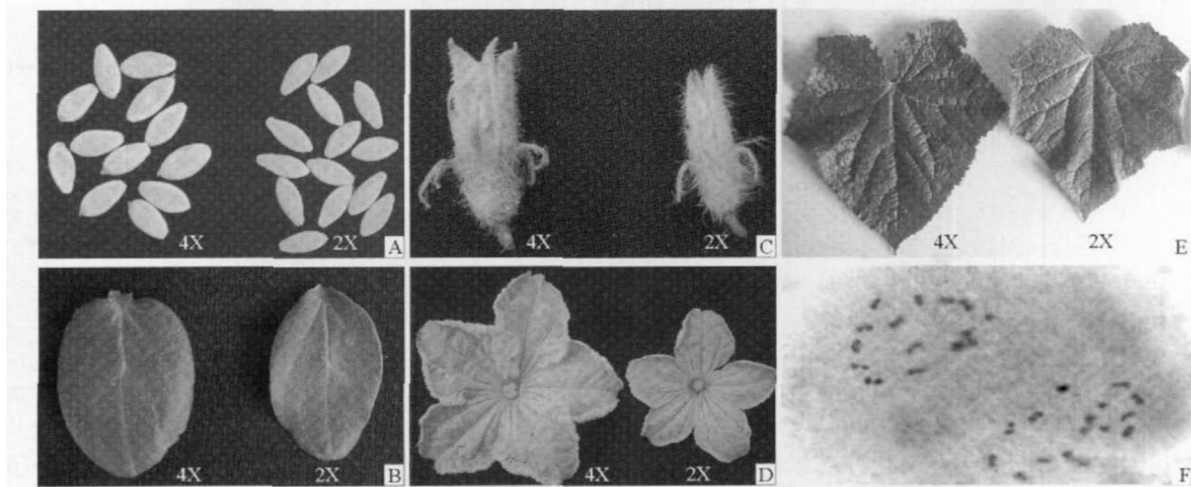


图 3 再生四倍体植株自交后代的形态观察

A. 种子; B. 子叶; C. 花蕾; D. 花; E. 叶; F. 染色体计数。

Fig. 3 The morphology observation of the progeny from regenerated tetraploid self-crossing

A. Seeds; B. Cotyledons; C. Buds; D. Flowers; E. Leaves; F. Chromosome counting

2.4 再生四倍体植株的育性

从表 2 可以看出, 对照二倍体植株不论是花粉可染率还是在花粉萌发率都比所获得的四倍体植株高。二倍体和四倍体花粉在培养 3~4 h 内花粉管生长长度均达到最大值, 但二倍体明显长于四倍体。四倍体单果结籽数为 15~34 粒, 而二倍体为 150 粒左右。这些结果说明二倍体黄瓜和四倍体黄瓜在育性上确实存在较大差异。此外, 由表 2 可知, 在黄瓜未授粉子房培养过程中获得的四倍体植株 (Tetra-1~6) 的花粉育性和自交结籽数要远高于由秋水仙素诱变获得的四倍体植株 (Tetra-JinlÜ), 这可能是由于秋水仙素的毒害作用所致。

表 2 二倍体和四倍体花粉可染率、萌发率及单果结籽数的比较

Table 2 Comparison of pollen dryration, pollen gemination and number of seeds per fruit between diploid and tetraploid

倍性 Pbldy	材料 Material	花粉可染率 /% Pollen dryration			花粉萌发率 /% Pollen gemination			单果结籽数 Number of seeds per fruit
		平均 Average	最小 Min	最大 Max	平均 Average	最小 Min	最大 Max	
2x	JinlÜ4	94.4 a	93.1	95.5	80.6 a	57.1	85.7	154
4x	Tetra-1	66.0 bc	56.7	78.1	48.9 bc	25.0	77.8	21
	Tetra-2	65.6 bc	58.8	74.9	53.8 bc	14.3	76.9	17
	Tetra-3	61.8 bc	53.2	77.8	46.9 c	28.6	66.7	15
	Tetra-4	73.0 b	67.2	82.1	56.9 bc	30.2	75.4	20
	Tetra-5	70.7 bc	66.5	74.0	56.2 bc	20.0	80.1	18
	Tetra-6	68.8 bc	63.1	73.6	58.8 bc	12.5	83.3	34
	Tetra-JinlÜ	61.6 bc	56.6	67.0	43.6 c	16.7	75.0	10

注: 邓肯氏新复极差测验, 不同小写字母表示差异达显著水平 ($P=0.05$)。

Note: Duncan's test (SSR), the different small letters indicated significance at $P=0.05$ level

3 讨论

四倍体因其“巨大性”, 生产上利用它来提高产量和品质、增加抗病抗逆能力, 而利用同源四倍体作为亲本获得三倍体材料在生产上也有广泛的应用, 同时利用同源四倍体获得三倍体并进而进行基因定位也是作物遗传学研究的一个热点。目前, 在黄瓜上主要是通过秋水仙素诱变来获得同源四倍体材料, 但诱导率和植株育性普遍较低。而在很多作物的单倍体诱导过程中, 经常可以获得自发加倍的同源四倍体植株, 有学者认为这是由于培养过程中核内复制或核融合的结果 (Masanori & Yoshiji, 2004), 而这也为培育作物同源四倍体提供了一条新的途径。本研究结果表明, 这一新的诱导途径同样适用于黄瓜。

至今, 有关黄瓜同源四倍体的诱导及相关研究较少。Mackiewicz & Malepszy (1996) 对黄瓜同源四倍体的诱导及四倍体与二倍体的杂交能力做了初步的研究, 发现其经秋水仙素诱导的四倍体育性低, 且和二倍体正反杂交的亲合性差, 未能获得饱满种子。同样, 在对本实验室来源于秋水仙素诱导的同源四倍体进行花粉育性和自交结籽数观察后也发现它们的育性也很低, 其自交结籽数 (10 粒) 要远少于经未授粉子房培养获得的四倍体的 (15~34 粒)。然而, 为什么本研究在黄瓜单倍体诱导过程中获得的四倍体植株较秋水仙素诱变获得的四倍体植株具有较好的育性, 目前还不清楚, 推测这可能与所获得的四倍体植株是纯合子有关。由于单倍体的每个基因都是单拷贝的, 各种隐性基因都可以表现出来, 经过两次加倍后形成的四倍体各基因理论上均处于纯合状态, 突变体很容易表现出来, 而这可能是引起在单倍体诱导过程中获得的再生四倍体植株具有较高育性和稳定性的原因, 但具体机制还有待于进一步研究。然而, 本研究中对不同来源途径的四倍体材料的育性观察还仅限于津绿四号这一种基因型, 为了更好的了解这两种不同来源途径下的四倍体材料是否真正存在育性的显著差异, 今后将利用黄瓜未授粉子房培养来获得更多基因型的同源四倍体材料来进行验证。

总之, 本研究获得的具有较好育性、并能稳定遗传的纯合同源四倍体材料为今后培育黄瓜三倍体

材料和创制全套黄瓜三体系奠定了基础。

References

- Chang Jin-hua, Luo Yao-wu. 2002. Studies on the hybrid between autotetraploid sorghum and Johnson grass and the subsequent generation. *Acta Pratacultural Science*, 11 (1): 56 - 58. (in Chinese)
- 常金华, 罗耀武. 2002. 同源四倍体高粱与约翰逊草杂交及其后代表现. *草业学报*, 11 (1): 56 - 58.
- Chen Jin-feng, Qian Chun-tao. 2002. Studies on chromosome preparations using plant tendril as source tissue. *Acta Horticulturae Sinica*, 29 (4): 378 - 380. (in Chinese)
- 陈劲枫, 钱春桃. 2002. 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*, 29 (4): 378 - 380.
- Chen Jin-feng, Lei Chun, Qian Chun-tao. 2004. Synthesis and characterization of autotetraploid in cucumber polyploid breeding. *Plant Physiol Commu*, 40 (2): 149 - 153. (in Chinese)
- 陈劲枫, 雷春, 钱春桃. 2004. 黄瓜多倍体育种中同源四倍体的合成和鉴定. *植物生理学通讯*, 40 (2): 149 - 153.
- Cheng Zhu-kuan, Li Xin, Yu Heng-xiu. 1996. A new set of primary trisomics in indica rice, its breeding and cytological investigation. *Acta Genetica Sinica*, 23 (5): 363 - 371. (in Chinese)
- 程祝宽, 李欣, 于恒秀. 1996. 一套新的籼稻初级三体的选育和细胞学鉴定. *遗传学报*, 23 (5): 363 - 371.
- Diao Weiping, Chen Jin-feng, Lei Chun. 2008. A study of factors affecting embryo forming from ovary culture of cucumber. *Journal of Nanjing Agriculture University*, 31 (1): 137 - 140. (in Chinese)
- 刁卫平, 陈劲枫, 雷春. 2008. 影响黄瓜未授粉子房培养胚发生的因素研究. *南京农业大学学报*, 31 (1): 137 - 140.
- Du Sheng-li, Wei Aimin, Wei Hui-jun. 2001. Studies on using biotechnology to create new germplasm in cucumber breeding. *Tianjin Science and Technology*, (2): 627.
- 杜胜利, 魏爱民, 魏惠军. 2001. 利用生物技术创造黄瓜育种新材料方法研究. *天津科技*, (2): 627.
- Eduard C, Richard E. 2000. Improve and androgenesis of interspecific potato and efficiency of SSR markers to identify homozygous regenerants. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 60: 101 - 112.
- Endang S, Youhei A, Yosuke T. 2006. Flower bud culture of shallot with cytogenetic analysis of resulting gynogenic plants and somaclones. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 86: 249 - 255.
- Geoffriau E, Kahane R. 1997. Variation of gynogenesis ability in onion (*Allium cepa* L.). *Euphytica*, 94: 37 - 44.
- Genes-Juhasz A, Balogh P, Ferenczy A. 2002. Effect of optimum stage of female gametophyte and heat treatment on *in vitro* gynogenesis induction in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Cell Report*, 21 (2): 105 - 111.
- Han Yi-ke, Du Sheng-li, Wang Ming. 2002. Study on cucumber chromosome doubling. *Tianjin Agricultural Sciences*, 8 (2): 1 - 4. (in Chinese)
- 韩毅科, 杜胜利, 王鸣. 2002. 黄瓜染色体加倍研究. *天津农业科学*, 8 (2): 1 - 4.
- Katzir N, Danin Y, Tzuri G. 1996. Length polymorphism and homologies of microsatellites in several Cucurbitaceae species. *Theor Appl Genet*, 93: 1282 - 1290.
- Li Shu-xian, Wu Zhi-juan, Yang Zhi-gang. 2002. The breeding of autotetraploid eggplant cultivar Xinqie No 1. *Scientia Agriculture Sinica*, 35 (6): 686 - 689. (in Chinese)
- 李树贤, 吴志娟, 杨志刚. 2002. 同源四倍体茄子品种新茄一号的选育. *中国农业科学*, 35 (6): 686 - 689.
- Liu Yong-qing. 1994. A study on the pollen germination of some vegetables in Cucurbitaceae. *Journal of Wuhan Botanical Research*, 12 (3): 213 - 216. (in Chinese)
- 刘永庆. 1994. 葫芦科蔬菜花粉萌发特性的研究. *武汉植物学研究*, 12 (3): 213 - 216.
- Mackiewicz H O, Malepszy S. 1996. Obtaining and characterization of tetraploid forms in cucumber *Cucumis sativus* L. var *sativus* and var *hardwickii* Alef. *Folia-Horticul*, 8 (1): 3 - 10.
- Masanori K, Yoshiji N. 2004. Production of triploid plants of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) by anther culture. *Euphytica*, 138: 141 - 147.
- Muhammad J J, Sung W K, Dae H K. 2005. Comparative study on vegetative, reproductive and qualitative traits of seven diploid and tetraploid watermelon lines. *Euphytica*, 145: 259 - 268.