

秋水仙素诱导油桃‘丽春’2n花粉的研究

王尚德¹, 刘佳琴^{1,*}, 吉王鹏², 兰彦平¹, 姚砚武¹, 周家华¹, 常虹¹

(¹北京市农林科学院农业综合发展研究所, 北京 100097; ²太原师范学院吕梁高等专科学校办学点, 山西吕梁 033000)

摘要: 为了探索油桃 [*Prunus persica* (L.) Batsch. var. *nectarina* (Ait.) Maxim.] 2n花粉的诱导方法, 采用注射法和棉浸法对油桃‘丽春’花芽进行诱导试验, 通过正交试验设计, 分别分析了注射和棉浸秋水仙素水溶液诱导2n花粉的关键因子及适宜水平。研究表明: 注射秋水仙素能获得最高达85.0%的2n花粉, 但得花率低; 棉浸法诱导2n花粉的效果比注射法低, 但得花率较高。处理时间和保湿剂浓度是棉浸法诱导2n花粉的关键因子, 处理时间为32 h和添加1%甘油为保湿剂时2n花粉比率可达44.1%。综合考虑得花率和2n花粉比率, 适宜的秋水仙素棉浸法诱导油桃2n花粉的条件为: 0.1%~0.2%秋水仙素水溶液每100 mL秋水仙素水溶液添加的饱和洗衣粉1 mL作为润湿剂, 添加甘油1 mL作为保湿剂, 处理24~32 h。

关键词: 油桃; 秋水仙素; 2n花粉; 棉浸法; 注射法

中图分类号: S 662.1

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2010) 07-1155-06

Studies on 2n Pollen Induced by Colchicine in Nectarine [*Prunus persica* (L.) Batsch. var. *nectarina* (Ait.) Maxim.] ‘Lichun’

WANG Shang-de¹, LIU Jia-chen^{1,*}, JI Wang-peng², LAN Yan-ping¹, YAO Yan-wu¹, ZHOU Jia-hua¹, and CHANG Hong¹

(¹Institute of Agricultural Integrated Development, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing, 100097, China; ²Taiyuan Normal College Lüliang College Point Schools, Lüliang, Shanxi 033000, China)

Abstract: In order to optimize the method of 2n pollen induction and to test the effects of colchicine on 2n pollen formation in nectarine, 2n pollen was induced by two colchicine treatments, cotton wool soaking and direct injection into floral buds of *Prunus persica* (L.) Batsch. var. *nectarina* (Ait.) Maxim. ‘Lichun’. Orthogonal experimental design was used in this study. In treatment of direct colchicine injection, 2n pollen ratio mounted to 85.0%, but fewer flowers developed. In treatment of cotton wool soaking, 2n pollen ratio was 44.1%, and the ratio of full developed flower was. The duration of treatment and humectant concentration were the key factors in cotton wool soaking. The maximum 2n pollen ratio was obtained when cotton wool soaking treatment lasted 32 hours and the 1% glycerol was used as humectant. Concerning to the ratio of flower harvested and 2n pollen percentage, the optimum method for 2n pollen induction in nectarine is 0.1%–0.2% colchicine treatment by cotton wool soaking for 24–32 h with 1 mL of laundry powder as saturation and 1% glycerol as humectant respectively.

收稿日期: 2009–12–08; **修回日期:** 2010–05–13

基金项目: 北京市农林科学院常规育种财政专项 (2008, 2009)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: shangdee@163.com)

Key words : nectarine ; colchicine ; 2n pollen ; cotton wool soaking ; injection

倍性育种是果树育种的重要方法之一,利用多倍体的巨大性、次生代谢旺盛等特点,增大果型,改善果实风味是育种工作者经常采用的措施(沈德绪,2000;王同坤等,2004),已在葡萄(*Vitis vinifera* L.)、苹果(*Malus domestica* Borkh.)、猕猴桃(*Actinidia chinensis* Planch.)等多种果树上取得了成功(韩礼星等,1998;王敏琴等,2000;刘庆忠等,2001;王同坤等,2004)。油桃[*Prunus persica* (L.)Batsch. var. *nectarine* (Ait.)Maxim.]受其遗传起源的影响而果实偏小(沈德绪,2000),利用多倍体的巨大性,有望改善这一缺憾。在众多的多倍体获得途径中,有性多倍化是理想的多倍体育种路线,它克服了营养器官加倍带来的不同倍性细胞的嵌合问题(Sanford,1983)。在有性多倍化过程中,未减数配子(2n配子)或多倍体产生的配子受精,参与形成多倍体合子,进而发育成多倍体。因目前尚未见桃自然多倍体的报道(沈德绪,2000),只能通过2n配子实现桃的有性多倍化。目前2n配子的产生包括自然发生和人工诱导两种途径,受外界环境和遗传的共同影响,2n配子的自然发生率较低(Derman,1947;张正海和康向阳,2006),通过人工诱导获得2n配子将会加速作物的有性多倍化进程。作者拟以油桃品种‘丽春’为材料,研究其2n花粉诱导技术,为进一步的桃倍性育种奠定技术基础。

1 材料与方法

1.1 材料及药剂配制

试验于2008年在北京市农林科学院农业综合发展研究所顺义科技示范园桃资源圃进行。试验品种为油桃‘丽春’[*Prunus persica* (L.)Batsch. var. *nectarina* (Ait.)Maxim. ‘Lichun’],7年生,树体健壮,无病虫害。除本文特别指出的处理措施外,均采用正常的田间管理。冬季修剪时,采用长枝修剪技术,只采用疏枝、回缩措施,对果枝不进行短截。试验选用中长果枝,在药剂处理前进行适当短截,并抹去发育不同步的芽,保留大小基本一致、完整、健康的花芽进行试验。

秋水仙素母液的配制:取1g秋水仙素,用冷水溶解并定容至100mL,即为1%秋水仙素水溶液。用此母液按比例配制不同处理浓度药液。

预先将十二烷基苯磺酸钠配制成10%水溶液,洗衣粉配制成超饱和溶液。按照试验设计,配制不同的处理液,每100mL处理液中加润湿剂1mL。如11号处理液:取秋水仙素母液10mL,十二烷基苯磺酸钠10%水溶液1mL,去离子水定容至100mL;12号处理液:取秋水仙素母液20mL,十二烷基苯磺酸钠10%水溶液1mL,甘油1mL,去离子水定容至100mL,依此类推。配制好的处理液做好标记,贮藏于4℃条件下。

1.2 注射法试验

试验采用了注射法和棉浸法两种处理方法。注射法主要考察秋水仙素浓度、注射次数、注射间隔时间3个因子。试验采用正交试验设计 $L_9(4^3)$,3次重复。设计如表1。

萌动后定时采集花芽,用卡诺固定液固定,醋酸洋红压片观察花粉母细胞减数分裂进程(康向阳,2002),当减数分裂进入粗线期时开始用医用1mL注射器逐一对花芽进行缓慢注射,药液从鳞片渗出时停止注射。

试验启动后,按照试验设计的间隔和注射次数对花芽进行不同的处理。同一处理方式处理3个枝条,30个以上花芽。

1.3 棉浸法试验

棉浸法试验设计也采用正交试验设计 $L_9(4^3)$ ，试验考察的因子包括秋水仙素浓度、润湿剂种类、保湿剂浓度和持续处理时间等 4 个因子。其中，润湿剂选用了十二烷基苯磺酸钠（Santomerse，Amresco 0122#）和普通洗衣粉，保湿剂为甘油。各因子的不同处理水平参见表 2。

在花粉母细胞减数分裂进入细线末期时用剪刀剪伤花芽顶端鳞片，然后用脱脂棉条均匀包裹枝条，并用胶布封闭以防止水分蒸发。枝条包紧后用注射器从高处向棉条注射相应的处理液，根据试验设计，棉浸处理相应的时间。完成处理后，小心解除胶布和棉条，并用清水喷淋花芽。同一处理方式处理 3 个枝条，30 个以上花芽。

1.4 数据统计与分析

试验记录处理的花芽数，能够膨大开花的花芽数，计算得花率。得花率（%）= $n/N \times 100$ （ n 为开花数； N 为处理花芽数）。在大蕾期采回花蕾，在室内剥取花药，在室温条件下晾干散粉，用奥林巴斯 BX51 显微镜观察，DP-70 摄像系统测量花粉粒大小，计数直径约 $50\text{ }\mu\text{m}$ （ $48\sim 52\text{ }\mu\text{m}$ ）的花粉的比例为 2n 花粉比率（Dermen，1938；Hesse，1971）。每个处理观察至少 10 个视野，累计花粉数超过 100 粒。数据分析采用 DPS 软件，得花率、2n 花粉比率经开方反正弦转化后进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 注射法诱导 2n花粉试验结果及分析

从注射法试验结果（表 1）可以看出，注射法能获得较高比例的 2n 花粉。试验中除处理 1、6 未收集到花粉外，其余各处理均获得了一定比例的 2n 花粉，7 号处理 2n 花粉比率平均达 76.5%，但注射法得花率普遍较低，除 5 号处理外，各种处理的平均得花率均在 20% 以下，且有多个试验的花芽全部脱落。部分处理虽能得到花，但花器扭曲残缺，花粉败育，说明注射对花芽造成了严重伤害，因而利用注射秋水仙素诱导油桃 2n 花粉的总效率不高。

表 1 注射法试验设计及结果
Table 1 Experimental design & results of injection

试验号 No.	秋水仙素浓度% Colchicine concentration	注射次数 Times of injection	间隔时间/h Time interval	空白 Spare	得花率/% Ratio of flower harvested	2n 花粉比率/% 2n pollen ratio
1	0.2	3	2	1	2.8	-
2	0.2	4	4	2	2.6	58.5
3	0.2	5	6	3	6.1	50.0
4	0.3	3	4	3	19.8	14.2
5	0.3	4	6	2	31.0	45.8
6	0.3	5	2	1	17.6	-
7	0.5	3	6	2	8.2	76.5
8	0.5	4	2	1	9.9	45.0
9	0.5	5	4	3	15.3	62.4

注：2n 花粉比率平均值是有数据试验的平均值；表中“-”表示数据缺失。
Note：Means of 2n pollen ratio are resulted from data obtained；‘-’ means datum absent.

2.2 棉浸法诱导 2n花粉试验结果及分析

为了减少重复注射对花芽造成的机械损伤，设计了棉浸法诱导试验，试验结果如表 2 所示，9 组试验均能得到正常开放的花朵，得花率最高 35.6%。就诱导效果而言，棉浸法处理均获得了一定比例的 2n 花粉，最高为处理 15，平均 2n 花粉比率为 34.4%。

表 2 棉浸法试验设计及结果
Table 2 Experimental design and results of cotton wool soaking

试验号 No.	润湿剂 Saturation	秋水仙素浓度/% Colchicine concentration	甘油浓度/% Glycerol concentration	处理时间/h Duration of treatment	得花率/% Ratio of flower harvested	2n 花粉比率/% 2n pollen ratio
11	十二烷基苯磺酸钠 Santomerse	0.1	0	8	15.8	19.9
12	十二烷基苯磺酸钠 Santomerse	0.2	1	24	13.3	22.0
13	十二烷基苯磺酸钠 Santomerse	0.3	5	32	7.7	21.1
14	洗衣粉 Laundry powder	0.1	5	24	35.6	18.0
15	洗衣粉 Laundry powder	0.2	1	32	30.0	34.4
16	洗衣粉 Laundry powder	0.3	0	8	9.7	17.9
17	无 Null	0.1	1	32	16.7	24.0
18	无 Null	0.2	0	8	13.6	17.9
19	无 Null	0.3	5	24	20.3	26.6

进一步对得花率进行极差分析（表 3）可知，所考察的 4 个因子对得花率的影响较为接近，最大的为润湿剂种类，极差为 12.8%，最小的为保湿剂浓度，药剂浓度和处理时间对得花率的影响居中。根据极差分析，得花率最高的各因子水平应为：秋水仙素浓度为 0.1%，润湿剂为洗衣粉，保湿剂为 5%甘油，处理时间 24 h。

表 3 棉浸法处理得花率和 2n 花粉比率极差分析表
Table 3 Range analysis of ratio of flower harvested and ratio of 2n pollen which treated by cotton soaking

因子 Factors	得花率/%	Ratio of flower harvested				2n 花粉比率/%	2n pollen ratio			
	水平 1	水平 2	水平 3	极差		水平 1	水平 2	水平 3	极差	
	Level 1	Level 2	Level 3	R		Level 1	Level 2	Level 3	R	
润湿剂 Saturation	12.3	25.1	12.8	16.9		21.0a	23.4a	22.8a	2.4	
药剂浓度 Colchicine concentration	22.7	12.3	10.4	12.6		20.6a	24.8a	21.9a	4.2	
甘油浓度 Glycerol concentration	13.0	20.0	8.2	21.2		18.6b	26.8a	21.9ab	8.2	
处理时间 Duration of treatment	13.0	23.1	10.1	18.1		18. 6b	22.2ab	26.5a	7.9	

注： a、b 为某一因子的 LSD 5%水平多重比较结果。
Note： The same letters are not significantly different ($P<0.05$) using LSD multiple comparion test.

对另一个指标 2n 花粉比率进行极差分析可以看出，对 2n 花粉比率影响最大的因素为保湿剂浓度，处理时间次之，而药剂浓度和润湿剂种类的影响较小。方差分析表明，不同的保湿剂与处理时间对油桃 2n 花粉的诱导有显著影响，而润湿剂和秋水仙素浓度对油桃 2n 花粉比率的影响不显著。

就保湿剂浓度而言,无保湿剂最低,添加 1%甘油时 2n 花粉比率最高,达 26.8%,多重比较结果显示,添加 1%甘油做保湿剂的处理获得 2n 花粉比率显著高于不添加甘油的处理,其它处理间差异均不显著。从处理时间看,处理时间越长,2n 花粉比率越高,处理 32 h 时 2n 花粉比率平均值为 26.5%,显著高于处理 8 h 的 18.6%。

根据试验结果可知,2n 花粉发生率最高的处理组合为处理 15:0.2%秋水仙素、润湿剂为洗衣粉、1%的甘油为保湿剂、处理 32 h。该处理的得花率为 30.0%,2n 花粉比率 34.4%。

2.3 2n花粉观察结果

显微镜观察‘丽春’花粉直径为 37~38 μm ,为三角椭球体,在视野中呈三角形,诱导的获得的大花粉直径约 50 μm ,多有四萌发孔,在视野中呈四边形(图 1,图 2)。

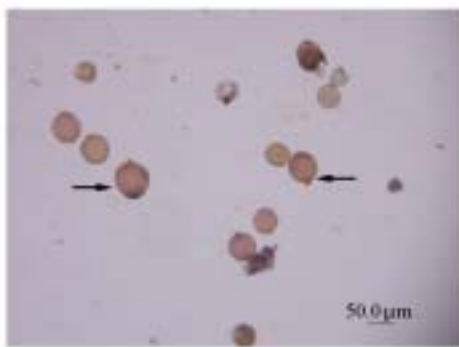


图 1 5 号处理诱导的油桃‘丽春’2n 花粉

箭头示 2n 花粉。

Fig. 1 2n pollen of nectarine ‘Lichun’ induced by No. 5 treatment

Arrow shows 2n pollen.

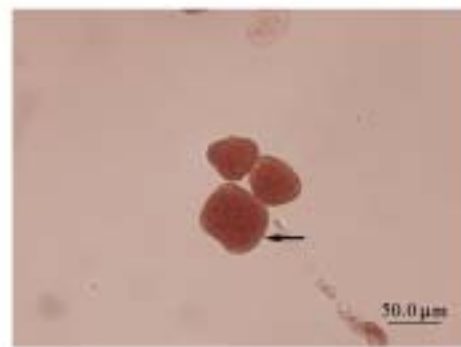


图 2 15 号处理获得的‘丽春’2n 花粉

箭头示 2n 花粉。

Fig. 2 2n pollen of nectarine ‘Lichun’ induced by No. 15 treatment

Arrow shows 2n pollen.

3 讨论

桃天然 2n 花粉的发生因遗传起源差异,分布在 0~50%之间(Derman, 1947),2n 花粉发生率高的亲本,其子代的 2n 花粉较高。在 2006—2008 的 3 个年度内,对‘丽春’等多个油桃品种的花粉观察中,均未发现 2n 花粉。可见,利用自然发生 2n 配子进行桃的有性多倍化受制于遗传和环境等因素,几率小,难度大,利用秋水仙素诱导,可以获得较高比例的 2n 花粉,促进桃的多倍体育种。

张新忠和刘国俭(1998)利用热激法处理桃花枝,获得了 13.33%~16.74%的大花粉,2n 花粉比率虽较自然发生率有显著提高,但仍相对较低,且热激处理后花粉的萌发比正常花粉晚,因而授粉后多倍体子代的获得几率很小。在本试验中,通过注射和棉浸秋水仙素最高分别获得了 85.0%和 44.1%的 2n 花粉,较热激处理效果有明显的改善。对 2n 花粉可以通过机械分离、筛分法等进行分离提纯(Quinn et al., 1974; 张新忠等, 2002),Pratassenja(1938, 1939)通过对 2n 花粉的分离与授粉获得了三倍体桃,因而可以借鉴该技术进一步提高 2n 花粉比率,进行多倍体育种。

本研究借鉴相关研究成果(康向阳, 2002),注射秋水仙素在粗线期进行。考虑到棉浸法药液渗透到花药需要一定的时间,故在细线末期启动试验。

综上所述,注射法诱导油桃的 2n 花粉虽能获得较高的 2n 花粉比率,但得花率低,不宜作为油桃 2n 花粉诱导的方法。棉浸法处理最高可获得 34.4%的 2n 花粉比率,且得花率较高,可用于有效

诱导油桃 2n 花粉。适宜的秋水仙素棉浸法诱导油桃 2n 花粉的条件为 :0.1% ~ 0.2%秋水仙素水溶液 ; 每 100 mL 秋水仙素水溶液添加饱和洗衣粉 1 mL 作为润湿剂 , 添加甘油 1 mL 作为保湿剂 , 处理 24 ~ 32 h。

References

- Dermen H. 1938. Detection of polyploidy by pollen grain size investigation with peaches and apricots. *Proc Amer Hort Sci* , 35 : 96 – 103.
- Dermen H. 1940. Colchicine polyploidy and technique. *The Bot Rev* , 6 : 599 – 635.
- Dermen H. 1947. Inducing polyploidy in peach varieties. *Jour Her* , 38 : 77 – 82.
- Han Li-xing , Zhao Gai-rong , Li Yu-hong. 1998. Polyploid induction on Chinese gooseberry. *Journal of Fruit Science* , 15 (3) : 273 – 276. (in Chinese)
- 韩礼星 , 赵改荣 , 李玉红. 1998. 猕猴桃多倍体诱导研究. *果树科学* , 15 (3) : 273 – 276.
- Hesse C O. 1971. Monoploid peaches *Prunus persica* Batsch description and meiotic analysis. *Amer Soc Hort Sci* , 96 : 326 – 330.
- Kang Xiang-yang. 2002. Cytogenetic and triploid breeding of *Populus tomentosa*. Beijing : China Environmental Science Press : 18 – 25. (in Chinese)
- 康向阳. 2002. 毛白杨细胞遗传与三倍体选育. 北京 : 中国环境科学出版社 : 18 – 25.
- Liu Qing-zhong , Zhao Hong-jun , Liu Peng. 2001. Regeneration of tetraploid plants of Royal Gala apple variety from *in vitro* leave treated with colchicine. *Journal of Fruits science* , 18 (1) : 7 – 10. (in Chinese)
- 刘庆忠 , 赵红军 , 刘 鹏. 2001. 秋水仙素处理离体叶片获得皇家嘎拉苹果四倍体植株. *果树学报* , 18 (1) : 7 – 10.
- Pratassentja G D. 1939. Production of polyploid plants , haploid and triploids in *Prunus persica*. *Comp Rend Acad Sci* , 22 : 348 – 351.
- Pratassentja G D , Trubitzina E M. 1938. Production of polyploid plants : A triploid in *Prunus persica*. *Comp Rend Acad Sci* , 19 : 531 – 533.
- Quinn A A , Mok D W S , Peloquin S J. 1974. Distribution and significance of dielandroids among the diploid *Solanums*. *Amer Potato* , 51 : 16 – 21.
- Sanford J C. 1983. Ploidy manipulation // Moore J N , Tanck. *Methods in fruit breeding*. West Lafayette : Purdue University Press : 100 – 123.
- Shen De-xu. 2000. *Fruits breeding*. Beijing : Chinese Agriculture Publish Press. (in Chinese)
- 沈德绪. 2000. 果树育种学. 北京 : 中国农业出版社
- Wang Min-qin , Bao Xue-zhen , Wang Xiao-hong. 2000. Primary Study on polyploid induction of grape. *Shandong Agricultural Sciences* , 1 : 19 – 20. (in Chinese)
- 王敏琴 , 鲍雪珍 , 王晓红. 2000. 葡萄多倍体诱导的初步研究. *山东农业科学* , 1 : 19 – 20.
- Wang Tong-kun , Zhang Jing-zheng , Qi Yong-shun , Pang Hai-zhen. 2004. Advance on polyploid breeding of fruit crops in China. *Journal of Fruits Science* , 21 (6) : 592 – 597. (in Chinese)
- 王同坤 , 张京政 , 齐永顺 , 庞海珍. 2004. 我国果树多倍体育种研究进展. *果树学报* , 21 (6) : 592 – 597.
- Zhang Xin-zhong , Liu Guo-jian. 1998. Induction of 2n pollen in *Prunus* by heat shock. *Acta Horticulturae Sinica* , 25 (3) : 292 – 293. (in Chinese)
- 张新忠 , 刘国俭. 1998. 热激处理对桃 , 李离体花枝 2n 花粉产生的影响. *园艺学报* , 25 (3) : 292 – 293.
- Zhang Xin-zhong , Liu Guo-jian , Yan Li-ying , Zhao Yong-bo , Chang Rui-feng , Wu Lu-ping. 2002. Purification of 2n pollen by sieving in peach , plum and pepper. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica* , 17 (Supplement) : 234 – 235. (in Chinese)
- 张新忠 , 刘国俭 , 闫立英 , 赵永波 , 常瑞丰 , 吴禄平. 2002. 用筛分法提纯桃、李、辣椒的2n花粉. *华北农学报* , 17 (增刊) : 234 – 235.
- Zhang Zheng-hai , Kang Xiang-yang. 2006. Advances in researches on genetic markers of 2n gametes. *Hereditas* , 28 (1) : 105 – 109 , 200. (in Chinese)
- 张正海 , 康向阳. 2006. 植物2n配子发生及其遗传标记研究进展. *遗传* , 28 (1) : 105 – 109 , 200.