

离体培养条件下金鱼草四倍体切花的诱导及培育*

胡 秀¹, 郑思乡^{2**}, 龚 洵³

- (1. 云南雷森科技有限公司, 云南 玉溪 650031;
2. 云南农业大学园林园艺学院, 云南 昆明 650201;
3. 中国科学院昆明植物所, 云南 昆明 650204)

摘要: 离体培养条件下以金鱼草 (*Antrirrhinum majus*) 二倍体切花实生苗为材料, 0.1%、0.2% 秋水仙素处理 12~36 h 均能成功诱导出四倍体切花, 其中以 0.2% 秋水仙素处理 24 h 效果最好, 变异率为 48%, 死亡率为 30%。对诱导初期得到的具多倍体特征的苗经丛生芽途径反复切割分离实现同质稳定, 生根移栽, 经培育得到 2 个品系 41 株花大、花瓣厚而挺、质感厚重、花枝粗、花序长的四倍体切花。并以二倍体切花为对照对其光合作用特性、生育特性作了初步研究。

关键词: 离体培养; 金鱼草; 四倍体切花; 光合作用

中图分类号: S 681.9.035.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004 - 390X(2004)05 - 0524 - 04

The Induction and the Cultivation of Tetraploid Cutflower of *Antrirrhinum majus*

HU Xiu¹, ZHENG Si-xiang², GONG Xun³

- (1. Leisen Technology Limited Company, Yuxi 650031, China;
2. College of Horticulture and Landscape, Y A U, Kunming 650201, China;
3. Kunming Institute of Botany, Science Academy of China, Kunming 650204, China)

Abstract: The induction effect of colchicines with different concentration and treating time were studied on snapdragon (*Antrirrhinum majus*) seedlings in vitro. The result showed that the tetraploids of snapdragon could be successfully induced by 0.1%~0.3% colchicines for 12~36 h and the best treatment was 0.2% colchicines for 24 h. For obtaining pure tetraploid, the induced seedlings were propagated by producing more buds. Comparing with the diploid, the obtained tetraploid had the features of big thick flower, long rough stem. The net photothesis rate of tetraploid snapdragon was higher than that of the diploid.

Key words: in vitro; *Antrirrhinum majus* L.; tetraploid cutflower; photosynthesis characteristics

金鱼草 (*Antrirrhinum majus* L.) 又名龙口花、龙头花, 玄参科多年生草本花卉, 常作为花坛花境切花的素材。金鱼草切花以其独特的外形、丰富艳丽花色, 在国外广泛应用。在国内随着切花种类的多样化及金鱼草丰富美好的寓意必将逐渐得到普遍应用。国外金鱼草的育种集中在二倍体杂种优势利用上, 已获得了很多品种并在全世界推广, 获

得了巨大的经济效益。国内育种多在引进品种中进行单株选择培育新品种^[1]。在多倍体育种方面, 早在 20 世纪 40 年代已成功获得四倍体金鱼草。岳桦^[2,3]采用秋水仙素浸种的方法也成功的获得了金鱼草四倍体, 并认为金鱼草四倍体存在雄性不育现象。切花的多倍体育种只有近年日本 Nihon Nohyaku. Co. Lt^[4]通过二倍体和四倍体杂交成功的

* 收稿日期: 2003 - 12 - 03

** 通讯作者

作者简介: 胡秀 (1976 -), 四川西昌人, 在读硕士研究生, 从事花卉遗传改良研究。

选育出花大花序长径粗的三倍体切花品种 Chihaya 系列。而国内没有金鱼草多倍体切花的研究及报道。本研究采用组织培养结合秋水仙素的方法诱导,培育出了花大、花瓣厚而挺、花茎粗、花序长的四倍体切花,并对其形态特征、光合作用特点、生育特性作了初步研究,为下一步研究奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 供试材料

经细胞学检测 $2n = 16$ 的金鱼草二倍体切花种子 2 个品系(市售)。

1.2 方法

1.2.1 金鱼草四倍体切花的诱导

种子经 75% 酒精浸 60 s, 无菌水漂洗 2 次, 无菌滤纸吸干, 再经 0.1% HgCl_2 浸 8 min, 无菌水漂洗 4 次, 接种于 $\text{MS} + 0.3 \text{ mg/L } 6\text{-BA} + 0.1 \text{ mg/L NAA}$ 培养基^[5]。芽长 0.5 ~ 1.0 cm, 用无菌的 0.1% 或 0.2% 秋水仙素浸泡 12 ~ 36 h, 无菌水漂洗 4 次, $\text{MS} + 0.3 \text{ mg/L } 6\text{-BA} + 0.1 \text{ mg/L NAA}$ 培养基^[6~12] 上诱导从生芽。

1.2.2 金鱼草四倍体切花的鉴定

形态学鉴定: 秋水仙素处理 10 ~ 15 d, 变异苗表现为叶厚、色深、质感粗糙, 叶片扭曲。

气孔鉴定: 撕取形态变异的苗的下表皮, 在显微镜下观测气孔大小, 样本数为 30, 取平均值。多倍体气孔平均比二倍体大 1 倍左右。气孔大小可作为多倍体初步鉴定的指标。

染色体鉴定: (1) 生根后取根尖压片法计数 $2n = 32$ 者为四倍体; (2) 移栽经培育至现蕾期, 取幼小花芽再次压片法计数 $2n = 4x = 32$ 者为四倍体。(制片方法: 8-羟基喹啉 0.002 mol/L 预处理 8 h, 无水乙醇 冰醋酸 = 3 : 1 冰水固定 30 min, 常温下 1 mol/L HCl 酸解 30 min, 卡宝品红染色, 拇指压片。)

1.2.3 金鱼草四倍体切花的同质稳定

参照郑思乡等^[9] 芦笋多倍体诱导及其立体培养的研究中使用的多倍体稳定方法, 经气孔初步鉴定为四倍体的变异苗接于 $\text{MS} + 0.3 \text{ mg/L } 6\text{-BA} + 0.1 \text{ mg/L NAA}$ 培养基上诱导从生芽, 反复切割分

离。

1.2.4 金鱼草四倍体切花光合作用的测定

以原始二倍体切花为对照, 使用 CI-301PS 光合作用测定仪, 于同等环境条件下测定植株营养生长盛期四倍体切花的光合作用特性, 所测叶片为充分展开的第 8, 9, 10 叶重复测定 4 次取平均值。

1.2.5 金鱼草四倍体切花的培育及其形态特征观察

变异苗生根后于腐叶土 园土 = 1 : 1 基质上炼苗, 20 d 后带土移植露地, 以复合肥为底肥(土肥比为 5 : 1), 缓苗后至花芽分化前参照张林生^[13~16] 的方法追肥 3 次, 花芽分化期追施磷钾肥 1 次, 并于主枝有 3 ~ 5 个侧芽时打顶, 侧枝长出后抹掉侧枝上的侧芽, 将之培育成花枝。

以原始二倍体切花为对照, 观察四倍体切花的形态特征, 主要有叶片大小, 花枝长, 花序长, 花茎粗度, 花的大小, 单花寿命, 花瓣厚度质感。

1.2.6 金鱼草四倍体切花生育特性的观察

以原始二倍体切花为对照, 观察四倍体切花的花期, 显微镜下观察花粉粒大小及育性, 结实性(自交, 以四倍体切花为母本与二倍体切花杂交)。以二倍体切花为对照, 观察四倍体切花的花粉母细胞的分裂, 方法为取处于减数分裂期的幼小花蕾(从 10:00 ~ 17:00 每隔 1 h 取 1 次直径 0.5 ~ 1.0 cm 的花蕾) 无水乙醇 冰醋酸 = 3 : 1 固定 4 ~ 24 h, 去花萼花瓣后, 取花药于 1 mol/L HCl 酸解 30 min, 卡宝品红染色拇指压片后显微镜下观察减数分裂各时期的特点。

2 结果与分析

2.1 组织培养结合秋水仙素对金鱼草切花四倍体的诱变效果

在离体培养条件下, 0.1% 和 0.2% 秋水仙素浸泡金鱼草种子发芽幼苗 12 ~ 36 h 均可获得变异苗, 但不同浓度和不同处理时间对诱变率影响大。以气孔显著增大为指标, 结果见表 1, 其中 0.2% 秋水仙素处理 24 h 最佳, 变异率为 48%, 死亡率为 30%。随着秋水仙素浓度的增高和处理时间的增长, 死亡率升高, 变异率降低, 品种之间没有差异。

表 1 组织培养结合秋水仙素对金鱼草切花四倍体的诱变效果

Tab. 1 The inducing effect of colchicine on snapdragon in vitro

秋水仙素浓度/ %	处理时间/h	处理株数/ 株	死亡株数/ 株	死亡率/ %	变异株数/ 株	变异率/ %
0.1	12	50	8	16	10	20
0.1	24	50	12	24	15	30
0.1	36	50	17	34	20	40
0.2	12	50	10	20	13	26
0.2	24	50	15	30	24	48
0.2	36	50	19	38	18	36
0.3	12	50	15	30	21	42
0.3	24	50	17	34	19	38
0.3	36	50	22	42	14	28

2.2 金鱼草四倍体切花的鉴定与同质稳定

经秋水仙素处理后得到的变异苗与二倍体相比较形态表现为叶宽厚,叶色浓绿,叶面粗糙。再经气孔观察,变异苗叶片下表皮气孔明显增大,单位面积内气孔数目明显减少,保卫细胞内叶绿体数目增多。并有变异株具嵌合体现象,即同一植株上不同叶片气孔大小具明显差异,甚至同一叶片上的气孔大小亦有差异,这是由于幼苗的生长点中各细

胞分裂不同步经秋水仙素处理后成为混倍体。因此必须对嵌合体不断切割分离,得以纯化,也使变异得以充分体现,经丛生芽途径分离切割 3 代后可基本达到同质稳定。变异株生根移栽后,于花芽分化期取幼小花芽压片计数为 $2n = 4x = 32$ (见图 1, 图 2),并以二倍体切花为对照结合花粉粒大小,气孔大小植株形态可最终鉴定金鱼草切花四倍体。

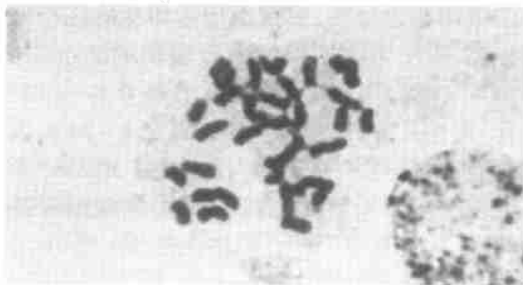
图 1 四倍体 ($2n = 4x = 32$)

Fig. 1 Tetraploid

图 2 二倍体 ($2n = 2x = 16$)

Fig. 2 Diploid

2.3 四倍体切花的光合作用特性

以原始二倍体切花为对照,使用 CI-301PS 光合作用测定仪,于同等环境条件下测定植株营养生长盛期四倍体切花的光合作用特性,所测叶片为充分展开的第 8,9,10 叶重复测定 4 次取平均值,结果见表 2。

从表 2 可看出四倍体切花的净光合速率、气孔导度、蒸腾速率均比二倍体切花高,特别是净光合速率比二倍体高 38.58%,这是四倍体切花具有大

型性的生理基础。蒸腾速率及气孔导度比二倍体高可能与气孔大小有关。而胞间 CO_2 浓度比二倍体低的原因需进一步研究。

2.4 金鱼草四倍体切花的形态特征观察

与二倍体切花比较,四倍体切花表现出明显的巨大性,气孔面积增大,花粉粒增大,叶片肥厚,花枝长,花序长,花茎粗,花瓣厚、质感厚重,单花寿命长,诱导出的各株基本具有一致性,但个别植株的花朵两个长的雄蕊呈菊花的匙状瓣化,见表 3。

表2 金鱼草四倍体切花光合作用特性

Tab. 2 The photosynthesis characteristics of tetraploid snapdragon

	四倍体切花	二倍体切花
胞间 CO ₂ 浓度/ (mg · kg ⁻¹)	43.23	101.56
净光合速率/ [μmol · (m ² · s) ⁻¹]	15.30	11.04
蒸腾速率/ [mmol · (m ² · s) ⁻¹]	2.83	2.10
气孔导度/ [mmol · (m ² · s) ⁻¹]	76.25	68.30
光合有效辐射/ [μmol · (m ² · s) ⁻¹]	1511.74	1336.70
相对湿度/ %	42.05	42.30
叶室空气湿度/	22.15	21.30

表3 金鱼草四倍体切花形态特征

Tab. 3 The morphological characteristics of tetraploid snapdragon cutflower

	花朵大小/ cm	单花寿命/ d	花枝长/ cm	花序长/ cm	花枝粗/ cm	花瓣厚度	香味
二倍体	3.1 × 2.8	20	70 ~ 90	20 ~ 30	0.6	薄	淡
四倍体	4.5 × 3.4	25	80 ~ 100	25 ~ 35	0.8	厚	浓

2.5 金鱼草四倍体切花结实性的观察

金鱼草四倍体切花花期比二倍体切花推迟 7 ~ 10 d, 显微镜下观察花粉粒, 其花粉败育约为 30% ~ 40%, 败育花粉表现为萎缩、体积小, 甚至不及二倍体花粉粒, 而正常四倍体花粉却显著比二倍体花粉大饱满色深, 细胞学减数分裂观察亦有染色体配对复杂、具落后染色体现象(另文发表), 但有 60% ~ 70% 的花粉是可育的, 并且四倍体植株自交后获得了遗传稳定的四倍体后代。金鱼草的结实性严重受环境条件的影响, 高温多湿的条件下, 四倍体切花的花药在开花后霉烂, 二倍体切花果实会膨大, 但最终果实也霉烂, 极少得到种子, 而在凉爽干燥的季节, 四倍体切花金鱼草则可正常结实, 结实率可达 60%。

3 讨论

3.1 采用组织培养结合秋水仙素诱导金鱼草切花四倍体方法的优点

(1) 秋水仙素作用于种子发芽幼苗, 主要是作用于幼苗的生长点, 生长点分生细胞分裂的不同步性必然导致嵌合体的发生, 通过丛生芽途径则可使不同倍性的变异充分体现, 避免消失, 并可使变异迅速纯化达到基本同质。采用组织培养结合秋水仙素以无菌幼苗为材料诱导金鱼草多倍体可以稳定而大量的获取金鱼草的四倍体; (2) 组织培养可迅速实现变异苗的快速增殖, 经气孔初步鉴定为多倍体的变异苗即可加以扩繁, 使其具有一定的群体

数量, 不致因意外原因丢失材料, 并可在具有一定的群体数量上对诱导出的金鱼草四倍体切花的整体一致性做初步的研究和评价, 并有足够多的材料做自交, 与原始二倍体的杂交, 与其他品种的杂交, 从而加快育种进程; (3) 采用组织培养结合秋水仙素以无菌二倍体切花种子发芽幼苗为材料可以稳定的获取金鱼草的四倍体切花, 这种方法具有高度的重现性, 可作为金鱼草育种中的一个重要途径加以利用。

3.2 金鱼草四倍体切花的结实性

四倍体切花因营养生长旺盛, 花期推迟, 并因其是同源四倍体, 胞母细胞减数分裂发生紊乱, 育性下降, 特别是花粉的育性, 但并非全部败育, 表现为四倍体切花自后获得稳定的四倍体切花, 且结实率高, 可达 60%, 这与岳桦(1990, 1992) 报道极为不一致。原因可能与其原始二倍体的杂合程度有关, 杂合程度越高则其同源四倍体的育性也会高一些。除此之外, 高温多湿的环境条件也严重影响金鱼草的结实性, 此时四倍体切花的花药多在花开放后霉烂, 二倍体切花果实会膨大, 但最终果实也霉烂, 极少得到种子。金鱼草切花四倍体的高结实率表明, 多倍体途径在金鱼草育种中具有很大的应用价值, 并可进一步以二倍体为对照结合生殖生理特性、生殖形态解剖、分子生物学研究探索金鱼草四倍体切花的结实性的内部特征, 为四倍体切花成为一个可稳定遗传的品种奠定基础, 也能为其他常异花授粉植物的多倍体育种提供可供借鉴的方法。

(下转第561页)

- [32] 万方浩,王韧. 世界杂草生防的历史成就及我国杂草生防的现状与建议[J]. 生物防治通报,1991,7(2):81-87.
- [33] OXTOBY E, HUGHES M A. Engineering herbicide tolerance into crop[J]. Trends in Biotechnology,1990,8(3):61-65.
- [34] SUN M. Engineering crop to resist weeds killers[J]. Science,1986,231(4744):1360-1361.
- [35] MARSHALL G. Implications of herbicide-tolerant cultivars and herbicide-resistant weeds for weed control management[J]. British Crop Protection Conference-weeds,1987,6(3):489-498.
- [36] ORINN J P. Evolving strategies for the genetic engineering of herbicide resistance in plants[J]. Biotechnology Advances(United Kingdom),1990,8(2):321-322.
- [37] MALLORY-SMITH C, HYSLOP G R. Herbicide-resistant crops:issues,impact, and implications[J]. Proc West Soc Weed Sci.,1999,52:3-6.

(上接第527页)

3.3 金鱼草四倍体切花的经济价值和在育种中的作用

金鱼草四倍体切花表现为花序长、花枝长、花大、质感厚重花枝粗,有宜人香味,而市售仅有二倍体切花,最大的缺点是花瓣薄,花小,几乎无香味,所以经稳定性试验后,切花四倍体可直接作为品种进入切花市场。

[参 考 文 献]

- [1] 金波,王月新. 三色堇、金盏菊、金鱼草新品种选育[J]. 园艺学报,1995,22(1):97.
- [2] 岳桦. 诱导金鱼草多倍体的初步研究[J]. 园艺学报,1990,17(1):76-80.
- [3] 岳桦,任俐. 不同品种金鱼草多倍体诱变方法的研究[J]. 东北林业大学学报,1992,22(4):102-107.
- [4] Triploid Snapdragons (Chihaya Series) <http://caliban.moz-koeln.mpg.de/~stuber/snapdragon/vieties/wada/wada.html>.
- [5] 杨晓杰. 不同处理对金鱼草种子发芽的影响[J]. 高师理科学刊,2002,22(3):60-62.
- [6] 辛雅芬. 金鱼草茎尖培养与植株再生[J]. 东北林业大学学报,1991,19(4):42-47.
- [7] 彭重华. 月季、金鱼草、瓜叶菊切花保鲜效应研究[J]. 湖南林业科技,1994,21(2):27-28.
- [8] NEWBURY H J. Aitken, - EAB. Micropropagation of snapdragon (*Antirrhinum majus* L.) [J]. Biotechnol - agricult - for. 1992,20,19-33.
- [9] SCHROEDWE K R, STIMART D P. Adventitious shoot formation on excised hypocotyls of *Antirrhinum majus* L. (snapdragon) in vitro [J]. Hort Science, 1999,34(4),736-739.
- [10] GONZALEZ-BENITO M E. Micropropagation of commercial and wild genotypes of snapdragon (*Antirrhinum* spp.) [J]. hort - sci, 1996,71(1):11-15.
- [11] 郑思乡. 芦笋多倍体诱导及其立体培养的研究[J]. 湖南农业科学,1996,(1):22-23.
- [12] 陈绍潘. 秋水仙碱诱变甜菊多倍体的研究[J]. 武汉植物学研究,1995,13(1):1-7.
- [13] 宋秀英. 玉米属八个亚种多倍体的诱导[J]. 山西农业大学学报,1994,14(3):231-234.
- [14] 张树珍. 橡胶新种质多倍体的诱导及研究[J]. 热带作物科技,1991,(3):35-37.
- [15] 张林生. 金鱼草切花的生产技术[J]. 花木盆景:花卉园艺,2002,(3):18-19.
- [16] 张卫芳. 金鱼草的栽培技术[J]. 西南园艺,2003,31(1):27-28.
- [17] 傅显华,黄健安. 金鱼草人工基质栽培中不同磷源效应的研究[J]. 园艺学报,1992,19(1):67-70.