

基因库中多花菜豆种子繁殖更新方法

段兴恒¹ 孔庆全¹ 王述民² 范传珠² 谭富娟² 马缘生² 弓步学¹

(1内蒙古农业科学院植物保护研究所, 呼和浩特 010031; 2中国农业科学院作物品种资源研究所)

摘要 取材于有特殊经济价值、常异花授粉作物多花菜豆, 研究基因库中种子繁殖更新方法。连续3年, 选用4个品种, 设25~200株5种不同群体, 采用人工授粉等5种授粉方法, 以自然条件下风、虫自然传粉为对照。从农艺性状调查、染色体观察及同工酶分析方面进行研究。人工授粉后无变异现象, 但结实率很低, 只有2%左右, 且成本昂贵; 群体内昆虫自然传粉结实好, 幼苗和籽粒变异率为1.3%和1.2%; 单花序或单花套袋自交基本不结实, 只有个别品种能结实(1%~2%); 对照生长最好, 结实率最高, 变异率也最大(幼苗1.7%、籽粒1.9%); 全封闭网棚蜜蜂传粉生长正常, 变异率低(幼苗0.4%、籽粒0.7%), 成本也较低; 全封闭网棚自然传粉的产量低, 折合每公顷只有378kg, 其成本高于网棚放蜂者。从而明确了在内蒙古呼和浩特繁种, 自然条件适宜可减轻选择压力; 以全封闭网棚蜜蜂传粉效果最佳, 可减少变异频率, 防止外来花粉掺入; 其群体大小一般以50株为宜, 是繁殖更新多花菜豆基因库种子切实可行的方法。

关键词 多花菜豆 基因库 种子繁殖 更新方法

基因库内的种子种质资源, 应使其所含有遗传物质保持其遗传完整性, 并具有高的活力, 这就要求在繁殖过程中需有足够群体。繁殖前后保持最大的遗传相似性, 是目前国际上正在被引起重视和探讨的一个问题^[4], 其中异花授粉作物难度大, 因其群体具有高度杂合性和异质性, 非常容易受各种因素的影响而丢失原有的遗传完整性。但在对库存种子进行定期或不定期的更新繁殖过程中, 往往由于繁种频繁、取样机误等, 造成基因频率的随机波动, 导致随机基因丢失, 引起遗传漂变; 或由于种子休眠、种子陈旧、种群样本大小、种子活力、生长环境、种群内生长密度、隔离方法、传粉方式、种子采摘方法和种子收获量等诸多因素的影响, 增大选择压力, 引起群体中某些基因的丢失, 从而导致遗传漂移^[2, 5], 乃至遗传完整性改变或遗传多样性丢失^[1]。R. B. Singh和J. T. Williams认为, 50%原种资源样品会由于以上因素而丢失^[3]。内蒙古自治区在多花菜豆种子繁殖更新中, 植株变异率往往高达10%左右。因此, 迫切需要针对不同作物通过研究明确合理的更新繁殖方法。国外已在玉米、向日葵、甜菜、黄瓜、黑麦、黑麦草、豌豆、番茄、棉花、野生稻等作物上做了研究, 但还有多花菜豆等大量作物种未被系统、深入研究。

1 材料和方法

1 1 供试材料

品种 4个,分别以 A, B, C, D 代表(A 大白芸豆、全国统一编号 E0005 B 红看花豆、E0112 C 大白芸豆、E0006 D 大黑花饭豆、E0101), 1994年实验所用种子, A、B、C来自内蒙古农科院, D来自黑龙江农科院种子库内保存的种子, 1995-1996年供试种子为前一年该试验各相应品种、群体和授粉方式的种子。全封闭网棚内自然传粉区的种子为 1995年对照区相应品种各群体的混合种, 播种前测试发芽率, 3年均 在 92% 以上, 多为 100%。

1 2 试验方法

每品种采用 25 50 100 150 200株不同群体, 有人工授粉, 群体内昆虫自然传粉, 单花序或单花套袋自交, 全封闭网棚蜜蜂传粉, 全封闭网棚自然传粉等 5种授粉方法, 以自然条件下风、虫自然传粉为对照 (见表 1)。

表 1 供试品种授粉方式及群体大小设计

授粉方式	品种代号	群 体 (株)				
		I (200)	II (150)	III (100)	IV (50)	V (25)
人工授粉	A	A ₁ I	A ₁ II	A ₁ III	A ₁ IV	A ₁ V
	B	B ₁ I	B ₁ II	B ₁ III	B ₁ IV	B ₁ V
	C	C ₁ I	C ₁ II	C ₁ III	C ₁ IV	C ₁ V
	D	D ₁ I	D ₁ II	D ₁ III	D ₁ IV	D ₁ V
群体内昆虫自然传粉	A	A ₂ I	A ₂ II	A ₂ III	A ₂ IV	A ₂ V
	B	B ₂ I	B ₂ II	B ₂ III	B ₂ IV	B ₂ V
	C	C ₂ I	C ₂ II	C ₂ III	C ₂ IV	C ₂ V
	D	D ₂ I	D ₂ II	D ₂ III	D ₂ IV	D ₂ V
单花序或单花套袋自交	A	A ₃ (不分群体)				
	B	B ₃ (不分群体)				
	C	C ₃ (不分群体)				
	D	D ₃ (不分群体)				
对 照	A	A ₄ I	A ₄ II	A ₄ III	A ₄ IV	A ₄ V
	B	B ₄ I	B ₄ II	B ₄ III	B ₄ IV	B ₄ V
	C	C ₄ I	C ₄ II	C ₄ III	C ₄ IV	C ₄ V
	D	D ₄ I	D ₄ II	D ₄ III	D ₄ IV	D ₄ V
全封闭网棚蜜蜂传粉	A	A ₅ I	A ₅ II	A ₅ III	A ₅ IV	A ₅ V
	B	B ₅ I	B ₅ II	B ₅ III	B ₅ IV	B ₅ V
全封闭网棚自然传粉	B	-	-	B ₆ III	B ₆ IV	

1 3 田间布置及实施概况

每种授粉方法及对照各群体组合均采用顺序排列, 不设重复, 全封闭网棚蜜蜂传粉区行长 8m, 穴距 0.5m; 全封闭网棚自然传粉区行长 5m, 穴距 0.5m; 人工授粉区和群体内昆虫自然传粉区, 行长 7m, 穴距 0.7m。全试验共占地 0.28hm², 试验于 5月上旬播种, 采用穴播法, 每穴 3粒种子, 各试验区均按每穴 1株定苗, 分株插架引蔓。成熟后分品种、群体按株编号, 单株收获。

装袋、脱粒, 还结合收获工作进行取样考种。

1.4 室内遗传分析

在中国农科院品质所特种室分别进行染色体数目观察和同工酶酶谱分析。

2 结果与分析

2.1 人工授粉结实率

根据多花菜豆为常异花授粉作物, 柱头光滑不易授粉和具有一对自交不孕的等位基因造成自交不孕的特点^[6-7], 在 4 个品种 5 个群体中, 采用不去雄授粉, 当天去雄当天授粉和前一天去雄次日授粉三种方法进行人工授粉, 3 年人工授粉共 25924 朵花, 结荚 532 个, 总结荚率为 2.1%。

表 2 各品种不同人工授粉方法结实率比较 (%) (1994~1996 年)

品 种 代 号	不 去 雄 授 粉	当天支雄 当天授粉	前一天去雄 次日授粉	平 均
A ₁	2.3	2.5	2.6	2.5
B ₁	1.2	1.5	2.2	1.6
C ₁	2.4	2.2	2.2	2.3
D ₁	2.1	1.5	2.6	2.1
平均	2.0	1.9	2.4	2.1

从 3 种授粉方法的结实情况看, 以前一天去雄次日授粉的结实率较高, 为 2.4%, 不去雄授粉为 2.0%, 当天去雄当天授粉为 1.9%, 三者相差不多。不同品种的结实率有差异, 白花品种 A、C₁ 的结实率平均为 2.4%, 红花品种 B、D₁ 平均为 1.9% (表 2)。不同群体人工授粉的结实率 3 年平均在 2.03%~2.3% 之间, 群体之间无明显差异^[9]。

总之, 人工授粉从理论上应对异花授粉作物是可行的, 表现在 1994 或 1995 年人工授粉的种子, 在 1995 或 1996 年其后代幼苗无变异植株出现, 而对照区 1995 年幼苗变异率为 1.2%, 1996 年为 1.7%。但由于人工授粉总结实率很低, 平均只 2.1% 左右, 且费工费时 (按照基因库种子入库最低量要求, 每繁殖一个品种所需人工授粉费用高达 12946.43 元), 所以, 人工授粉法对多花菜豆繁殖更新不宜采用。

2.2 群体内昆虫自然传粉

试验区内用尼龙纱网和高秆作物高粱对不同品种和同一品种内不同群体进行四周隔离, 但昆虫仍能在其间进行传粉。3 年试验结果在田间生育情况表明: 每年生育期长短和分枝数有差异, 其他性状如花色、荚色、生长习性、结荚习性及株高等均无差异。

主要经济性状表现, 在品种间有差异, 白花品种 A₃ C₂ 的单株荚数、单株粒数、单株粒重比红花品种 B₃ D₂ 优; 从群体大小看, 200 株群体最优, 25 株最差, 其单株荚数、单株粒数、单株粒重, 尤其小区产量为 I > II > III > IV > V; 荚长、单荚粒数、百粒重在品种间和群体间均无明显差异。群体内昆虫自然传粉, 生长比较正常, 其单花结实率与单花序结荚数, 与对照差异不明显, 但从单株荚数、单株粒数、单株粒重及小区产量看, 仍有差异, 群体内昆虫自然传粉者不如对照; 从幼苗、籽粒变异率看, 群体内昆虫自然传粉者较高, 分别为 1.3% 和 1.2%, 但比对照 1.7%、1.9% 的变异还是低的。因而, 群体内昆虫自然传粉法对多花菜豆繁殖更新仍不理想。

2.3 单花序或单花套袋自交的结实率

单花序套袋自交是按品种把一个花序上已开放的花和已座的荚全部剪掉, 保留未开花朵, 然后套上羊皮纸袋使其自交。试验结果, 仅品种 A₃ 在 1994 年套 50 个袋, 结荚率为 2%, 其他 3 个品种及 A₃ 在 1995~1996 年结荚率均为 0。

单花套袋自交与单花序套袋自交方法基本相同,不同之处在于一个花序上只留下一个发育良好未开放的花 试验结果,只品种 A₃在 1994年套 50个袋,1996年套 100个袋,结荚率分别为 2%及 1%,其他 3个品种及 A₃在 1995年结荚率均为 0

上述结果表明,两种套袋自交方法的结实情况,在品种间有差异 仅品种 A₃在 3年中有 2年自交结荚率为 2%、1%。就套袋方法,单花套袋自交略高于单花序套袋自交的结荚率,但很低,几乎为零,故套袋自交在多花菜豆基因库种子繁种更新中也不宜采用。

2 4 全封闭网棚蜜蜂传粉

大棚内用尼龙纱对不同品种及同品种的不同群体进行全封闭隔离,通过蜜蜂进行群体内传粉 开花期间(6月 21日~ 8月 10日)在 A、B两个品种,10个群体中各放松丹 1号蜜蜂(*Apis mellifera*)1箱,每箱两脾,有蜜蜂 2000~ 2500只。

试验结果表明,放蜂后的多花菜豆生育正常,比群体内昆虫自然传粉生育期提早 1~ 2d 株高约在 180cm 以上,分枝为 2 9~ 3 0 各群体之间生育期则无差异。主要经济性状单株荚数、单株粒数、单株粒重、单花结实率,全封闭网棚放蜜蜂传粉不如群体内昆虫自然传粉,最好的还是对照,但百粒重以放蜂者最高,单荚粒数,荚长和单花序结荚数差异不大(表 3)。

表 3 不同传粉方式主要经济性状比较 (1996年)

品种	传 粉 方 式	荚长 (cm)	单株荚 数(个)	单株粒 数(粒)	单荚粒 数(粒)	单株粒 重(g)	百粒重 (g)	单花结 实(%)	单花序 结荚 个
A ₅	全封闭蜜蜂传粉	9 2	25. 6	66 9	2 6	84 5	126 7	13 3	1 7
A ₂	群体内自然传粉	10 0	34 0	92 8	2 7	101 0	106 8	14 7	1 7
A ₄	对照	9 7	41. 7	118 3	2 8	133 9	113 5	15 5	1 8
B ₅	全封闭蜜蜂传粉	10 7	23. 3	62 0	2 7	68 5	111 2	11 4	1 7
B ₂	群体内自然传粉	10 1	24. 4	62 8	2 6	61 7	96 7	13 6	1 6
B ₄	对照	10 1	31. 7	85. 2	2 7	88 0	103 2	15 2	1 8

小区产量高低同群体大小成正比,依次为I > II > III> IV > V,不同的传粉方式也有差异,如表 4所示,全封闭网棚放蜜蜂和群体内昆虫自然传粉的小区产量均较低,对照自然传粉者最高 全封闭蜜蜂传粉虽产量略低,但幼苗和籽粒变异率也低,只 0 4%和 0 7%,远低于对照和群体内昆虫自然传粉的变异率。按大粒种每份基因库需 2500粒计,只需 50株就够了,产量低者可适当增加株数。

表 4 不同传粉方式、不同群体小区产量比较(kg)
(1996年)

群体	全封闭蜜蜂传粉	群体内昆虫传粉	对照
I	13 3	16 5	21 2
II	10 9	11. 3	16 9
III	7 3	6 8	11 3
IV	4 1	3 0	4 7
V	2 2	1. 4	2 4

注: 小区产量系 A₅、B₅两品种的平均值。

全封闭网棚放蜜蜂传粉所繁殖的种子,与基因库中保存的种子,即与《中国食用豆类品种资源目录》中的性状比较,生长习性、花色、结荚习性、荚色、粒色、粒形等质量性状均无变异,在生育天数、株高、分枝数、单株荚数、单荚粒数、单株产量、荚长、百粒重等数量性状上有差异,这是由于当地自然环境、历年气候和株、行距等栽培条件不同造成的(表 5) 此外,全封闭网棚放蜂传粉费用很低,每繁殖一个品种的成本费仅 242 69元(含租蜂费、网棚折旧费等),放蜂传粉与人工授粉成本费之比为 1: 53 3

2 5 全封闭网棚自然传粉

在全封闭网棚中自然传粉
选用 B 品种, 100株和 50株两个群体, 用尼龙纱网进行全封闭隔离, 结果表明, 虽百粒重 (189 6g)高于放蜂者, 但小区产量低, 平均产量只 378kg /hm², 比放蜂产量 2560kg /hm² 低 85 2%; 单株结荚数仅 1.99 个, 单株结实率 (35 0%) 和单花结实率 (1 03%) 等也低, 难以保持品种遗传多样性; 加之此法成本高于放蜂, 据测算繁殖一个品种需成本费 503 62 元, 放蜂者同其成本费之比为 1: 2 1 因此, 全封闭网棚自然传粉对由昆虫传粉的常异花授粉作物多花菜豆繁殖更新也是不宜采用的。

2 6 幼苗和采收后籽粒变异率

根据多花菜豆花色同粒色, 幼茎色具有相关性, 即白花品种种皮白色, 幼茎为绿色, 红花品种种皮为花斑或黑色, 幼茎为紫红色的特性, 幼苗期调查和收获后考种时, 对各种授粉方式的幼苗和籽粒变异情况的统计结果 (4个品种平均值)表明, 对照区的幼苗变异率和籽粒变异率最高, 分别为 1 7%和 1.9%。群体内昆虫自然传粉次之, 为 1 3%和 1.2%。而蜜蜂传粉区仅为 0 4%和 0 7%。人工授粉一代的幼苗和采收后的籽粒颜色则无一变异。需要说明, 全封闭网棚自然传粉的幼苗变异率也高 (1.6%), 是因采用上年对照区种子所致, 但其籽粒颜色无变异。
仅就全封闭网棚蜜蜂传粉与其他不同授粉方式间, 即各处理间的幼苗变异率, 经方差分析, 差异显著 (F= 3 83 F_{0.05}= 3 71), 主要因授粉方式不同所致, 而品种间差异则不明显。



图 1 多花菜豆 Multiflora Bean A 2r= 22

表 5 全封闭蜜蜂传粉繁殖种子与《目录》中性状比较

性 状	B 005(大白芸豆)		B 0112(红看花豆)	
	A _d IV、III	《目 录》 鉴定结果	B _d IV、III	《目 录》 鉴定结果
生长习性	蔓生	蔓生	蔓生	蔓生
全生育日数 (d)	131	136	131	124
花色	白	白	红	红
株高 (cm)	> 180	150	> 180	235
分枝数 (个)	3 0 2 8	4 0	2 6 2 9	2 5
单株荚数 (个)	26 5 26 2	11 0	17 7 25 2	9 1
单荚粒数 (粒)	2 8 2 6	1 3	2 5 2 7	5 1
单株产量 (g)	89 6 84 5	17 3	53 2 70 3	45 7
结荚习性	无限	无限	无限	无限
荚色	褐	褐	褐	褐
荚长 (cm)	8 9 9 1	11 0	10 1 10 4	11 9
粒色	白	白	花斑	花斑
粒形	宽肾	宽肾	宽肾	宽肾
百粒重 (g)	120 4 120 8	115 0	110 7 112 2	97 8

图 2 多花菜豆 Multiflora Bean B 2r= 22

2.7 染色体数目观察

取根长 1cm 左右,用冰水前处理,酒精:冰醋酸(3:1)固定液固定,醋酸洋红染色压片,显微镜下观察染色体数目。观察结果,4个品种的染色体数目均为 $2n=22$ 目前尚未发现由于繁殖使其染色体数目发生变异的现象(图 1-2)

2.8 同工酶分析

对每个处理取 50 单株的幼苗,用聚丙烯酰胺凝胶电泳,分析不同品种酯酶(EST)和不同个体间超氧歧化酶(SOD)、苹果酸脱氢酶(MDH)、过氧化氢酶(CAT)等几种同工酶的多样性,比较不同处理(不同群体、不同授粉方式等)间遗传多样性的异同

对多花菜豆品种间酯酶种子的分析结果表明,其谱带有差异(图 3),各品种种子酶谱的条带数目相同;但其条带宽窄,颜色深浅及其分布状况则有异。而从全封闭网棚内放蜜蜂传粉后的幼苗,分析超氧歧化酶、过氧化氢酶、苹果酸脱氢酶的结果表明,在群体内各单株间的酶谱条带的数目,宽窄和颜色深浅是一致的(图 4)

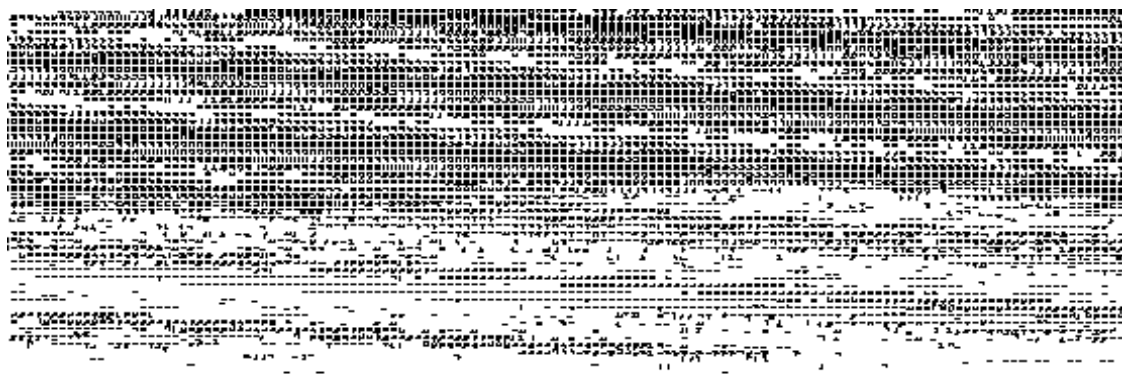


图 3 脂酶同工酶酶谱示意图

图 4 超氧歧化酶同工酶酶谱示意图

3 结论与讨论

依据幼苗、种子粒色变异率高低,保持品种遗传多样性的程度,结实率的高低、效益成本核算、繁殖技术难易程度及基因库种子入库最低量要求等原则,在田间试验农艺性状调查对比和室内染色体数目观察、同工酶酶谱分析的基础上,明确了多花菜豆基因库种子在内蒙古呼和浩特繁殖更新,自然条件适宜,开花期 6~8 月平均温度 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$,未超过临界温度 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ^[7,8],可减轻选择压力;多花菜豆基因库种子繁殖更新的授粉方式以全封闭网棚蜜蜂传粉为佳,可以减少突变频率,防止外来花粉掺入,其群体大小,按照不同品种产量水平的高低,一般以 50 株为宜,个别低产品种可适当增加株数

参 考 文 献

- 1 Breese EL. Regeneration and multiplication of germplasm resources in seed genebanks the scientific

- background Rome IBPGR, 1989 18~ 42
- 2 Crossa J. Gene-action and the bottleneck effect in relation to sample size for maintenance of cross-pollinated population. Field Crops Research, 1992, 29: 225~ 239
 - 3 Singh W illiam s JT. Maintenance and multiplication of plant genetic resources. In: Holden JH, W illiam s JT. Ed. Crop Genetic Resources: Conservation and Evaluation. IBPGR George Allen and Unwin Ltd, 1984
 - 4 马缘生主编. 作物种质资源保存技术. 北京: 学术书刊出版社, 1989, 1~ 2
 - 5 柴建方. 种质库异花授粉作物种子的更新繁殖. 作物品种资源, 1996 (2): 39
 - 6 龙静宜, 段醒男, 等. 食用豆类作物 (多花菜豆). 北京: 科学出版社, 1989, 226
 - 7 郑卓杰, 王述民, 等. 中国食用豆类学 (多花菜豆). 北京: 农业出版社, 1997, 252
 - 8 谭其猛. 蔬菜育种. 北京: 农业出版社, 1981, 316
 - 9 段兴恒, 等. 多花菜豆开花特性与杂交技术. 内蒙古农业科技, 1997 (2): 17~ 18

A Study on Renewal Method of Multiflorous Bean Seed Regeneration in Genebank

Duan Xingheng¹ Kong Qingquan¹ Wang Shumin² Fan Chuanzhu²
Tan Fujiuan² Ma Yuansheng² Gong Buxue¹

(1 Plant Protection Institute, Inner Mongolia Academy of Agricultural Sciences, Huhhot 010031;
2 Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing)

Abstract It was conducted to study the renewal method of multiflorous bean seed regeneration in genebank. Four varieties and five different groups (25~ 200 plants) were used for 3 years in the research, and anemogamy and entomophilous pollination in nature was used as the check, and agronomical character, chromosomes and isoenzymes were studied. The result showed that setting ratio of multiflorous bean was only 2.1% and no variability in artificial pollination. The variability percentages of seedling and seed were 1.3% and 1.2% respectively in entomophilous pollination. The setting ratio was the best and variability percentage was the highest (1.7% seedling and 1.9% seed) in check. The development of beans was normal with a low variability ratio (0.4% seedling and 0.7% seed) in bee pollination of closed net shed and its yield only 378 kg/ha. The result indicated that the best method of multiflorous bean seed regeneration from genebank should select bee pollination in closed net shed in Inner Mongolia because of low variability ratio and no outside anther available.

Key words Multiflorous bean; Genebank seed; Renewal regeneration method