

我国西瓜种质资源的创新研究

马双武¹, 韦小敏², 王吉明¹

(1. 中国农业科学院郑州果树研究所 郑州 450009; 2. 郑州牧业工程高等专科学校生物系, 郑州 450011)

摘要:综述了近20年来我国西瓜种质资源创新研究的方法和成果。创新的方法包括自然突变、杂交选育、秋水仙诱变、⁶⁰Co γ 照射、低能氮离子注入、激光和质子束辐射、太空搭载、单倍体培养、外源DNA导入和基因遗传转化等,通过这些方法创造了许多新的西瓜种质资源。

关键词:西瓜; 种质资源; 创新

中图分类号: S651; S602.4 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2006)05-0055-03

1 自然突变

在生产和育种过程中,由于自然环境条件中不确定因素的作用,使一些西瓜材料产生自然的基因突变,表现出特异的性状,成为西瓜资源创新的一条很有价值的途径。比如无杈西瓜、板叶西瓜大叶红(中育3号)、西瓜G17AB雄性不育两用系、西瓜子叶失绿致死基因携带株^[1]等的获得和研究,都是自然突变的结果。西瓜自然突变的发现应归功于有一定专业基础、深入田间的技术人员。

2 杂交转育创新

在固定品种推广年代,杂交转育主要是一种育种的手段,即把两个或多个具有不同优良性状的资源杂交,然后逐代选育出一个综合性状较好的新品种推广。比较熟悉的一些固定西瓜品种选育过程为:早花(小花狸虎 \times 旭大和6号)、中育1号(早花 \times 红枚)、汴梁1号(中育1号 \times 庆丰)、郑州3号(郑州2号 \times 兴城红)、郑州2号(早花 \times 核桃纹)、石红1、2号(郑州3号 \times 中育6号)、中育9号(中育2号 \times 手巾条)、中育10号(中育5号 \times 中育6号)等。

20世纪80年代后,随着杂交一代西瓜在我国的兴起,这种育种方法逐步成为西瓜种质创新的主要途径,主要用于杂交一代亲本材料的选育,选育的报道也越来越少。黄仕杰等用蜜宝 \times ‘中育3号’(大叶红)培育出了板叶新品种‘重凯一号’;崔德祥^[2]等以自选单系‘X-4’ \times ‘重凯一号’选育出了板叶新品系‘新凯’;肖光辉等^[3]报道,用常规杂交转育的方法将野生西瓜的抗枯萎病性状转育到栽培西瓜中,后代在病圃中经7代自交纯化和抗性选择,选育出了4份抗性材料。



第一作者简介:马双武,1965年生,学士,研究员,1987年毕业于华中农业大学园艺系,一直从事西瓜种质资源研究工作,2001年至今承担“国家西瓜甜瓜中期库”工作,负责国内外西瓜甜瓜种质资源的收集、种植观察鉴定、繁种入库保存、研究创

新和分发利用等,参加和主持国家、农业部、省等10多项研究课题,主编和参加著书8本,发表论文20余篇,获国家、农业部和省科技进步奖4项,获国家发明专利1项。

收稿日期: 2006-05-10

苗期接种鉴定和疫土自然接种鉴定的结果都表明,选育出的4份材料,对西瓜枯萎病表现中抗,对炭疽病的抗性均较强等。

3 诱变创新

3.1 秋水仙素诱变

主要用于西瓜四倍体的诱变,诱变方法不断改进。谭素英等采用剥去生长点外幼叶、进行秋水仙液滴芽或涂芽的方法诱变西瓜四倍体,变异株率可提高到50%~60%。房超等以幼胚子叶组织为外植体,0.05%的秋水仙液进行西瓜离体诱导四倍体的诱变,变异株率高达50%~60%。马国斌等^[4]研究认为:采用西瓜茎尖离体诱导四倍体的有利途径是8d左右苗龄的茎尖,诱变培养基应保持较低的细胞分裂素浓度和0.1%的秋水仙素浓度,处理时间为24~48h。

3.2 ⁶⁰Co γ 照射

黄学森等用⁶⁰Co γ 照射西瓜种子(剂量376 Gy,剂量率0.94~1.98 Gy/min),获得一份轻抗枯萎病和无杈(在中育1号后代中)突变材料。王恒炜等^[5]利用⁶⁰Co γ 射线辐射处理‘118’西瓜干种子,通过7代连续系统选择、鉴定,选育出了新突变系C68-42-10-9-23-73-82。新突变系表现为中晚熟,生长势强,抗枯萎病,果实圆形,底色浅绿,上覆中宽深绿条带,果形指数1.01,平均单瓜重6.4 kg,粉红瓢,中心糖含量10.8%,耐运输贮藏,种子大片,为淡红色麻籽,干粒重98 g。以其为母本选育出了西瓜新品种‘甘抗9号’。

王鸣、张兴平等^[6]对原始易位系‘旭大和’及其它几个优良西瓜品系的干种子用⁶⁰Co γ 射线进行重复照射,进一步提高其不育性,并育出一批杂合易位少籽西瓜新品系,其单瓜种子产种量较普通二倍体减少50%~80%,种子数量最少的单瓜中仅含十余粒至数十粒种子。朝井小太郎、吴进义等^[7]用不同剂量的⁶⁰Co γ 射线辐照二倍体西瓜的干种子和花粉,结果各个剂量均可出现染色体易位,并选出易位纯合体,培育出‘华知A’雄性不育系和少籽西瓜易红1号、5号等。

3.3 低能氮离子注入

宋道军等^[8]通过离子束介导实现了银杏供体DNA与西瓜受体DNA的远缘杂交,杂交后银杏内酯在西瓜品种3-16和SR2-1⁴-2中的最高表达量分别为17.0 μ g/g和46.0 μ g/g,其杂交的亲合率为25%,对银杏内酯表达的两个月龄西瓜叶片

中的超氧化物歧化酶活性测定表明,分别比对照提高了近一倍。朱立武等用低能氮离子处理新红宝西瓜陈干种子(能量为 30 keV,总剂量为 $5 \sim 6 \times 10^{16}$ ions/cm²),结果表明,低剂量处理能提高种子发芽率和发芽势;并且随着处理剂量的提高,叶片脂同工酶变异频率降低,过氧化物酶变异频率升高。尹若春等^[9]进行了低能氮离子注入西瓜胚芽的诱变研究,结果表明,植物活体组织的失水率与存活率成反比。离子注入(能量为 25 keV,总剂量为 3.9×10^{16} ions/cm²,脉冲剂量为 1.3×10^{14} ions/cm²)损伤在提高植物活组织失水率的同时,将严重降低其存活率(约为 9%~40%)。采用二甲亚砷预处理会降低植物活组织失水率,提高存活率到 70%~80%以上,处理最佳浓度为 2%,时间为 25~35 min。胚芽适龄为 3 d,以子叶平展、芽尖未明显萌动时最佳。王浩波等用低能氮离子(N⁺)束处理萌发的西瓜种子,结果表明,不同剂量(能量为 20~25 keV,总剂量为 $2.6 \sim 7.8 \times 10^{16}$ ions/cm²)对西瓜种子发芽率的影响与离子束处理微生物和多数已报道的植物上的诱变效应一样,呈现“升—降—升—降”的马鞍形曲线。用这种诱变处理方法对萌动的西瓜种子进行辐照,第 1 代出现了果皮花纹不同于对照的变异株。用低能离子束辐照西瓜花粉,当代座果率有明显下降,当代及第 2 代果实内种子数量显著减少。另一报道表明^[10],用低能氮离子束(处理量为 25 keV,总剂量为 6.24×10^{16} ions/cm²)西瓜种子后,接种在含有 15 mg/L 镰刀菌酸(Fusaric acid, FA)培养基上获得无菌苗,以其子叶为外植体接种在 MS+2 mg/L 6-苄氨基嘌呤(BA)+15 mg/L FA 培养基上诱导生芽,再将抗性再生芽转接到 MS+0.2 mg/L 萘乙酸(NAA)+15 mg/L FA 培养基上进行再生苗的生根诱导培养。结果表明,处理比对照生芽和生根的诱导率分别高出 3%~12%和 0.3%~4%。

3.4 激光辐射

李雨润等^[11]采用功率密度为 898 mw/cm²的 CO₂ 激光对西瓜种子进行不同时间的辐射处理研究,结果表明:5~15 s 的低剂量照射能提高种子的发芽率,以 15 s 为最佳;5~10 s 照射可提高种子的发芽势,以 5 s 效应显著。20 s 以上的激光照射则对种子发芽产生抑制作用,40 s 达到了半致死剂量,各项指标均低于对照的 50%以上。

3.5 质子束辐射

孙逊等^[12]用不同能量(4、6、8 mev)和剂量(25、50、100 c)的质子束辐照西瓜干种子的诱变研究发现,质子辐照可诱发有丝分裂行为异常,染色体结构变异——产生微核、染色体桥、染色体断片等;随着质子束能量和剂量的提高,染色体畸变细胞率呈增加趋势;质子束还能引起雌花着生节位的降低、果实提早成熟和瓢质改善。选育出了 2 份有价值的突变材料。

3.6 太空搭载育种

方晓中利用卫星搭载诱变技术处理西瓜干种子,通过太空的辐射和微重力的双重作用,以产生有益的遗传变异,选育出新的品系,培育出卫星西瓜新品种。试验表明,太空处理过的种子在当代种植时基本无变化,2 代以后开始表现为返祖、染色体自然加倍和果个变大、品质提高、抗性增强等变异,培育出‘卫星 2 号’西瓜新品种。崔艳玲等^[13]通过太空搭载的方法已选育出航兴 1~3 号西瓜新品种。

4 生物技术创新

4.1 单倍体培养

我国在西瓜单倍体培养方面很早就有成功报道,比如薛光荣等报道,分别用‘琼酥’和‘周至红’的花药诱导成了植株。诱导的关键是选择小孢子发育在单核靠边期时的花蕾(花蕾横径为 5 cm 左右,花冠明显突出,花药增大,质地硬实,易于剥离),去分化培养基上花药裂口处必须能分化出致密的愈伤组织。但后来却未见成功的应用报道。

魏瑛^[14]以 MS 为基本培养基附加 NAA、6-BA 和 KT,对在 4℃和 10℃低温下处理 24 h 和 72 h 的西瓜花药组织的影响及花药愈伤组织的形成作了观察。结果发现:处理后的花药经过前期的褐变,在 2 个月时开始形成愈伤组织。其中“西农 8 号”在 4℃低温下处理 72 h 后的愈伤组织诱导率高达 35.01%,NAA 在花药愈伤组织的形成中起主要作用,而不同基因型材料花药的抗冻性表现出一定差异。魏跃等以 10 个西瓜品种杂交后代 F₁ 的花药作为研究材料,从基因型与激素作用关系等方面对花药愈伤组织的诱导进行了研究。结果表明,适宜的基因型是花药诱导培养成功的关键因素,不同基因型对激素变化的敏感性不同,最适培养基也不相同。

4.2 外源 DNA 的导入

4.2.1 花粉管导入 李涛等应用花粉管通道导入技术将黑籽南瓜 DNA 导入受体西瓜‘早花’品种,期望得到早熟、抗寒的西瓜新品系,RAPD 分析表明,变异后代中产生了与‘早花’西瓜明显差异、分子量在 2 Kb 左右的 DNA 片段 OPY02/2000。王国萍等^[15]利用西瓜有性生殖过程,通过花粉管通道法直接导入西瓜活体植株的技术,将携带有外源几丁质酶基因的质粒 DNA 涂抹在授粉后的柱头上使其沿花粉管通道进入到生殖细胞,得到转化处理种子。转化 T₁ 代植株经除草剂 Basra 筛选和 PCR 扩增获得了转化植株。对 T₃ 代株系进行田间自然发病和人工接种鉴定获得了 3 个抗枯萎病的株系。采用的几丁质酶基因(Chill)来源于水稻,构建在 Ti 质粒载体 pCAMBAR-CHI11 上,宿主菌株 LBA4404 几丁质酶基因片段大小为 111 Kb,该质粒上还含有一个 Bar 基因作为转基因植株的筛选标记基因。

4.2.2 浸胚法 肖光辉等^[16]采用 DNA 浸胚法将供体瓠瓜的总 DNA 导入西瓜, D₁ 代获得一变异株,变异率为 0.32%。D₂ 代变异植株成株期功能叶过氧化物酶同工酶酶带数增加,出现了供体植株的酶带,变异株部分染色体的臂长、臂比、带型与受体相比产生了明显的变异,果实有 22.7% 的皮色由深绿变成白色或白皮绿网纹,接近供体瓠瓜的皮色;果实形状有 31.0% 发生变异;种子的形状和色泽有 33.3% 发生变异。初步认为西瓜的性状变异是供体瓠瓜 DNA 导入的结果, D₃ 代在病圃中筛选出的 D₃-1、D₃-2、D₃-3、D₃-4 和 D₃-5 材料,性状已稳定,并且在病圃中表现出对枯萎病的抗性强,苗期接种鉴定结果表明, D₃-1 和 D₃-2 高抗枯萎病, D₃-3 和 D₃-4 中抗枯萎病, D₃-5 轻抗枯萎病。

4.2.3 子房注射法 王浩波等^[17]采用子房注射法将南瓜总 DNA 导入西瓜,经病圃田间筛选和 6 代自交纯化已获得 5 份稳定的西瓜抗病种质材料,田间对枯萎病的抗性得到了显著提高,有 3 个株系达到 HR 水平。

4.2.4 基因枪法又称微弹轰击法 任春梅等^[18]以西瓜顶芽为转化受体,采用基因枪法轰击的方法将质粒 pBI121 DNA

导入西瓜,旨在建立基因枪介导西瓜遗传转化系统。研究表明,预培养时间与轰击次数对转化率影响显著,而扩散腔类型和甘露醇处理浓度对转化率的影响不显著。经 GUS 基因表达产物的检测,抗 Kan 试管苗的转化率为 33.3%。

4.3 基因遗传转化

王春霞等以 2 d 龄的西瓜无菌苗子叶为外植体,通过与根癌农杆菌共培,建立了西瓜子叶农杆菌介导法的遗传转化系统。所用根癌农杆菌含有 NPT-Ⅱ 基因和番茄的 ACC 合成酶及其反义基因的质粒。Southern blot 分析表明, NPT-Ⅱ 基因已整合到西瓜的基因组,乙烯释放指标表明,转入的正义和反义 ACC 合成酶基因得到不同程度的表达。

王慧中等^[19]研究表明:西瓜子叶外植体能被含双元载体 pBPM WMV 的根瘤农杆菌感染,该质粒载体含有一个 NPT-Ⅱ 基因以供选择 Kan^r 的转基因西瓜植株以及一个 WMV-2 CP 基因, Kan^r 西瓜植株经 NPT-Ⅱ 酶活性检测、DNA 分子点杂交及 Southern 杂交试验证明,外源的 WMV-2 CP 基因已导入西瓜细胞。王慧中等^[20]进一步研究表明:通过自交结合 PCR 检测,发现 WMV-2 CP 基因在转化植株自交一代的分离符合孟德尔 3:1 的分离比。经过连续 4 代的选择鉴定,已从 T₇、T₁₁ 和 T₃₂ 3 个独立转化子的后代中筛选获得 8 个转基因纯合株系,性状表现整齐一致。Western blot 分析结果表明, R₄T₇₋₁、R₄T₁₁₋₃ 以及 R₄T₃₂₋₇ 3 个不同来源的株系均能表达产生外壳蛋白。转基因纯合株系 WMV-2 感染后的病毒抗性实验表明,与未转基因对照相比,转基因株系可以推迟发病时间,减轻发病程度。实验筛选获得的转基因株系 R₄T₃₂₋₇ 表现出对 WMV-2 的高度抗性。

黄学森等^[21]通过西瓜花叶病毒(WMV)外壳蛋白基因、小西葫芦黄化花叶病毒(ZYMV)制酶基因、黄瓜花叶病毒(CMV)复制酶基因的导入,培育出了转基因西瓜新材料 BH-1。经温室及大田抗病病毒鉴定表明,其抗性达中抗以上水平,是我国第 1 个通过转基因获得的抗病毒病西瓜新材料。

参考文献:

- [1] 马双武,张莉.携带西瓜白化致死基因突变株的发现[J].中国西瓜甜瓜,1999,(4):22.
- [2] 崔德祥,范恩普,黄蔚,等.全缘叶西瓜新品系新凯的选育与遗传分析[J].西南农业学报,1996,9(1):125-127.

- [3] 肖光辉,吴德喜,肖兰异,等.瓠瓜和野生西瓜在西瓜抗病育种中的利用[J].北方园艺,1998,3(4):8-11.
- [4] 马国斌,王鸣.西瓜和甜瓜茎尖离体诱导四倍体[J].中国西瓜甜瓜,2002,(1):4-5.
- [5] 王恒伟.西瓜新突变系的筛选及利用研究[J].甘肃农业科技,2003,(4):30-31.
- [6] 王鸣,张兴平,张显,等.用 γ 射线诱发染色体易位培育少籽西瓜的研究[J].园艺学报,1988,15(2):126-131.
- [7] 吴进义,陈璞华,谢锡林.西瓜雄花退化系华知 A 的育成在西瓜育种上的应用前景[J].中国西瓜甜瓜,2001,(2):8-9.
- [8] 宋道军,陈若雷,尹若春,等.离子束介导植物分子超远缘杂交的研究[J].自然科学进展,2001,11(3):327-329.
- [9] 尹若春,吴丽芳,郭金华,等.低能氮离子注入西瓜胚芽的存活率的初步研究[J].激光生物学报,2002,11(3):207-211.
- [10] 王浩波,高秀武,谷运红,等.离子束诱变西瓜体细胞抗镰刀菌酸突变体研究[J].核技术,2003,26(8):609-611.
- [11] 李雨润,郝丽珍.CO₂激光对西瓜种子最佳辐射剂量的筛选及其数学模拟[J].激光生物学报,1999,8(4):290-292.
- [12] 孙逊,任瑞星,施巾帽,等.质子束(H⁺)处理西瓜种子诱变效应研究[J].中国西瓜甜瓜,2002,4(1):1-2.
- [13] 崔艳玲,路志学,芦金生.航天诱变选育航兴 1、2、3 号西甜瓜新品种[J].核农学报,2004,18(4):326.
- [14] 魏跃,龚义勤,邓波,等.西瓜花药愈伤组织的诱导[J].湖北农业科学,2005,(5):93-95.
- [15] 王果萍,王景雪,孙毅,等.几丁质酶基因导入西瓜植株及其抗病性鉴定研究[J].植物遗传资源学报,2003,4(2):104-109.
- [16] 肖光辉,吴德喜,刘建雄,等.西瓜种质创新途径及创新种质的抗病性鉴定[J].作物品种资源,1999,(2):38-40.
- [17] 王浩波,林茂,杨坤,等.导入南瓜 DNA 选育抗枯萎病西瓜新种质的研究[J].西北农业学报,2002,11(1):24-27.
- [18] 任春梅,董延瑜,洪亚辉,等.基因枪介导的西瓜遗传转化研究[J].湖南农业大学学报(自然科学版),2000,26(6):432-434.
- [19] 王慧中,赵培洁,周晓云,等.农杆菌法转化获得转基因西瓜植株[J].浙江大学学报(农业与生命科学版),2000,26(1):111-113.
- [20] 王慧中,赵培洁,徐吉臣,等.转 WMV-2 外壳蛋白基因西瓜植株的病毒抗性[J].遗传学报,2003,30(1):70-75.
- [21] 黄学森,牛胜鸟,王锡民,等.西瓜转基因抗病毒病新材料 BH-1[J].中国西瓜甜瓜,2004,(1):5-7.

欢迎订阅 2007 年《大豆科学》

《大豆科学》是由黑龙江省农科院主办的学术性期刊。国内外公开发刊,双月刊,16 开本,每期 96 页。国内每期订价:10.00 元,全年 60.00 元,邮发代号:14-95。国外每期订价:10.00 美元(包括邮资),全年 60 美元。国外总发行由中国国际图书贸易总公司,北京 399 信箱。国外代号:Q5587。

《大豆科学》是中国自然科学核心期刊,中国科学引文数据库来源期刊。主要刊登有关大豆的遗传育种,品种资源,生理生态,耕作栽培、病、虫、杂草防治,营养施肥,生物

技术及食品加工等方面的研究报告,学术论文,国内、外研究进展评述,研究简报,学术活动简讯、新品种介绍等。

《大豆科学》主要面向从事大豆科学研究的科技工作者,大专院校师生、各级农业技术推广部门的技术人员及科技种田的农民。

本刊热忱欢迎广大科研单位及有关企业刊登广告,广告经营许可证号:2301004010071。订阅办法:全国各地邮局,如在邮局漏订,可到编辑部补订。通过邮局汇款至哈尔滨市学府路 368 号《大豆科学》编辑部。邮政编码:150086。联系电话:0451-86668735。

网址: <http://ddkx.chinajournal.net.cn>

E-mail: dadoukx@sina.com