

通过雌核发育获得葫芦科蔬菜作物单倍体的研究进展

郭凤领, 戴照义, 李金泉, 汪红胜

(湖北省农业科学院 经济作物研究所, 湖北 武汉 430064)

摘要: 综述了葫芦科蔬菜作物通过雌核发育途径获得单倍体的研究进展, 包括未授粉子房(胚珠)离体培养诱导的雌核发育、外源正常花粉授粉诱导的雌核发育、辐射花粉授粉诱导的雌核发育及其影响因素, 并展望了其应用前景。

关键词: 葫芦科; 雌核发育; 单倍体

中图分类号: S 642.03.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2008)01-0059-02

单倍体材料具有重要的遗传研究价值和育种实践意义。首先, 单倍体的每种基因都只有 1 个, 是研究基因性质及其作用的良好材料; 其次, 单倍体可直接表达隐性基因的性状, 更适于在细胞水平筛选突变体, 进行植物基因克隆筛选; 同时, 单倍体材料可查明其原始亲本的染色体组构成, 用于物种之间亲缘关系和物种进化的研究。由单倍体加倍获得的双单倍体(DH)即为纯系, 可直接用于育种, 极大地缩短育种周期; 此外, DH 群体也是构建连锁图的优良群体。

葫芦科蔬菜作物通过花药培养的途径诱导单倍体非常困难, 鉴于大孢子也是单倍性的, 研究者尝试着用雌核发育途径来生产单倍体, 取得了一定成功。雌核发育主要包括离体条件下的雌核发育和活体条件下的雌核发育两个方面。在葫芦科蔬菜作物中, 主要通过对未授粉子房(胚珠)和辐射花粉授粉后的子房进行离体培养这两种离体雌核发育方式获得了单倍体植株; 活体雌核发育主要是通过外源正常花粉或辐射花粉授粉诱导方式进行。其中离体子房(胚珠)培养和辐射花粉授粉诱导这两种途径创制单倍体的效果较好。

1 未授粉子房(胚珠)离体培养诱导的雌核发育

对未授粉的子房或胚珠进行离体培养诱导雌核发育创制单倍体在葫芦科的黄瓜、甜瓜、南瓜属上均已见成功报道。

黄瓜: 对黄瓜子房(胚珠)培养的条件进行过很多探索。Gemesne 等取 0.5~1.0 cm 长的黄瓜子房通过离体培养首次在黄瓜上获得了单倍体植株, 可能由于诱导条件和取材大小的原因, 诱导频率很低。2002 年, 他们对 6 种不同基因型的黄瓜进行了取材时期和预处理方式的研究, 发现雌花开放前 6 h 时胚囊刚好形成, 胚的诱导频

率最高。杜胜利等研究了黄瓜离体雌核发育时的解剖特征和培养早期外植体的生理生化变化, 结果表明, 在子房培养的前 6 d, 外植体的各种酶都发生了与对照明显不同的变化, 解剖学观察发现此时雌核发育即已开始。培养 24 d 胚状体开始形成, 40 d 形成成熟的胚状体。同时对黄瓜雌核发育机制、黄瓜离体雌核发育培养体系、黄瓜染色体倍性鉴定及加倍技术、黄瓜白粉病和霜霉病分子标记辅助选择体系等进行了研究, 建立了一套高效、稳定的黄瓜未受精子房培养的技术体系, 再生频率达 25%, 研究并建立了一套简单、快速而有效的倍性鉴定方法, 筛选出诱导黄瓜单倍体、双单倍体染色体加倍的有效办法, 加倍频率达 16.9%。南瓜: 在南瓜属中, hambonnet 等、Dumas de Vaulx 等、Metwally 等和陈学军等利用未授粉胚珠培养, Gemesne 等利用子房培养均成功地获得了单倍体植株。甜瓜: 甜瓜子房培养的报道相对较少。Gemesne 等曾对培养条件进行过摸索, 并得到了单倍体植株。Ficcadenti 等采用了与 Gemesne 等相似的培养方法获得了甜瓜的单倍体植株, 最高胚发生频率可达 36.4%, 再生植株中单倍体发生频率为 15.4%。

2 外源正常花粉授粉诱导的雌核发育

通过外源正常花粉授粉也可诱导葫芦科作物的雌核发育。早在 1954 年, Hayase 就从笋瓜(*Cucurbita maxima* L.)×中国南瓜(*Cucurbita moschata* L.)的杂交果实中得到了单倍体植株。Dumas de Vaulx 用 *Cucumis ficifolius* L. 给甜瓜(*Cucumis melo* L.)授粉得到了甜瓜的单倍体植株。Nikolova 等用 1 个二倍体的黄瓜株系给 1 个双单倍体的黄瓜株系授粉, 从其后代中筛选出了 5 棵单倍体植株。Kurtar 等曾用西瓜(*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum et Nakai)、甜瓜(*Cucumis melo* var. *cantalupensis* Naud.)、*Cucumis melo* var. *flexuosus* Kq Naud.)、黄瓜(*Cucumis sativus* L.)、南瓜(*Cucurbita maxima* Duch.ex Lam. and *Cucurbita moschata* Duch.ex Poir.)、丝瓜(*Luffa acutangw* L.)、瓠瓜[*Lagenaria*

第一作者简介: 郭凤领(1974), 女, 硕士, 助理研究员, 主要从事西瓜甜瓜育种栽培等研究工作。E-mail: guofenglingok@163.com.

收稿日期: 2007-07-27

siceraria (Molina) Standl.] 和黑籽南瓜 (*Cucumis ficifolia* Bouché) 分别给 4 种不同基因型的南瓜 (*Cucurbita pepo* L.) 授粉试图诱导单倍体 结果只有 *Cucurbita pepo* L. × *Cucurbita maschata* Duch. ex Poir. 这一组合的果实中有种子和胚, 但最后所得的再生植株全为二倍体。可见这一途径单倍体发生频率低且不稳定。

3 辐射花粉授粉诱导的雌核发育

Sauton 等通过辐射花粉授粉结合胚胎拯救技术从甜瓜作物中成功地获得了单倍体植株, 随后人们对基因型、辐射剂量等影响因素进行了系统的研究并将其应用于甜瓜和葫芦科其他蔬菜作物, 取得了很大成功(表 1.2)。

3.1 基因型对单倍体诱导的影响

基因型对单倍体产生的影响因作物不同有些差异。Ficcadenti 等对甜瓜进行研究发现, 不同的正反交组合对单倍体的诱导有显著影响。但 Caglar 等对 27 种不同的黄瓜母本进行研究证明不同的基因型对单倍体的诱导率没有很大差别。此后, Fads 等用 8 种不同基因型的黄瓜进行试验也证明, 同一剂量下的单倍体发生频率同基因型无关。

3.2 辐射剂量对单倍体诱导的影响

Co^{60} 产生的 γ 射线是辐射花粉授粉技术诱导葫芦科蔬菜作物单倍体的有效辐射源。辐射剂量的选择是诱导单倍体的关键因素之一。实践中大多以临界剂量或半致死剂量作为适宜剂量的标准, 同时也有研究认为辐射剂量同植物的倍性及花粉粒大小有关, 倍性越高或花粉粒越小越耐辐射。此外, 辐射剂量与作物的种类、辐射的器官和植株的生长状态等有关。黄瓜选用的剂量为 100~900 Gy, 其中 200~300 Gy 辐射时单倍体的诱导率较高, 西瓜的常用剂量也为 200~300 Gy; 甜瓜的辐射剂量 150~4 000 Gy 都有人试验过, 但较常用的是 500~2 500 Gy; 南瓜的有效辐射剂量普遍较低, 通常为 25~50 Gy。

3.3 其他因素的影响

亲本植株良好的生长状态直接影响到单倍体的发生频率, 因此植株生长在适宜的温湿环境很重要。花粉管到达胚囊的数量越多, 越能有效地促进雌核发育, 从而提高单倍体的诱导率, 因此辐射授粉前后花粉活力的保持和授粉量的多少也是影响诱导率的关键因素。此外, 辐射花粉诱导雌核发生产生的胚大都不能发育完全, 败育胚的比例很高, 可能与发育不全的胚乳营养供应不足有关, 因此适时进行胚拯救也非常重要。孙玉宏等通过辐射花粉授粉给甜瓜 WT-1 进行授粉, 以授粉后 12 d 左右时进行胚抢救的效果较好。Sauton 等认为甜瓜辐射授粉后 3 周做胚珠离体抢救, 可以提高单倍体胚的诱导效率; NSari 和 Abakl31 也认为西瓜离体胚抢救的最佳时间为授粉后 3~4 周。这表明不同基因型的甜

瓜, 其胚败育的进程不一样, 胚抢救的适宜时间也应根据试验来具体确定一般认为授粉后 3~4 周进行胚培养较为合适。

植物细胞在离体培养过程中会产生乙烯, 过多的乙烯能干扰多胺的合成进而阻止器官的发生, 尤其在密闭的容器中, 乙烯的过度积累会直接影响到外植体的生长和芽的分化。试验表明, 接种后, 乙烯产量成上升趋势, 一周后, 乙烯含量达最大值, 但此后含量开始下降, 到达 2 周时, 含量达到平稳水平。AgNO₃ 作为乙烯作用的抑制剂, 在组培过程中能竞争性地作用于乙烯作用部位从而抑制乙烯活性, 促进植物器官发生和体细胞胚胎发生。河北农大将 AgNO₃ 应用于葫芦科作物离体雌核诱导单倍体上。甜瓜胚珠用 AgNO₃ 处理 2 周后, 及时转移到新的培养基上伸长, 在 5~80 mg/L 的 AgNO₃ 培养基上获得了甜瓜再生植株。至于不同浓度诱导效率不同, 则可能与植株的生理状态有关。

4 应用前景

葫芦科中的大多数作物都是中国重要的园艺作物, 生产上迫切需要适应特殊生态条件和抗病高产的优良品种, 因此迫切需要快速创制出一批优异的育种材料。但葫芦科各属的蔬菜作物大多遗传基础狭窄, 同时又存在远缘及近缘杂交障碍, 所以利用常规育种手段周期长、变异小, 并且不易捕捉目标性状。单倍体技术的研究和应用将会极大地缩短育种周期, 提高育种效率。同时, 单倍体重要的遗传价值也将为葫芦科蔬菜作物的遗传研究开辟广阔的前景。

马铃薯贮藏注意温湿度

1 温度 贮藏初期窖温和湿度可能会高一些, 这是正常现象, 但一般不会超过 20℃, 20 d 后窖温下降。对于高寒地区永久砖窖, 贮藏初期马铃薯处在后熟期, 呼吸旺盛, 分解出较多的二氧化碳、水分和热量, 容易出现高温高湿, 这时应以降温散热、通风换气为主, 最适温度应在 4℃; 贮藏中期的 12 月到下年的 2 月, 正是处于严寒低温季节, 薯块已进入完全休眠状态, 易受冻害, 这一阶段应防冻保暖, 温度控制在 1~3℃; 贮藏末期 3~4 月份, 气温转暖, 窖温升高, 马铃薯开始萌芽, 这时应注意通风, 温度控制在 1~4℃。

2 湿度 在马铃薯贮藏期间, 过于潮湿会使窖内顶棚上形成水滴, 促使马铃薯过早发芽和形成须根; 过于干燥会使马铃薯重量损耗过多, 使马铃薯变软和皱缩。因此, 当贮藏温度在 1~3℃时, 湿度应保持在 85%~90% 之间, 湿度变化的安全范围为 80%~93% 之间。有经验的农户朋友多以薯皮不出现潮湿、窖内顶棚上有轻微小水珠为基本的湿度条件。