

辐照花粉授粉及胚挽救时期 对苦瓜离体雌核发育的影响

陈小凤, 黄如葵, 黄玉辉, 刘杏连, 梁家作, 周生茂

(广西农业科学院 蔬菜研究所, 广西 南宁 530007)

摘要:采用辐照花粉授粉结合胚挽救技术,以 7 个不同基因型苦瓜作花粉供体对 MC52 进行授粉,系统探讨辐照剂量、胚挽救时期对成苗率的影响及辐照剂量对产胚类型的影响。结果表明:进行苦瓜辐照花粉授粉诱导离体雌核发育的适合辐照剂量为 150 Gy,胚最佳抢救时期为授粉后第 10 天。试验发现辐照剂量在 200 Gy 时也可获得高的坐果率,但大部分种子已成空壳,对于苦瓜辐照花粉授粉诱导雌核发育获得单倍体是没有意义的;对辐照获得的 102 株苗进行倍性鉴定,虽未得到单倍体植株,但在该试验中仍有较高比例的各种类型胚未发育成植株,还须进一步优化胚的培养条件。

关键词:苦瓜;辐照花粉;胚胎挽救;单倍体

中图分类号:S 642.5;Q 691.8 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)16-0152-03

辐照花粉授粉是诱导离体雌核发育获得单倍体的有效途径之一,而单倍体材料的获得对植物遗传研究和育种实践均具有重要的价值^[1]。Sauton^[2]首次采用辐照花粉授粉结合胚挽救技术获得甜瓜单倍体,在葫芦科其它瓜类蔬菜如黄瓜^[3-4]、西瓜^[5]上也获得了成功,得到单倍体胚。上述研究内容主要集中在辐照剂量、胚挽救时期、胚培养条件等影响辐照花粉诱导单倍体的因素方面,有些在此基础上进一步对单倍体形态、育性及生理生化方面进行研究^[4]。在苦瓜中,还没有关于利用该技术创制单倍体研究的文献报道。为了获得苦瓜单倍体,该试验利用 7 个不同基因型苦瓜作花粉供体对 MC52 进行授粉,探讨辐照剂量、胚挽救时期对成苗率的影响及辐照剂量对胚产生类型的影响,对辐照花粉授粉诱导苦瓜离体雌核发育的试验体系进行了初步探索,为进一步为获得苦瓜单倍体奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料来源于广西农业科学院蔬菜研究所。胚挽救时期的试验父本为 MC1、MC1-①、MC3、MC53;其它试验的父本为 MC1、MC9、MC42、MC105;母本均为 MC52。

第一作者简介:陈小凤(1975-),女,广西鹿寨人,硕士,助理研究员,研究方向为苦瓜育种。

责任作者:黄如葵(1969-),女,博士,研究员,研究方向为蔬菜育种。E-mail:rkhuang@gxaas.net。

基金项目:教育部留学回国人员科研启动基金;广西自然科学基金资助项目(桂科自 0832086)。

收稿日期:2011-05-20

1.2 试验方法

于早上 8 时左右采集前 1 d 开放的父本雄花,装入防水袋中,立即拿到广西辐照中心进行 ^{60}Co 射线辐照。辐照剂量为 100、150、200 Gy。为了有利于第 2 天早上花粉的散粉,将辐照过的雄花保存在 25℃,相对湿度为 43%的环境条件下^[6],并于取雄花当天下午把要授粉的雌花套袋。次日早上用辐照过的花粉授粉并作好标记,继续套袋隔离至坐果,5 d 后统计坐果率。胚挽救时期试验取授粉后 10、12、14 d 的瓜,其它试验取授粉后第 10 天的瓜,用 75%的乙醇对瓜表面进行消毒,剖开果实分离种子并接种到基本培养基 MS 中,7 d 后剥离种壳取出小胚接到 MS+6-BA 0.2 mg/L 中成苗培养。

1.3 计算方法

坐果率=授粉数/坐果数 $\times 100$;成苗率=成苗数/培养种子数 $\times 100$;可抢救胚率=(未成熟胚+成熟胚)/培养的种子数 $\times 100$ 。

2 结果与分析

2.1 辐照剂量对坐果率及成苗率的影响

由图 1 可看出,辐照剂量对坐果率的影响并没有以剂量的高低表现出一定的规律性,低辐照剂量和高辐照剂量均可获得高的坐果率。辐照剂量为 150 Gy 时,父本为 MC1 及 MC9 的组合,成苗率高于辐照剂量为 100 Gy 的,MC42 与 MC105 为父本的组合却正好相反。辐照剂量为 200 Gy 时,仅 MC1 为父本的组合成苗率有 4.17%,其它组合均无胚萌发成苗。

2.2 胚挽救时期对成苗率的影响

由表 1 可知,授粉后第 10 天取瓜培养,可抢救胚的百分率最高,大部分组合的成苗率也是最高的,并且出现了较多其它类型的未成熟胚。胚挽救时期在授粉后第 12 天以上时,仅获得子叶型的成熟胚,未出现其它类型的胚。

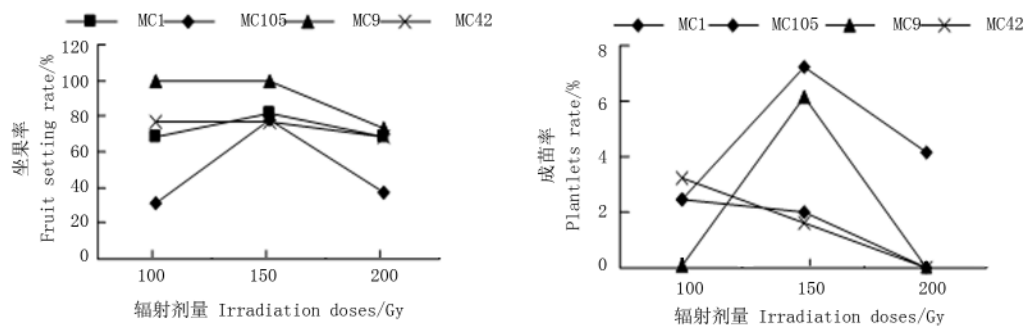


图 1 辐照剂量对坐果率及成苗率的影响
Fig. 1 Effects of irradiation doses on fruits setting rate and plantlets rate

表 1 胚挽救时期对成苗率的影响
Table 1 Effects of embryo rescue period on plantlets

| 父本基因型 Paternal genotype | 授粉天数 Pollinated days/d | 取瓜数 Taking melons/个 | 培养种子数 No. of cultured seeds/个 | 未成熟胚/成熟胚 Immature embryos/ Mature embryos/个 | 可挽救胚的百分率 Embryo rescue/ % | 成苗数/成苗率 No. of Plantlets/ Plantlets rate/ % |
|----------------------------|---------------------------|------------------------|----------------------------------|---|------------------------------|---|
| MC1 | 10 | 5 | 70 | 12/14 | 37.14 | 8/11.42 |
| | 12 | 3 | 42 | 0/2 | 4.76 | 1/2.38 |
| | 14 | 2 | 28 | 0/0 | 0 | 0/0 |
| MC3 | 10 | 9 | 143 | 4/16 | 13.99 | 2/1.40 |
| | 12 | 2 | 39 | 0/4 | 10.26 | 1/2.56 |
| | 14 | 1 | 7 | 0/0 | 0 | 0/0 |
| MC1-① | 10 | 14 | 80 | 32/36 | 85 | 31/38.75 |
| | 12 | 4 | 29 | 0/4 | 13.79 | 1/3.45 |
| | 14 | 5 | 89 | 0/8 | 8.99 | 0/0 |
| MC53 | 10 | 9 | 113 | 40/28 | 60.18 | 21/18.58 |
| | 12 | 7 | 40 | 0/4 | 10 | 1/2.50 |
| | 14 | 2 | 36 | 0/0 | 0 | 0/0 |

注:表中未成熟胚指子叶型胚以下的发育类型,成熟胚指子叶型胚。
Notes: The immature embryo refers to the cotyledon embryo following growth type and the mature embryo refers to cotyledon embryo in this table.

2.3 辐照剂量对产胚类型的影响

取辐照剂量为 100 Gy 和 150 Gy 的瓜,剥离种壳取胚培养。辐照花粉授粉后,种子的发育程度是不一致的,出现了球形胚、鱼雷胚、心形胚、子叶形胚,未见箭

状胚和捌状胚(图 2)。表 2 表明,辐照剂量不同,获得各种类型的胚的比例也是不一样的。随着辐照剂量由 100 Gy 增加到 150 Gy,4 个组合获得的球形胚、鱼雷胚、心形胚的比例都是明显增加的。

表 2 辐照剂量对产胚类型的影响
Table 2 Effects of Irradiation doses on embryo types.

| 父本基因型 Paternal genotype | 辐照剂量 Irradiation doses/Gy | 球形胚比例 Ball-shaped embryo rate/ % | 鱼雷胚比例 Torpedo embryo rate/ % | 心形胚比例 Heart-shaped embryo rate/ % | 子叶胚比例 Cotyledon embryo rate/ % |
|----------------------------|------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|
| MC1 | 100 | 16.13 | 3.23 | 32.26 | 48.39 |
| | 150 | 28.17 | 7.04 | 45.07 | 19.72 |
| MC105 | 100 | 12.00 | 0.00 | 32.00 | 56.00 |
| | 150 | 31.25 | 5.00 | 45.00 | 18.75 |
| MC9 | 100 | 18.42 | 2.63 | 31.58 | 47.37 |
| | 150 | 30.61 | 6.12 | 42.86 | 20.41 |
| MC42 | 100 | 18.29 | 2.44 | 30.49 | 48.78 |
| | 150 | 31.25 | 6.25 | 37.5 | 25.00 |

3 结论与讨论

该研究中,低辐照剂量和高辐照剂量均可获得高的坐果率,原因尚不明确。因为影响坐果率的因素有很多,比如亲本的生理状态、授粉前后花粉活力的保持及授粉量多少等。经剥壳取胚培养发现,辐照剂量为 200 Gy 时,大部分种子已成空壳,这对于苦瓜辐照花粉授粉诱导雌核发育获得单倍体是没有意义的。

取不同发育程度的胚进行培养,父本为 MC1、MC9、MC42、MC105 的 4 个组合共得到 102 株苗,其中

鱼雷胚没有苗生成,球形胚获得 1 株苗,心形胚获得 14 株苗,其余 87 株均由子叶胚得来。根据 Kurtar E S 等^[7]的研究,若球形胚,箭状胚,杆状胚可以发育,则形成单倍体,仅有 53.8%鱼雷形胚和 23.1%的心形胚发育成单倍体,其余的鱼雷形胚、心形胚、子叶形胚及畸形胚则发育成双单倍体。在苦瓜上以 150 Gy 剂量辐照得到的球形胚、鱼雷形胚、心形胚的比率较高,因此初步推断适合的辐照剂量为 150 Gy。

辐照花粉诱导雌核发育的过程中,种子中败育胚

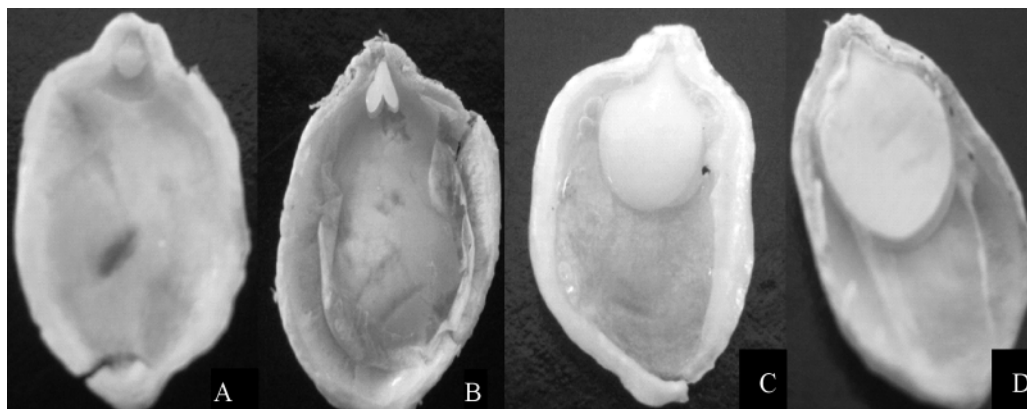


图 2 胚的类型
Fig. 2 embryo type

注:A:球形胚;B:鱼雷胚;C:心形胚;D:子叶形胚。

Note:A:Ball-shaped embryo;B:Torpedo embryo;C:Heart-shaped embryo;D:Cotyledon embryo.

的比率很高,因此确定苦瓜胚挽救时间非常重要,太早或太晚效果都不好。12 d 和 14 d 取瓜培养时,部分基因型仅获得少量的子叶型胚,大部分胚已败育,形成空壳种子。以授粉后第 10 天取瓜培养时,可挽救胚的百分率和成苗率均是最高。

对该试验中获得的苗进行倍性鉴定,未得到单倍体植株。从幼胚发育到心形胚阶段,在适宜的培养基上做胚离体挽救,可以提高胚的诱导率,如 Sauton^[8]等的研究发现,幼胚在 MS+6-BA 0.2 mg/L+活性炭 0.15 mg/L 的培养基上进行胚抢救更容易发育成胚状体,然后从胚状体再发育成植株,说明不同类型的胚所需的培养条件应是不一样的。而该试验得到的所有类型的胚均用同一种培养基培养,仍有相当高比例的球形胚、鱼雷胚、心形胚、子叶形胚未发育成苗。

辐照花粉诱导雌核发育成单倍体的过程是复杂的,影响的因素有很多,如基因型、授粉季节、辐照源及剂量、胚抢救时期、培养条件等。该试验只是初步摸清辐照花粉授粉诱导苦瓜离体雌核发育的条件。

综上所述,为了建立稳定、高效的苦瓜辐照花粉诱导雌核发育获得单倍体的技术,还需要选择更多的基

因型参与试验,应对授粉季节进行对比试验和对各种类型胚的培养条件作进一步的优化。

参考文献

- [1] Nitxschen W, Wenxel G. Production of Haploid Plants//Haploids in Plant Breeding [M]. Verlag Paul Pare, Berlin and Hamburg, 1977: 8-16.
- [2] Sauton A. Effect of season and genotype on gynogenetic haploid production in muskmelon (*Cucumis melon* L.) [J]. Sci. Hort, 1988, 35: 71-75.
- [3] Szczyt K N, de Vaulx R D. Preliminary data on haploid cucumber (*Cucumis sativus* L.) induction [J]. Cucurbit Genet Coop Rpt, 1989, 12: 24-25.
- [4] 雷春, 陈劲枫, 钱春桃, 等. 辐照花粉授粉培育单倍体黄瓜研究 [J]. 中国农业科学, 2006, 39(7): 1428-1436.
- [5] 谢森, 赵隽, 潘俊松, 等. 辐照花粉授粉诱导黄瓜单倍体 [J]. 上海交通大学学报, 2005, 23(2): 153-157.
- [6] 陈小凤, 黄如葵, 刘杏连, 等. 苦瓜辐照花粉短期保存方法的初步研究 [J]. 长江蔬菜, 2010(2): 50-52.
- [7] Kurtar E S, Sati N, Abak K. Obtention of haploid embryos and plants through irradiated pollen technique in squash (*Cucurbita pepo* L.) [J]. Euphytica, 2002, 27: 335-344.
- [8] Sauton A, De Vaulx R D. Obtention de plants haploids chez le melon (*Cucumis melon* L.) par gynogeneses induite par de pollen irradie [J]. Agronomic, 1987, 7: 141-148.

Effects of Irradiated Pollen Pollination and Stages of Embryo Rescue on Embryo Development *in vitro* of Bitter Gourd

CHEN Xiao-feng, HUANG Ru-kui, HUANG Yu-hui, LIU Xing-lian, LIANG Jia-zuo, ZHOU Sheng-mao
(Vegetable Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning, Guangxi 530007)

Abstract: The technology of combining irradiated pollen pollination with embryo rescue were adopted, seven different bitter melon were used to maternal parents were paternal parent MC52 to systematically investigate the effects of irradiation doses, embryo rescue period on plantlets and the effects of irradiation doses on embryo types. The results showed that the 150 Gy dose was the best irradiation dose and the tenth day was the best embryo rescue period to induction of female gametogenesis for bitter melon. 200 Gy dose could obtain high fruit rated, but it make no significant to product haploid for bitter melon, as the seeds became empty. The 102 plantlets were not had haploid through identified chromosome ploidy, but the high percent type embryos were not grew plantlets in the experiment, so culture conditions of embryo needed to improve.

Key words: *Momordica charantia* L.; radiated pollen; embryo rescue; haploid