

几种生理因素对子房未授粉南瓜胚形成的影响

孙守如*, 翟庆慧, 胡建斌, 陈解放, 章鹏

河南农业大学园艺学院, 郑州450002

摘要: 以南瓜品种‘蜜本’为试材, 研究生理因素影响未授粉南瓜胚形成的结果表明: 开花前1 d的子房最适宜于胚的诱导; 胚诱导前以35 °C高温处理6 d后胚形成能力显著提高; 高浓度2,4-D促进胚的发生, 抑制愈伤组织的形成; 加有4.0 mg·L⁻¹ 2,4-D、0.5 mg·L⁻¹ NAA和0.5 mg·L⁻¹ 6-BA的MS培养基上的出胚率最高(20.6±3.8)%, 每个子房块的平均出胚数达11.3±3.2。
关键词: 南瓜; 未受精子房; 胚形成

Effects of Several Physiological Factors on Embryo Formation in Unpollinated Ovary Culture of Pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch. ex Poiret)

SUN Shou-Ru*, ZHAI Qing-Hui, HU Jian-Bin, CHEN Jie-Fang, ZHANG Peng

College of Horticulture, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

Abstract: Effects of several physiological factors on embryo formation in unpollinated pumpkin ovary culture were studied using ‘Miben’ pumpkin (*Cucurbita moschata*) as experimental material. The results showed that the ovaries at the stage of 1 d before anthesis were optimal for embryo induction. Heat treatment of 35 °C for 6 d before embryo induction remarkably enhanced the potential of embryo formation in unpollinated ovary. High concentration of 2,4-D promoted embryo formation in unpollinated ovary and inhibited callus formation. The ovary explants cultured in MS medium containing 4.0 mg·L⁻¹ 2,4-D, 0.5 mg·L⁻¹ NAA and 0.5 mg·L⁻¹ 6-BA gave highest embryo formation rate [(20.6±3.8)%] with the mean embryo number of 11.3±3.2 per ovary segment.

Key words: pumpkin; unpollinated ovary; embryo formation

南瓜种质资源十分丰富, 地理分布也极为广泛, 且适应性强、耐储运。尽管我国南瓜的栽培面积广、产量高, 但其育种研究(如种质创制、主要农艺性状遗传机制和标记开发等)相对滞后。目前市场上商业化的南瓜品种数量远不如黄瓜、甜瓜和苦瓜等同科的同类作物(罗伯祥等2006)。一般认为, 杂交育种是获得作物新品种的途径之一, 培育高纯度的亲本自交系是杂交育种的首要前提, 但传统的自交选择方法费力耗时, 且亲本性状的表达常受环境的影响, 致使育种工作难度增大。而在离体条件下, 采用培养未授粉的子房促使雌核发育获得单倍体植株(加倍后得到双单倍体), 是较短时间内获得高纯度亲本的快速而有效的方法。迄今人们已在黄瓜(Gemes-Juhasz等2002; 刁卫平等2008)、西葫芦(Metwally等1998; 谢冰等2006)和甜瓜(Lotfi等2003)等葫芦科作物中采用未授粉的子房进行培养的手段已获得了胚或再生植株, 但在南瓜中还未见有这方面的报道。本文就几种生理因素对未授

粉的子房中胚发生的影响进行了研究, 以期为建立高效南瓜单倍体培养体系以及单倍体育种技术提供基础性资料。

材料与方法

南瓜(*Cucurbita moschata* Duch. ex Poiret)品种‘蜜本’, 由本校豫艺种业有限公司提供。2008年3月中旬育苗, 4月1日定植于本校教学实验基地。盛花期(约5月中旬)采取生长健壮、无病虫害植株的开花前2 d、1 d和12 h的子房。在超净工作台上用75%的酒精浸泡30 s, 然后用1 g·L⁻¹的HgCl₂浸泡8~10 min, 无菌水冲洗4次后, 切去子房两端约1 cm的部分, 剩余部分横切成2 mm薄片, 接种到培养基上进行胚诱导。

收稿 2009-08-20 修订 2009-09-24

资助 河南省科技攻关项目(0624100004)和河南省重点科技攻关项目(9210211016)。

* 通讯作者(E-mail: ssr365@sina.com; Tel: 0371-63558096)。

试验采用 MS 培养基配方, 添加 $7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂、 $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖以及不同浓度的 2,4-D、NAA 和 6-BA, pH 调至 5.8, $121 \text{ }^\circ\text{C}$ 高压灭菌 15 min。试验设置以下 5 种影响因素, 以研究它们对南瓜子房中的胚形成的影响。(1)不同发育时期的材料: 开花前 2 d、1 d 和 12 h; (2)不同时间的高温处理: 在 $35 \text{ }^\circ\text{C}$ 黑暗条件下分别培养 3、5 和 7 d, 同时以室温 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 为对照; (3)不同浓度的 2,4-D: MS 培养基中加入不同浓度的 2,4-D, 分别为 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 和 $4.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 并附加 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA、 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA 和 $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖; (4)不同组合的植物生长调节物质: 从试验(3)中筛选出的适宜 2,4-D 浓度与 0.25 和 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA 以及 0.5 和 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA 组合, 培养基中附加 $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖。将形成的胚连同切块转移至上述处理(3)和(4)中效果最好的培养基中, 但不加 2,4-D, 进行植株再生。培养条件为: 室温 $25 \text{ }^\circ\text{C}$; 光照强度为 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 光照时间为 $14 \text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ 。

子房的切块接种于装有培养基的培养皿中, 每皿 6 个子房块, 每处理 6 皿(36 块), 重复 3 次, 即每个处理有 108 个子房块。培养 15 d 后统计数据, 计算出胚率(形成胚的子房块/接种子房块总数 $\times 100\%$)和平均出胚数(平均每个子房块出胚数)。出胚率转换成反正弦后进行方差分析。

结果与讨论

1 不同发育时期的子房对胚形成的影响

接种到不同胚诱导培养基上的子房块均有胚的形成, 但不同发育时期的子房出胚率并不一致。统计 3 种不同诱导培养基上的出胚率和出胚数的结果(表 1)表明, 开花前 1 d 的子房出胚普遍好于开花前 2 d 和 12 h 的子房, 分别接种在 M_1 、 M_2 和 M_3 三种培养基上的开花前 1 d 的子房块, 其平均出胚数和出胚率均高于开花前 2 d 和 12 h 的, 它们的出胚率差异达到显著水平, 出胚数(除 M_2 以外)也是如此。据此以下实验均选用开花前 1 d 的子房作为外植体。

表 1 不同发育时期的子房对胚形成的影响

Table 1 Effects of ovaries at different developmental periods on embryo formation

开花前时间	诱导培养基	平均出胚数 / 个	出胚率 / %
2 d	M_1 (MS+ $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D+ $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA+ $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA)	3.1 ± 1.2^c	2.5 ± 0.7^d
	M_2 (MS+ $3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D+ $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA+ $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA)	2.8 ± 0.7^{cd}	3.1 ± 0.6^d
	M_3 (MS+ $4.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D+ $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA+ $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA)	3.3 ± 0.6^c	3.6 ± 1.3^c
1 d	M_1 (MS+ $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D+ $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA+ $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA)	4.2 ± 0.9^b	4.6 ± 1.4^b
	M_2 (MS+ $3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D+ $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA+ $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA)	3.4 ± 0.7^c	3.9 ± 1.2^c
	M_3 (MS+ $4.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D+ $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA+ $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA)	5.0 ± 1.3^a	5.6 ± 1.7^a
12 h	M_1 (MS+ $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D+ $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA+ $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA)	2.2 ± 0.6^d	3.1 ± 0.6^d
	M_2 (MS+ $3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D+ $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA+ $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA)	2.6 ± 0.5^{cd}	2.9 ± 0.7^d
	M_3 (MS+ $4.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D+ $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA+ $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA)	3.1 ± 1.0^c	4.0 ± 1.1^c

表中数据所附不同字母表示经邓肯氏新复极差法检验为显著水平($P=0.05$)。

2 不同高温处理时间对胚形成的影响

根据热处理促进雌花核发育启动的报道(Gemes-Juhász等2002), 我们以室温($25 \text{ }^\circ\text{C}$)为对照, 观察接种于 M_3 培养基(MS+ $4.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D+ $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA+ $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA)中的子房块, 经不同时间高温处理后的出胚率和平均出胚数的结果(表 2)表明, 经过高温($35 \text{ }^\circ\text{C}$)处理的出胚率和平均出胚数显著高于常温($25 \text{ }^\circ\text{C}$)和未进行高温处理的, 说明

高温促进南瓜未授粉子房中胚的形成。高温处理 5 d 的效果最佳, 出胚率[(22.6 ± 6.3)%]和平均出胚数(4.8 ± 1.1)均最高, 明显好于 3 和 7 d 处理的。

3 不同浓度的 2,4-D 对胚形成的影响

未添加 2,4-D 的培养基几乎不能诱导胚的形成, 而接种在添加 2,4-D 的培养基中的子房块时有胚的形成, 说明外源 2,4-D 对未授粉南瓜子房内胚的形成是必要的。高浓度的 2,4-D ($\geq 3.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)

有利于胚的形成。添加 3.5、4.0 和 4.5 mg·L⁻¹ 2,4-D 的培养基上的出胚率均在 5% 以上, 出胚数大于或等于 3。培养基中 2,4-D 浓度降低后, 出胚率和平均出胚数均显著下降(表 3)。此外, 在低浓度 2,4-D 条件下, 子房块愈伤组织化速度快, 生长也快, 而含有高浓度 2,4-D 培养基上的愈伤组织生长反而减缓。这些结果说明, 在未授粉的南瓜子房培养过程中, 高浓度 2,4-D (≥ 3.5 mg·L⁻¹) 对愈伤组织形成不利。

表 2 不同高温处理时间对胚形成的影响

Table 2 Effects of different times of heat treatment on embryo formation

处理时间/d	温度/°C	平均出胚数/个	出胚率/%
0	25	1.4±0.5 ^e	1.7±0.4 ^c
	35	1.5±0.4 ^e	2.1±0.3 ^c
3	25	1.6±0.3 ^e	3.4±0.5 ^c
	35	3.1±0.7 ^b	19.2±3.8 ^b
5	25	2.1±0.4 ^d	3.1±0.7 ^c
	35	4.8±1.1 ^a	22.6±6.3 ^a
7	25	2.3±0.5 ^{cd}	4.1±1.0 ^c
	35	2.6±0.5 ^c	15.6±0.6 ^b

表中数据所附不同字母表示经邓肯氏新复极差法检验为显著水平($P=0.05$)。

4 不同生长调节物质组合对胚状体诱导的影响

我们选取胚诱导效果较好的 3 种浓度 2,4-D (3.5、4.0 和 4.5 mg·L⁻¹), 与不同浓度 NAA (0.25

和 0.5 mg·L⁻¹) 和 6-BA (0.5 和 1.0 mg·L⁻¹) 进行随机组合的结果(表 4)表明, 4.0 mg·L⁻¹ 2,4-D、0.5 mg·L⁻¹ NAA 和 0.5 mg·L⁻¹ 6-BA 的胚诱导效果最好, 其出胚率为(20.6±3.8)%, 平均出胚数达 11.3±3.2。

附带提一下的是, 我们将已形成的胚连同子房块转至不加 2,4-D (加有 0.5 mg·L⁻¹ NAA 和 0.5 mg·L⁻¹ 6-BA) 的培养基上, 5~7 d 后部分胚从母体组织脱落, 大约 3 周后形成完整的小植株。但胚转化成小植株的频率不足 5%。在下一步的研究中, 我们将改进胚的诱导条件, 进一步提高子房块的出胚率和植株转化率。

表 3 不同浓度的 2,4-D 对胚形成的影响

Table 3 Effects of different concentrations of 2,4-D on embryo formation

2,4-D 浓度/mg·L ⁻¹	平均出胚数/个	出胚率/%
1.0	1.5±0.3 ^c	4.0±1.2 ^c
1.5	1.7±0.6 ^c	3.6±0.5 ^{cd}
2.0	2.1±0.4 ^b	4.0±0.8 ^c
2.5	1.6±0.4 ^c	3.2±0.6 ^d
3.0	2.0±0.5 ^b	3.7±0.6 ^{cd}
3.5	3.2±0.7 ^a	5.9±1.3 ^a
4.0	3.0±0.6 ^a	5.1±1.5 ^a
4.5	3.4±1.0 ^a	5.6±0.9 ^a

表中数据所附不同字母表示经邓肯氏新复极差法检验为显著水平($P=0.05$)。

表 4 不同植物生长调节物质组合对胚形成的影响

Table 4 Effects of different plant growth regulator combinations on embryo formation

2,4-D 浓度/mg·L ⁻¹	NAA 浓度/mg·L ⁻¹	6-BA 浓度/mg·L ⁻¹	平均出胚数/个	出胚率/%
3.5	0.25	0.5	2.5±1.3 ^e	7.3±1.6 ^e
3.5	0.25	1.0	2.6±0.7 ^e	10.1±2.5 ^d
3.5	0.5	0.5	5.1±2.3 ^e	19.4±3.6 ^a
3.5	0.5	1.0	2.9±1.1 ^e	13.3±2.1 ^c
4.0	0.25	0.5	3.5±0.8 ^d	15.9±3.0 ^{bc}
4.0	0.25	1.0	5.2±1.0 ^b	16.7±3.3 ^b
4.0	0.5	0.5	11.3±3.2 ^a	20.6±3.8 ^a
4.0	0.5	1.0	3.6±0.6 ^d	15.6±2.2 ^{bc}
4.5	0.25	0.5	4.1±0.5 ^c	17.1±2.3 ^b
4.5	0.25	1.0	5.5±1.3 ^b	11.2±0.3 ^d
4.5	0.5	0.5	4.5±0.8 ^{bc}	14.5±2.2 ^c
4.5	0.5	1.0	3.4±0.4 ^d	8.8±1.4 ^e

表中数据所附不同字母表示经邓肯氏新复极差法检验为显著水平($P=0.05$)。

参考文献

- 刁卫平, 陈劲枫, 雷春, 宋慧, 张晓青(2008). 影响黄瓜未授粉子房培养胚发生因素的研究. 南京农业大学学报, 31 (1): 137~140
- 罗伯祥, 沈俊国, 赵苏海, 朱明超(2006). 南瓜属作物育种研究进展. 种子, 25 (1): 43~46
- 谢冰, 王秀峰, 樊治成(2006). 西葫芦未受精胚珠离体培养条件的优化及胚囊植株的再生. 中国农业科学, 39 (1): 132~138
- Gemes-Juhasz A, Balogh P, Ferenczy A, Kristof Z (2002). Effect of optimal stage of female gametophyte and heat treatment on *in vitro* gynogenesis induction in cucumber (*Cucumis sativus* L.). Plant Cell Rep, 21: 105~111
- Lotfi M, Alan AR, Henning MJ, Jahn MM, Earle ED (2003). Production of haploid and doubled haploid plants of melon (*Cucumis melo* L.) for use in breeding for multiple virus resistance. Plant Cell Rep, 21: 1121~1128
- Metwally EI, Moustafa SA, El-Sawy BI, Haroun SA, Shalaby TA (1998). Production of haploid plants from *in vitro* culture of unpollinated ovules of *Cucurbita pepo*. Plant Cell Tiss Org Cul, 52: 117~121