

提高春季西瓜未授粉子房胚状体诱导率的方法

闵子扬^{1,2} 邹甜¹ 阮万辉² 孙小武^{1*}

(¹ 湖南农业大学园艺园林学院, 湖南长沙 410128; ² 湖南省蔬菜研究所, 湖南长沙 410125)

摘要: 为提高春季西瓜未授粉子房的胚状体诱导率、加速西瓜单倍体育种进程, 以早佳 8424 西瓜未授粉子房为材料, 对影响春季西瓜未授粉子房胚状体诱导率的因素进行了研究。结果表明: 摘取子房时尽量保留最长果柄, 然后将带果柄子房用 $0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 TDZ 溶液浸泡 10 min, 最后将其置于 $15 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温条件下预处理 2 d, 能够将春季西瓜未授粉子房的胚状体诱导率从 3.5% 提高到 15.9%。

关键词: 西瓜; 春季; 未授粉子房; 胚状体; 诱导

西瓜 (*Citrullus lanatus*) 是葫芦科重要的蔬菜作物之一, 具有丰富的营养和保健功能, 深受消费者喜爱。我国作为西瓜的生产和消费大国, 其产量占世界总产量的 60% 以上, 但我国西瓜育种水平相对滞后, 品种类型无法完全满足市场需求, 因此, 提高我国西瓜育种水平、增强西瓜产业国际竞争力具有重要意义。

单倍体育种对于加速育种进程、创新种质资源、构建遗传图谱等均具有重要意义 (袁素霞等, 2010; Qiao et al., 2015)。单倍体的获得方法主要有离体雄核培养和离体雌核培养, 但在葫芦科作物上以未授粉子房或胚珠为外植体的离体雌核培养为主 (孙守如等, 2013; 赵晓菲, 2014)。离体雌核培养过程中再生植株的产生方式有两种, 一种是诱导形成愈伤组织后再分化产生芽, 最后形成完整再生植株; 另一种是以胚状体发育途径直接形成再生植株。相关研究表明, 愈伤组织途径形成的再生植株大部分起源于体细胞, 而以胚状体发育途径形成的再生植株中单倍体植株的比例显著高于以愈伤组

织途径形成的再生植株 (Ramsay et al., 2003; 赵珺, 2007)。这提醒我们在进行西瓜未授粉子房离体培养以创制单倍体植株的过程中, 提高胚状体的诱导率是一个需要解决的关键问题。

TDZ (噻苯隆) 是一种新型植物生长调节剂, 具有细胞分裂素和生长素的双重功效, 广泛应用于诱导植物愈伤组织形成和体细胞胚分化 (徐晓峰和黄学林, 2003), 已在香蕉 (魏岳荣等, 2007)、非洲紫罗兰 (杨先泉等, 2010)、南瓜 (闵子扬等, 2016) 等作物的体细胞胚诱导中取得了较好效果。本试验以 TDZ 为预处理激素, 探讨其对西瓜胚状体诱导效果的影响。

参照前期研究 (闵子扬等, 2016), 笔者已建立了一套诱导率较高的西瓜未授粉子房离体培养诱导胚状体再生的技术体系, 主要技术路线如下: 以开花前一天的西瓜未授粉子房为材料, 流水冲洗 30 min 后在超净工作台上用 75% 酒精消毒 30 s, 无菌水冲洗 3 次, 去除子房表皮后横切成 1 mm 左右的薄片, 然后在 3% 次氯酸钠溶液中消毒 2 min, 无菌水冲洗 5 次后接种于 $\text{MS}+30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖 $+7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂粉 $+0.04 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDZ 的诱导胚状体发生的培养基上, $35 \text{ }^\circ\text{C}$ 黑暗条件下热激 5 d 后转到组培室培养, 28 d 后统计胚状体诱导率。通过上述技术体系能够获得较高的胚状体诱导率, 但试验过程中发现材料的种植季节不同其诱导率存在显著差异, 春季

闵子扬, 男, 博士研究生, 研究实习员, 专业方向: 瓜类蔬菜遗传育种,
E-mail: minziyang1220@163.com

* 通讯作者 (Corresponding author): 孙小武, 男, 教授, 博士生导师,
专业方向: 瓜类蔬菜遗传育种, E-mail: sunxiaowu2007@126.com

收稿日期: 2017-11-09; 接受日期: 2018-02-28

基金项目: 湖南省科技厅重点研发项目 (2016NK2193)

西瓜未授粉子房胚状体诱导率仅为 3.5%，而秋季诱导率最高可达 20.2%，并且这种现象在南瓜、西葫芦等瓜类作物上也有报道（谢冰等，2006；孙守如等，2013）。为提高春季西瓜未授粉子房的胚状体诱导率、延长试验可操作时间、加速西瓜单倍体育种进程，本试验在前期已建立的西瓜未授粉子房离体培养诱导胚状体再生技术体系的基础上，以春季西瓜未授粉子房为研究对象，探索提高春季西瓜未授粉子房胚状体诱导率的方法，以期能够加速西瓜单倍体育种进程，为我国西瓜种质资源创新、新品种选育、基因工程相关研究提供帮助。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试西瓜品种为早佳 8424，由湖南省蔬菜研究所提供。试验材料于 2016 年 4 月 10 日定植在湖南省蔬菜研究所高桥科研基地的塑料大棚中，5 月 20 日第 2 朵雌花出现时开始取样接种。以下各处理每处理接种 3 瓶，每瓶 9 个外植体，3 次重复。

1.2 试验方法

1.2.1 果柄长度对胚状体诱导率的影响 取样时，分别以最长果柄、1/2 果柄、无果柄 3 种类型（图 1）的西瓜未授粉子房为材料，用 $0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 TDZ 溶液浸泡 10 min 后置于保湿盒中， $15 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温条件下放置 2 d，然后按照已建立的技术体系进行接种，培养 28 d 后分别统计西瓜未授粉子房胚状体诱导率。

胚状体诱导率 = (形成胚状体总数 / 膨大胚珠总数) $\times 100\%$



图 1 不同果柄长度的西瓜未授粉子房

彩色图版见《中国蔬菜》网站：www.cnveg.org，下图同。

1.2.2 激素预处理方式对胚状体诱导率的影响 以果柄最长时的西瓜未授粉子房为材料，分别用 0.01 、 0.02 、 $0.03 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 TDZ 溶液浸泡 5、10、15 min 后置于保湿盒中， $15 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温条件下放置 2 d，以不进行激素预处理的材料为对照，然后按照已建立的技术体系进行接种，培养 28 d 后分别统计西瓜未授粉子房胚状体诱导率。

1.2.3 温度预处理方式对胚状体诱导率的影响 以果柄最长时的西瓜未授粉子房为材料，用 $0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 TDZ 溶液浸泡 10 min 后置于保湿盒中，分别在 10 、 15 、 $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 的恒温条件下处理 1、2、3 d，以不进行温度预处理的材料为对照，然后按照已建立的技术体系进行接种，培养 28 d 后分别统计西瓜未授粉子房胚状体诱导率。

1.3 数据分析

采用 SPSS 软件对以上各数据进行方差分析和 Duncan's 多重比较。

2 结果与分析

2.1 不同果柄长度对西瓜胚状体诱导率的影响

西瓜未授粉子房取样后有一个预处理的过程，不会立刻接种，存放过程中需要消耗部分养分，果柄能够为子房提供部分营养，因此不同果柄长度会对存放后子房的生理状态产生影响。试验结果表明，果柄最长时其胚状体诱导率最高，达 13.8%，而无果柄子房的胚状体诱导率仅为 2.6%，带 1/2 果柄的胚状体诱导率为 4.4%，说明果柄长度越长，西瓜胚状体诱导率越高。

2.2 激素预处理方式对西瓜胚状体诱导率的影响

由表 1 可以看出，当 TDZ 浓度为 0 时，不同预处理时间的胚状体诱导率均处于较低水平，胚状体生长状况一般，总体不利于再生植株的获得。TDZ 浓度为 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时，相较于不用激素处理，其胚状体诱导率显著提高，当预处理时间达到 15 min 时，诱导率可达 6.0%。随着 TDZ 浓度的进一步提高，胚状体诱导率仍有上升的空间。在 TDZ 浓度为 $0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 或 $0.03 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 条件下，预处理时间为 10 min 或 15 min 时，各处理之间胚状体诱导率差异不显著且均处于较高水平，最高可达 16.7%。可以看出，与未使用激素预处理相比，激素预处理能够显著提高胚状体诱导率。但试验过

程中也发现, TDZ 浓度达 $0.03 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 且激素预处理时间为 10、15 min 时, 虽然胚状体诱导率较高, 但再生的胚状体存在严重畸形, 不利于再生植株的获得。

2.3 温度预处理方式对西瓜胚状体诱导率的影响

如表 2 所示, 在相同预处理温度下, 不同预处理时间之间胚状体诱导率差异显著并呈现出一定的趋势, $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 或 $15 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 时随着预处理时间的延长, 胚状体诱导率呈先上升后下降的趋势; $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 及室内自然条件下随着预处理时间的延长, 胚状体诱导率逐渐下降。预处理时间相同时, 随着预处理温度的上升, 胚状体诱导率呈现出先上升后下降的趋势, 在 $15 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 预处理 2 d 时达到峰值, 诱导率高达 15.9%, $15 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 预处理时间达 3 d 时诱导率急剧下降, 这可能

表 1 不同激素预处理方式对西瓜胚状体诱导率的影响

激素预处理方式		胚状体诱导率/%	胚状体生长状况
TDZ/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	预处理时间/min		
0	5	3.6 ef	一般
	10	3.7 e	一般
	15	3.4 f	一般
0.01	5	4.8 d	一般
	10	5.9 c	良好
	15	6.0 c	良好
0.02	5	10.8 b	良好
	10	15.2 a	很好
	15	15.3 a	有畸形
0.03	5	10.8 b	有畸形
	10	15.3 a	严重畸形
	15	16.7 a	严重畸形

注: 表中同列数据后不同小写字母表示在 5% 水平上差异显著, 下表同。

表 2 不同温度预处理方式对西瓜胚状体诱导率的影响

温度预处理方式		胚状体诱导率/%	胚状体生长状况
温度/ $^{\circ}\text{C}$	预处理时间/d		
10	1	4.2 f	良好
	2	11.9 b	良好
	3	5.8 e	有畸形
15	1	11.8 b	良好
	2	15.9 a	良好
	3	6.2 d	有畸形
20	1	11.7 b	良好
	2	8.4 c	良好
	3	6.1 d	有畸形
室内自然条件	1	5.9 e	一般
	2	4.3 f	有畸形
	3	2.8 g	严重畸形

是由于预处理时间过长子房生理状态明显下降造成的。试验过程中还发现, 如果西瓜子房在室内自然条件下放置一段时间, 其胚状体诱导率显著下降, 放置时间达到 3 d 时其诱导率仅为 2.8%, 并且胚状体存在严重的畸形现象, 说明西瓜未授粉子房的生理状态对胚状体诱导率影响显著。综上认为, 在 $15 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下预处理 2 d, 能够显著提高春季西瓜未授粉子房的胚状体诱导率, 有利于再生植株的获得。

3 结论

提高春季西瓜未授粉子房胚状体诱导率的方法为: 摘取子房时尽量保留最长果柄, 然后将带最长果柄的西瓜未授粉子房用 $0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 TDZ 溶液浸泡 10 min, 最后将其置于 $15 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温条件下预处理 2 d, 预处理完成后进行接种培养, 能够显著改善春季西瓜未授粉子房胚状体诱导率低的问题。通过上述预处理手段, 能够将春季西瓜未授粉子房的胚状体诱导率从 3.5% (图 2-A) 提高到 15.9% (图 2-B), 虽然距秋季西瓜未授粉子房的胚状体诱导率 20.2% 仍有差距, 但仍显著提高了试验效率。

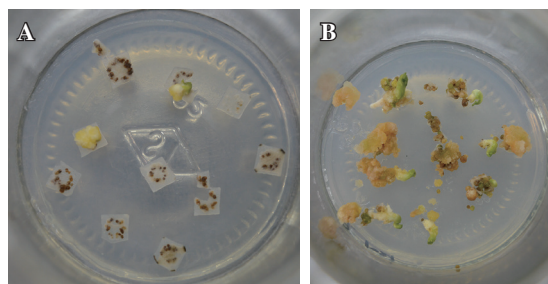


图 2 春季西瓜未授粉子房的胚状体诱导

A, 未经预处理的西瓜未授粉子房的胚状体诱导; B, 经过预处理的西瓜未授粉子房的胚状体诱导。

4 讨论

相关研究证明 TDZ 具有细胞分裂素和生长素的双重功效, 在诱导愈伤组织形成和体细胞胚分化等一系列过程中均能发挥作用 (徐晓峰和黄学林, 2003)。本试验使用 $0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 TDZ 对春季西瓜未授粉子房进行预处理, 取得了较好的效果, 能够显著提高其胚状体诱导率且形成的胚状体畸形率较低, 说明 TDZ 有利于提高春季西瓜未授粉子房的胚状体诱导率。2, 4-D 是诱导胚状体发生的重

要因素,许多植物离体胚状体诱导均使用不同浓度的2,4-D,但胚状体形成前后,外植体在含2,4-D的培养基上诱导时间的长短却因不同作物而异。笔者在前期试验中发现,2,4-D能够诱导西瓜胚状体的发生且诱导效果明确,但诱导一段时间后需及时将外植体转移到不含2,4-D的培养基上,步骤相对复杂。TDZ能够取得与2,4-D相同的诱导效果且步骤简单,因此,本试验只对TDZ的预处理效果进行了研究,其他激素的诱导效果有待进一步研究。

倍性育种过程中经常使用温度预处理来改变配子体的生理状态,提高再生植株的诱导率,这在西葫芦(谢冰等,2006)、黄瓜(杜胜利等,2003)、甜瓜(韩丽华等,2005)等作物上已经得到广泛证明。小孢子培养过程中一般在4℃进行预处理,能够取得较好的效果。大孢子培养时接种后一般在35℃进行热激处理,但处理效果却有不同报道。本试验采用15℃进行接种前预处理,取得了较好的效果,这可能是由于春季西瓜未授粉子房发育时所处环境温度变化较大,最低气温低,从而影响了子房的生理状态,15℃恒温处理2d,有效改善了子房的生理状态及激素水平,有利于后期诱导胚状体形成。

本试验有效改善了春季西瓜未授粉子房胚状体诱导率过低的问题,显著延长了试验可操作时间,加速了西瓜单倍体育种进程,试验结果可为我国西瓜种质资源创新、新品种选育、基因工程相关研究提供帮助。

参考文献

- 杜胜利,韩毅科,丛颖,魏爱民,侯锋,陈启民. 2003. 黄瓜离体雌核发育的过程及其早期生化变化研究. 南开大学学报:自然科学版, 36(2): 27-30.
- 韩丽华,王建设,陈贵林. 2005. AgNO₃对甜瓜离体胚囊发育的影响. 河北农业大学学报, 28(2): 48-50.
- 闵子扬,李涵,邹甜,童龙,成娟,孙小武. 2016. 南瓜未授粉子房离体培养及植株再生. 植物学报, 51(1): 74-80.
- 孙守如,章鹏,胡建斌,孙利萍,张曼,孙治强. 2013. 南瓜未授精胚珠的离体培养及植株再生. 植物学报, 48(1): 79-86.
- 魏岳荣,杨护,黄秉智,黄霞,黄学林,邱继水,许林兵. 2007. Picloram, ABA和TDZ对香蕉体细胞胚胎发生的影响. 园艺学报, 34(1): 81-86.
- 谢冰,王秀峰,樊治成. 2006. 西葫芦离体雌核发育胚状体成苗影响因子分析. 西北农业学报, 15(5): 182-186.
- 徐晓峰,黄学林. 2003. TDZ:一种有效的植物生长调节剂. 植物学通报, 20(2): 227-237.
- 杨先泉,姚丽君,倪苏,冯丽华. 2010. TDZ对非洲紫罗兰叶外植体细胞胚发生的效应. 西南农业学报, 23(6):2030-2033.
- 袁素霞,刘玉梅,方智远,杨丽梅,庄木,张扬勇,孙培田. 2010. 结球甘蓝和青花菜小孢子胚植株再生. 植物学报, 45(2): 226-232.
- 赵珺. 2007. 百合未授粉子房离体培养及胚胎学研究〔硕士论文〕. 沈阳:沈阳农业大学.
- 赵晓菲. 2014. 西葫芦离体雌核培养诱导胚囊再生植株技术研究〔硕士论文〕. 杨凌:西北农林科技大学.
- Ramsay J L, Galitz D S, Lee C W. 2003. Basal medium and sucrose concentration influence regeneration of Easter Lily in ovary culture. HortScience, 38(3): 404-406.
- Qiao Y C, Huang H D, Zhang H, Li G G, Zhang Y S, Liu Z Z. 2015. Preliminary study on tissue culture technique of *Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* (L.) Makion var. *utilis*. Agricultural Science & Technology, 16(10): 2202-2206, 2213.

Studies on Method for Improving Embryoid Induction Rate of Spring Watermelon Unfertilized Ovary

MIN Zi-yang^{1,2}, ZOU Tian¹, RUAN Wan-hui², SUN Xiao-wu^{1*}

(¹College of Horticulture and Landscape, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, Hunan, China; ²Hunan Research Institute of Vegetables, Changsha 410125, Hunan, China)

Abstract: In order to improve embryoid induction rate of watermelon unfertilized ovary and accelerate its haploid breeding process, this experiment took unfertilized ovary of watermelon 'Zaojia8428' as material and studied on the factors affecting induction rate of embryoid grown in spring. The results showed that keeping the fruit stalk as long as possible when the ovary was taken, then steeping it in 0.02 mg · L⁻¹ TDZ for 10 min and putting it at 15 °C as pretreatment for 2 days could improve the induction rate of embryoid from 3.5% to 15.9%.

Key words: Watermelon; Spring; Unfertilized ovary; Embryoid; Induction