

杨红,顾妍,张朝阳,等. 辐射花粉授粉诱导西瓜单倍体[J]. 江苏农业科学,2017,45(22):159-161.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.22.043

辐射花粉授粉诱导西瓜单倍体

杨红,顾妍,张朝阳,孙玉东,罗德旭

(江苏徐淮地区淮阴农业科学研究所/淮安市设施蔬菜重点实验室,江苏淮安 223001)

摘要:以 Bonbon、嘉年华二号、先甜 74、超玉 4 个西瓜品种为试验材料,采用辐射花粉授粉结合胚挽救技术,研究其对西瓜单倍体的诱导效果,结果表明,授粉 11~12 d 的西瓜果实相对较好,能得到较多的幼嫩种子;采用西瓜表面灼烧消毒再取种的方法简便易行,污染率极低。

关键词:单倍体;辐射花粉;胚挽救;授粉;诱导效果;西瓜

中图分类号: S651.036 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)22-0159-03

γ 射线是辐射花粉授粉诱导葫芦科蔬菜作物单倍体的有效辐射源。近年来,通过辐射花粉诱导雌核发育获得单倍体技术已应用于育种中,并培育出黄瓜、西瓜、甜瓜等多种葫芦科植物单倍体植株^[1-3]。西瓜种子由雌花中的胚珠发育而来,一般普通种子是经授粉后双受精产生,而用辐射处理过的花粉进行授粉无法完成双受精过程而产生瘪种,及时对其进行胚挽救,可以更快得到单倍体。采用化学试剂处理可使雌花不经授粉直接膨大,形成的种子就是单倍体。本试验采用辐射花粉授粉结合胚挽救技术,探讨西瓜辐射花粉经不同胚挽救处理对坐果和单倍体胚产生的影响,为西瓜单倍体材料的获得奠定良好的基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验于 2012—2014 年在江苏徐淮地区淮阴农业科学研究所进行,供试西瓜品种 Bonbon、嘉年华二号、先甜 74、超玉。Bonbon 为日本引进西瓜品种,超玉为江苏徐淮地区淮阴农业科学研究所育成,这 2 个西瓜品种的种子略大;嘉年华二号和先甜 74 由先正达公司提供,均为小籽西瓜品种。

1.2 试验方法

1.2.1 γ 射线辐照花粉授粉对西瓜种子形成的影响

收稿日期:2016-05-18

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(14)2014]。

作者简介:杨红(1982—),女,新疆乌鲁木齐人,硕士,助理研究员,主要从事蔬菜育种与栽培研究。E-mail:linrainhong@qq.com。

通信作者:孙玉东,研究员,主要从事蔬菜遗传育种和设施蔬菜栽培等研究。E-mail:sunyudong@aliyun.com。

[J]. Journal of Experimental Botany, 2007, 58(9): 2297-2306.

[15] Jones H E, Ohlsson H. Nutrient assessment of a forest fertilization experiment in northern Sweden by root bioassays[J]. Forest Ecology and Management, 1991, 64: 59-69.

[16] Berg P H. Lars högbom and helga schinkel. nitrogen-related root variables of trees along an n-deposition gradient in Europe[J]. Tree Physiology, 1998, 18(12): 823-828.

[17] 范志强,王政权,吴楚,等. 不同供氮水平对水曲柳苗木生物

量、N 分配及其季节变化的影响[J]. 应用生态学报, 2004, 15(9): 1497-1501.

射处理过的花粉进行授粉,标明花粉辐射剂量及授粉时间;授粉后 8~20 d,分别采集正常生长的未成熟果实进行胚挽救试验,调查种子发育情况,同时,尝试用 0.1% 氯吡脲(重庆诺意)处理部分雌花,使其直接膨大,处理后 8 d 采集正常生长的未成熟果实进行胚挽救试验。胚挽救以 MS 培养基为基础添加 2% 蔗糖、2% D-甘露醇、7% 琼脂固化, pH 值为 5.8;继代培养以 MS 培养基为基础添加 3% 蔗糖、7% 琼脂固化, pH 值为 5.8。

1.2.2 不同消毒方式对西瓜幼胚的消毒效果 将未成熟西瓜果实中的种子取出,放入灭菌烧杯中,用 0.1% 氯化汞(HgCl₂)溶液和不同浓度次氯酸钠(NaClO)溶液分别浸泡 2~30 min(表 1);灭菌水冲洗 5~6 次,置于灭菌纸上吸干水分,接种于灭菌培养基上培养 3~5 d,观察是否污染以确定消毒效果。

将取回的西瓜果实用 75% 乙醇擦拭表面,放于铁盘中,用少量的 95% 乙醇淋湿西瓜表面,用灼烧方法进行灭菌;无菌手术刀切开西瓜,将西瓜中的未成熟种子接种于灭菌培养基上培养 3~5 d,观察是否污染以确定消毒效果。

1.2.3 不同接种方法的接种效果 试验设 4 个处理:切去种子远胚端约 1/3 后,将近胚端朝下插入培养基;切去种子远胚端约 1/3 后,将胚平放于培养基上;种子近胚端朝下插入培养基;种子平放于培养基上。接种时种子为白色或淡黄色,待种子转绿,转接至普通 MS 培养基上培养 2~5 周,种子鼓起、表皮变褐或子叶长出时去除种皮,转接至分化培养基上。

1.2.4 6-BA 浓度对西瓜未成熟胚生长的影响 将消毒西瓜种子接种于含有不同浓度 6-BA 的培养基上培养 4 d,观察并记录种子转绿过程及萌发状态。

1.2.5 西瓜种子幼胚观察及倍性鉴定 西瓜种子萌发前,对量、N 分配及其季节变化的影响[J]. 应用生态学报, 2004, 15(9): 1497-1501.

[18] 肖文发,徐德应. 森林能量利用与产量形成的生理生态基础[M]. 北京:中国林业出版社,1999:34-39.

[19] Lareher W. Plant ecophysiology[M]. Germany: Verlag Eugen Ulmer GmbH and Co, 1993.

[20] 那守海,郝铁钢,阎秀峰. 供氮水平对落叶松根系碳、氮积累与分配的影响[J]. 东北林业大学学报, 2007, 35(11): 19-22.

种子幼胚进行切片观察;种子萌发至子叶展开,切取顶芽,转接入含有 6-BA 的 MS 培养基上进行增殖培养,每个品种扩繁 3~4 瓶;取部分芽、叶,采用醋酸洋红法进行倍性鉴定。

1.2.6 不同西瓜品种胚挽救效果 调查不同西瓜品种的胚挽救效果,对胚已萌发但未成苗进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 γ 射线辐照处理对西瓜种子形成的影响

分别用授粉后 8~20 d 的西瓜种子进行胚挽救试验,结果表明,授粉后 10 d 内的西瓜种子过于幼嫩,接种时损伤较大,而授粉超过 15 d 的西瓜种子未成熟胚基本死亡,发育趋于成熟的又都是二倍体种子;授粉 11~12 d 的西瓜种子相对较好,可得到较多的幼嫩种子用于胚挽救。经氯吡脞处理的西瓜雌花,坐果率较低,但获得的可用种子数较多,而氯吡脞的效果受温度影响较大,试验效果不明显。

2.2 不同消毒方式对西瓜幼胚的消毒效果

由表 1 可见,各浓度的次氯酸钠溶液对西瓜幼胚的消毒效果不理想,污染率为 21.1%~86.5%;随消毒时间的延长,氯化汞溶液对西瓜幼胚的消毒效果较次氯酸钠有显著提高,污染率显著降低($P<0.05$);灼烧外皮的消毒方法也相对较好,污染率较低,为 2.6%。

2.3 不同接种方法的接种效果

试验表明,由于培养基中加入琼脂后具有一定的弹性,种子插入培养基后会慢慢滑出,成为平放于培养基的状态;种子插入过深,则因组培瓶内水分较大,形成无氧状态,种子迅速死亡。切去种子远胚端约 1/3 后接种,因组培瓶内水分较大,种子极易变黑死亡;将完整种子直接接种,在种子种皮变白或变褐、种子中间膨起或看到子叶时,将种子去除种皮进行转接,该方法接种效率相对较高,污染较少,但也会出现有部分种子因无法撑破种皮或种子内水分较高而死亡。

2.4 6-BA 浓度对西瓜未成熟胚生长的影响

由表 2 可见, Bonbon、嘉年华二号、先甜 74、超玉在 6-

表 1 不同消毒方式对西瓜幼胚的消毒效果		
消毒方法	消毒时间 (min)	污染率 (%)
3% NaClO	10	86.5a
3% NaClO	20	79.9b
3% NaClO	30	76.8b
6% NaClO	10	85.3a
6% NaClO	20	78.2b
6% NaClO	30	65.3c
10% NaClO	10	76.3b
10% NaClO	20	59.4d
10% NaClO	30	21.1e
0.1% HgCl ₂	2	12.1f
0.1% HgCl ₂	5	9.8g
0.1% HgCl ₂	8	3.2g
0.1% HgCl ₂	10	0.0h
0.1% HgCl ₂	15	0.0h
0.1% HgCl ₂	20	0.0h
0.1% HgCl ₂	30	0.0h
灼烧外皮	0.5~1.0	2.6g

注:同列数据后不同小写字母表示处理间有显著性差异($P<0.05$)。

BA 浓度为 5 μmol/L 时的种子转绿比例相对最高,分别为 44.70%、43.48%、20.11%、60.28%;种子转绿与萌发之间没有明显关系,大部分转绿的种子并没有萌发,萌发的种子大多从种皮已褐变的种子萌发而来;嘉年华二号在 6-BA 为 10 μmol/L 时种子萌发比例相对最高,为 7.19%。

2.5 西瓜种子幼胚观察及幼苗倍性鉴定

对西瓜种子幼胚进行观察发现,西瓜种子幼胚存在不同形态,由于西瓜种子相对较小,种皮较硬,在剥种子的时候极易损伤幼胚,目前得到心形胚、球形胚、子叶形胚 3 种形态的西瓜种子幼胚(图 1)。普通二倍体西瓜的染色体为 $2n=22$ 。由图 2 可见,组培苗根尖组织细胞内含有 11 条染色体,确定该组培苗材料为单倍体。

表 2 6-BA 浓度对不同西瓜品种未成熟种子转绿及萌发的影响

6-BA 浓度 (μmol/L)	先甜 74		超玉		嘉年华二号		Bonbon	
	转绿比例(%)	萌发比例(%)	转绿比例(%)	萌发比例(%)	转绿比例(%)	萌发比例(%)	转绿比例(%)	萌发比例(%)
2.5	14.06	0.00	57.21	1.42	36.23	5.47	44.08	0.00
5.0	20.11	0.10	60.28	1.11	43.48	6.24	44.70	0.00
10.0	11.47	0.10	57.08	0.00	42.19	7.19	39.30	0.00

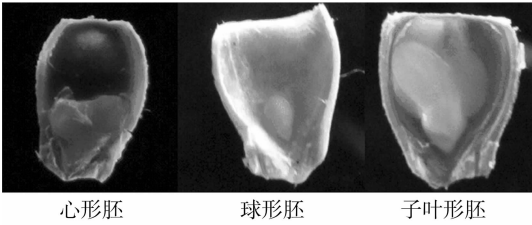
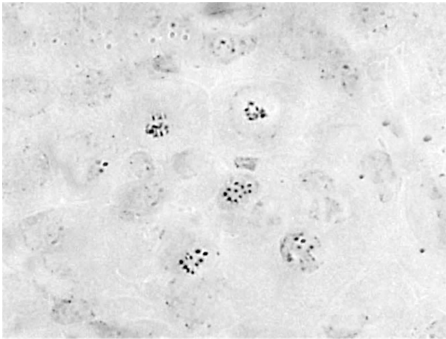


图1 西瓜种子的幼胚



(显微镜倍数: 10×100)

图2 西瓜根尖染色体情况

2.6 不同西瓜品种胚挽救效果及胚萌发但未成苗原因统计分析

由表 3 可见,嘉年华二号西瓜种子的萌发率及成苗率明显高于其他品种,而 Bonbon 西瓜品种的种子却没有 1 个萌发

表 3 不同西瓜品种胚挽救萌发率及成苗率比较

品种	接种总数	萌发数 (个)	萌发率 (%)	成苗数 (株)	成苗率 (%)
先甜 74	3 154	2	0.06	1	0.03
超玉	1 023	10	0.98	4	0.39
嘉年华二号	1 379	85	6.16	12	0.87
Bonbon	904	0	0.00	0	0.00

成苗。由表 4 可见,萌发的胚没有生长点是其不能继续生长的主要原因,其异常常见为萌发后的胚异常膨大、表面布满白色绒毛等;嘉年华二号未成苗原因相对最为复杂,除胚无生长点外,还有扩繁失败及培养时玻璃化、褐化、污染、生长异常等现象发生。

3 结论与讨论

试验结果表明,以辐射花粉授粉 11 ~ 12 d 的西瓜果实相

表 4 胚已萌发但未成苗原因统计

品种	成苗数量 (株)	未成苗原因下的苗数(株)					
		无生长点	扩繁失败	玻璃化	褐化	污染	生长异常
先甜 74	1	1	0	0	0	0	0
超玉	4	6	0	0	0	0	0
嘉年华二号	12	46	4	10	4	2	7
Bonbon	0	0	0	0	0	0	0

对较好,可得到较多的幼嫩种子,且西瓜果实须当天采当天用,否则无论是室温还是低温条件下储存,都不能保证试验材料的鲜活。目前,已知成功获得西瓜的单倍体植株是由花药培养或胚珠培养^[4-7]得来,其消毒方法均采用药剂消毒。本试验发现,西瓜未成熟种子的胚较幼嫩,种皮很薄,用试剂消毒对西瓜未成熟种子损伤较大,且消毒不彻底;完好的西瓜幼瓜内部近似于无菌状态,采用 75% 乙醇浸泡并灼烧外皮法消毒并取种,其污染率极低。由于花粉辐射受环境限制较大,本试验尝试用氯吡脲处理西瓜,使其不经授粉直接膨大,其幼胚一旦萌发得到的便是单倍体,但采用氯吡脲处理西瓜雌花坐果率较低,接种数千粒种子仅得到几个单倍体材料,加上其过于娇嫩,未能获得加倍材料。氯吡脲处理西瓜并进行胚挽救,获得西瓜单倍体的方法只需静待其萌发,前期处理和接种工作量相对较大,但筛选工作量大大减少。

适用于葫芦科作物的培养基配方多不适于西瓜,而在基础 MS 培养基中适当增加盐酸硫胺素含量有助于西瓜的生长。西瓜幼嫩种子在含有 5 ~ 10 μmol/L 6 - BA、添加 2% 蔗糖和 2% 甘露醇的 MS 培养基上生长 3 ~ 7 d,转至无 6 - BA 而添加 2 ~ 3% 蔗糖、1 ~ 2% 甘露醇的 MS 培养基上继续生长(添加 6 - BA 含量会影响种子生长)而产生愈伤组织;待西瓜种子的子叶长出可在含有 1 ~ 10 μmol/L 6 - BA、添加 3% 蔗糖的 MS 培养基上进行增殖(6 - BA 1 μmol/L 和 5 μmol/L 交替使用可防止玻璃化苗的出现),在含有 5 μmol/L IBA、添加 3% 蔗糖的 1/2 MS 培养基上进行生根培养。吲哚乙酸(IAA)、萘乙酸(NAA)不适用于西瓜单倍体培养,而在培养基中加入 0.1% ~ 0.2% 的活性炭可能够促进其生长。

Ertan 等对南瓜种子的幼胚进行观察,得出 8 种形态的南瓜种子幼胚,且认为球形胚和心形胚能够培养得到的是单倍

体材料,子叶形胚培养得到的是二倍体材料,而其他形态的胚则无法正常发育^[8]。本试验结果表明,西瓜种子球形胚经培养得到的是单倍体材料,子叶形胚得到的是二倍体材料,而其他形态的胚则没有发育。

参考文献:

[1] Sauton A, Vaulx R D. Obtention de plantes haploides chez le melon (*Cucumis melo* L.) par gynogenèse induite par du pollen irradié[J]. *Agronomie*, 1987, 7(2): 141 - 148.

[2] Sari N, Abak K, Pitrat M, et al. Induction of parthenogenetic haploid embryos after pollination by irradiated pollen in watermelon [J]. *HortScience*, 1994, 29(10): 1189 - 1190.

[3] Abak K, Sari N, Paksoy M, et al. Genotype response to haploid embryo induction with pollination by irradiated pollens in melon, obtaining of dihaploid lines, determination of haploid and diploid plants by different techniques[J]. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 1996, 20(5): 425 - 430.

[4] 薛光荣, 余文炎, 杨振英, 等. 西瓜花粉植株的诱导及其后代初步观察[J]. *遗传*, 1988, 10(2): 5 - 8, 49.

[5] 王建设, 杨 颖, 裴晓利, 等. 西瓜单倍体的生产方法及其专用培养基: L201010178184[P]. 2010 - 05 - 14.

[6] 王 静, 乔 飞, 江雪飞, 等. 不同倍性西瓜原生质体制备与低温耐受性分析[J]. *江苏农业科学*, 2015, 43(10): 206 - 209.

[7] 王玉书, 王 欢, 高美玲, 等. 小型西瓜花药愈伤组织诱导条件[J]. *江苏农业科学*, 2015, 43(3): 30 - 32.

[8] Kurtar E S, Balkaya A. Production of *in vitro* haploid plants from in situ induced haploid embryos in winter squash (*Cucurbita maxima* Duchesne ex Lam.) via irradiated pollen[J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2010, 102(3): 267 - 277.