

网络出版时间:2013-10-22 17:02

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20131022.1702.013.html>

西葫芦未受精子房离体培养的影响因素

程 慧,程永安,张恩慧,赵晓菲,许忠民

(西北农林科技大学 园艺学院,陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 【目的】探究西葫芦未受精子房离体培养的主要影响因素,以提高其胚状体诱导率和生根品质,增加再生植株数量,丰富西葫芦育种材料。【方法】以西葫芦“春玉一号”未受精子房为材料,分析 MS、B5、N6 和 White 4 种基本培养基的诱胚效果;在 MS 培养基中添加不同质量浓度的 6-BA(0,0.5,1.0,2.0 mg/L)和 NAA(0,0.2,0.5,1.0 mg/L),筛选 2 种激素的最佳组合;之后添加不同质量浓度的 2,4-D(0,1.0,2.0,3.0,4.0,5.0 mg/L),筛选 2,4-D 的适宜质量浓度;在 MS 培养基中添加不同质量浓度的 NAA(0,0.05,0.1,0.2,0.5,1.0 mg/L),分析其对胚状体芽生根效果的影响。【结果】西葫芦未受精子房以 MS 为基本培养基时胚状体诱导率最高,为 16.67%;在 MS 培养基中添加 1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA 时的诱导效果最好,诱导率为 19.76%;在 MS+30 g/L 蔗糖+8 g/L 琼脂+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA 培养基中添加 1.0 mg/L 2,4-D 可以加快胚珠膨大的速度,增加胚珠转绿的数量,但对出胚的提高效果不显著。MS+30 g/L 蔗糖+8 g/L 琼脂+0.1 mg/L NAA 有利于提高胚状体芽的生根品质,且根系生长健壮。【结论】MS+30 g/L 蔗糖+8 g/L 琼脂+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA+1.0 mg/L 2,4-D 是西葫芦未受精子房离体培养中胚状体诱导的最佳培养基,MS+30 g/L 蔗糖+8 g/L 琼脂+0.1 mg/L NAA 是诱导其胚状体芽生根的较适宜培养基。

[关键词] 西葫芦;未受精子房;培养基;激素组合;胚状体诱导

[中图分类号] S642.603.6

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2013)11-0100-05

Factors affecting *in vitro* culture of unpollinated ovary of summer squash (*Cucurbita pepo* L.)

CHENG Hui, CHENG Yong-an, ZHANG En-hui, ZHAO Xiao-fei, XU Zhong-min

(College of Horticulture, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】Major factors affecting isolated culture of unfertilized ovary of summer squash (*Cucurbita pepo* L.) were investigated to improve the induction rate of embryoid and rooting quality, increase the number of regeneration plants, and enrich its breeding materials. 【Method】Taking the unpollinated ovaries of ‘Chun-Yu No. 1’ as explants, we analyzed induction effects of MS, B5, N6 and White on embryoids. MS medium was supplemented with combinations of 6-BA (0, 0.5, 1.0 and 2.0 mg/L) and NAA (0, 0.2, 0.5 and 1.0 mg/L). Then 2,4-D (0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 and 5.0 mg/L) was added to identify the best combination and optimum 2,4-D concentration. At last, effects of adding NAA (0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 and 1.0 mg/L) to MS medium on root growth of embryoid bud were analyzed. 【Result】The highest embryoid induction rate of unpollinated ovaries on basic medium was 16.67% on MS. The best embryoid induction rate was 19.76% on medium of MS+30 g/L Suc+8 g/L Agar+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L

[收稿日期] 2012-12-26

[基金项目] 国家大宗蔬菜产业技术体系项目(CARS-25);公益性行业(农业)科研专项(201303112)

[作者简介] 程 慧(1987—),男,黑龙江伊春人,在读硕士,主要从事西葫芦育种与生物技术研究。

E-mail: chenghui1987113@163.com

[通信作者] 程永安(1957—),男,陕西渭南人,研究员,硕士生导师,主要从事南瓜、西葫芦育种技术和专用品种的选育及南瓜功能成分研究。E-mail: yongan27@163.com

NAA. Adding 1.0 mg/L 2,4-D to the medium accelerated the inflation without improving the growth of embryo. MS+30 g/L Suc+8 g/L Agar+0.1 mg/L NAA enhanced the root growth of embryoid bud. 【Conclusion】MS+30 g/L Suc+8 g/L Agar+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA+1.0 mg/L 2,4-D was the best embryoid induction medium for *in vitro* culture of unfertilized ovary of summer squash. MS+30 g/L Suc+8 g/L Agar+0.1 mg/L NAA was suitable for root growth of embryoid bud.

Key words: summer squash (*Cucurbita pepo* L.); unpollinated ovary; medium; hormone combination; embryoid induction

植物未受精子房培养最早由 San Noeum^[1] 于 1976 年在大麦 (*Hordeum spontaneum* L.) 上获得成功, 至今已经有 10 个科的 25 种植物通过未受精子房培养被成功诱导出单倍体植株^[2]; 但关于西葫芦单倍体的育种研究近几年才为研究者所重视。西葫芦 (*Cucurbita pepo* L.) 属葫芦科南瓜属, 是我国主要瓜类蔬菜之一。西葫芦为雌雄同株异花作物, 雌花发育健全, 通过未受精子房培养容易诱导出单倍体植株, 其染色体加倍获得的双单倍体植株是一种高度纯合的育种材料, 可以作为基因转化的基础材料, 为隐性基因的表达提供了有利条件。西葫芦杂交优势明显, 栽培中采用的几乎都是杂种一代品种, 但利用常规方法选育纯合自交系需进行多代自交选择, 限制了杂种一代品种的选育速度。因而, 西葫芦未受精子房离体培养技术研究具有十分重要的理论意义和利用价值, 但目前关于西葫芦未受精子房离体培养的研究报道相对较少, 且胚状体诱导率不高^[3-4], 单倍体再生植株数量较少^[5-7]。为此, 本研究以西葫芦“春玉一号”品种为试材, 分析培养基类型、激素种类及其质量浓度等对未受精子房离体培养出胚和生根的影响, 旨在提高西葫芦未受精子房离体培养的胚状体诱导率和胚囊再生植株成活率, 为西葫芦育种新材料的创制及新品种的选育提供依据。

1 材料与方法

1.1 材 料

选用西北农林科技大学园艺学院南瓜课题组提供的西葫芦品种“春玉一号”为试材。将供试西葫芦种子于 2011 年春季在日光温室穴盘育苗, 待幼苗长到 3 叶 1 心时定植于塑料中棚, 正常田间栽培管理, 从第 2 朵雌花开放前开始取样。

1.2 方 法

1.2.1 外植体处理 在雌花开花前 1 d 上午, 选取花冠紧闭、色泽黄绿的子房, 用自来水冲洗干净; 在超净工作台上去除表皮, 用体积分数 75% 的酒精消毒 1 min, 再用体积分数 7% 的次氯酸钠消毒 10

min, 无菌水冲洗 3 次后, 切除子房两端大约 1 cm 部分, 剩余部分切成 1~2 mm 的小薄片备用。每个试验均设 3 次重复, 每重复接种 5 瓶, 每瓶接种 10 个子房切片; 培养条件为: 25 ℃ 恒温, 光照 14 h/d, 光照强度 2 000 lx。培养 50 d 后统计胚状体诱导率。

1.2.2 基本培养基对未受精子房胚状体诱导的影响 将外植体接种到含 1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA+30 g/L 蔗糖+8 g/L 琼脂的 MS、B5、N6、White 等 4 种基本培养基上培养, 进行胚状体诱导, 比较不同培养基对未受精子房胚状体诱导的影响。

1.2.3 6-BA 和 NAA 质量浓度组合对未受精子房胚状体诱导的影响 在 MS+30 g/L 蔗糖+8 g/L 琼脂的培养基上, 分别添加不同质量浓度的 6-BA (0, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L) 与 NAA (0, 0.2, 0.5, 1.0 mg/L), 然后接种西葫芦未受精子房切片, 比较 6-BA 与 NAA 不同质量浓度组合 (共 16 个处理) 对未受精子房胚状体诱导的培养效果。

1.2.4 2,4-D 对未受精子房胚状体诱导的影响 在 MS+30 g/L 蔗糖+8 g/L 琼脂+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA 的培养基上, 添加不同质量浓度 2,4-D (0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mg/L), 统计胚珠膨大时间和胚珠转绿数, 比较添加不同质量浓度 2,4-D 对未受精子房胚状体的诱导效果。

1.2.5 NAA 对胚状体芽生根的影响 将高度为 2.0~3.0 cm 的胚状体芽转接至添加不同质量浓度 NAA (0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 mg/L) 的 MS 生根培养基上进行培养, 每瓶接种 1 个胚状体芽, 15 d 后统计生根率, 比较 NAA 质量浓度对胚状体芽生根的影响。

1.2.6 数据统计与分析 胚珠转绿率=转绿胚珠数/总胚珠数×100% (根据西葫芦子房的解剖结构特点, 总胚株数按每个子房切片 6 个胚珠进行估算);

胚状体诱导率=胚状体数/总胚珠数×100%;

胚状体芽生根率=(生根胚状体数/总胚状体

数) $\times 100\%$ 。

试验数据采用 DPS 软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 基本培养基对西葫芦未受精子房胚状体诱导的影响

由图 1 可以看出,在所选择的 4 种基本培养基中,西葫芦未受精子房在以 MS 为培养基时的胚状体诱导率最高,达 16.67%;N6 培养基次之,达

13.33%;B5 培养基虽然能诱导出胚状体,但是诱导率较低,仅为 2.67%;White 培养基的诱导率为 0。由此可见,在 MS 培养基上西葫芦未受精子房离体培养的胚状体诱导效果最好。将在 4 种基本培养基上已经膨大转绿、未诱导出胚状体的胚珠再转接到 MS 培养基上继续进行培养,结果发现,胚珠并未继续分化形成胚状体,而是逐渐黄化死亡。表明未受精子房的胚囊细胞虽能膨大转绿,但因其生长势较弱,很难继续分化、发育成胚状体。

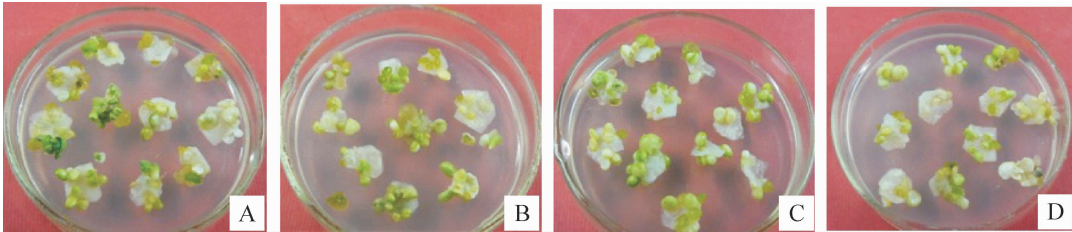


图 1 基本培养基对西葫芦未受精子房胚状体诱导的影响
A. MS; B. N6; C. B5; D. White

Fig.1 Effects of different basic medium on embryoid induction of unfertilized ovaries of summer squash

2.2 6-BA、NAA 质量浓度组合对西葫芦未受精子房胚状体诱导的影响

从表 1 可以看出,在西葫芦未受精子房的离体培养中,不添加 6-BA、NAA 或只添加其中任一种激素的处理均不能诱导出胚状体;在 2 种激素共同存在时均能诱导出胚状体,但各处理之间的诱导率存在一定差异。其中 C3 处理的胚状体诱导率最高,

达 17.25%,与其他处理存在极显著性差异;其次是 C4、C2 处理,胚状体诱导率分别为 12.47% 和 10.67%;B2 处理的胚状体诱导率最低,仅为 1.22%,较 C3 处理低 92.93%。由此可知,在西葫芦未受精子房的胚状体诱导中,以在 MS+30 g/L 蔗糖+8 g/L 琼脂培养基中添加 1.0 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L NAA 时的诱导效果最好。

表 1 6-BA、NAA 质量浓度组合对西葫芦未受精子房胚状体诱导的影响

Table 1 Effects of 6-BA and NAA combination on embryoid induction of unfertilized ovaries of summer squash

处理 Treatment	激素质量浓度/(mg·L ⁻¹) Mass concentration of hormone		总胚珠数 No. of total ovule	胚状体数 No. of embryoid	诱导率/% Induction rate
	6-BA	NAA			
A1	0	0	900	0	0 fF
A2	0	0.2	888	0	0 fF
A3	0	0.5	894	0	0 fF
A4	0	1.0	900	0	0 fF
B1	0.5	0	906	0	0 fF
B2	0.5	0.2	900	11	1.22 eE
B3	0.5	0.5	880	28	3.18 deE
B4	0.5	1.0	890	34	3.82 deDE
C1	1.0	0	900	0	0 fF
C2	1.0	0.2	900	96	10.67 bBC
C3	1.0	0.5	887	153	17.25 aA
C4	1.0	1.0	890	111	12.47 bB
D1	2.0	0	888	0	0 fF
D2	2.0	0.2	900	46	5.11 cdDE
D3	2.0	0.5	885	68	7.68 cCD
D4	2.0	1.0	900	33	3.67 deE

注:表中数据为 3 次重复的平均值;同列数据后标不同小写字母者表示差异达显著水平(LSD 检验, $P<0.05$),标不同大写字母者表示差异达极显著水平(LSD 检验, $P<0.01$)。下表同。

Note: Data in table are average values of triplicates. Different lowercase and uppercase letters indicate significant difference at $P<0.05$ and $P<0.01$ according to LSD test, respectively. The same below.

2.3 2,4-D 对西葫芦未受精子房胚状体诱导的影响

从表 2 可以看出,与对照相比,在 MS+30 g/L 蔗糖+8 g/L 琼脂+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA 的培养基中,添加不同质量浓度 2,4-D 后,各处理西葫芦未受精子房中胚珠的膨大速度均有所加快,均由 CK 的 3 d 缩短为 2 d;同时,胚珠转绿率均有不同程度的提高,其中 1.0 和 4.0 mg/L 2,4-D 处理的胚珠转绿率均显著高于对照。从西葫芦未受精子房胚状体的诱导率来看,1.0 和 2.0 mg/L 2,4-D

处理的诱导率高于对照,分别为 19.76% 和 18.21%,但与对照均无显著性差异($P>0.05$),而其他处理均极显著低于对照。由此可见,在 MS+30 g/L 蔗糖+8 g/L 琼脂+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA 的培养基中,添加一定质量浓度的 2,4-D 可以加快西葫芦未受精子房中胚珠的膨大速度,增加胚珠转绿数,但对胚状体诱导率的提高效果不显著,甚至出现降低趋势。对于胚珠转绿效果而言,以添加 1.0 mg/L 2,4-D 时的效果相对较好。

表 2 2,4-D 对西葫芦未受精子房胚状体诱导的影响

2,4-D 质量浓度/ (mg · L ⁻¹) 2,4-D mass concentration		胚珠膨大时间/d Ovule expand time	胚珠转绿率/% Ovule virescent rate	平均诱导率/% Average induction rate
0(CK)		3	82.33 cA	17.25 aA
1.0		2	93.14 aA	19.76 aA
2.0		2	90.06 abcA	18.21 aA
3.0		2	86.78 abcA	10.38 bcBC
4.0		2	91.42 abA	12.54 bB
5.0		2	83.76 bcA	7.29 cC

2.4 NAA 对西葫芦未受精子房胚状体芽诱导生根的影响

由表 3 可知,NAA 质量浓度为 0.1 和 0.2 mg/L 时,西葫芦胚状体芽的生根率均显著高于 CK,生根率均为 100%,其他处理之间及其与 CK 间

差异均不显著;但 NAA 质量浓度对生根时间、最长根长及根系品质均有不同程度的影响。综合比较而言,以添加 0.1 mg/L NAA 对胚状体芽生根的诱导效果较好,11 d 可见根系显露,再生苗最长根的长度为 7~10 cm,且根系生长健壮。

表 3 NAA 对西葫芦未受精子房胚状体芽生根的诱导效果

NAA/(mg · L ⁻¹)	生根时间/d Time of visible root days	生根率/% Rooting frequency	最长根长/cm Root length	根系品质 Root quality
0.0(CK)	15	93.33 bA	>10	细长 Slim
0.05	13	96.67 abA	7~10	细长 Slim
0.1	11	100.00 aA	7~10	健壮 Ruobust
0.2	11	100.00 aA	6~8	轻微木质化 Slightly lignified
0.5	10	96.67 abA	6~8	大量木质化 Massive lignified
1.0	10	96.67 abA	6~8	严重木质化 Serious lignified

3 讨 论

利用西葫芦未受精子房培养获得胚囊再生植株是创制西葫芦新育种材料的一种有效途径,但是诱导效果受到多种因素的综合影响。目前有关基本培养基对未受精子房离体培养诱导效果的研究报道较少。刘栓桃等^[8]利用 N6 培养基培养西葫芦胚珠,再生植株诱导率为 1.67%~6.67%;陈学军等^[5]利用 MS 培养基培养西葫芦胚状体芽,诱导率最高为 15.6%。本试验比较了 MS、N6、B5、White 4 种基本培养基对西葫芦未受精子房离体培养的诱胚效果,结果表明,MS 培养基的诱导效果最好,胚状体

诱导率可达 16.67%。不同培养基诱导效果的差异可能与培养基中铵盐和 B 族维生素含量不同有关,但这还需要更进一步的研究来证实。

此外,胚囊再生植株的获得还与培养基中的激素种类及其配比相关,两者决定着胚囊雌核的分化和发育程度。外源激素是影响植物未受精子房诱导出胚的决定因素。王璐等^[9]研究表明,添加适宜质量浓度的 6-BA 优于 6-BA 和 NAA 组合处理,且 6-BA 为 1.0 mg/L 时,黄瓜平均每子房的产胚量最高;翟庆慧^[10]研究认为,0.5 mg/L 6-BA 和 0.5 mg/L NAA 是南瓜未受精子房诱胚的最适激素;陈解放^[11]研究表明,0.25 mg/L NAA+0.50 mg/L

6-BA 对南瓜胚状体的诱导效果最好,诱导率为 3.3%;谢冰等^[12]研究发现,1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA 组合对西葫芦未受精子房的胚状体诱导率最高。本试验结果表明,在 MS+30 g/L 蔗糖+8 g/L 琼脂的培养基中,不添加 6-BA 和 NAA 或只添加其中 1 种激素均不能诱导出胚状体,而同时添加不同质量浓度的 2 种激素均会诱导出胚,且以 1.0 mg/L 6-BA 和 0.5 mg/L NAA 组合的诱导效果最好,胚状体诱导率最高可达 19.76%。

关于 2,4-D 对西葫芦未受精子房的离体培养效果,Metwally 等^[4]研究认为,在 MS 培养基中添加 1.0 或 5.0 mg/L 2,4-D 时的胚状体诱导效果最好,诱导率分别为 8.8%和 9.1%。本研究认为,西葫芦未受精子房在最适 6-BA 和 NAA 组合下诱胚时,添加 1.0 mg/L 的 2,4-D 虽能使胚珠膨大速度加快、转绿数量增加,但胚状体的诱导率提高不显著,2,4-D 质量浓度过高反而会抑制出胚。二者研究结果不同的原因可能在于:Metwally 等^[4]是单一添加 2,4-D,而本试验是在 6-BA 和 NAA 组合基础上添加 2,4-D,可能是这 2 种激素限制了 2,4-D 的作用,也可能是由于高质量浓度的 2,4-D 对胚囊的发育产生了毒害,从而抑制了胚状体的诱导。

在未受精子房离体培养过程中,诱导胚状体芽生根是获得完整再生植株的重要环节之一,生根时间、根长及根的数量和品质取决于胚状体芽的内源激素和外源激素的共同作用。王春霞等^[13]发现,将伸长的西瓜不定芽转至 1/2MS+0.1 mg/L NAA 培养基时的生根效果最好;李伟等^[14]对南瓜子叶再生芽的生根研究发现,添加 0.1 mg/L NAA 的生根效果最好,10 d 后可见根系再生,生根率可达 100%。本研究认为,外源激素 NAA 不是西葫芦胚状体芽生根的决定因素,而是影响生根品质的主要因素,无论添加 NAA 与否,其胚状体芽生根率均超过 93%,但添加 0.1 mg/L NAA 时胚状体芽生根时间短、根系长且根系生长健壮。

4 结 论

以西葫芦未受精子房作为外植体能够诱导出再生植株,并且以 MS 为基本培养基时胚状体的诱导率最高,为 16.67%;在 MS 培养基中添加 1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA 时胚状体的诱导效果最好,诱导率为 19.76%;在此培养基上添加 1.0 mg/L 2,4-D 可以加快胚珠膨大的速度,增加胚珠转绿的数量,但对出胚的提高效果并不显著;生根培养时,

在 MS 培养基中添加 0.1 mg/L NAA 有利于提高胚状体芽的生根品质,且根系生长健壮。综合上述研究结果可知,西葫芦未受精子房离体培养诱导胚状体的最佳培养基为 MS+30 g/L 蔗糖+8 g/L 琼脂+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA+1.0 mg/L 2,4-D,最佳的生根培养基为 MS+30 g/L 蔗糖+8 g/L 琼脂+0.1 mg/L NAA。

[参考文献]

- [1] San Noeum L H. Haploids d'*Hordeum vulgare* L. par culture *in vitro* d'ovaries non fécondes [J]. Ann Amélior Plant, 1976, 24:751-754.
- [2] 王文和. 未授粉子房和胚珠离体培养诱导植物雌核发育研究进展 [J]. 植物学通报, 2005, 22(增刊):108-117.
Wang W H. Advances in induction of gynogenesis *in vitro* by unpollinated ovary and ovule culture [J]. Chinese Bulletin of Botany, 2005, 22(Suppl.):108-117. (in Chinese)
- [3] Chambonnet D, Dumas de Vaulx R. Obtention of embryos and plants from *in vitro* culture of unfertilized ovules of *Cucurbita pepo* L. [J]. Acta Botanica Sinica, 1985, 8:66.
- [4] Metwally E I, Moustafal S A, El-Sawy B I, et al. Production of haploid plants from *in vitro* culture of unpollinated ovules of *Cucurbita pepo* L. [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1998, 52(3):117-121.
- [5] 陈学军, 邢国明, 陈竹君. 西葫芦未授粉胚珠离体培养和植株再生 [J]. 浙江农业学报, 2000, 12(3):165-167.
Chen X J, Xing G M, Chen Z J. *In vitro* induction of plants from unpollinated ovules in summer squash [J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2000, 12(3):165-167. (in Chinese)
- [6] 谢冰, 王秀峰, 樊治成. 西葫芦未受精胚珠离体培养条件的优化及胚囊植株的产生 [J]. 中国农业科学, 2006, 39(1):132-138.
Xie B, Wang X F, Fan Z C. Improved conditions of *in vitro* culture of unpollinated ovules and production of embryonary sac plants in summer squash (*Cucurbita pepo* L.) [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2006, 39(1):132-138. (in Chinese)
- [7] Tarek A S. Factors affecting haploid induction through *in vitro* gynogenesis in summer squash (*Cucurbita pepo* L.) [J]. Scientia Horticulturae, 2007, 115:1-6.
- [8] 刘栓桃, 赵智中, 孙小镭, 等. 西葫芦未受精胚珠离体诱导植株再生的关键因素 [J]. 华北农学报, 2008, 23(2):96-100.
Liu S T, Zhao Z Z, Sun X L, et al. Critical factors influence *in vitro* plantlet production of unfertilized ovule culture in summer squash (*Cucurbita pepo* L.) [J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2008, 23(2):96-100. (in Chinese)
- [9] 王璐, 陈小燕, 张力, 等. 不同因素对黄瓜未受精子房胚状体诱导的影响 [J]. 西北农业学报, 2008, 17(4):267-270.
Wang L, Chen X Y, Zhang L, et al. Effect of different factors on induction of embryoids in unfertilized ovaries of cucumber [J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2008, 17(4):267-270. (in Chinese)