

早黄瓜未授粉子房雌核诱导技术体系研究

郭晓雨, 宋晓飞, 李晓丽, 孙成振, 冯志红, 闫立英*

(河北科技师范学院园艺科技学院, 河北秦皇岛 066004)

摘要 以4种不同基因型早黄瓜的未授粉子房为试材,研究了基因型、子房不同发育时期及采样时间、不同质量浓度的TDZ、温度对雌核诱导的影响,旨在探究早黄瓜未授粉子房诱导雌核发育的技术体系。结果表明,不同基因型对雌核发育的影响差异显著,“1503”的雌核启动率最高,为77.22%;开花前1d的样品最优,此时1503雌核启动率为95.56%;随TDZ质量浓度上升,雌核启动率呈先上升后下降趋势,其中0.08 mg/L TDZ处理的1503雌核启动率最高,达91.6%;35℃暗培养4d的处理,雌核启动率最优,达78.33%。早黄瓜未授粉子房培养最优雌核诱导技术体系:以开花前1d未授粉子房为材料,在添加0.08 mg/L TDZ的诱导培养基上进行35℃暗培养4d。该研究成功建立了早黄瓜未授粉子房雌核诱导技术体系,为早黄瓜遗传育种及基础理论研究提供技术支持。

关键词 早黄瓜;未授粉子房;雌核启动率

中图分类号 S642.2 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2020)05-0051-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.05.015



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Female Nucleus Development Induction Technique System in Cucumber Non-pollination Ovary

GUO Xiao-yu, SONG Xiao-fei, LI Xiao-li et al (College of Horticulture Science and Technology, Hebei Normal University of Science & Technology, Qinhuangdao, Hebei 066004)

Abstract The effects of genotype, ovary development stage and sampling time, TDZ treatment with different mass concentration, and temperature on esterior induction were studied in unpollinated ovary of cucumber. The results showed that there were significant differences in the effects of different genotypes on the development of the female nucleus. The sample was optimal 1 day before flowering, when the activation rate of the female nucleus of “1503” was 95.56%. With the increase of TDZ mass concentration, the activation rate of female nucleus increased first and then decreased, among which the activation rate of 1503 female nucleus treated with 0.08mg/L TDZ was the highest, up to 91.6%. After dark culture at 35℃ for 4 days, the activation rate of female nucleus was the best, up to 78.33%. In this study, the optimal estrus induction technology system for the culture of unpollinated ovary of drought cucumber was as follows: the unpollinated ovary was taken as the material 1 day before flowering, and dark culture was conducted at 35℃ for 4 days on the induction medium supplemented with 0.08 mg/L TDZ. In this study, the technology system of ovum estrogen-nucleus induction in unpollinated ovary of drought cucumber was preliminarily explored, which provided technical support for the genetic breeding and basic theoretical research of drought cucumber.

Key words Drought cucumber; Non-pollination ovary; Female nuclear initiation rate

黄瓜(*Cucumis sativus* L.)为重要的蔬菜作物,北方早黄瓜属于华南型黄瓜^[1]。我国环渤海湾地区和东北三省是早黄瓜主产区 and 消费区。在黄瓜常规杂交育种中,杂交后代自交系的纯合往往需要5~7年,而利用未授粉子房培养快速获得纯系是加速黄瓜育种的有效途径^[2-3]。San Noeum等^[4]在大麦离体培养研究中首次提出“雌核发育”一词。雌核发育诱导受基因型、取样时期、培养条件、外源激素等因素影响。Shalaby^[5]研究结果发现,南瓜的胚发生率为48%。李伟^[6]发现,西葫芦的胚诱导率为18.7%。在黄瓜上,刘立功等^[7]以7种基因型为材料,研究发现不同基因型出胚率差异较大,最高出胚个数为25.3个,最低仅为0.7个。裴晓利等^[8]以9种基因型为试材,结果发现“津优38”雌核启动率最高,为92.33%。研究表明,西葫芦、南瓜等以雌花开放当天的未授粉子房为材料,培养效果最好^[9-10]。

在暗培养的时间和温度等因素上,也有较多研究。在黄瓜上,25℃暗培养1d的未授粉子房雌核启动率最高为91.3%,噻苯隆(Thidiazuron, TDZ)有助于雌核发育^[11-12]。在西葫芦上,热激处理5d效果更佳^[13]。在南瓜上,35℃处理

下的未授粉子房胚发生率最高,达32.2%^[14]。TDZ浓度也是影响雌核发育的重要因素,在TDZ浓度方面,在黄瓜离体雌核研究中,TDZ浓度为0.08 mg/L时雌核启动率最高,为93.1%^[11];在甜瓜离体培养中,以TDZ浓度0.02 mg/L时雌核启动率最高,为65.8%^[15];在西瓜中,以0.08 mg/L TDZ处理的反应率为最佳^[16]。为此,笔者通过选择基因型、子房不同发育时期、不同质量浓度的TDZ、不同暗培养处理温度,研究提高黄瓜全雌性雌核启动率,以期提高黄瓜杂交育种效率。

1 材料与方法

1.1 试验材料 供试材料由河北科技师范学院黄瓜课题组提供,以华南型全雌早黄瓜杂种一代的“1501”“1502”“1503”“1504”。

1.2 试验方法 在植株开花前1d用镊子取雌花节15~30节、长度2.0~2.2 cm未授粉子房为外植体,流水冲洗30 min,用体积分数75%乙醇浸泡30 s,无菌水冲2次,再用质量浓度0.1 g/L的HgCl₂溶液浸泡6 min,无菌水冲洗4~5次,每次2 min,无菌滤纸吸净表面的水分,用解剖刀去掉外植体花冠及瓜把,留取中间部分,剥去外植体表皮,切成1.0 mm厚的薄片,可明显看见子房。各个试验处理的外植体(3次重复,每次重复60片,总计180片)均接种至培养基(MS基本培养基+30 g/L蔗糖+10 g/L凝胶,pH 5.7,高温灭菌20 min)中,接种后于光照度2 000 lx、光照时间16 h/d,电热恒温培养箱25℃暗培养5 d。

基金项目 河北省科技计划项目(16226308D-4);河北省高等学校科学技术研究项目(BJ2018002);河北省现代农业产业技术体系创新团队建设项目(HBCT2018030209)。

作者简介 郭晓雨(1993—),女,河北承德人,硕士研究生,研究方向:黄瓜遗传育种与分子生物学。*通信作者,教授,博士,从事黄瓜遗传育种与分子生物学研究。

收稿日期 2019-11-12;修回日期 2019-11-26

1.3 旱黄瓜未授粉子房雌核发育诱导设计

(1)不同基因型。取开花前1 d的1501、1502、1503、1504为试材接种在诱导培养基(MS基本培养基+30 g/L蔗糖+10 g/L凝胶+0.08 mg/L TDZ, pH 5.7), 35 °C暗培养5 d。

(2)子房不同发育时期及采样时间。①子房不同发育时期,调查开花前1、2、3、4、5 d和开花当天子房长度及花冠形态;②采样时间,以1501、1502、1503、1504为试材,接种在诱导培养基(MS基本培养基+30 g/L蔗糖+10 g/L凝胶+0.08 mg/L TDZ, pH 5.7)中,25 °C暗培养5 d。

(3)不同质量浓度的TDZ处理。以1501、1502、1503、1504为试材,将子房切片分别培养在含0、0.06、0.08、0.10 mg/L TDZ的培养基(MS基本培养基+30 g/L蔗糖+10 g/L凝胶 pH 5.7)中,置于电热恒温培养箱25 °C暗培养5 d。

(4)不同温度。以1501、1502、1503、1504为试材,接种在诱导培养基(MS基本培养基+30 g/L蔗糖+10 g/L凝胶+0.08 mg/L TDZ, pH 5.7)中,于25、30、35、37 °C暗箱培养处理5 d。

1.4 数据处理与分析 子房薄片培养7 d后,每1 d调查1次胚发生数(以有类似球形胚结构出现的子房块计数),共调查3次,雌核启动率=每处理子房切片总数/有胚发生子房块数。试验数据采用DPS软件(2008.01.15/版本)和Excel 2016软件。

2 结果与分析

2.1 不同基因型对旱黄瓜未授粉子房雌核启动率的影响 35 °C暗培养5 d,5种不同基因型的雌核启动率有明显

差异(表1)。1503的雌核启动率达显著水平,为77.22%;1504的雌核启动率最低,为48.33%。通过人工诱导培养的外植体其雌核启动率与不处理的外植体雌核启动率有显著差异。

表1 基因型对雌核启动率的影响

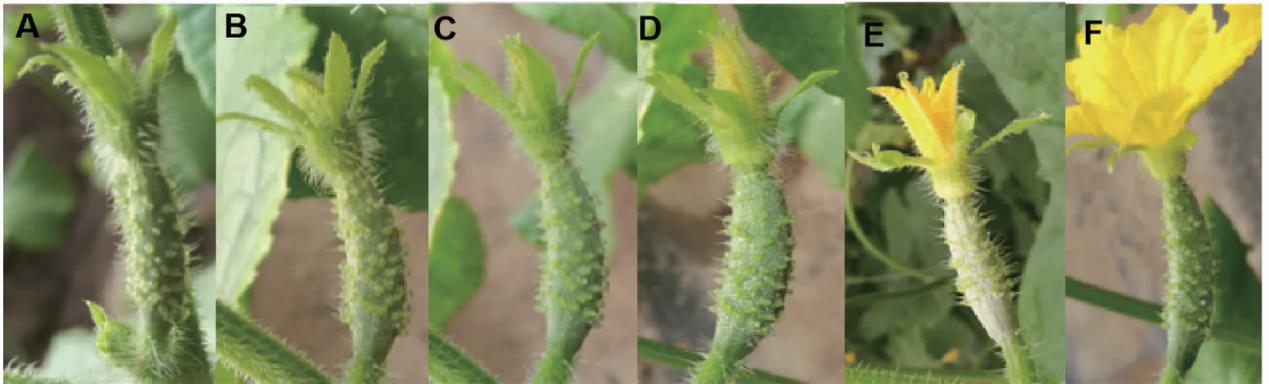
Table 1 Effect of genotype on female nuclear initiation rate

材料 Material	胚形成的 子房块数 NRO	培养子房 总块数 NOC	雌核启动率 Female nucleus activation rate//%
1501	128	180	71.11 c
	129	180	71.67 bc
	130	180	77.22 bc
1502	99	180	55.00 de
	104	180	57.78 d
	94	180	52.22 ef
1503	132	180	73.33 bc
	139	180	77.22 a
	134	180	74.44 ab
1504	91	180	50.56 fg
	87	180	48.33 g
	88	180	48.89 g

注:同列不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)

Note: Different letters in the same column indicate significant differences at 0.05 level

2.2 子房不同发育时期及采样时间对旱黄瓜未授粉子房雌核启动率的影响 结果表明,子房不同发育时期其子房长度、花冠形态和及采样时间雌核启动率表现不同。在植株开花盛期,取15~30节开花前1 d的未授粉子房,其长度为2.0~2.2 cm(表2),花冠呈黄绿色紧闭状态(图1 E)。1503开花前1 d的雌核启动率达显著水平,达95.56%(表3)。



注:A.开花前5 d;B.开花前4 d;C.开花前3 d;D.开花前2 d;E.开花前1 d;F.开花当天

Note: A. 5 days before flowering; B. 4 days before flowering; C. 3 days before flowering; D. 2 days before flowering; E. 1 day before flowering; F. Flowering day

图1 子房发育形态

Fig. 1 Morphology of ovary development

表2 子房不同发育时期

Table 2 Different stages of ovary development

天数 Days//d	子房长度 Ovary length//cm	花冠形态 Corolla form
5	0.8~1.0	花冠浅绿色
4	1.0~1.3	花冠紧闭,绿色
3	1.3~1.7	花冠紧闭,深绿色
2	1.7~2.0	花冠紧闭,黄绿色
1	2.0~2.2	花冠紧闭,黄绿色
当天	2.2~2.5	花冠开放,鲜黄色

2.3 不同浓度的TDZ对旱黄瓜未授粉子房雌核启动率的影响 研究不同质量浓度的TDZ对4种基因型雌核启动率的影响。结果表明,不同质量浓度的TDZ在0、0.06、0.08、0.10 mg/L中,1503的雌核启动率在TDZ质量浓度0.08 mg/L时最高,达91.67%;比TDZ质量浓度0.00 mg/L时的雌核启动率高85.19个百分点。雌核启动率最低的是1502,在TDZ质量浓度0.00 mg/L时仅为3.70%(表4)。

表 3 采样时间对雌核启动率的影响

Table 3 Effect of sampling time on female nucleus priming rate

材料 Material	采样时间 Sampling time	胚形成的 子房块数 NRO	培养子房 总块数 NOC	雌核启动率 Felame nucleus activation rate//%
1501	开花前 2 d	121	180	67.22 c
	开花前 1 d	168	180	93.33 a
	开花当天	73	180	40.56 g
1502	开花前 2 d	102	180	56.67 d
	开花前 1 d	145	180	80.56 b
	开花当天	81	180	45.00 fg
1503	开花前 2 d	136	180	75.56 b
	开花前 1 d	172	180	95.56 a
	开花当天	85	180	47.22 ef
1504	开花前 2 d	82	180	45.56 efg
	开花前 1 d	138	180	76.67 b
	开花当天	93	180	51.67 de

注:同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)

Note: Different letters in the same column indicate significant differences at 0.05 level

表 4 不同质量浓度的 TDZ 对雌核启动率的影响

Table 4 Effect of different concentration of TDZ on the activation rate of female nucleus

材料 Material	浓度 Mass concentration mg/L	胚形成的 子房块数 NRO	培养子房 总块数 NOC	雌核启动率 Felame nucleus activation rate//%
1501	0	12	180	6.67 h
	0.06	88	180	48.89 d
	0.08	140	180	77.78 b
	0.10	60	180	33.33 ef
	0.10	60	180	33.33 ef
1502	0	8	180	3.70 h
	0.06	91	180	50.56 d
	0.08	131	180	72.78 c
	0.10	19	180	10.56 g
	0.10	19	180	10.56 g
1503	0	15	180	6.48 h
	0.06	89	180	47.59 d
	0.08	165	180	91.6 a
	0.10	62	180	34.44 e
	0.10	62	180	34.44 e
1504	0	13	180	5.00 h
	0.06	9	180	5.00 h
	0.08	135	180	75.00 bc
	0.10	55	180	30.56 f
	0.10	55	180	30.56 f

注:同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)

Note: Different letters in the same column indicate significant differences at 0.05 level

2.4 不同温度对早黄瓜未授粉子房雌核启动率的影响 将 4 种不同材料在 25、30、35、37 °C 下进行暗培养 5 d。结果发现,1503 在 35 °C 下暗培养 4 d 时,雌核启动率最高达 78.33%(表 5)。培养 2 d 时,切片可见球型(雌核,黄白色),培养 5 d 后,呈淡绿色(图 2)。

3 结论与讨论

3.1 不同基因型对雌核启动率的影响 研究表明基因型是西葫芦雌核发育的影响因素^[6];杜胜利等^[17]首次在研究黄

瓜离体雌核发育的影响因素中发现了基因型对黄瓜雌核发育有影响;在离体雌核培养中基因型是影响胚发育的重要因素之一,该研究结果发现在离体雌核培养中经过处理的不同基因型其雌核启动率有明显差异,进而证实基因型是影响雌核发育的因素。

表 5 不同温度对雌核启动率的影响

Table 5 Effect of different temperature on the activation rate of female nucleus

材料 Material	温度 Temperature °C	胚形成的 子房块数 NRO	培养子房 总块数 NOC	雌核启动率 Felame nucleus activation rate//%
1501	25	72	180	40.00 def
	30	78	180	43.33 cde
	35	123	180	68.33 b
	37	60	180	33.33 g
	37	60	180	33.33 g
1502	25	69	180	38.33 efg
	30	84	180	46.67 c
	35	120	180	66.67 b
	37	63	180	35.00 fg
	37	63	180	35.00 fg
1503	25	81	180	45.00 cd
	30	87	180	48.33 c
	35	141	180	78.33 a
	37	66	180	36.67 fg
	37	66	180	36.67 fg
1504	25	73	180	40.56 def
	30	84	180	46.67 c
	35	121	180	67.22 b
	37	60	180	33.33 g
	37	60	180	33.33 g

注:同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)

Note: Different letters in the same column indicate significant differences at 0.05 level

3.2 子房不同发育时期及采样时间对雌核启动率的影响

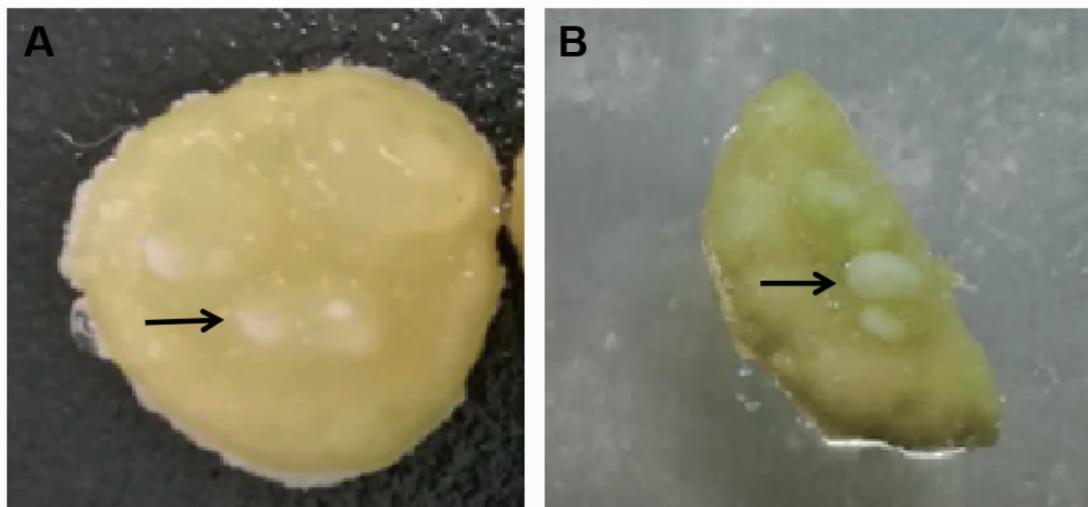
子房发育时期对雌核发育有一定的影响。黄瓜只能从雌配子体晚期或成熟胚囊期的胚珠与子房培养诱导孤雌生殖。外植体的接种时期可能比培养基成分更为重要^[18]。研究甜瓜离体雌核发育开花前 1 d 子房培养效果最好^[19],这与该试验结果基本一致;在子房发育时期的研究表明取开花前 1 d 效果最好,胚状体诱导率达 83.3%^[6];而同其他研究有较小差异,认为未授粉子房开花前 2~3 d 的胚诱导率最高,其原因可能是不同基因型、不同培养条件导致^[20]。该试验在植株开花盛期取 15~30 节开花前 1 d 的未授粉子房的雌核发育最高。

3.3 不同质量浓度的 TDZ 对雌核启动率的影响 TDZ 浓度对启动雌核发育具有一定的诱导效果。TDZ 具有类细胞分裂素的活性,促进植物体内类生长素物质合成的作用^[21];研究表明 0.06 mg/L 时胚状体诱导率最高为 66.7%^[22];但也有研究 TDZ 的使用对雌核发育有诱导影响,且浓度在 0.04 mg/L 时胚发生率最大^[20];裴晓利等^[8]在研究黄瓜离体雌核发育中发现浓度以 0.08 mg/L 时雌核启动率为 93.1%;而该试验仅对 TDZ 一种外源激素进行了研究,在 0、0.06、0.080 和 0.10 mg/L 的处理中得出 TDZ 0.08 mg/L 对雌核发育有较大影响,达 91.67%。

3.4 不同温度对雌核启动率的影响 在南瓜未授粉子房研

究上表明暗培养 35 ℃ 条件下 5 d 培养效果最好^[23];在 35 ℃ 暗培养 3 d 的反应率效果较好^[24]。该试验发现 35 ℃ 暗培养 4 d 时,雌核启动率最高。进一步说明 35 ℃ 利于早黄瓜雌核

启动率的发生。与前人研究有所差异,可能与基因型有关,需进一步研究。



注:A.雌核(箭头);B.胚的萌发物(箭头)

Note:A. Female nuclei (arrow); B. Embryo germination (arrow)

图2 黄瓜未授粉子房雌核的发生

Fig. 2 Occurrence of female nuclei in unpollinated ovary of cucumber

4 结论

通过基因型、子房不同发育时期、不同质量浓度的 TDZ、不同温度暗培养的早黄瓜雌核诱导试验研究发现,试材 1503 的雌核启动率明显高于 1501、1502、1504 3 种试材,进而证实基因型、子房不同发育时期、不同质量浓度的 TDZ,不同温度是影响雌核发育的因素。该试验结果表明,取植株开花盛期 15~30 节开花前 1 d 的未授粉子房,花冠紧闭,呈黄绿色,2.0~2.2 cm 的外植体接种到添加 0.08 mg/L 的培养基上,35 ℃ 暗培养 4 d 利于早黄瓜的雌核启动率的发生。但此技术在早黄瓜的实践应用上还需深入研究。

虽然离体培养研究目前很受欢迎,但在实践应用上会受到多因素影响(环境条件,操作人员,场所等),操作复杂,费时费力,易污染,建议工厂化管理应用,如何大面积推广应用还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 李彩霞,董邵云,薄凯亮,等.黄瓜响应低温胁迫的生理及分子机制研究进展[J].中国蔬菜,2019(5):17-24.
- [2] 李建欣,葛桂民,庞淑敏,等.三个基因型黄瓜品种未授粉子房胚状体诱导及植株再生研究[J].北方园艺,2012(23):131-134.
- [3] 黄金华,董彦琪,王文英,等.葫芦科蔬菜单倍体育种技术研究进展——未授粉子房离体培养技术[J].中国瓜菜,2016,29(5):1-4.
- [4] SAN NOEUM L H, AHMADI N. In vitro induction of gynogenesis in higher plants [J]. Proceedings of the conference on broadening genetic base of crops, 1979, 51:327-329.
- [5] SHALABY T A. Factors affecting haploid induction through *in vitro* gynogenesis in summer squash (*Cucurbita pepo* L.) [J]. Scientia horticulturae, 2007, 115(1):1-6.
- [6] 李伟.西葫芦未授粉子房离体培养成胚条件优化与成苗技术研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2012.
- [7] 刘立功,王晶,赵泓,等.黄瓜未授粉子房诱导出胚和再生植株的研究[J].中国蔬菜,2015(6):48-53.

- [8] 裴晓利,杨颖,李胜,等.黄瓜离体雌核发育诱导单倍体的研究[J].甘肃农业大学学报,2011,46(6):52-56.
- [9] 孙守如,章鹏,胡建斌,等.南瓜未受精胚珠的离体培养及植株再生[J].植物学报,2013,48(1):79-86.
- [10] 闵子扬,李涵,邹甜,等.南瓜未授粉子房离体培养及植株再生[J].植物学报,2016,51(1):74-80.
- [11] 王焯,顾兴芳,张圣平,等.黄瓜未受精胚珠离体培养及单倍体植株再生[J].园艺学报,2015,42(11):2174-2182.
- [12] 王璐,陈小燕,张力,等.不同因素对黄瓜未授粉子房胚状体诱导的影响[J].西北农业学报,2008,17(4):267-270.
- [13] 葛志东.西葫芦未授粉子房离体培养研究[D].乌鲁木齐:新疆农业大学,2009.
- [14] 张加一.南瓜未受精胚珠再生植株方法研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2016.
- [15] MALIK A A, CUI L, ZHANG S X, et al. Efficiency of SSR makers for determining the origin of melon plants derived through unfertilized ovary culture [J]. Hort Sci, 2011, 38(1):27-34.
- [16] 李迎迎.西瓜未授粉子房离体培养技术的研究[D].郑州:河南农业大学,2017.
- [17] 杜胜利,魏爱民,韩毅科,等.黄瓜离体雌核发育及染色体倍性鉴定与加倍研究[C]//中国园艺学会.2008年园艺植物染色体倍性操作与遗传改良学术研讨会论文集摘要集.北京:中国园艺学会,2008:1.
- [18] 张伶俐,崔崇土,屈淑平.植物离体雌核发育的研究进展[J].东北农业大学学报,2009,40(11):133-136.
- [19] 牛明明.甜瓜离体雌核发育诱导单倍体研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2012.
- [20] 刁卫平,陈劲枫,雷春,等.影响黄瓜未授粉子房培养胚发生因素的研究[J].南京农业大学学报,2008,31(1):137-140.
- [21] 徐晓峰,黄学林. TDZ:一种有效的植物生长调节剂[J].植物学通报,2003,20(2):227-237.
- [22] 陈小鹏,刘桂桃,孙小镭,等.黄瓜未授粉子房的胚状体诱导研究初报[J].西北农业学报,2005,14(2):148-151.
- [23] 翟庆慧.南瓜未授粉子房和未受精胚珠离体培养研究[D].郑州:河南农业大学,2009.
- [24] DIAO W P, JIA Y Y, SONG H, et al. Efficient embryo induction in cucumber ovary culture and homozygous identification of the regenerants using SSR markers [J]. Scientia horticulturae, 2008, 119(3):246-251.