

黄瓜单倍体育种研究进展

叶永亮, 杜波, 鹿娜

(哈尔滨市农业科学院, 黑龙江 哈尔滨 150070)

摘要: 综述了近几年来黄瓜单倍体育种的最新研究进展。包括黄瓜单倍体获得的途径, 主要为辐射花粉培养、未授粉子房(胚珠)培养和花药培养等; 单倍体培养时 PGRs 的种类及浓度, 以及单倍体培育的制约因素等; 分析了黄瓜单倍体试验中存在的问题和今后发展的方向。

关键词: 黄瓜; 单倍体; 辐射花粉; 未授粉子房; PGRs

中图分类号: S642.2 文献标识码: A 文章编号: 1002-2767(2009)06-0160-03

Progress of Cucumber (*Cucumis sativus* L.) Haploid Breeding

YE Yong-liang DU Bo, LU Na

(Harbin Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150070)

Abstract: This paper reviewed the latest research of cucumber haploid breeding in the recent years. The study including access to gain for cucumber haploid, that mainly were radiation pollen culture, no pollination ovary (ovule) and anther culture and so on, the type and concentration of PGRs of haploid culture as well as constraint factors of haploid and so on. Then, the existing problems and future development direction were analyzed.

Key words: cucumber; haploid; radiation pollen; no pollination ovary; PGRs

培育抗逆性强、抗多种病害、适应性广、产量高且

商品性好的黄瓜新品种是黄瓜育种工作的核心任务^[1]。传统的育种方法费时、费力且效率较低; 加之资源匮乏, 选育品质好、产量高的新品种就变得更加困难。采用单倍体育种方法进行品种选育弥补了传统育种的许多不足, 成为人们关注的焦点。单倍体育种是利用花

收稿日期: 2009-03-24

第一作者简介: 叶永亮(1981-), 男, 河北省南皮县人, 学士, 农艺师, 从事黄瓜分子育种研究。E-mail: yyl8998@126.com。

- [3] 马秉元, 李亚玲, 段双科. 玉米对丝黑穗病的抗性与遗传初步研究[J]. 中国农业科学, 1983(4): 12-17.
- [4] Ali A, Baggett J R. Inheritance of resistance to head smut disease in corn[J]. J Amer Soc Hort Sci, 1990, 115(4): 668-672.
- [5] Lübberstedt T, Xia X G, Tan G, et al. QTL mapping of resistance to *Sporisorium reilianum* in maize[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1999, 99: 593-598.
- [6] Lu X W, Brewbaker J L. Molecular mapping of QTLs conferring resistance to *sphacelotheca reilianum* (kln) clint[J]. Maize Genetics Cooperation Newsletter (MNL), 1999, 73: 36.
- [7] 高树仁. 玉米抗丝黑穗病遗传分析及数量性状基因定位[D]. 长春: 吉林大学博士研究生论文, 2005.
- [8] 李新海, 韩晓清, 张锦芬, 等. 玉米矮花叶病毒抗性资源鉴定的研究[J]. 华北农学报, 2001, 16(2): 38-42.
- [9] 刘锡若, 薛国典. 玉米品种对丝黑穗病的抗病性和幼苗诊断的研究[J]. 植物保护学报, 1983, 10(4): 274-275.
- [10] 王金华, 王铨茂. 玉米丁布对玉米丝黑穗病菌抗性关系的研究[J]. 植物保护学报, 1989, 16(3): 187-190.
- [11] 董玲, 金益, 王振华. 玉米资源抗丝黑穗病快速鉴定方法的初步研究[J]. 2005, 18(5): 653-657.
- [12] 高洁, 祁新, 蔚荣海. 玉米种质资源对丝黑穗病的抗性鉴定[J]. 吉林农业大学学报, 2006, 28(2): 142-147, 151.
- [13] 王振华, 鄂文弟, 于天江, 等. 玉米丝黑穗病种质鉴定及遗传研究[J]. 东北农业大学学报, 2004, 35(3): 8-10.
- [14] 刘文国, 王绍萍, 钱淑玲, 等. 78599 系列自交系在吉林省玉米育种中的优缺点及对策[J]. 吉林农业科学, 2003, 28(1): 18-19.
- [15] 张建国, 赵伟, 李树军. 高抗丝黑穗病优良玉米种质资源的创新与改良[J]. 黑龙江农业科学, 2005(2): 24-25.
- [16] 李建生. 玉米分子育种研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2007, 9(2): 10-13.
- [17] 邱红波, 彭忠华, 胡安龙, 等. 玉米抗丝黑穗病基因 SSR 分析[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(8): 3139-3141.
- [18] 倪深, 肖炎农, 王凤格, 等. 基于 PCR 技术的玉米丝轴黑粉菌侵染率及扩展进程的研究[J]. 中国农业科学, 2006, 39(9): 1804-1809.
- [19] 吕香玲, 卢峰, 宋波. 利用同源序列发掘抗病候选基因的方法[J]. 华北农学报, 2007, 22(增刊): 10-12.
- [20] 吉海莲, 李新海, 谢传晓, 等. 基于元分析的抗玉米丝黑穗病 QTL 比较定位[J]. 植物遗传资源学报, 2007, 8(2): 132-139.
- [21] 倪深. 玉米抗丝黑穗病相关基因的筛选及抗病机理初探[D]. 武汉: 华中农业大学, 2006.

药培养等方法诱导产生单倍体,并使其单一的染色体各自加倍成对,成为有活力、能正常结实的纯合体。它在遗传上是稳定的,不再分离,相当于同质结合的纯系(而从杂交到获得不分离的品系只需要两个世代的时间)。由于单倍体植株的基因型和表现型完全一致,大大降低了误选频率;而且以单倍体为诱变材料,突变隐性基因性状就可表现出来,获得突变体的速度可大大加快,从而缩短了育种年限;并可快速产生纯合的育种新材料(纯系),为提高育种效率提供了可能,还可作为遗传转化的优良受体材料。

1 单倍体的研究进展

1.1 单倍体的初始研究

20世纪50年代末,植物胚胎学家开始了未授粉胚珠培养的探索,试图闯出离体诱导单倍体的新途径,然而未能成功。20世纪60年代,Tulecke 离体培养未授粉的银杏(*Ginkgo biloba*)雌配子体,得到单倍体愈伤组织,但没有分化成植株。在被子植物中,Nishi 和 Mitsuok 对水稻(*Oryza sativa*)未授粉子房培养产生了二倍体和四倍体植株,但未获得单体。20世纪70~80年代,Uchimiyu 等从未传粉的玉米(*Zea mays*)子房和茄子(*Solanum melongena*)的胚珠诱导出愈伤组织,并观察到其中有单倍体细胞的分裂,表明雌配子体人工诱导单倍体植株是可能的。Jensen 等进行未授粉棉花(*Gossypium hirsutum*)胚珠培养诱导了极核融合和分裂,但没有进一步的结果。San Noeum 首次利用大麦(*Hordeum vulgare*)未授粉子房培养出单倍体植株。随后国内用未授粉的小麦(*Triticum sativum*)及烟草(*Nicotiana tabacum*)子房培育出单倍体植株,以后的报道逐渐增多。

1.2 黄瓜单倍体国外研究进展

黄瓜单倍体研究在国外较为成熟,最多的是利用花药培养的方法。Ashok 等^[2]通过花药培养方法获得了单倍体植株,探讨了预处理、生长因子对黄瓜花药培养的影响,认为4℃预处理2d的黄瓜花药愈伤组织诱导率及胚胎诱导率最高。Kunmar 等对黄瓜花药培养的碳源及氨基酸的研究表明,花药诱导培养的最佳碳源为蔗糖,浓度0.2 mol·L⁻¹;混合氨基酸(谷胱氨酸、甘氨酸、精氨酸、天冬氨酸半胱氨酸)在一定浓度范围内的效果比单一氨基酸的效果更好,这说明黄瓜花药培养需要较为充足的营养环境。Gemesne 等^[3]对黄瓜离体雌核发育的最适时期及热激处理进行了研究,认为开花前6h,即较为成熟或者完全成熟的胚囊的子房为最适培养期,且在诱导培养时35℃热击处理2~4d获得的胚状体诱导率(18.4%)和植株再生率最高(7.1%)。Meghna R.Malik 等利用单倍体技术从无胚胎发生的野生油菜上分离得到胚胎发生系;Amal J Johnston

等利用遗传减法策略研究了拟南芥雌配子体和大孢子之间的相互关系;还有很多学者利用单倍体技术进行植物抗病育种研究。

1.3 黄瓜单倍体国内研究进展

国内单倍体研究起步较早,经历了相当长的时间。但是到目前为止,单倍体的成功率还是较低。天津黄瓜研究所的杜胜利研究员^[1,4-6]在这一领域成绩突出,已经利用单倍体技术育成多个新品系。西北农林科技大学硕士韩毅科^[7]对黄瓜倍性鉴定及染色体加倍技术^[8,10]做了系统研究;西北农林科技大学硕士王晓云在黄瓜离体发育早期生理生化的研究方面进行了深入探讨;随后山东农业大学园艺科学与工程学院、中国农业科学的谢冰等对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做了详细报道,他们建立了西葫芦离体雌核发育高频植株再生体系,以加速自交系选育,有效缩短西葫芦杂种一代育种周期;再有南京农业大学园艺学院/作物遗传与种质创新国家重点实验室的雷春等^[11]对栽培黄瓜染色体倍性操作及相关基础研究做了相关报道。系统探讨授粉组合、雄花辐射时的发育时期和辐射剂量对黄瓜座果和单倍体胚生产的影响^[12]。

2 单倍体获得的途径

单倍体获得主要包括2种途径,即体内发生和离体诱导。体内发生即从胚囊内产生单倍体。包括:自发产生、假受精、半受精、雄核发育或孤雄生殖、雌核发育或孤雌生殖。离体诱导主要是依据植物细胞具有潜在的再生性和全能性。离体雄核发育—花药—小孢子培养;离体雌核发育—未授粉子房—胚珠培养;原位雌核发育—用化学试剂或辐射处理过的花粉受粉。

2.1 花药小孢子培养

2.1.1 外植体的采集时间和预处理 外植体的采集时间是决定单倍体是否能诱导成功的关键步骤。一般我们选择小孢子处于四分体时期、单核居中期或单核靠边期进行采摘。采摘后的花蕾镜鉴后要进行处理,预处理的作用还不确定,许多学者分析有可能是外植体通过某种刺激使其改变极性分布并从生理生化上改变其细胞的生理状态,从而改变其分裂方式和发育途径。黄瓜花蕾的预处理可采取4℃低温处理3~5d。

2.1.2 愈伤组织诱导及胚状体形成 预处理后的花粉粒经常规灭菌后要诱导愈伤组织。基本培养基可选择MS或B5,附加PGRs中的NAA 0.1、TDZ 0.1、2,4-D 2和BA 0.5 mg·L⁻¹,3%蔗糖。在愈伤组织长到一定程度后,大概25~30d可转入胚状体诱导培养基。诱导培养基中适当减少2,4-D的用量。

2.2 未授粉子房—胚珠的培养

2.2.1 外植体的采集时间和预处理 外植体的采集

时间一般为开花前1 d或开花前2 d,在诱导效率上没有明显差异。外植体的预处理根据基因型不同而不同,一般华南型和欧洲温室型需要35℃热激,华北型和腌渍型可直接进行胚状体诱导。

2.2.2 胚状体诱导 胚状体诱导培养基选择MS,附加NAA 0.1、2、4-D 4.0和BA 1.0 mg·L⁻¹,3%蔗糖。胚状体形成过程中的关键因素除了培养基的配比外,光照条件和温度条件也值得注意。可调节光照时间为14 h/8 h,温度为25℃。大孢子培养较小子培养来说易获得单倍体,但单倍体率一般要低于小子培养。

2.3 辐射花粉培养

2.3.1 花粉辐射及授粉 开花前1 d上午8:00左右采集选定材料的雄花,将带有部分花丝的花药取下来,装入防水纸袋。进行100、200、300和400 Gy剂量的辐射处理,当然不同基因型在具体试验中需要进行辐射剂量的摸索。当天下午,用铝片对开放前的雌花进行隔离。第2天早上7:00~9:00用辐射过的花粉进行授粉。授粉后的雌花用铝片隔离至座果^[13]。

2.3.2 胚状体诱导 授粉2~3个星期后采收果实。用95%的乙醇对果实进行表面消毒,然后将果实剖开分离种子接种到不添加任何激素的MS培养基上进行培养。约10 d后,将肉眼可见绿胚的种子挑出来,剥取绿胚并将其接种在MS附加6-BA 0.2 mg·L⁻¹的培养基上生长。

3 单倍体育种中存在的问题及展望

黄瓜单倍体诱导率一直很低,并且重复性较差。国内文献检索一般采用未授粉子房(胚珠)培养方法,虽有成功,但诱导率低且不能用于后期分析工作,更无法在育种工作中发挥作用^[14]。国外大多采用小子培养手段^[15-18],具体方法无法得知。从经验来看,单倍体培育之所以如此艰难有3点原因:其一,基因型差异较大,较欧洲温室型和华南型而言,密刺型较易获得分化植株;其二,培养基中外源调节剂的种类和彼此间的比例关系较难掌握,比如说生长素和细胞分裂素等;其三,培养条件难以控制,尤其是预培养的温度控制。当然还存在诸多的外界和内在的因素制约着单倍体的诱导。

单倍体育种在新品种培育方面、亲本鉴定方面以及分子生物学研究方面意义重大^[19-20],但是单倍体育种工作道路艰难,作为育种工作者,还要继续努力,探索出诱导效率高且重复性较好的培养基,创造利于单倍体生长的优越条件,为单倍体育种的后续研究打下坚实的基础。

参考文献:

- [1] 杜胜利,魏惠军,魏爱民等.通过辐射花粉授粉诱导获得黄瓜单倍体植株[J].中国农业科学,1999(2):107.
- [2] 中国科学院植物研究所.单倍体育种资料集[M].第二集.北京:中国科学院植物研究所,1973.
- [3] Gemesne J A, Venczel G P, Altman A, et al. Haploid plant induction in Zucchini (Cucurbita pepo L. convar. giromontina DUCH) and in Cucumber (Cucumis sativus L.) lines through invitro gynogenesis[J]. Acta Horticulturae, 1997, 447: 623-625.
- [4] 杜胜利.黄瓜雌核发育及染色体倍性鉴定与加倍研究[D].天津:南开大学,2002.
- [5] 杜胜利.利用生物技术创造黄瓜育种新材料方法研究[J].天津科技,2001(2):627.
- [6] 杜胜利,韩毅科,丛颖,等.黄瓜离体雌核发育的过程及其早期生化变化研究[J].南开大学学报(自然科学版),2003(2):27-30.
- [7] 韩毅科,杜胜利,王鸣,等.黄瓜染色体加倍研究[J].天津农业科学,2002,8(2):1-4.
- [8] 谭素英,黄秀强,刘济伟.提高西瓜四倍体诱导率的研究[J].华北农业学报,1993,8(4):12-15.
- [9] 柴兴容,董莉,上欣.甜瓜四倍体育种及其生产利用研究[J].中国西瓜甜瓜,1998(2):16-19.
- [10] Li Ying, Whitesides J F, Rhodes B. In vitro generation of tetraploid watermelon with two dinitroanilines and colchicine[J]. Cucurbit Genetics Coop Rpt, 1999, 22: 38-40, 83.
- [11] 陈劲枫,雷春,钱春桃,等.黄瓜多倍体育种中同源四倍体的合成和鉴定[J].植物生理学通讯,2004,40(2):149-152.
- [12] Ashok Kunmar H G, Murtly H N, Pack K Y. Embryogenesis and plant regeneration from anther culture of Cucumis sativus L.[J]. Scientia Horticulturae, 2003, 98: 213-222.
- [13] 雷春,陈劲峰,钱春桃,等.辐射花粉授粉和胚株培养诱导产生黄瓜单倍体植株[J].西北植物学报,2004,24(9):1739-1743.
- [14] 侯锋,李淑菊.我国黄瓜育种研究进展及展望[J].中国农业科学,2000,33(3):100-102.
- [15] Niemirovicz K S, Fanis N M, Rucinska M. Conservation and storage of a haploid cucumber (Cucumis sativus L.) collection under in vitro conditions[J]. Plant Cell Report, 2000, 19: 311-314.
- [16] Zha Ding Shi, Zha DS. Haploid plant production and ploidy level determination in netted melon (Cucumis melo L.)[J]. Acta Agriculturae Shanghai, 2002, 18(1): 43-45.
- [17] Lotfi M, Alan A R, Henning M J, et al. Production of haploid and doubled haploid plants of melon (Cucumis melo L.) for use in breeding for multiple virus resistance[J]. Plant Cell Rep, 2003, 21: 1121-1128.
- [18] Chen Jin-Feng, Staub Jack, Adelberg Jeff, et al. Synthesis and preliminary characterization of a new species (amphidiploid) in Cucumis[J]. Euphytica, 2002, 123: 315-322.
- [19] 李晓丽,徐跃进,田福发,等.秋水仙素诱导菠菜和黄瓜四倍体方法的筛选[J].湖北农业科学,2003(1):68-69.
- [20] 房超,林佩德,张兴平,等.西瓜多倍体育种新方法——利用组织培养诱导四倍体西瓜[J].中国西瓜甜瓜,1996(4):7-9.