

利用南瓜属蔬菜未授粉子房培养单倍体的研究进展

孙朋朋^{1,2}, 刘 涛^{1,2}, 沈 虹^{1,2}, 孙 锦^{1,2,3}

(1. 南京农业大学(宿迁)设施园艺研究院, 江苏 宿迁 223800; 2. 宿迁市设施园艺研究院, 江苏 宿迁 223800; 3. 南京农业大学 园艺学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 为了促进南瓜单倍体育种, 通过介绍雌配子形成过程, 综述了近年来南瓜属蔬菜未授粉子房(或胚珠)离体培养概况, 并对离体雌核培养的影响因素进行分析, 对再生植株倍型鉴定和单倍体加倍方法进行阐述, 最后探讨其当前存在的问题和应用前景。

关键词: 南瓜属蔬菜; 未授粉子房; 离体培养; 单倍体植株

中图分类号: S642 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-2767(2015)06-0141-06 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2015.06.0141

南瓜属蔬菜包括 5 个主要栽培种, 即南瓜(中国南瓜)、笋瓜(印度南瓜)、西葫芦(美洲南瓜)、黑籽南瓜和灰籽南瓜, 因其具有良好的栽培特性以及较强的环境适应性, 而被人们广泛栽培^[1]。长期以来, 人们主要是利用常规育种手段进行南瓜属蔬菜新品种的培育工作, 但常规育种获得相对较纯合的自交系一般至少需要 5~6 a 时间, 育种周期长、工作量大、遗传性状不稳定等不良因素限制了南瓜属蔬菜的育种进程^[2]。自然界中曼陀罗单倍体植株的发现, 使研究者看到了单倍体育种的曙光。随后, 许多研究者开始研究利用单倍体获得纯系的方法。单倍体诱导和染色体自然加倍可以获得纯合的双单倍体植株^[3], 一般 1~2 a 即可获得纯合自交系, 这样既可以大大缩短育种年限, 也能使单倍体材料在当代即表现出显隐性基因型性状^[4], 很好地克服对常规育种的缺点。但是自然界中南瓜属蔬菜自发产生单倍体植株的频率极低^[5], 研究者尝试许多方法进行单倍体诱导, 如离体雄核(花粉或小孢子)培养, 离体雌核培养(未授粉的子房或胚珠)和花粉(正常或辐射处理)诱导孤雌生殖等方法, 虽然 3 种方法都或多或少地获得了单倍体植株, 但通过雄核离体培养或花粉诱导孤雌生殖产生单倍体植株难度较大, 相比较而言, 离体雌核培养成功率较高, 因而育种家对

南瓜属蔬菜离体雌核进行培育获得单倍体植株越来越受到重视, 在许多物种中, 未授粉雌核离体诱导也被看作是比较成功的获得单倍体植株的方法之一^[6-8]。

1 高等植物雌配子形成分析

在高等植株雌蕊子房里着生胚珠, 在胚珠的珠心组织里分化为大孢子母细胞和胚囊母细胞, 由 1 个大孢子母细胞(2n)经过减数分裂形成 4 个大孢子(n), 即为四分孢子。4 个大孢子分成两部分, 其中 1 个远离珠孔的继续发育, 形成胚囊, 其余 3 个养分被吸收后自然解体。继续发育的一个大孢子的核经过 3 次有丝分裂后形成 8 个核(n), 其中 3 个为反足细胞, 2 个为助细胞, 2 个极核形成 1 个细胞, 1 个为卵细胞。这个 7 细胞 8 核结构组成的结构称为雌配子体。未授粉子房(或胚珠)离体培养实际上就是诱导胚囊细胞的发育过程, 因胚囊细胞只包含植物体一半染色体信息, 所以发育成的植株为单倍体植株。

单倍体经过诱导加倍可以获得双单倍体植株(DH), 假如一个基因座上存在一对等位基因, 分别为 A 和 a, 单倍体诱导获得 AA 和 aa 的频率均为 1/2, 但常规方法获得基因型频率分别为^{1/4} AA、^{1/2} Aa 和^{1/4} aa, 假如 aa 为目标基因型, 有 n 不存在连锁关系的基因座, 那么两种方法获得目标基因的比率分别为 $(1/2)^n$ 和 $(1/4)^n$, 这样可以看出利用单倍体诱导方法获得目标基因的概率明显大于常规方法。

2 南瓜属蔬菜离体雌核培养获得单倍体概况

自从 San Noeum 利用大麦未受精子房培育获得单倍体植株以来, 已经包括有洋葱^[9-10]、甘薯^[11]、郁金香^[12]、玉米^[13]、甜菜^[14]、黄瓜^[15]和小

收稿日期: 2015-01-21

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资助项目(CARS-25-C-03); 江苏省重大创新载体资助项目(BY2011012); 江苏省农业三新工程资助项目(SXGC[2014]256, SXGC[2015]270); 宿迁市科技计划(农业科技支撑)资助项目(L201410)

第一作者简介: 孙朋朋(1987-), 男, 山东省惠民县人, 硕士, 助理研究员, 从事蔬菜遗传育种与生物技术研究。E-mail: sunpengpeng1987@126.com。

通讯作者: 孙锦(1972-), 男, 副教授, 从事设施园艺方面的科研与教学工作。E-mail: jinsun@njau.edu.cn。

麦^[16]等10科25种植物通过未受精子房或胚珠被成功诱导出单倍体植株^[17]。在南瓜属蔬菜的研究方面,Chambonet等首次利用西葫芦未授粉胚珠培养获得单倍体和二倍体的嵌合体植株^[18]。随后南瓜属蔬菜离体雌核培养被广泛研究,并取得一定进展。Metwally等利用开花前1d的西葫芦雌花,研究4℃低温预冷天数和MS培养基添加不同浓度2,4-D对雌核发育的影响,获得了西葫芦单倍体植株^[19]。陈学军利用我国广泛栽植的西葫芦品种早青一代的胚囊获得了胚囊植株^[20]。郭永强对3个杂一代和1个杂六代品种进行西葫芦未授粉子房离体培养,最终获得单倍体植株^[21]。谢冰等利用5个杂交组合,分析选取雌花不同发育时期,以及附加不同浓度2,4-D、NAA、BA的N₆培养基对未受精胚珠形成胚状体的影响,最终获得了再生植株^[22]。徐静以15个基因型的西葫芦品种为试材,进行未授粉子房离体培养,最终获得了西葫芦单倍体植株^[23]。刘栓桃等利用6个杂交种和3个地方品种共9个基因型的未受精胚珠进行离体培养,其中8个基因型获得了再生植株^[24]。葛志东以5个基因型的西葫芦品种为试材,进行未授粉子房离体培养,获得了单倍体植株^[25]。李伟^[26]和王朝阳^[27]对西葫芦未受精子房进行离体培养,均获得了西葫芦单倍体植株。程慧等以西葫芦品种春玉一号为试材,研究了不同培养基类型,不同激素浓度对未受精子房的诱胚效果,获得了再生植株^[28]。

南瓜未授粉子房离体培养试验由Kwack等获得初始成功^[29]。随后,Shalaby在对南瓜基因型、雌花位置、预处理温度时间、蔗糖浓度研究时获得了单倍体植株^[30]。为明确南瓜未授粉子房和胚珠诱导的最佳培养条件,翟庆慧以试验南瓜1号为试材,以MS培养基为基本培养基,研究了黑暗热激处理时间、2,4-D浓度、激素组合、碳源种类和浓度等影响南瓜雌核发育的因素,最终获得了单倍体植株^[31]。陈解放同样以试验南瓜1号为材料获得未受精胚珠诱导的单倍体植株,选择出胚状体诱导培养基和分化再生培养基,并研究了KT预处理和AgNO₃对未受精胚珠胚状体和小苗的影响^[32]。孙守如等总结翟庆慧和陈解放的试验成果,以未受精胚珠为外植体,研究了激素种类、外植体发育时期、高温预处理时间和AgNO₃浓度对胚状体诱导的影响,并诱导出了南瓜单倍体植株^[33]。

从这些研究报道可以看出,南瓜属蔬菜离体雌核诱导技术取得了一定的进展,其在育种及其

它研究中的地位也越来越受到重视,但目前诱导出的南瓜属蔬菜单倍体的基因型数量有限,离体雌核胚诱导率也比较低,限制了其在育种等领域的进一步研究应用,因此探究南瓜属蔬菜离体雌核培养的影响因素并建立高效稳定的雌核离体诱导体系成为一大热点。

3 南瓜属蔬菜离体雌核培养影响因素

未受精子房(或胚珠)培养单倍体植株的成败以及诱导率的高低,受到许多种因素影响,这些因素不但自身影响离体雌核培养,而且它们之间的交互作用对未授粉子房(或胚珠)的发育也存在一定的影响。目前,在这方面研究相对较多的是供体植株基因型、取材状况、温度预处理、培养基成分等因素。

3.1 供体植株基因型

人们在长期的研究中发现,离体雌核的诱导与离体雄核相同,诱导的成功与否受供体基因型影响很大。有研究者认为,植物雌核发育诱导效率很大程度上取决于所使用品种的不同^[34],杂交组合离体雌核诱导率比定性品种要高^[35]。郭永强对4个无亲缘关系的南瓜杂交种的未授粉子房进行离体培养发现,再生植株诱导率和再生植株中单倍体比率均存在着较为显著的差别,变异幅度分别为0.5%~6%和0~14.3%^[21]。谢冰等研究发现,基因型对西葫芦胚状体诱导频率也有一定影响^[22]。Shalaby在对12种不同基因型南瓜品种的离体雌核培养时发现Raad的F₁材料表现最优^[30]。徐静利用9个基因型品种研究基因型对西葫芦离体雌核培育的影响发现不同基因型诱导出苗率(0~61.3%)和诱导出苗时间(31~55d)均不同^[23]。刘栓桃等对最佳取样时期的未受精胚珠在适宜的诱导培养基进行培养,9个基因型的8个获得了再生植株,8个基因型再生植株产率范围是2.67%~33.33%^[24]。葛志东利用5个西葫芦杂交种研究发现,不同基因型未授粉子房再生植株诱导率存在差异(0~6.76%)^[25]。李伟^[26]和王朝阳^[27]研究发现基因型对西葫芦未受精子房离体培养诱导胚状体具有一定影响。

从上述的试验研究来看,供体植株基因型确实对离体雌核发育存在一定的影响,但是由于种质资源有限等限制因素,目前还未有研究者较为系统地研究基因型和胚诱导率之间的具体关系。

3.2 取材状况

胚珠的发育时期对离体雌核胚胎的发生有着很重要的影响^[36],子房(或胚珠)最敏感的时期为接近成熟和完全成熟的胚囊发育时期^[15]。陈学

军等分别对开花前 3 d、开花当天和开花后 2 d 雌花进行离体培养,获得的胚诱导率分别是 10.5%、14.2% 和 4.4%^[20]。谢冰等在研究不同播种时期与取材时间对胚珠培养发现,秋播材料诱导率高于春播与夏播材料;开花当天胚珠诱导率最高^[22]。Shalaby 对 2 个南瓜 F₁ 杂种的第一、二、三节位上雌花进行离体胚珠培养后得出,第二节位上的雌花胚诱导率和成苗效果均最佳^[30]。刘栓桃等利用 9 个基因型西葫芦试材研究不同开花时期雌花对胚诱导及再生植株产率时发现,开花当天的雌花最适宜离体胚珠的诱导,再生植株产率最高^[24]。葛志东选取品种 281 和 282 开花前 2 d、开花前 1 d、开花当天的西葫芦子房进行离体培养时发现,两个基因型有一致的诱导表现,均为开花前 1 d 诱导率最高,开花当天次之^[25]。王朝阳选取西葫芦开花前 2 d、开花前 1 d、开花当天和开花后 1 d 的雌花进行未受精子房离体培养获得,开花前 1 d 和开花当日未受精子房出胚数和胚囊植株诱导率最高^[27]。陈解放研究发现,开花当天南瓜子房处于七细胞八核成熟胚囊期,此时期的胚状体诱导率和成苗率均高于其它对应时期胚珠^[32]。孙守如等将开花前 2 d、开花前 1 d 和开花当天的雌花胚珠接种后发现,开花当天的未受精胚珠出胚效果最好,出胚率为 26.7%^[33]。

由此可知,第二节位上,开花当天和开花前 1 d 雌花离体胚珠诱导获得单倍体植株的成功率比较高。这可能与内源激素(如内源 GA、BA 等)水平在开花当天达到最高水平有关^[20]。

3.3 温度预处理

为了提高培养效率,通常对试验材料进行低温、黑暗、热激、饥饿等预处理或预培养,目的是从生理和生化上改变细胞生理状态、分裂方式和发育途径^[37]。Kwack 等研究表明,南瓜在 5℃ 条件下预处理 2 d 能提高胚胎诱导率^[29]。Shalaby 发现 4℃ 或 32℃ 条件下都是处理 4 d 的效果最佳^[30]。但也有研究者认为不进行低温预处理的胚珠诱导率较高^[19]。郭永强对西葫芦接种胚珠热激处理得出,37℃ 热激 5 d 的效果最好^[21]。徐静对西葫芦杂交种进行黑暗热激处理时得出,35℃ 热激 5 d 的胚珠转色率最高,并与其它处理存在显著差异^[23]。葛志东利用京香蕉进行热激处理对离体胚珠转绿率的影响试验时,设置 3 个温度梯度:32、35 和 38℃,每个温度设置 3 个时间梯度:3、5 和 7 d,最终获得以 35℃ 热激 5 d 效果最佳^[25]。王朝阳对接种后的西葫芦子房置于不同温度热激处理后同样获得 35℃ 热激 5 d 西葫芦胚珠转色率最高^[27]。翟庆慧对 35℃ 黑暗热激南

瓜离体子房天数的不同对出胚率的影响,35℃ 黑暗热激的诱导率以 6 d 的效果最佳^[31]。孙守如等研究发现,35℃ 高温处理 5 d 的效果最为明显,出胚率达 32.2%,出苗率也最高 44.8%^[33]。

由此可以看出,低温预处理的温度和时间对南瓜属蔬菜胚诱导率研究相对较少,但在高温黑暗热激处理方面,大部分研究证明,35℃ 热激 5 d 对离体雌核发育有着明显的促进作用。

3.4 培养基成分

体细胞胚胎发生的细胞和形态建成受培养基和遗传效应的影响,其中培养基包括培养基成分和物理状态^[38]。在一般的植物再生体系建立过程中,培养基被看作是人工诱导形态建成的首要因素,同样,未受精子房(或胚珠)的离体培养也受培养基成分的影响。培养基成分包含基本培养基、碳源、外源激素和其它外源添加物等多种因素。

3.4.1 基本培养基 早期的研究中,研究者主要采用的是 Nitsch 培养基,但未能成功诱导出离体雌核单倍体植株。20 世纪 70 年代后,研究者开始把基本培养基换作改良的 Miller、N₆、MS 培养基之后,才陆续有了成功的报道。李伟以添加一定外源激素的 MS、B₅、N₆、White 基本培养对西葫芦未受精胚珠进行离体培养时获得,以 MS 作为基本培养基时,胚状体诱导率最高,达 16.67%,其次为 N₆ 培养基(13.33%),B₅ 诱导率很低,White 诱导率为 0^[26]。程慧等以西葫芦春玉一号未受精子房为材料,分析 MS、B₅、N₆ 和 White 基本培养基的诱胚效果,结果表明以 MS 为基本培养基时胚状体诱导率最高^[28]。但由于在种内和种间离体胚胎发生所需要的营养不同,所以并没有获得通用的培养基^[39],即使在同一种作物,不同的品种之间,对培养基的要求也存在不同,所以在选择基本培养基时,必须要经过充分的比较试验才能确定。目前,在南瓜属蔬菜上成功获得单倍体植株主要应用的是 MS 和 N₆ 培养基。

3.4.2 外源激素 Kwack 等研究认为植物激素对南瓜胚的发生起重要作用^[29]。Metwally 等研究发现,1 和 5 mg·L⁻¹ 2,4-D 浓度处理时,对西葫芦未受精胚珠胚诱导率效果最佳^[19]。郭永强认为,MS 培养基中加入 IBA 可以促进植株生根^[21]。谢冰等对 2,4-D、NAA、BA 等 3 种植物生长调节剂的浓度进行研究表明,N₆ 培养基中添加 2 mg·L⁻¹ 2,4-D、0.5 mg·L⁻¹ NAA 和 1 mg·L⁻¹ BA 对西葫芦离体雌核诱导率最高^[22]。徐静利用京葫一号研究发现,添加 0 mg·L⁻¹ 2,4-D、

0.5 mg·L⁻¹NAA 和 1 mg·L⁻¹6-BA 培养基上表现最好,诱导率高达 42.4%,出苗最早仅需 24 d,苗的状态也比较好^[23]。刘栓桃等以并丰一号对不同浓度 2,4-D 筛选与 0.5 mg·L⁻¹NAA 适宜激素配比发现,0.5 mg·L⁻¹NAA+1.0 mg·L⁻¹2,4-D 再生植株产率最高,达 28.33%^[24]。葛志东研究显示,不加外源激素的 MS 培养基上不能诱导出西葫芦再生植株,单独使用一种培养基诱导率极低,培养基中加入 3 mg·L⁻¹2,4-D+0.25 mg·L⁻¹NAA+1 mg·L⁻¹6-BA 效果最佳^[25]。翟庆慧对南瓜子房离体培养后,筛选出最适宜南瓜离体胚珠诱导的 2,4-D 浓度为 4.0 mg·L⁻¹,NAA 和 6-BA 组合的浓度均为 0.5 mg·L⁻¹^[31]。陈解放研究发现,外源激素 KT 对南瓜未受精胚珠不定芽的发生具有抑制作用,但其可以延缓胚珠组织的衰老^[32]。李伟研究发现,不添加激素或只添加一种激素处理均不能诱导出胚状体,且在诱导出胚状体处理中,0.5 mg·L⁻¹NAA+1 mg·L⁻¹6-BA 组合的胚状体诱导率较高,达 17.25%^[26]。程慧等在 MS 培养基中添加不同浓度的 6-BA 和 NAA,筛选出 2 种激素的最佳组合(1 mg·L⁻¹6-BA+0.5 mg·L⁻¹NAA),之后添加不同浓度的 2,4-D 筛选出质量浓度为 1.0 mg·L⁻¹2,4-D 可加快胚珠的膨大速度,增加转绿率,但对出胚率无影响;研究还筛选出了 0.1 mg·L⁻¹NAA 是诱导胚状体芽生根的适宜浓度^[28]。孙守如等研究发现,2,4-D、NAA 和 6-BA 组合有利于胚状体的形成,出胚效果最好的培养基为 MS+1.0 mg·L⁻¹2,4-D+0.25 mg·L⁻¹NAA+0.5 mg·L⁻¹6-BA,出胚率达 31.1%^[33]。

就目前研究来看,南瓜属蔬菜胚培养所使用培养基中添加激素研究最多的是 2,4-D、NAA 和 6-BA,所使用范围分别为 0~5 mg·L⁻¹、0.25~0.5 mg·L⁻¹和 1.0 mg·L⁻¹。总的来看,2,4-D 的添加浓度范围比较大,具体添加量以及 NAA 和 6-BA 组合成最佳配比,仍需要进行大量研究。其它外源激素,如在黄瓜离体雌核培养上成功应用的 TDZ^[40]以及在胡萝卜上提高雌核诱导率的 IAA^[41],在南瓜属蔬菜上研究相对较少。

3.4.3 琼脂和蔗糖浓度 蔗糖是未受精子房(或胚珠)的离体培养诱导应用最多,也是相对较成功的碳源。另外,琼脂浓度对胚状体的诱导也有一定作用。陈学军等研究发现,西葫芦胚珠愈伤组织诱导成苗阶段在 0.8%琼脂和 2%蔗糖组合时芽诱导率最高,达 15.6%^[20]。Shalaby 用 Eskandrani 南瓜品种未受精胚珠离体培养,所使用蔗糖浓度分别为 3%、6%和 9%,发现不同浓度的蔗糖

胚诱导率不同,分别为 16.0%、8.4%和 0^[30]。翟庆慧利用蔗糖和葡萄糖两种碳源及不同浓度对南瓜未受精子房培养研究,结果显示出胚率以蔗糖 30 g·L⁻¹为最高,均值为 14.67%,其次为葡萄糖 40 g·L⁻¹,均值为 6.35%^[31]。

从已有的报道来看,南瓜属蔬菜离体雌核诱导蔗糖浓度在 20~30 g·L⁻¹的水平诱导率较高,并且易于诱导形成单倍体植株;琼脂含量为 0.8%时诱导效果最佳。

3.4.4 其它外源添加物 活性炭(AC)和 AgNO₃等两种非激素物质在培养基中也以不同方式起着不同作用。AgNO₃是乙烯合成的抑制剂,Mohiuddin 等认为 AgNO₃影响愈伤组织内源激素代谢^[42]。因此某些研究者也在培养基中添加 AgNO₃来进行南瓜属蔬菜未受精离体胚珠的诱导研究。培养基中添加一定浓度活性炭可以吸附离体胚珠中产生的有毒次生代谢产物,但浓度过高也会吸附培养基内的营养物质。陈学军等在做诱根试验时发现,培养基中添加高浓度的 NO₃⁻有利于不定根的形成^[20]。陈解放把 AgNO₃设置 6 个浓度(0、2、4、8、16 和 32 mg·L⁻¹)后添加在诱导培养基中并把活性炭设置 3 个浓度(0、0.5、1 和 2 g·L⁻¹)添加入再生培养基中进行研究得知,AgNO₃浓度在 16 mg·L⁻¹时,胚珠出芽率高(达 80%),南瓜未受精胚珠不定芽发生的最佳 AgNO₃浓度为 16 mg·L⁻¹;胚状体和不定芽的分化再生培养基以含活性炭 0 和 1 g·L⁻¹较好,外植体接种到含活性炭 1 g·L⁻¹培养基上后,生长比接种到不含活性炭培养基上稍缓,但根和茎都很粗壮,叶片墨绿,移栽到培养基上后很容易成活^[32]。但也有研究者认为南瓜未受精胚珠对 AgNO₃极为敏感,离体雌核胚诱导明显受到其抑制^[33]。目前,对于活性炭和 AgNO₃的作用机理还不十分明确,有待于进一步的研究。

4 再生植株的倍型鉴定及单倍体植株加倍

离体雌核培养获得的单倍体植株理论上应是来源于胚囊成员细胞的单倍体,但是实际还包含了单倍体、双单倍体、多倍体以及嵌合体植株,因此需要对获得的再生植株进行倍型鉴定,在其中筛选出单倍体植株,并对其进行加倍,是其应用于育种的前提和基础。

目前,再生植株鉴定应用最多的是染色体计数法,该方法检测结果可信,是倍型确定中最基本的方法,但由于南瓜属蔬菜染色体数目多,容易造成观察和技术困难^[43],需要大批研究观察才能确

定其倍型;形态学鉴定法是通过观察植株形态学特性进行再生植株倍型的鉴定,这种方法简便直观,但是需要幼苗长到一定大小才能观察确定,耗时间较长,而且准确率有待确定;叶片单位面积气孔数、气孔保卫细胞长度及叶绿体数目与再生植株的倍型有一定影响,因此此方法也可以进行再生植株的倍型鉴定。谢冰等^[22]选用该法初步对西葫芦再生植株的倍性进行确定;流式细胞仪鉴定法是通过比较核 DNA 含量鉴定再生植株的倍型,该方法便捷、迅速、准确度高,不受样品部位及时间限制,一次同时可以测定多个样品,效率高,但流式细胞仪价格昂贵、检测费用较高,因此,在南瓜属蔬菜再生植株的倍型鉴定方法选择过程中,结合实验室仪器设备,选择相对较准确、效率高且耗费较少的某一种或某几种方法进行检测。

检测获得的单倍体再生植株应用于育种之前一般先进行染色体加倍。染色体加倍可分为自然加倍和人工加倍,自然加倍是在生长过程中植株自然加倍成双单倍体,但是在大多数作物中自然加倍频率较低;秋水仙碱处理幼苗,阻止纺锤体的正常生长,染色体复制后不能一分为二,从而使染色体加倍,秋水仙碱处理法是目前最常用的人工加倍方法,包括浸渍法、涂抹法、滴液法等,其中浸渍法是主要的方法。

5 问题及展望

应用未授粉子房(或胚珠)获得单倍体株系并用于育种已经在水稻、小麦、玉米和烟草等作物中进行实践,培育出来的新品种也得到大面积的推广。蔬菜中应用未授粉子房(或胚珠)离体培养比较普遍的是葫芦科植物,并在黄瓜、西葫芦、甜瓜、南瓜和苦瓜等作物中获得单倍体(或双单倍体)植株,但大多数诱导试验体系不够稳定,目前应用在育种实践上的相关报道仅有津美 3 号黄瓜新品种^[44]。其中南瓜属蔬菜虽然获得了单倍体植株,但是诱导出的基因型有限,诱导率比较低,诱导体系不够完善、培养基成分及培养条件间相互作用关系还不清楚等原因,一直制约着其向育种方向发展,需要进一步优化胚的培养条件,筛选胚状体发生频率高的形态学和生理指标,探索雌核发育过程中激素和酶活性的变化。因此,通过改进实验技术建立稳定性好、重复性高的南瓜属蔬菜未授粉子房离体培养诱导效率并获得再生植株,在南瓜属蔬菜育种中具有重要意义。

近年来,随着我国经济的快速发展和人们生活水平的逐步提高,南瓜属蔬菜以其独特的营养保健作用受到人们的重视,南瓜属蔬菜育种业的

相关研究也逐步扩展。通过未授粉子房的离体培养单倍体植株,可以避免育种工作中繁琐的多代自交程序,可以快速有效地获得纯系,从而大大缩短育种年限;培养植株所含隐性基因均处于纯合状态,可以消除显性基因的干扰,有利于新品种的获得。因此,通过离体雌核诱导技术对南瓜属蔬菜主要品质、抗逆性、抗病性和耐低温弱光等进行改良以及种子资源的创新利用上,将会开辟一条新的育种途径。

参考文献:

- [1] 刘宜生,林德佩,孙小武,等.我国南瓜属作物产业与科技发展的回顾和展望[J].中国瓜类,2008(6):4-9.
- [2] 李玲,唐炎英,闵子扬,等.葫芦科蔬菜未授精子房离体培养的研究进展[J].长江蔬菜,2013(10):7-10.
- [3] Jain S M, Sopory S K, Veilleux R. *In Vitro* Haploid Production in Higher Plants[M]. Germany: Springer, 1996.
- [4] 杨明贵,王毓洪,李林章,等.葫芦科植物未授粉子房培育单倍体研究进展[J].长江蔬菜:学术版,2013(2):9-12.
- [5] Savin F, Decombe V, Le Couvieur M, et al. The X-ray detection of haploid embryos arisen in muskmelon (*Cucumis melo* L.) seeds, and resulting from a parthenogenetic development induced by irradiated pollen[J]. Report: Cucurbit Genetics Cooperative, 1988, 11: 39-42.
- [6] Lux H, Herrmann L, Wetzel C. Production of haploid sugar beet (*Beta vulgaris* L.) by culturing unpollinated ovules[J]. Plant Breeding, 1990, 104(3): 177-183.
- [7] Hansen A L, Gertz A, Joersbo M, et al. Short-duration colchicine treatment for in vitro chromosome doubling during ovule culture of *Beta vulgaris* L. [J]. Plant Breeding, 1995, 114(6): 515-519.
- [8] Alan A R, Mutschler M A, Brants A, et al. Production of gynogenic plants from hybrids of *Allium cepa* L. and *A. roylei* Stearn [J]. Plant Science, 2003, 165(6): 1201-1211.
- [9] Bohanec B, Jakše M, Ihan A, et al. Studies of gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.): induction procedures and genetic analysis of regenerants [J]. Plant Science, 1995, 104(2): 215-224.
- [10] Luthar Z, Bohanec B. Induction of direct somatic organogenesis in onion (*Allium cepa* L.) using a two-step flower or ovary culture [J]. Plant Cell Reports, 1999, 18(10): 797-802.
- [11] Kobayashi R S, Sinden S L, Bouwkamp J C. Ovule culture of sweet potato (*Ipomoea batatas*) and closely related species [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1993, 32(1): 77-82.
- [12] Van Creijl M G M, Kerckhoffs D M F J, De Bruijn S M, et al. The effect of medium composition on ovary-slice culture and ovule culture in intraspecific *Tulipa gesneriana* crosses [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2000, 60(1): 61-67.
- [13] Tang F, Tao Y, Zhao T, et al. In vitro production of haploid and doubled haploid plants from pollinated ovaries of maize (*Zea mays*) [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2006, 84(2): 233-237.
- [14] Gürel S, Gürel E, Kaya Z. Doubled haploid plant production from unpollinated ovules of sugar beet (*Beta vulgaris*

- L.) [J]. Plant Cell Reports, 2000, 19(12): 1155-1159.
- [15] Gemes-Juhasz A, Balogh P, Ferenczy A, et al. Effect of optimal stage of female gametophyte and heat treatment on in vitro gynogenesis induction in cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. Plant Cell Reports, 2002, 21(2): 105-111.
- [16] Sibi M L, Kobaissi A, Shekafandeh A. Green haploid plants from unpollinated ovary culture in tetraploid wheat (*Triticum durum* Desf.) [J]. Euphytica, 2001, 122(2): 351-359.
- [17] 王文和. 未授精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(S): 108-117.
- [18] Chambonnet D, De Vaulx R D. Obtention of embryos and plants from in vitro culture of unfertilized ovules of *Cucurbita pepo* [J]. Cucurbit Genet Coop, 1985, 8: 66.
- [19] Metwally E I, Moustafa S A, El-Sawy B I, et al. Production of haploid plants from in vitro culture of unpollinated ovules of *Cucurbita pepo* [J]. Plant Cell, Tiss Org Cult, 1998, 53: 117-121.
- [20] 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.
- [21] 郭永强. 西葫芦离体雌核发育途径诱导单倍体的研究[D]. 北京: 首都师范大学, 2004.
- [22] 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.
- [23] 徐静. 西葫芦雌核离体高效培养体系的建立[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2007.
- [24] 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.
- [25] 葛志东. 西葫芦未授精子房离体培养研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2009.
- [26] 李伟. 西葫芦未授精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.
- [27] 王朝阳. 西葫芦 (*Cucurbita pepo* L.) 胚珠培养技术及雄花花粉发育研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2012.
- [28] 程慧, 程永安, 张恩慧, 等. 西葫芦未授精子房离体培养的影响因素[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2013, 41(11): 100-112.
- [29] Kwack S N, Fujieda K. Somatic embryogenesis in cultured unfertilized ovules of *Cucurbita moschata* [J]. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 1988, 57: 34-42.
- [30] 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.
- [31] 翟庆慧. 南瓜未授精子房和未受精胚珠离体培养研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2009.
- [32] 陈解放. 南瓜未受精胚珠离体培养体系的优化[D]. 郑州: 河南农业大学, 2010.
- [33] 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.
- [34] Chen J F, Cui L, Malik A A, et al. In vitro haploid and dihaploid production via unfertilized ovule culture [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2011, 104(3): 311-319.
- [35] Li R B, Pandey M P. Genetic studies on vitro unpollinated ovary culture in rice [J]. Oryza, 1999, 36(1): 28-31.
- [36] San L H, Gelebart P. Production of gynogenetic haploids [M]. London: Academic Press, 1986.
- [37] 祝仲纯, 吴海珊. 从未授粉的小麦及烟草子房培养出单倍体植株[J]. 遗传学报, 1979(6): 181-183.
- [38] Martinez L E, Agüero C B, López M E, et al. Improvement of in vitro gynogenesis induction in onion (*Allium cepa* L.) using polyamines [J]. Plant Science, 2000, 156(2): 221-226.
- [39] Mukhambetzhonov S K. Culture of nonfertilized female gametophytes in vitro [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1997, 48(2): 111-119.
- [40] 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, 2009, 119(3): 246-251.
- [41] Kielkowska A, Adamus A. In vitro culture of unfertilized ovules in carrot (*Daucus carota* L.) [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2010, 102(3): 309-319.
- [42] Mohiuddin A K M, Chowdhury M K U, Abdullah Z C, et al. Influence of silver nitrate (ethylene inhibitor) on cucumber in vitro shoot regeneration [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1997, 51(1): 75-78.
- [43] 杜胜利, 韩毅科, 魏爱民, 等. 黄瓜倍性鉴定方法的研究[J]. 园艺学报, 2002, 29(3): 280-281.
- [44] 韩毅科, 杜胜利, 魏爱民, 等. 利用未授精子房培养技术育成黄瓜新品种‘津美3号’[J]. 园艺学报, 2010, 37(3): 509-510.

Research Progress on Obtaining *Cucurbita*'s Haploid Through Unpollinated Ovary Culture

SUN Peng-peng^{1,2}, LIU Tao^{1,2}, SHEN Hong^{1,2}, SUN Jin^{1,2,3}

(1. Facility Horticulture Institute, Nanjing Agricultural University (Suqian), Suqian, Jiangsu 223800; 2. Facility Horticulture Institute of Suqian, Suqian, Jiangsu 223800; 3. Horticultural College of Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095)

Abstract: In order to promote the pumpkin haploid breeding, the female gametophyte formation process, and then *in vitro* culture of unfertilized ovaries of *Cucurbita* vegetables were reviewed, the factors affecting of culture *in vitro* of unfertilized ovaries, the method of regeneration's plant ploidy identification and haploid doubling were analyzed, then the current problems and the development prospects of unpollinated ovary *in vitro* culture of *Cucurbita* vegetables were presented.

Keywords: *Cucurbita* vegetables; unpollinated ovary; *in vitro* culture; haploid plants