

Y1799781

华中农业大学学位论文独创性声明及使用授权书

学位论文 是否保密	否	如需保密, 解密时间	年 月 日
独创性声明			
<p>本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知, 除了文中特别加以标注和致谢的地方外, 论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果, 也不包含为获得华中农业大学或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料, 指导教师对此进行了审定。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中做了明确的说明, 并表示了谢意。</p>			
研究生签名: <u>刘晓东</u>		时间: 2010 年 5 月 16 日	
学位论文使用授权书			
<p>本人完全了解华中农业大学关于保存、使用学位论文的规定, 即学生必须按照学校要求提交学位论文的印刷本和电子版本; 学校有权保存提交论文的印刷版和电子版, 并提供目录检索和阅览服务, 可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。本人同意华中农业大学可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容, 同时本人保留在其他媒体发表论文的权力。</p>			
<p>注: 保密学位论文(即涉及技术秘密、商业秘密或申请专利等潜在需要提交保密的论文)在解密后适用于本授权书。</p>			
学位论文作者签名: <u>刘晓东</u>		导师签名: <u>向红阳</u>	
签名日期: 2010 年 5 月 16 日		签名日期: 2010 年 5 月 17 日	

注: 请将本表直接装订在学位论文的扉页和目录之间



目 录

摘要	1
ABSTRACT	2
缩略语表	4
1 前 言	5
1.1 课题的提出	5
1.2 国内外研究进展	7
1.2.1 供体植株的基因型	11
1.2.2 接种时未受精子房和胚珠的发育时期（胚囊成熟度）	11
1.2.3 培养基对未受精子房和胚珠离体培养的影响	12
1.2.4 培养条件对未受精子房和胚珠的影响	14
1.2.5 供体植株的生理状态对未受精子房和胚珠的影响	15
1.2.6 单倍体植株倍性鉴定方法	15
1.2.7 再生胚囊植株的倍性水平	16
1.2.8 单倍体植株加倍的研究	16
2 本论文研究目的和内容	17
3 材料与方法	18
3.1 材料	18
3.2 方法	18
3.2.1 苦瓜花粉灭活处理	18
3.2.2 花粉活力检测	19
3.2.3 利用葫芦科近缘属花粉对苦瓜雌花进行蒙导法处理	19
3.2.4 甲苯胺蓝、马来酰肼、二甲基亚砜处理苦瓜雌花	19
3.2.5 苦瓜未受精胚珠的准备	19
3.2.6 接种外植体的灭菌准备	20
3.2.7 苦瓜处理后子房在不同激素和添加剂配比下的诱导培养	20
3.2.8 苦瓜未受精胚珠的预培养	21

3.2.9 苦瓜未受精胚珠的在不同激素和添加剂配比的诱导培养.....	21
3.2.10 数据处理.....	21
4 结果与分析.....	24
4.1 苦瓜花粉灭活处理结果	24
4.2 葫芦科近缘属花粉对苦瓜雌花进行蒙导处理结果分析	29
4.3 甲苯胺蓝、马来酰肼、二甲基亚砜处理苦瓜雌花结果分析	33
4.4 外植体灭菌处理结果	37
4.5 苦瓜处理后子房在不同激素和添加剂配比下的诱导培养	37
4.6 苦瓜未受精胚珠在不同激素和添加剂配比下的诱导培养	39
5 讨论.....	43
5.1.苦瓜花粉灭活处理	43
5.2 葫芦科近缘属花粉对苦瓜雌花的影响	44
5.3 化学药剂对苦瓜子房的影响	47
5.4 灭菌试剂种类和浓度的选择	47
5.5 热激对苦瓜未受精胚珠的影响	48
5.6 基因型的影响	48
5.7 生长激素的影响	48
5.8 AgNO ₃ 对外植体分化的影响	49
5.9 诱导苦瓜单倍体的潜在途径	49
参考文献.....	50
致 谢.....	56

摘要

苦瓜 (*Momordica charantia* L.) 作为一种药食兼用的保健蔬菜, 近年来受到消费者的青睐。随着人们对苦瓜需求的增加, 对其育种目标提出了多元化的要求。然而, 常规遗传育种方法存在育种周期长、难度大等问题, 严重制约苦瓜的育种进程。而单倍体育种可以加快优良自交系的选育, 显著提高育种速度。

本研究以两种不同基因型的苦瓜品种 Z-1-4×132-3-1、“翠妃”为实验材料, 分析了花粉蒙导、化学药剂处理和未授粉子房离体培养等方法, 对苦瓜单倍体诱导的影响, 初步获得了如下结果:

(1) 用外源花粉对苦瓜子房进行蒙导法处理时, 普通丝瓜 (*Luffa cylindrica* roem.) 的花粉刺激苦瓜子房生长的效果, 要显著地优于黄瓜、冬瓜、南瓜、网纹甜瓜、瓠瓜等葫芦科作物。

(2) 用化学药剂处理苦瓜花粉时, 80-100 mg/L 的甲苯胺蓝溶液能显著地抑制苦瓜花粉正常萌发, 导致花粉管异常, 有利于刺激苦瓜子房进一步发育。1%-2%二甲基亚砜溶液能刺激 30%的苦瓜子房进一步生长, 但难以形成商品瓜。

(3) 比较了不同方法对苦瓜子房外植体的灭菌效果, 结果表明用 3%次氯酸钠溶液灭菌 10 min 的效果最好。此外, 秋季的灭菌时间应短于春、夏季。

(4) 取苦瓜雌花开放前 12 个小时的未受精子房作为外植体, 苦瓜子房块在含有 1.0 mg/L 6BA, 1.0 mg/L NAA 的 MS 培养基中时, 随着 AgNO_3 浓度上升, 能较快形成愈伤组织, 以 5 mg/L AgNO_3 最高, 愈伤率达到 90%以上。翠妃苦瓜子房对激素的敏感性大于 Z-1-4×132-3-1。

(5) 取苦瓜雌花开放前 12 个小时的未受精胚珠作为外植体, 接种在 1/2MS 预培养基上, 35 ℃黑暗条件下热激 4 d, 胚珠明显膨大生长。将其转接至 NAA 浓度为 0.5 mg/L、6BA 浓度为 1 mg/L、2, 4-D 浓度为 4 mg/L 的 MS 培养基上培养, 获得的愈伤率最高, 达到 71%。CPPU 对苦瓜未授粉子房没有明显刺激效应。

关键词: 苦瓜 (*Momordica charantia* L.); 未受精胚珠; 子房; 离体培养;

Abstract

Bitter gourd (*Momordica charantia* L.) is a medical gourd vegetable, and welcomed recent years. Its consumption is increasing gradually. The breeding object of bitter gourd should be diversity-oriented to meet the market need. However, the conventional breeding process is long period and great difficulty, lead to seriously restricting the breeding progress of bitter gourd hybrid. The process would be shorter and easier obviously to choose excellent inbred line through haploid breeding.

In this study, two different genotypes of bitter gourd varieties were experimental material, named Z-1-4×132-3-1 and “cuifei”. According to analyze the effect of pollen mentor, chemical agent and in vitro to unpollinated ovary, the preliminarily research results were as follows:

(1) In pollen mentor experiment, *Luffa (Luffa cylindrica roem.)* pollen was the best foreign pollen to be spreaded on the stigma of pistillate flower of bitter gourd to stimulate the ovary's further development than cucumber, wax gourd, pumpkin, melon and bottle gourd's.

(2) The pollen germination was significantly inhibited by 80-100 mg/L toluidine blue solution because of obvious appearance of abnormal pollen tube, which might stimulate the ovary to develop further. 1%-2% DMSO solution could stimulate 30% ovary to develop further, which were difficult to form marketable fruits.

(3) Comparison to different concentration of NaClO solution and different sterilization time, the result showed that using 3% NaClO solution to sterilize 10 min was proper. In addition, the result clearly showed that the sterilization time of explants in autumn was less than in spring or summer.

(4) The explant was ovary donors which were collected 12 hours prior to anthesis. Ovary blocks of bitter gourd were induced into callus quickly in MS medium by adding 1.0 mg/L 6BA, 1.0 mg/L NAA and 1.0 mg/L-6.0 mg/L AgNO₃, and the highest callus formation frequency was around 90% when the concentration of AgNO₃ was 5 mg/L. Ovary blocks of “cuifei” were more sensitive to hormone than ones of Z-1-4×132-3-1.

(5) The unpollinated ovules were from ovary donors which were collected 12 hours prior to anthesis. They were peeled out of the ovary in the lab to be incubated on 1/2MS

pretreatment medium in 35 °C for heat shock 4 days in the dark to be enlarged obviously. Then, they were transferred into MS medium by adding 1.0 mg/L 6BA, 0.5 mg/L NAA and 4 mg/L 2, 4-D, the highest callus ratio was 71%. CPPU could not stimulate ovary blocks to form callus.

Key words: Bitter gourd (*Momordica charantia* L.); Unpollinated ovules; Ovary; *In vitro*;

缩略语表

缩写符号	中文名	英文名
MS	MS 培养基	Murashige and Skoog Medium
TDZ	N-苯基-N'-1, 2, 3-噻二唑-5-脲	Thidiazuron
6-BA	6-苄氨基嘌呤	6-Benzylamino Purine
NAA	a-萘乙酸	Naphthalene acetic acid
GA ₃	赤霉素	Gibberellin acid
IAA	吲哚乙酸	Indole-3-aceticacid
KT	激动素	Kinetin
2,4-D	2, 4-二氯苯氧乙酸	2,4-dichloro-phenoxy acetic acid
CPPU	N -(2-氯-4-吡啶基) -N' -苯基脲	N -(2-chloro -4-pyridyl) -N' -phenylurea
ZT	玉米素	Zeatin
AgNO ₃	硝酸银	Silver nitrate
DH	双单倍体	Double haploid
SAM	S-腺苷甲硫氨酸	S-adenosyl-L-methionine
DMSO	二甲基亚砜	Dimethyl sulfoxide
lx	勒克斯	Lux

1 前 言

1.1 课题的提出

单倍体植株是由 Berger 于 1921 年首先在曼陀罗 (*Datura stramonium* L.) 上发现的，从此世界各地便陆续刊发出有关植物单倍体的报道。据统计，植物科学工作者已经在 16 科 39 属 71 种植物中发现了单倍体。作物单倍体本身很少有育种价值，但一旦与常规育种有机结合，就显示出了巨大的优势，使作物育种发生了革命性的变化。通过遗传学的理论知识，我们知道单倍体仅仅具有配子的染色体数，经过染色体加倍后可以迅速获得纯合二倍体，其隐性性状能够直接的表现出来而不被显性基因掩盖。因此，通过单倍体获得纯合二倍体的育种手段在作物育种上具有非常重要的价值，尤其是对于二倍体作物的育种。其重要价值主要表现在以下几个方面（周娣等，1982；伍成厚等，2004）：

(1) 加速育种进度。首先，单倍体仅仅含有配子的染色体，其间各种隐性性状在其染色体加倍后，能够直接表现出来而不被显性性状掩盖，因此快速提高了育种的选择效率；其次，单倍体经自然或人工加倍可得到纯合二倍体，这一优势对异花授粉作物和杂交后代来说意义重大，我们知道用传统的方法获得较为纯合的材料需要较长时间，而利用单倍体技术可以大大缩短自交纯合年限，并快速获得具有优良稳定性状的自交系，从而减少育种年限，提高育种效率。

(2) 有助于远缘杂交类型的培育。因为远缘杂交时，亲本之间存在着较大的遗传差异，造成杂种 F_1 难以结实或结实率很低，并且 F_2 及其后世代易出现明显地性状分离。而利用单倍体染色体加倍的方法，就有助于保持新性状的稳定，进而培育出纯合的新类型。

(3) 物种进化研究。应用单倍体材料可查明其原始亲本染色体组的构成，单倍体植物减数分裂时，能够说明有无同源染色体和染色体组参与。假如，在减数分裂期发现大量的 II 价染色体，同时单倍体植株表现出高度可育性，说明核内有相同的染色体组，产生此单倍体植物的相应的二倍体类型起源于多倍体。另外通过对单倍体孢母细胞减数分裂时的情况来分析，可以追溯各个染色体组之间是否有同源或部分同源的关系。这对利用 DH 群体进行 RAPD、RFLP 或 AFLP 分析物种之间的亲缘关系和物种进化有着重要的意义 (Graner et al, 1991; Maheswaran et al, 1997)。

(4) 构建连锁图谱。为构建 RFLP 和 AFLP 连锁图，需要建立合适的作图群体。作图群体大致分为四类：(a) 基于杂交产生的 F_2 群体；(b) 回交群体 (Backcross, BC)；(c) 重组近交系群体 (Recombinant Inbred Lines, RI)；(d) 双单倍体 (Double Haploid, DH) 群体。DH 群体的性质与 RI 相似，具有多方面优点：DH 群体代表着一个永久性的群体，因为所有的等位基因都是固定的，可以无限地用于新标记的作图，并可在研究小组之间共享；DH 群体可以重复进行检验，特别适合于抗性等数量性状的分析；其分子标记基因型可以从自交产生的 10-20 个植株的混合样品加以准确的分析。更为主要的是某些作物构建 DH 群体比 RI 群体更省时。诸如景蕊莲等 (1999) 构建小麦 QTL 遗传图谱利用花药培养创建小麦 DH 群体。将 DH 应用于分子生物学和基因工程领域，特别是应用于 QTL 定位、构建作物分子遗传图谱和筛选植物功能基因等方面时，能极大地方便研究人员的实验进程。

(5) 作为外源基因转化的受体。利用单倍体植株的原生质体、细胞和组织作为外源基因的转化受体，有利于外源基因，尤其是隐性基因的整合和表达。对转基因单倍体的染色体进行加倍，可以避免转导的外源基因丢失。综上可见，单倍体育种技术具有非常重要的理论和实践意义。

但是在自然界中植物自发产生单倍体的频率极低，因而极大地限制了育种工作者对单倍体的探索和利用。为此植物工作者们一直在努力尝试各种方法来提高植物单倍体的诱导频率，这些方法大致可分成以下两类：

(1) 植物活体诱导，即人们利用各种物理、化学以及生物的技术手段来刺激植物活体以诱导单倍体；

(2) 植物离体诱导，活体诱导虽然已经取得不少的经验，但至今还不能提供一种较为通用的方法。随着实验胚胎学的兴起，使得离体诱导研究逐渐得到植物工作者的重视和青睐，并日渐成为了主流的实验方法。植物体外研究可以摆脱整体植株空间上的制约，注重局部对象的研究，提供较自然且更为稳定的实验条件，能有针对性地研究条件因素对单倍体发育的影响，更有效地引进新的实验技术，能促进外植体发育朝着预期的方向进行。

目前，通过人工获得单倍体的方法有四种：1、花药和花粉培养；2、未受精子房和胚珠培养；3、远缘杂交亲本染色体消除法；4、辐射花粉结合胚抢救。其中，以花粉和花药培养的研究最广泛也最成功。

作为诱导植物单倍体的一条途径，未受精子房和胚珠的离体培养与花粉和花药的离体培养具有同样重要的价值和意义。但是由于技术上的原因，未受精子房和胚

珠离体培养的研究和利用程度不及花粉和花药培养。即便如此，前人的实验证明未受精子房和胚珠的离体培养诱导单倍体途径具有其不可替代的优势（周端等 1982；王文和，2005）：

(1)至今，有较多作物的花药和花粉培养很难成功或者其诱导单倍体频率太低，未受精子房和胚珠离体培养可能提供另一条有效的单倍体诱导途径，如葫芦科、百合科等作物；

(2)雄性不育植物的单倍体培养；

(3)对于禾本科植物，用花药和花粉培养诱导出的单倍体的白化苗率通常很高，未受精子房和胚珠诱导则可获得较多绿色苗；

(4)在某些植物中花粉和花药植株表现出明显的倍性和性状变异，未受精子房和胚珠离体培养可能提供一条获得较为稳定后代的途径。

此外，未受精子房和胚珠的离体培养可以为研究胚囊单倍体细胞自发成胚的发育机理建立一个良好的离体体系。

1.2 国内外研究进展

离体培养未受精子房和胚珠是为了诱导植物雌核离体发育，而植物雌核离体发育的目的就是产生单倍体（Haploid）、自然加倍或人工加倍的双单倍体以及多倍体与非整倍体植株，我们把这三类植株统称为胚囊植株，胚囊植株在植物遗传学以及作物育种实践中具有很高的研究和利用价值。

早在二十世纪五十年代植物学家和育种家就开始了对未受精子房和胚珠离体培养的探索，尝试着以此找到一条获得单倍体的新途径，然而没有成功（周端等，1982）。二十世纪六十年代，Tulecke（1964）通过银杏（*Ginkgo biloba*）未受精雌配子的离体培养，获得了单倍体的愈伤组织，但是没有分化出植株。Nishi 和 Mitsuoka（1969）在对水稻（*Oryza sativa*）未受精子房的离体培养中获得了二倍体和四倍体植株，但是没有获得单倍体植株。Uchimiya 等（1971）通过对玉米（*Zea mays*）未受精子房和茄子（*Solanum melongena*）未受精胚珠的离体培养诱导出了愈伤组织，而且观察到愈伤组织中有单倍体细胞的分裂，从而证明了通过未受精雌配子体的离体培养诱导单倍体植株是可行的。San Noeum（1976）利用大麦（*Hordeum vulgare*）未受精子房首次诱导出单倍体植株，并开创性的提出了“离体雌核发育”（*in vitro gynogenesis*）的概念。此后，国内的植株科学工作者利用烟草（*Nicotiana tabacum*）

和小麦 (*Triticum sativum*) 的未受精子房诱导出了单倍体植株 (祝仲纯等, 1979), 以后相关的报道逐渐增多。

从所查的文献报道来看, 国内相关的研究工作主要集中在二十世纪八十年代, 涉及的作物主要有水稻、小麦、大麦、玉米、向日葵、烟草、非洲菊、百合、韭菜等作物, 而且获得了这些作物的单倍体及双单倍体胚囊植株。这些研究所涉及的内容主要包括未受精胚珠和子房离体培养以及再生体系的建立, 各种因素对诱导频率的影响能力, 再生植株的倍性鉴定方法及其发育起源的研究等, 并对国内外的相关研究进展做出了综述报道 (周端等, 1982)。这些研究工作有力的推动了国内的单倍体研究发展, 其中很多的研究结果还为国外的相关研究提供了重要的参考。进入二十世纪九十年代以后, 相关的报道却逐渐减少。近几年来, 人们对于农作物新品种的需求在日趋增长, 丰富种质资源、选育符合各种消费环境的农作物新品种成为了当务之急。随着科学技术的发展, 作物育种技术水平也得到了飞速发展, 尤其是分子标记技术在遗传育种研究中的广泛应用, 使得单倍体诱导研究在国内再一次兴起。其中, 在黄瓜未受精子房的离体培养研究上取得了重大突破 (杜胜利, 2001), 并已将研究成果成功地应用到黄瓜的新品种选育上。

在这方面的研究上, 国外学者的研究与国内情况相异, 从二十世纪九十年代到二十一世纪初的一些文献报道中可以看出, 国外的研究主要集中在探索并完善未受精子房和胚珠离体培养单倍体途径上, 而且很多研究工作已经进入到寻找再生胚囊植株农艺性状遗传规律的阶段, 其中有些研究成果转化到了育种实践中。表 (1) 是未受精子房或胚珠培养已获单倍体的物种。

表 1 未受精子房或胚珠培养已获单倍体植株的物种

Table 1 The species of haploid plants obtained by cultured unpollinated ovaries or ovules

科名 Families	植物种名 Plant species	外植体 Explants	参考文献 References
禾本科	<i>Hordeum vulgare</i> L.	子房	Castillo et al., 1993
	<i>H.vulgarevar.mudum</i>	子房	谷祝平和郑国锠, 1984
	<i>Eragrostis tef</i>	子房	Gugsa et al., 2006
	<i>Triticum durum</i> Desf.	子房	Olfa et al., 2007
	<i>Oryza sativa</i> L.	子房	Li et al., 1998
	<i>Zea mays</i>	子房	敖光明等, 1982
茄科	<i>Nicotiana tabacum</i>	子房	祝仲纯和吴海珊, 1979
	<i>Hyoscyamus muticus</i> L.	子房	Chand et al., 1998
	<i>Nicotiana rustica</i>	子房	吴伯骥和郑国锠, 1982
	<i>Petunia axillaris</i>	胚珠	Deverna and Collins, 1984
	<i>P.hybrida</i>	子房	Raquin, 1985
	<i>Solanum tuberosum</i>	子房	陶自荣等, 1985
葫芦科	<i>Cucubita pepo</i> L.	胚珠	Gemesne et al., 1997; Metwally et al., 1998; 陈学军等, 2000; 谢冰等, 2006; Tarek et al., 2007
	<i>C.pepocon var.</i>	子房	Gemesne et al., 1997
	<i>Cucumis melo</i> L.	胚珠	Ficcadenti et al., 1999; 韩丽华等 2004
	<i>C.sativus</i> L.	子房	Gemesne et al., 1997; 杜胜利等, 2001; Gemes-Juhasz et al., 2002
	<i>Allium tuberosum</i>	子房	田惠桥和杨弘远, 1989
	<i>A.cepa</i> L.	子房	Campion et al., 1990; Endang et al., 2002
菊科	<i>Gerbera jamesonii</i>	胚珠	Sitbon, 1981
	<i>Helianthus annuus</i>	胚珠	闫华等, 1987
杨柳科	<i>Populus ×simonigra</i>	子房	吴克贤和徐苗珍, 1984
蓼科	<i>Beta vulgaris</i> L.	子房	Gurel et al., 2000
大戟科	<i>Heveabrasiliensis</i>	胚珠	陈正华等, 1985
豆科	<i>Psoralea Corylifolia</i>	子房	Chand et al., 2007
石竹科	<i>Melandrium album</i>	子房	Mol, 1992
十字花科	<i>Arabidopsis thaliana</i> var. <i>Columbia</i>	胚珠	Rojek et al., 2005
		子房	
紫菀科	<i>Guizotia abyssinica</i>	子房	Bhat, 2007
蔷薇科	<i>Fragaria ananassa</i>	子房	王文和, 2001
	<i>F.virginiana</i>	子房	王文和, 2001

从文献报道中可以发现研究多集中在禾本科、百合科、葫芦科、茄科以及菊科，其中以禾本科的研究最多。在水稻（周端等, 1983; Li, 1998）和非洲菊（*Gerbera jamesonii*）（Meynet et al., 1984）的未受精子房和胚珠的离体诱导单倍体中已分别建立起可重复的培养流程。而且 Li (1999) 对水稻未受精子房获得的单倍体植株的某

些农艺性状进行了遗传学分析。Bohanec (2001) 对洋葱未受精子房培养发育来的株系进行了 RAPD 分析, 证明了再生植株的基因型是稳定的, Serik (1997) 报道了未受精子房和胚珠诱导获得的单倍体植株已经应用在水稻、甜菜、洋葱和非洲菊的育种上。对于甜瓜的未受精子房和胚珠的离体培养, 最早是 Ficcadenti (1999) 获得成功, 得到了单倍体, 其次是 Lotifi 等 (2003) 采用 Ficcadenti 的诱导方法获得了三棵幼苗, 但是还未来得及鉴定就死亡了, 最后是韩丽华等 (2004) 获得了 6 棵胚囊植株, 而且鉴定有单倍体植株。未受精子房和胚珠离体培养的研究开辟了另一条单倍体育种途径, 这为作物育种开创了新的研究领域, 并且随着实验生殖细胞学的兴起, 也为研究雌核发育和开展植物遗传工程提供了良好的平台。

纵观国内外的相关报道, 未受精子房和胚珠离体培养的研究主要集中在以下几个方面: (1) 建立可重复的离体培养体系; (2) 探索人工诱导单倍体的影响因素; (3) 再生胚囊植株的倍性鉴定; (4) 研究再生胚囊植株的发育起源; (5) 单倍体胚囊植株的人工加倍方法; (6) DH 群体的农艺性状分析以及和亲本的性状比较。

离体雌核诱导单倍体的育种途径应用的关键技术就是能否有效的提高再生胚囊植株的诱导频率, 因此, 深入研究植物离体雌核发育机理非常重要。但是, 目前这方面的文献很少, 报道的也只是植物工作者的一些推测, 还得不到证实。因为, 影响离体雌核发育的因素太多, 而且难以控制胚囊发育的同步性, 所以很难调控雌核的发育动向, 同时很难控制雌核朝着指定的方向发育。反过来, 未受精子房和胚珠培养可以提供一个半离体的手段对胚囊的发育进行远比过去深入细致的研究(周端, 1982)。为了更好的将相关的研究成果应用到遗传学和育种的研究实践中, 植物工作者应进一步开展基础性研究, 深入组织、器官、细胞以及分子水平对植物离体雌核发育的机理进行研究。

综合未受精子房和胚珠离体培养研究的文献资料后, 我们发现, 影响未受精子房和胚珠培养的因素有很多, 包括供体植株的基因型、未受精子房和胚珠的发育时期即胚囊细胞的发育时期、基本培养基类型、供体植株的栽培季节、外植体培养前的预处理、外植体的接种方式、培养方式、以及培养条件等, 其中培养条件又包括激素组成、pH 值、外源添加物等。但是, 这些影响因素并不是独立存在的, 往往实验结果受到多个实验因素的影响。下面就关于各种影响未受精子房和胚珠离体诱导单倍体的因素作进一步研究。

1.2.1 供体植株的基因型

和其他的组织培养一样，在未受精子房和胚珠的离体培养中，诱导成功与否以及诱导频率高低均受到基因型的明显影响，在水稻的未受精子房和胚珠培养中，周端等（1983）发现粳稻胚囊愈伤组织的诱导频率最高，其次是籼稻。Li 等（1999）在对 11 个水稻品种进行未受精子房培养时发现基因型导致愈伤组织的诱导频率在 0.8% 到 12.5% 之间变动。在对非洲菊 (*Gerbera jamesonii*) (Miyoshi, 1996) 的 17 个基因型未受精子房培养中，有 4 个基因型没有产生愈伤组织。Gemes-Juhasz 等(2002) 在对 5 个黄瓜品种进行未受精子房培养得到的单倍体植株诱导频率最高的为 18.4%，最低的为 7.1%。谢冰等（2005）发现基因型对西葫芦胚状体的诱导有很大的影响，在对小油菊 (*Guizotia abyssinica L.*) 未受精子房离体培养中，Bhat (2007) 发现胚状体的诱导频率从 2.5% 到 12.5% 不等。Tarek (2007) 在对 12 个西葫芦品种的未受精胚珠离体培养时也发现了基因型是一个关键的因素，子房的反应率从 0 到 48.8% 不等。而在甜菜 (Marylise, 1989) 的未受精子房离体培养中发现基因型只有在特定的培养基条件下才产生明显的影响。另外，在草莓（王文和，2001），向日葵（阎华等，1988）等作物上也发现了基因型的影响。以上的文献报道表明，基因型对未受精子房和胚珠离体培养单倍体具有很大的影响。因此，我们在探索培养条件时应根据不同的基因型做出相应的调整，并深入到细胞和分子水平探索基因型影响的机理。

1.2.2 接种时未受精子房和胚珠的发育时期（胚囊成熟度）

Gemes-Juhasz 等 (2002) 在研究黄瓜未受精子房离体培养时选取开花前 3 天，开花前 6 个小时，以及开花当天的子房为实验材料，结果表明：只有开花前 6 个小时的胚珠经过 6-12 周的培养能得到胚状体，其他的时期的子房则不能诱导出胚状体。韩丽华等（2004）在甜瓜未受精胚珠离体培养中依据前人的研究成果，采取的样品是开花前 14 h 的子房，并诱导成功获得了单倍体植株和其他胚囊植株，此时胚囊处于接近成熟胚囊的状态。而谢冰等（2005）在对西葫芦未受精胚珠离体培养研究中发现，接种时胚珠的发育时期是西葫芦离体雌核发育的关键因素，其作用大于培养基与供体基因型的效应，其结果表明：开花当日的胚珠平均诱导率最高为 15.1%，其次是开花前一日的胚珠为 13.2%，诱导率最低的是开花后一日的胚珠为 0.9%。开花当日的胚囊为成熟胚囊，开花前一日的胚囊为接近成熟的胚囊。Bhat (2007) 在小油菊的研究上也得出了类似的结论：在开花当天和开花前一天采的子房能出胚，而开花前两三天的花不能出胚。从以上文献中可以看出，对于葫芦科的作物，成熟

胚囊或接近成熟的胚囊比较容易诱导成功或者诱导的频率较高。因此，选择合适的胚囊成熟度对实验的成功与否起着重要的作用。

1.2.3 培养基对未受精子房和胚珠离体培养的影响

在植物组织培养中，培养基为外植体的生长发育提供了所需的营养物资，所以培养基对外植体的培养起着至关重要的作用。而培养基的影响除了其自身的形态外，还包括其所含的其他成分：基本培养基组成、添加的各种外源激素的种类和浓度、碳源种类和浓度、pH 值、琼脂以及其他有机无机成分（表 2）。任何一个因素的改变都可能会对实验结果造成很大的影响，但是这些因素又是一个整体，对外植体生长发育的影响是综合的效应。而每一种实验材料都有其最适合的培养基，很难找到一种较为通用的培养基，因此在具体的实验过程中，我们需要针对不同的培养材料，筛选出各自适合的培养基，这需要大量的工作。

表 2 未受精子房和胚珠离体培养所用的培养基
Table 2 The medium of in vitro culture unpollinated ovaries and ovules

种名 Species	基本培养基 Basal medium	添加物 Additional components	参考文献 Reference
<i>Guizotia abyssinica</i> (L.f.)Cass.	MS	2.0μm2, 4-D+1.0μmKT+30g/L 蔗糖	Bhat et al.,2007
<i>Eragrostis tef</i>	MS,L3	9.2μm2, 4-D+8.9μmBAP	Gugsa et al.,2006
<i>Arabidopsis thaliana</i>	MS	2mg/LBAP+0.1mg/LNAA+60g/L 蔗糖	Rojek et al.,2005
<i>Allium cepa</i>	B5	2.0mg/L2,4-D+2.0mg/L6-BA+7.5% 蔗糖	Endang et al.,2003
<i>Beta vulgaris</i>	MS	1.0-2.0mg/LBAP+10%蔗糖 1.0-2.0mg/L2,4-D+1.0mg/LNAA+0.	Gurel et al.,2000
<i>Triticum durum</i> Desf.	改良 MS	5-1.0mg/LKLT+0.1mg/LIPA+30g/L 蔗糖+60g/L 麦芽糖	Olfa et al.,2007
<i>Hyoscyamus muticus</i>	MS,BN	0.05mg/LNAA+0.5mg/L6-BA	Chand et al.,1998
<i>Psoralea corylifolia</i>	MS	2.2μm6-BA+4.3μmGA3+3.0-6.0% 蔗糖或者麦芽糖	Chand et al.,2005
<i>Oryza sativa</i>	N6	0.25mg/LNAA+0.5mg/LIAA+2.0mg/LKLT	Li et al., 1998
<i>Cucumis sativus</i>	CBM	0.02mg/LTDZ+0.05mg/LNAA+0.2mg/L6-BA+3%蔗糖	Genes-Juhasz et al.,2002
<i>Hordeum vulgare</i>	N6	0.6μmCPA+2.8μmIAA+4.4μm6-BA+80g/L 蔗糖	Castillo et al.,1993
<i>Cucurbita pepo</i>	MS	1or5mg/L2,4-D+30g/L 蔗糖	Metwally et al.,1998
<i>Cucurbita pepo</i>	N6	2.4-D+NAA+BA+3%蔗糖	谢冰, 2006
<i>Cucumis melo</i>	CBM		韩丽华, 2004
<i>Hevea brasiliensis</i> Muell.-Arg.	改良 MB	1mg/L2,4-D+1.2mg/LKLT	杨晓泉, 1997
<i>Allium tuberosum</i>	MS	0-2mg/LZT+0-0.4mg/L MCPA	田惠桥, 1989

1.2.3.1 基本培养基对未受精子房和胚珠离体培养的影响

对于未受精子房和胚珠的离体培养，常用的基本培养基有 MS、N6、B5、CBM 等，或以这些培养基为基础的改良培养基，其中又以 MS 培养基应用得最为广泛。

1.2.3.2 外源激素对未受精子房和胚珠离体培养的影响

从表 2 中可以看出，每个成功的未受精子房和胚珠离体培养试验都添加了外源激素，外源激素的种类和浓度均对未受精子房和胚珠离体培养起着至关重要的作用，所用的外源激素种类有：IAA、NAA、6-BA、KT、GA₃、TDZ、BAP、MCPA 等，在水稻的未受精子房的研究中，周娟等（1981）发现，外源激素的浓度对促进雌核发育、防止体细胞增生起着关键的作用，不加外源激素的培养基很难启动雌核发育，而且增加外源激素的浓度有利于未受精子房的生长，但较低的激素浓度更利于雌核发育，过高的外源激素容易导致体细胞的愈伤化。王文和（2001）在对草莓的未受精子房的离体培养的研究中发现，2, 4-D 是成功诱导所必需的外源激素，当 2, 4-D 浓度小于 2.0 mg/L 时，诱导效果随 2, 4-D 浓度增大而增大，2, 4-D 浓度为 2 mg/L 时诱导频率最高。而添加 KT 和 BA 等细胞分裂素类物质则对雌核的发育有抑制作用并促进体细胞愈伤组织的增生，对诱导不利。在很多作物中，TDZ 是一种应用很广泛的外源激素，尤其是在葫芦科作物的未受精子房和胚珠的离体培养中，如黄瓜（Gemes-Juhasz et al., 2002; Diao et al., 2009）、甜瓜（韩丽华等，2004）。众多的文献资料说明，植物的雌核发育需要外源激素的刺激，但是外源激素的种类和浓度又依据外植体的种类的不同而不同，而且不同的外源激素种类和浓度对刺激雌核发育和体细胞增生两方面都有影响。

1.2.3.3 碳源的浓度和种类对未受精子房和胚珠离体的影响

从表（2）可以发现蔗糖是未受精子房和胚珠离体培养的常用碳源，使用浓度因作物的种类而异，蔗糖浓度从 3% 到 10% 不等。Tarek et al. (2007) 在西葫芦未受精胚珠的离体培养中比较了 30、60、90 g/L 三个蔗糖浓度的效应，发现 30 g/L 的蔗糖浓度是最佳浓度，而 90 g/L 的蔗糖浓度没有诱导出胚囊植株。除作为碳源外，蔗糖还通过调节培养基中的渗透压来影响胚状体的诱导。对于其他的碳源，麦芽糖也可以作为一种碳源应用在试验中，而且其效果优于蔗糖。Olfa et al. (2007) 在 *Triticum durum* Desf. 未受精子房的研究中发现，麦芽糖能提高反应的子房发生率。S Chand et al. (2007) 在对 *Psoralea corylifolia* 未受精子房的培养研究中也发现了类似的现象，

在比较 3.0%、4.0%、5.0%、6.0% 的蔗糖和麦芽糖浓度的影响时发现：胚状体诱导率在各种浓度的麦芽糖培养下均高于蔗糖，其中麦芽糖浓度为 5.0% 时胚状体的诱导率最高，可能原因是麦芽糖可以直接被外植体吸收利用，而蔗糖需要水解成单糖才能被吸收利用。因此，在选择碳源时，不仅要考虑碳源的浓度，也要考虑到碳源的种类。

1.2.4 培养条件对未受精子房和胚珠的影响

1.2.4.1 接种方式的影响

从所查的文献报道中可以发现，大部分的未受精子房和胚珠都是在固体培养基中进行的。在固体培养基上，外植体的摆放具有随机性，有的是因为不同的作物特异的外植体形状而摆放不同，有的是因为外植体的切分方式不同而不同。西葫芦是将未受精胚珠平放在培养基上（谢冰等，2006），草莓是将未受精子房直插在培养基中（王文和，2001），黄瓜是切 2 mm-3 mm 厚的子房薄片平放接种（杜胜利，2001；Diao et al., 2009），或者分离出的胎座平放在培养基上接种（Gemes-Juhasz et al., 2002），甜瓜也是将分离出的胎座平放着接种在培养基上（韩丽华等，2004；王林，2009）。苦瓜也是将子房、胎座或者未受精胚珠平放在培养基上（杨满业，2003；宋莉英，2004）。

1.2.4.2 预处理对未受精子房和胚珠的影响

低温和热激是两种常用的预处理方式，很多实验表明，这两种方式对未受精子房和胚珠的离体培养有一定的促进作用，但其作用机理尚不明确。Gemes-Juhasz et al. (2002) 在研究黄瓜未受精子房离体培养时比较了 24 °C、28 °C、35 °C 三个温度的影响，发现胚状体的诱导率在 35 °C 的热激条件最高为 18.4%。陈小鹏等 (2005) 也证明了 35 °C 热激处理是黄瓜胚状体诱导的最佳温度。Diao et al. (2009) 在黄瓜也证明了 35 °C 热激能提高胚的诱导率，而且 3 d 的要好于 2 d 和 4 d 的热激。韩丽华等 (2004) 在厚皮甜瓜未受精胚珠离体培养时也进行了 35°C 的热激。Tarek et al. (2007) 在西葫芦未受精胚珠的离体培养发现：32 °C 条件下热激 4 d 效果最好。Gurel et al. (2000) 在研究甜菜未受精子房离体培养发现：4 °C 低温处理 5 d 能提高胚的诱导率。Olfa et al. (2007) 在小麦上也发现了 4 °C 低温处理有利于有用的愈伤组织的形成和单倍体植株的形成。但也有实验表明 4 °C 低温并没有增加胚的诱导率，反而降低了胚的诱导率 (Bhat et al., 2007)。所以，低温和热激的选择也依据作物的不同而不同。

1.2.4.3 其他有机和无机添加物对未受精子房和胚珠的影响

AgNO_3 是一种常用的化学诱雄剂，能抑制乙烯的活性，而且可以通过促进多胺的合成来提高体细胞胚的发生频率。韩丽华等（2004）的研究发现在诱导培养基中添加 80 mg/L 的 AgNO_3 时，甜瓜未受精子房的出胚率最高。但是 Diao et al. (2009) 在黄瓜未受精胚珠离体培养的研究中却发现 AgNO_3 对胚的诱导没有显著影响，Gurel et al. (2000) 在对甜菜未受精子房离体培养的研究中发现 AgNO_3 浓度为 2.5 mg/L 时降低胚的诱导率，5.0 mg/L 时抑制胚的诱导率，而 0.5% 的活性炭能提高胚的诱导率，但是 Geyt et al. (1986) 在甜菜上却发现 0.5% 的活性炭抑制了愈伤组织的诱导。由这些文献我们可以看出，同种添加物在不同的实验材料上产生了不同的效果，乃至相反的效果，所以对于不同的作物，我们需要对添加物种类和浓度进行系统的比较实验，不可盲目添加。

1.2.5 供体植株的生理状态对未受精子房和胚珠的影响

供体植株的生理状态由植株所处的生长环境决定，包括温度、光照、营养状况以及环境胁迫等条件。Marylise et al. (1989) 在研究甜菜的雌核发育时发现 6 月的材料要优于夏季其他月份的材料。王文和 (2001) 在做草莓的未受精子房离体培养的研究时发现，草莓各种生长环境中诱导率最高的是春季露地苗一级花蕾，依次为春季露地苗二级花蕾、保护地苗一级花蕾和保护地苗二级花蕾。Tarek et al. (2007) 在比较西葫芦第一、二、三节位雌花的效应后发现：第二节的雌花诱导频率最高，并且夏季生长的雌花效果更好。Puddephat et al. (1999) 在洋葱的未受精胚珠的离体培养中发现：生长在 15 °C 条件下生长的材料的胚的诱导率是 10 °C 和温室正常生长的 10 倍。Sibi et al. (2001) 在小麦的研究中发现夏季是未受精子房离体培养的最佳季节。韩丽华等 (2004) 的甜瓜实验证明了秋季材料的诱导率比春季好。

除了以上所说综述的几项影响因素之外，对未受精子房和胚珠离体培养有影响的因素还包括培养温度、光照时间、pH 值、琼脂浓度以及添加复合物等因素。

1.2.6 单倍体植株倍性鉴定方法

在得到单倍体植株后，在应用之前，我们需要对其进行倍性鉴定，目前，植物倍性鉴定方法包括直接途径和间接途径。其中，直接途径有体细胞染色体计数和流式细胞术；间接途径包括植株性状观察、叶片气孔保卫细胞叶绿体数目、气孔密度、气孔大小、花粉粒的性状等的观察。杜胜利等 (2002) 在研究黄瓜倍性鉴定方法时

得到的结论是：体细胞染色体计数法是最可靠的直接方法。流式细胞术是在二十世纪七十年代发展起来的一种新的分析技术，利用此技术可以快速测定细胞核中 DNA 的含量，是一种操作简便、迅速、准确度也较高的倍性鉴定方法。但是若植株已经自然加倍，那么这两种方法又是不完全的，还必须对该植株的自交后代性状的具体表现进行鉴定，才能确定其倍性以及是否纯合。

1.2.7 再生胚囊植株的倍性水平

由植物雌核发育获得的胚囊植株其来源可以由植物的每一个或几个胚囊成员细胞发育而来，这就说明了胚囊植株群体并非都是单倍体群体，而是由单倍体、双单倍体、多倍体以及混倍体所组成的复杂群体。对于植物遗传学研究和应用育种来说，每一种类型都有其很高的利用价值。Miyoshi et al. (1996) 在鉴定 *Gerbera jamesonii* 的愈伤组织时得到了 80.4% 的单倍体愈伤组织，15.2% 的双单倍体愈伤组织，4.3% 混倍体愈伤组织。Chand et al. (1998) 在 *Hyoscyamus muticus* 获得的胚囊植物群中发现单倍体占 25%，二倍体占 35%，混倍体占 40%。Puddephat et al. (1999) 在得到的洋葱胚囊植株中发现单倍体占 68%，自然加倍的双单倍体为 23%。而二倍体占优势的胚囊植株再生体系在育种实践中更具有优势。

1.2.8 单倍体植株加倍的研究

在很多的文献报道中，得到的胚囊植株包含了一部分的 DH 群体，而这些 DH 群体属于自然加倍，也就是我们所需要的倍性。而对于单倍体植株，我们需要对其进行加倍。秋水仙素是一种常用的加倍试剂，但是其使用浓度、作用时间、作用部位以及方式对作物的加倍产生能不同的效果，刘仁祥等 (2009) 在烟草单倍体加倍效应的研究中发现：随着秋水仙素浓度的升高，加倍率呈开口向下的抛物线曲线变化趋势；加倍率与浸苗时间呈线性回归关系，加倍率随浸苗时间的延长而增加。Yetisir et al. (2003) 在研究甜瓜单倍体加倍方法时发现：用秋水仙素浸染生长点的方法最好，加倍率为 89%，是植株离体浸染和伤口浸染的 3 倍。同样是甜瓜单倍体加倍技术，薛皓等 (2008) 的研究成果表明：1 mg/L 6-BA 和 0.5% 秋水仙素+2% DMSO 对甜瓜单倍体的加倍效果较好。文科等 (2006) 在研究玉米单倍体加倍技术时比较了三种秋水仙素处理方法，浸根法、注射法和浸种法，结果表明：浸种法处理效果最好，注射法次之，浸根法最差。

2 本论文研究目的和内容

苦瓜 (*Momordica charantia* L.), 别名锦荔枝、癞葡萄、凉瓜, 是葫芦科苦瓜属一年生草本蔓生攀援植物, 其染色体数为 $2n=2x=22$ 。

它不仅具有很高的食用价值, 而且现代医学证明苦瓜含有多种药用成份, 具有多种药用功效。苦瓜作为一种药食兼用的保健蔬菜, 近年来受到广大消费者的青睐, 对苦瓜的需求也不断增加。

随着人们对苦瓜需求的增加, 不同商品生产目的对苦瓜育种目标提出了多元化的要求。苦瓜的主要育种目标为抗逆、优质和高产, 其中抗逆包括抗病育种, 耐低温弱光以及耐高温高湿等。随着苦瓜栽培方式的日益多样, 特别是各种大棚温室等保护地栽培方式的兴起, 使得苦瓜育种工作者需要培育适合各种栽培方式的品种。在传统的育种中, 苦瓜优良自交系的获得需要经过多年多代的自交选择。因此, 传统遗传育种方法存在育种周期长、难度大等问题, 严重制约苦瓜的育种进程。

单倍体技术的研究和应用将会极大地缩短育种周期, 提高育种效率。而且单倍体重要的遗传价值也将为苦瓜的遗传研究开辟广阔的前景。同时, 单倍体尤其是双单倍体与分子生物学、基因工程的密切结合, 则可更好地改良苦瓜的遗传变异, 产生更多的优良品种。从葫芦科其他作物诱导单倍体发生途径比较得出, 辐射花粉、花粉蒙导、化学药剂诱导雌核发育可能得到单倍体。

本研究以苦瓜未授粉子房和未受精胚珠为实验材料, 利用花粉蒙导、化学药剂、离体培养处理等手段, 探索诱导雌核发育并结合离体培养以获得苦瓜单倍体植株的方法, 从而建立苦瓜未受精子房和胚珠的诱导体系, 为获得大量单倍体苦瓜、构建苦瓜的遗传图谱以及分子遗传研究提供基础平台。

3 材料与方法

3.1 材料

试验材料名称及特性见表（3），其中 Z-1-4×132-3-1 由本实验室提供，“翠妃”从农友种苗武汉分公司处购买。

表 3 试验材料名称及特性
Table 3 The name and character of experimental material

代号 No.	材料名称 Name	材料特性 Character	来源 Source
A	Z-1-4×132-3-1	青皮、无刺瘤、长棒形	实验室杂交组合
B	翠妃	墨绿、刺瘤、纺锤形	农友种苗

试验材料于 2009 年 2 月 24 日播种育苗，同年 3 月 30 日定植于国家蔬菜改良中心华中分中心的大棚内，田间管理如同一般大田生产。

本实验取用开花后经过处理的子房以及未受精胚珠，所以在苦瓜的整枝上有别于普通栽培，其植株基本上留花而不坐果，采样部位从苦瓜植株第 10 节开始，主、侧蔓健壮的雌花作为样本。采样完后主、侧蔓均不打顶，6 月份以后每月进行一次整枝修剪。同时，将植株上因为昆虫授粉而开始膨大的幼瓜及时摘除，以确保其他雌花生长良好。为了解决苦瓜子房供应量的问题，通过有效的田间管理延长其种植时间，直到同年 12 月中旬罢园，为实验提供足够的材料。

3.2 方法

3.2.1 苦瓜花粉灭活处理

将试验材料的雄花未开放前进行套袋隔离处理，在其上午开花后，每天各采集 200 朵雄花带回实验室。当天选取 50 朵雄花花药做如下处理，连续如此操作一周。

- (1) 将花药放在直径 60 mm 的培养皿中，再置于烘箱中，烘箱温度为 50 ℃，连续处理三天，每天 12 小时。
- (2) 采用功率为 30 w 的紫外灯管照射花药 1-24 小时。
- (3) 使用 20-100 mg/L 甲苯胺蓝溶液浸泡苦瓜花粉一小时。
- (4) 将苦瓜花粉在室温条件下放置 1-24 小时。

3.2.2 花粉活力检测

用硼酸-蔗糖溶液法将其在黑暗条件下培养 1 小时后测定处理后的花粉活力，随机观察并记录五个视野下正常生出长度超过花粉粒直径 1/2 的花粉管的花粉粒数和该视野下的花粉粒总数，并用 Olympus CX41 显微镜连接广州明美科技公司 MD30 型 CCD 拍照存档。

花粉萌发率=正常生出长度超过花粉粒直径 1/2 的花粉管的花粉粒数/该视野下花粉粒总数×100%

花粉畸形率=花粉管畸形的花粉粒数/该视野下花粉粒总数×100%

3.2.3 利用葫芦科近缘属花粉对苦瓜雌花进行蒙导法处理

对两种试验材料第二天早上即将开放的雌花用硫酸纸袋套袋。次日早上，将当天刚刚开放的南瓜、普通丝瓜、瓠瓜、西瓜、网纹甜瓜、黄瓜花粉分别与失活的苦瓜花粉混合，将其分别涂抹在当天早上开放的雌花柱头上，重新套上纸袋，3-10 天后采下这些子房带回实验室，将花瓣和柱头轻轻剥离，用自来水连续冲洗 1 小时，再用手术刀将子房外皮削去，用蒸馏水将苦瓜子房表面冲洗干净。最后在超净工作台上用手术刀将已处理过的苦瓜子房切成 5 mm×5 mm 的小块，使之刚刚露出胚珠，一般一个小块含有 3-5 个胚珠，消毒后置于培养基上。

3.2.4 甲苯胺蓝、马来酰肼、二甲基亚砜处理苦瓜雌花

对两种试验材料第二天早上即将开放的雌花用硫酸纸袋套袋。次日早上不同浓度溶液的甲苯胺蓝、马来酰肼、二甲基亚砜对雌花柱头进行喷施。甲苯胺蓝溶液是在当天早上开放的雌花柱头涂抹上苦瓜花粉之后，再将其喷施于雌花柱头，使其完全浸没花粉 1 分钟，再套上纸袋；其他两种溶液是直接喷施在雌花柱头上后，套上纸袋，3-10 天后采下子房带回实验室备用。余下操作同 3.2.3

3.2.5 苦瓜未受精胚珠的准备

据观察，苦瓜雌花一般于上午 7 时许开放，以胚珠为培养材料的苦瓜子房在雌花开放前 12 小时采下带回实验室。将花瓣和柱头轻轻剥离，用自来水连续冲洗 1 小时，然后用手术刀将子房外皮削去，再用蒸馏水将苦瓜子房表面冲洗干净。最后在超净工作台上用手术刀将苦瓜子房切成条，以刚刚露出胚珠为佳。每条子房上含胚珠 10-20 个，放置带灭菌滤纸上，接种时用镊子挑出胚珠置于培养基上。

3.2.6 接种外植体的灭菌准备

超净工作台上紫外杀菌 30 min，再在超净工作台上用 75% 的酒精消毒 60 s。设计次氯酸钠的有效氯浓度为 2%、3%、4%、5%，设置的灭菌时间为 8 min、9 min、10 min（表 4）。灭菌试验共 12 个处理，处理编号见表（4）。每个处理 3 皿，两个品种共 72 皿。每个处理以 150 ml 烧杯为灭菌容器，每次加入 50 ml 次氯酸钠溶液。灭菌的同时不断振荡。灭菌完成后，用无菌蒸馏水清洗 3 次，每次 1 min，最后将带有胚珠的小块放在灭菌滤纸上吸干水分备用。对于灭菌试验的培养皿接种小块后，同样放置在 35 °C 的黑暗条件下热激 4 d，然后放在正常的培养条件下（光强为 2000 lx，光照时间为 14 h）培养，两周后观察其污染率。污染率=污染的培养皿数/接种的培养皿数×100%，在正式试验之前完成。

表 4 不同的灭菌处理方案

Table 4 Different treatments of sterilization

处理时间 (min) Treatment time (min)	2%次氯酸钠 2%NaClO	3%次氯酸钠 3%NaClO	4%次氯酸钠 4%NaClO	5%次氯酸钠 5%NaClO
8	1	4	7	10
9	2	5	8	11
10	3	6	9	12

3.2.7 苦瓜处理后子房在不同激素和添加剂配比下的诱导培养

将经过消毒好的子房在灭菌滤纸上切成 5 mm×5 mm 的小块，再接种于不含激素和添加剂的培养基上以及不同激素和添加剂配比的培养基上。每皿（100 mm）均匀接种 10-20 枚子房块，每个处理 5 个皿。子房块含有带胚珠的胎座组织，子房块平放于培养基上，胚珠无明显朝向。接种子房块时，用镊子轻柔夹取之，以免夹伤胚珠，最后用 Parafilm 封口膜封口，接种后的子房块则在 28 °C 黑暗培养 2 d 后，再于培养室进行光照培养，以此诱导胚状体或者愈伤组织生成。以 MS 培养基为基本培养基，添加 NAA、6-BA、CPPU、AgNO₃，并加入 3% 的蔗糖和 0.75% 的琼脂，调节培养基的 pH 值为 5.84-6.00，培养基用高压灭菌锅在 121 °C-126 °C 的条件下灭菌 20 min，其中培养基中的维生素、AgNO₃ 溶液采用抽滤灭菌，在培养基经过高温高压灭菌之后凝固前时加入，此操作在超净工作台上完成。培养基共 25 种，其中添加成分见表（5）。

愈伤组织诱导率=诱导出愈伤组织的胎座块/全部接种的胎座块×100%

3.2.8 苦瓜未受精胚珠的预培养

将准备好的材料接种于预培养基上，其中，未受精的胚珠，每皿（60 mm）整齐均匀的接种 15-25 枚，最后用 Parafilm 封口膜封口。以 MS 培养基为基本培养基，同时加入 NAA、2, 4-D、6-BA，并加入 3% 的蔗糖和 0.75% 的琼脂，调节培养基的 pH 值为 5.84-6.00，培养基用高压灭菌锅在 121 °C-126 °C 的条件下灭菌 20 min，其中培养基中的维生素采用过滤灭菌，在培养基冷却但还没有凝固时加入，诱导培养基激素添加成分见表(6)，此操作在超净工作台上完成。将接种好的培养皿（60 mm）放在 35 °C 的黑暗条件下热激 4 d 以刺激胚珠膨大。

3.2.9 苦瓜未受精胚珠的在不同激素和添加剂配比的诱导培养

将经过热激 4 d 处理后的未受精胚珠转移到诱导培养基上继续培养，仍以培养皿（60 mm）为培养容器，每个皿倒入 6 ml 培养基，其中每皿接种胚珠 10-25 枚，每个处理 5 个皿。培养室的温度控制在 25-30 °C 之间，光照时间为 14 h (06-20 时)，光照强度为 2000 lx。未受精胚珠膨大后，再将其切成小块，接种到分化培养基上。分化培养基是在 MS 培养基上加入 3% 的蔗糖和 0.75% 的琼脂以及激素 6-BA、NAA、IAA，其中 6-BA 的浓度为 1.0、2.0、3.0 mg/L, AgNO₃ 的浓度为 1.0、2.0、3.0, NAA 的浓度为 0、0.2、0.5 mg/L, IAA 的浓度为 0、0.2、0.5 mg/L。实验采用 L₉ (3⁴) 的四因素三水平正交组合设计（表 7）。

未受精胚珠愈伤组织诱导率=诱导出愈伤组织的胚珠个数/全部接种的胚珠个数×100%

3.2.10 数据处理

实验数据使用 SPSS16.0 软件进行分析处理，多重比较的显著水平 $\alpha=0.05$ 。

表 5 诱导培养基中的激素与添加剂配比组合
Table 5 Hormones and additive for induction medium

处理标号 Order of treatment	6-BA(mg/L)	CPPU(mg/L)	NAA(mg/L)	AgNO ₃ (mg/L)
1	0	0	0	0
2	1	0	1	0
3	2	0	1	0
4	3	0	1	0
5	4	0	1	0
6	5	0	1	0
7	6	0	1	0
8	1	0	1	0
9	1	0	2	0
10	1	0	3	0
11	1	0	4	0
12	1	0	5	0
13	1	0	6	0
14	1	0	1	1
15	1	0	1	2
16	1	0	1	3
17	1	0	1	4
18	1	0	1	5
19	1	0	1	6
20	0	0.05	0.5	0
21	0	0.10	0.5	0
22	0	0.15	0.5	0
23	0	0.20	0.5	0
24	0	0.25	0.5	0
25	0	0.30	0.5	0

表 6 胚珠诱导培养基中所添加的激素水平
Table 6 Hormones level for ovary induction medium

处理编号 Order of treatment	NAA(mg/L)	2,4-D(mg/L)	6-BA(mg/L)
1	0.5	1	1
2	0.5	2	1
3	0.5	1	0
4	0.5	4	1

表 7 诱导培养基中所用的激素及添加剂水平
Table 7 Hormones and additive level for induction medium

培养基编号 Order of medium	激素或添加剂 (mg/L) Hormones or Additive Level (mg/L)			
	6-BA	AgNO ₃	NAA	IAA
1	1	1	0	0
2	1	2	0.2	0.2
3	1	3	0.5	0.5
4	2	1	0.2	0.5
5	2	2	0.5	0
6	2	3	0	0.2
7	3	1	0.5	0.2
8	3	2	0	0.5
9	3	3	0.2	0

4 结果与分析

4.1 苦瓜花粉灭活处理结果

对 Z-1-4×132-3-1 和翠妃两种试验材料的花粉进行常温放置、烘干、紫外线照射和甲苯胺蓝溶液浸泡共四种处理之后，将它们分别用硼酸-蔗糖溶液法在黑暗条件下培养 1 小时后再测定花粉活力。分析结果见表 (8-9)，图 1-图 11。

结果表明：在这四种处理后的花粉内，烘干是能在最短时间内使苦瓜花粉几乎完全丧失萌发活力的处理方式，品种间无显著差异，而处理梯度有显著差异 ($F=11.725, p<0.01$)；常温处理花粉后，品种间有显著差异 ($F=5.91, p<0.05$)，处理梯度上也有显著差异 ($F=163.671, p<0.01$)；紫外线辐射花粉后，品种间无显著差异，而处理梯度间有显著差异 ($F=269.078, p<0.01$)；而随着甲苯胺蓝溶液浓度的提高，花粉不能正常萌发、花粉管外形异常的现象越加明显，品种之间畸形率差异显著 ($F=13.624, p<0.01$)，处理梯度之间也有显著差异 ($F=103.608, p<0.01$)。

本研究结果表明用烘干法灭活苦瓜花粉是最高效的方法。

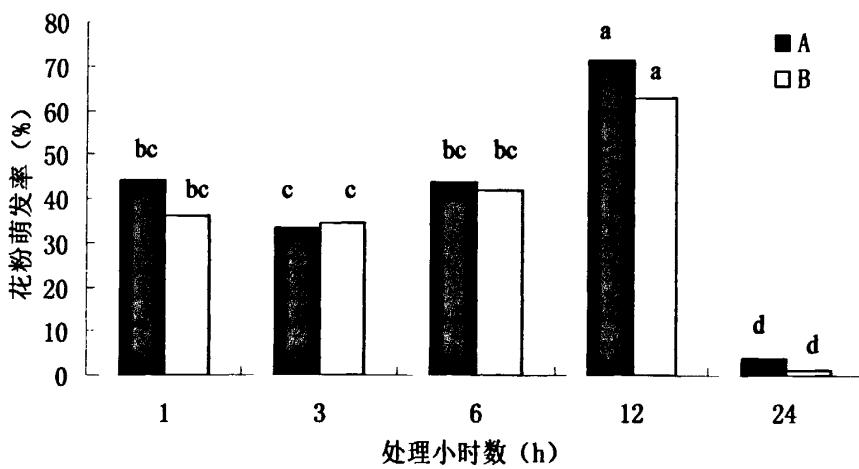


图 1 常温放置处理后苦瓜花粉萌发率

Fig. 1 The germination rate of pollen after room temperature treatment

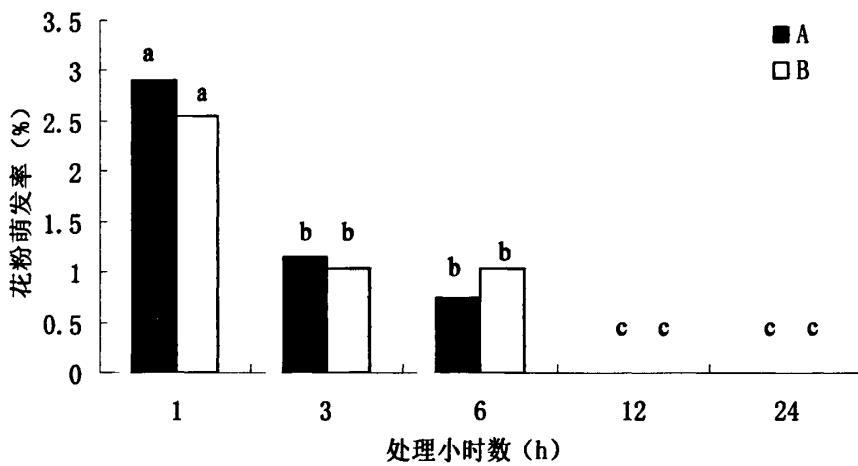


图 2 烘干处理后苦瓜花粉萌发率

Fig. 2 The germination rate of pollen after drying treatment

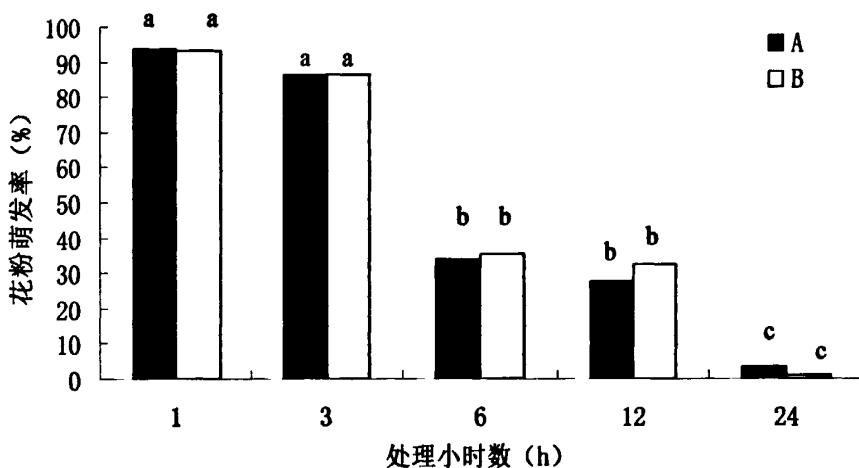


图 3 紫外线处理后苦瓜花粉萌发率

Fig. 3 The germination of pollen after ultraviolet radiation

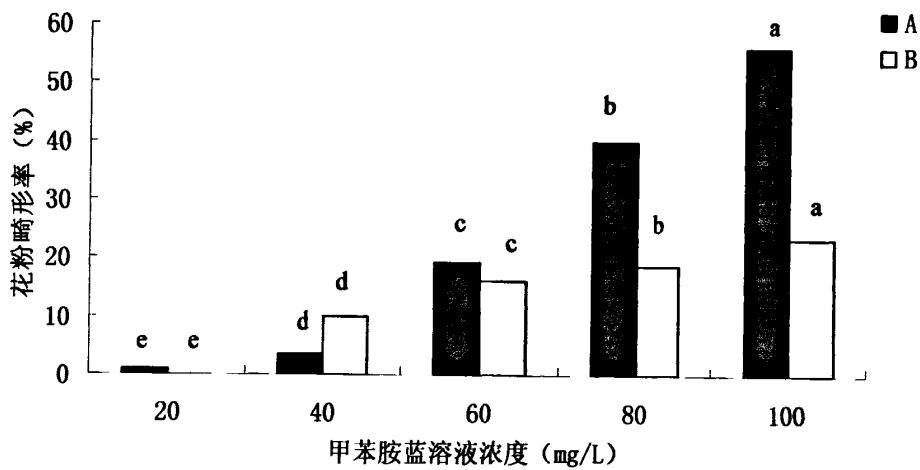


图 4 甲苯胺蓝溶液处理后花粉的畸形率

Fig. 4 The deformity rate of pollen after toluidine blue immersion

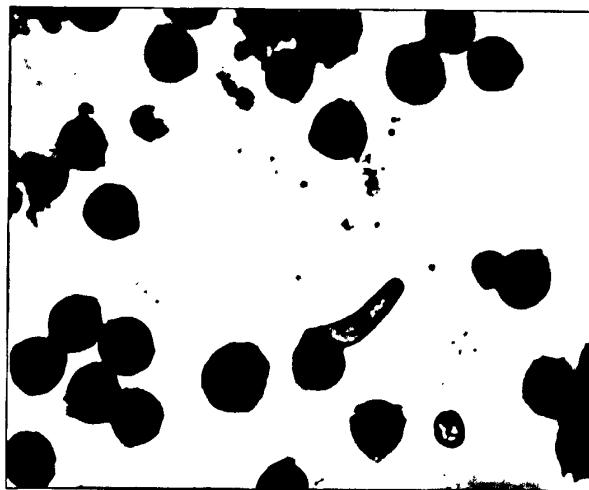


图 5 A 苦瓜花粉烘干一小时后在放大 40 倍下的成像

Fig. 5 40 times enlarged drawing of A pollen after drying in 1 hour

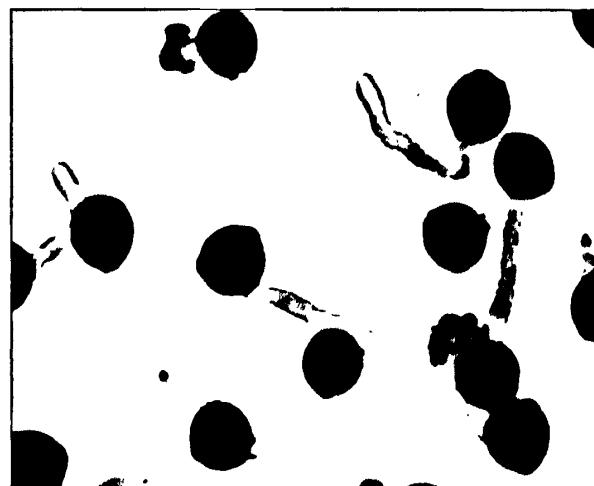


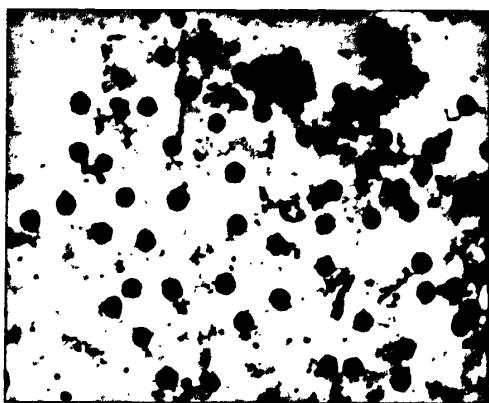
图 6 A 苦瓜花粉室温保存一小时后在放大 40 倍下的成像

Fig. 6 40 times enlarged drawing of A pollen after storage in room temperature in 1 hour

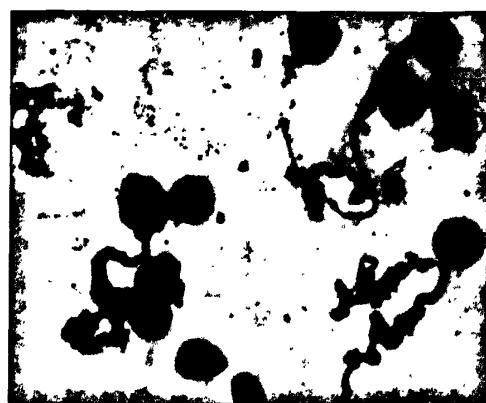


图 7 A 苦瓜花粉紫外线辐射一小时后在放大 40 倍下的成像

Fig. 7 40 times enlarged drawing of A pollen after ultraviolet radiation in 1 hour



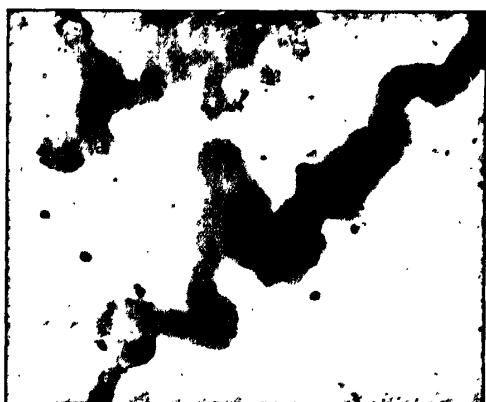
8



9



10



11

图 8-11 A 苦瓜花粉在 100mg/L 甲苯胺蓝溶液浸泡一小时后，在放大 40、100、400 倍下的成像。

Fig. 8-11 40, 100, 400 times enlarged drawing of A pollen after immersion in 100mg/L toluidine blue solution in 1 hour

表 8 不同处理后苦瓜花粉萌发率

Table 8 Germination rate after different treatment

处理时间 Time	常温 Room temperature		烘干 Drying		紫外线辐射 Ultraviolet radiation	
	A	B	A	B	A	B
1	44.25 bc	36.18 bc	2.90 a	2.55 a	93.53 a	93.16 a
3	33.29 c	34.59 c	1.15 b	1.04 b	86.28 a	86.20 a
6	43.83 bc	41.80 bc	0.75 b	1.04 b	33.86 b	35.62 b
12	71.29 a	62.89 a	0 c	0 c	27.52 b	32.75 b
24	3.94 d	1.21 d	0 c	0 c	3.20 c	1.11 c

表 9 不同浓度甲苯胺蓝溶液处理后苦瓜花粉畸形率

Table 9 Malformation rate after different level concentration of toluidine blue solution

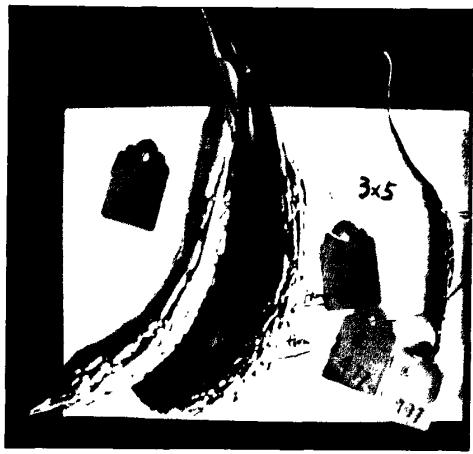
溶液浓度 Concentration of solution	A		B
20	0.74 e		0 e
40	3.47 d		9.77 d
60	19.11 c		16.13 c
80	39.88 b		18.78 b
100	55.87 a		23.38 a

4.2 葫芦科近缘属花粉对苦瓜雌花进行蒙导处理结果分析

对两种试验材料的雌花用当天刚刚开放的南瓜、普通丝瓜、瓠瓜、西瓜、网纹甜瓜、黄瓜花粉分别与失活的苦瓜花粉混合后，进行蒙导处理。实验结果见表(10-11)，图12-图20。

由结果可知用普通丝瓜花粉进行蒙导处理10天，约有50%的A材料(下同)苦瓜子房生长量、25%的B材料(下同)子房生长量明显高于其他五种花粉蒙导处理结果，品种间存在显著差异($F=477.904$, $p<0.01$)，南瓜、瓠瓜、西瓜、网纹甜瓜、黄瓜五种花粉蒙导处理之后的苦瓜子房生长量之间也存在着显著差异($F=1.984$)。

$\times 10^3$, $p < 0.01$); 经过普通丝瓜花粉蒙导处理后的子房块在含激素的培养基上并未分化出愈伤组织。



11



12

图 11-12 A 苦瓜子房经过普通丝瓜花粉蒙导处理两周后

Fig. 11-12 The ovary of A via pollen mentor with luffa's pollen in 2 weeks



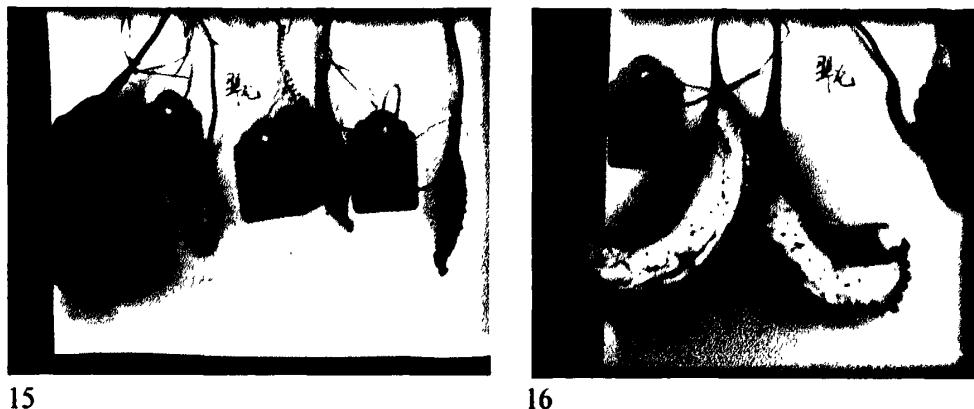
13



14

图 13-14 A 苦瓜子房正常授粉两周后

Fig. 13-14 The ovary of A pollinated with itself pollen in 2 weeks

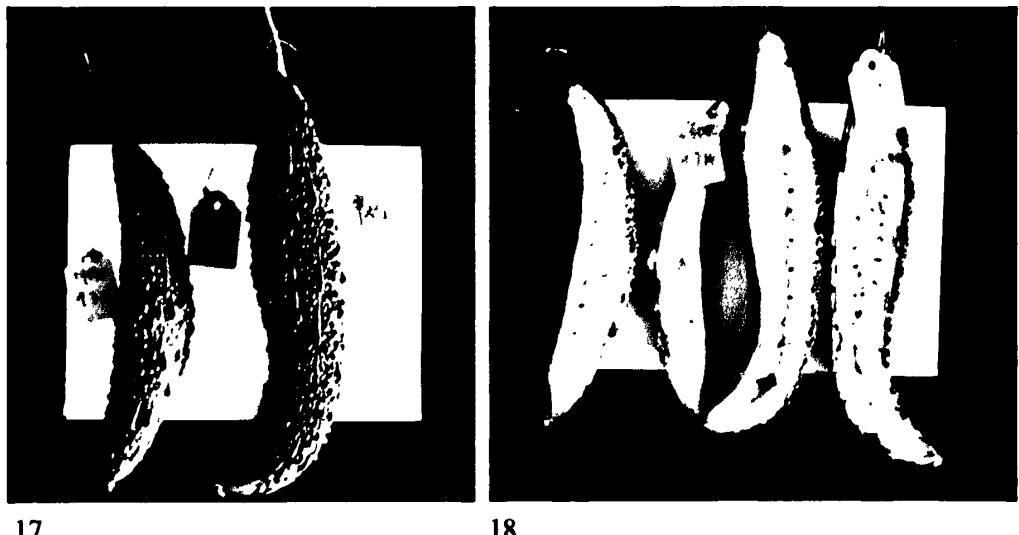


15

16

图 15-16 B 苦瓜子房经过普通丝瓜花粉蒙导处理两周后

Fig. 15-16 The ovary of B via pollen mentor with luffa's pollen in 2 weeks

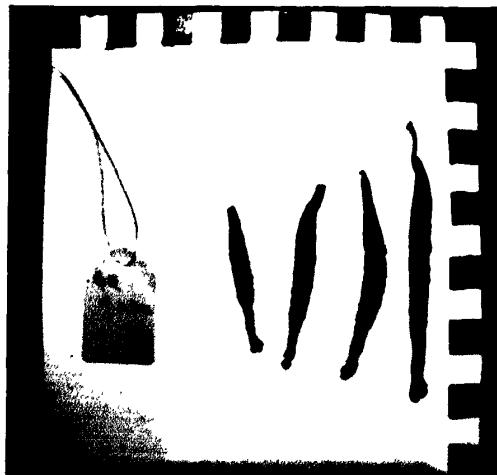


17

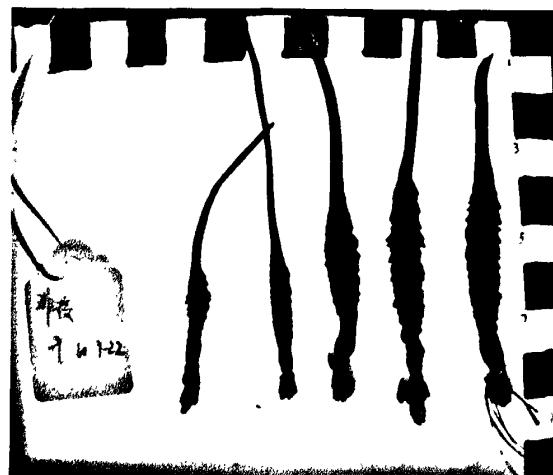
18

图 17-18 B 苦瓜子房正常授粉两周后

Fig 17-18 The ovary of B pollinated with itself pollen in 2 weeks



19(A)



20(B)

图 19-20 A, B 子房未授粉处理两周后

Fig. 19-20 The ovary of A, B unpollinated ovary in 2 weeks

表 10 A 苦瓜子房经过蒙导法处理之后的结果
Table 10 Result of pollen mentor treatment of A bitter gourd

蒙导花粉 Species of pollen mentor	长 (cm) Length(cm)	直径 (cm) Diameter(cm)	质量 (g) Weight(g)
黄瓜	4.02 e	0.63 f	1.10 c
南瓜	5.94 d	0.82 e	3.05 c
瓠瓜	6.86 c	1.13 c	3.61 c
网纹甜瓜	7.37 c	0.87 d	4.14 c
普通丝瓜	13.29 b	3.10 b	36.02 b
西瓜	6.10 d	0.88 e	2.71 c
正常授粉	24.49 a	4.38 a	150.87 a

表 11 B 苦瓜子房经过蒙导法处理之后的结果
Table 11 Result of pollen mentor treatment of B bitter gourd

蒙导花粉 Species of pollen mentor	长 (cm) Length(cm)	直径 (cm) Diameter(cm)	质量 (g) Weight(g)
黄瓜	3.49 e	0.46 f	0.69 c
南瓜	4.30 d	0.68 e	1.10 c
瓠瓜	5.38 c	0.92 c	1.61 c
网纹甜瓜	5.26 c	0.82 d	1.22 c
普通丝瓜	7.57 b	3.21 b	32.14 b
西瓜	3.45 d	0.47 e	0.58 c
正常授粉	21.25 a	3.99 a	116.44 a

4.3 甲苯胺蓝、马来酰肼、二甲基亚砜处理苦瓜雌花结果分析

对两种苦瓜试验材料的雌花用甲苯胺蓝、马来酰肼和二甲基亚砜进行处理。实验结果见表 (12-14), 图 21-图 28。

由结果可知甲苯胺蓝, 随着溶液浓度的升高, 其对花粉萌发的抑制效果愈加明显, 从处理后子房的生长量看出, 品种间子房长度不存在显著差异, 子房直径存在显著差异 ($F=5.566$, $p<0.05$), 质量存在显著差异 ($F=58.133$, $p<0.01$); 而在处理梯度之间, 子房的长度、直径以及质量均存在显著差异。

马来酰肼, 苦瓜雌花对溶解它的冰醋酸溶液很敏感, 即便将含有马来酰肼(1 g/L)的冰醋酸原液稀释 3.3 倍-10 倍之后作为工作液使用, 喷施到苦瓜雌花上之后, 雌花柱头在次日即呈明显萎缩状态。品种间子房长度上有显著差异 ($F=13.686$, $p<0.05$), 子房直径存在显著差异 ($F=62.435$, $p<0.01$), 子房质量存在显著差异 ($F=39.552$, $p<0.01$); 同时在品种内处理梯度间, 子房的长度、直径以及质量上均存在显著差异。

二甲基亚砜, 其 1%、2% 浓度的溶液能使 30% 左右苦瓜子房在未授粉的情况下膨大, 但处理 14 天后, 其尚未长成商品瓜时, 瓜条即开始黄化。经过处理的子房接种到含激素的培养基上, 胎座上的胚珠未能分化成胚状体或愈伤组织。品种间子房长度有显著差异 ($F=31.914$, $p<0.01$), 子房直径存在显著差异 ($F=17.246$, $p<0.01$), 子房质量有显著差异 ($F=14.995$, $p<0.05$), 而品种内处理梯度之间, 子房的长度、直径以及质量均存在显著差异。



图 21-22 A 苦瓜子房用 20 mg/L 甲苯胺蓝溶液处理两周后
Fig. 21-22 The ovary of A sprayed with 20 mg/L toluidine blue solution in 2 weeks

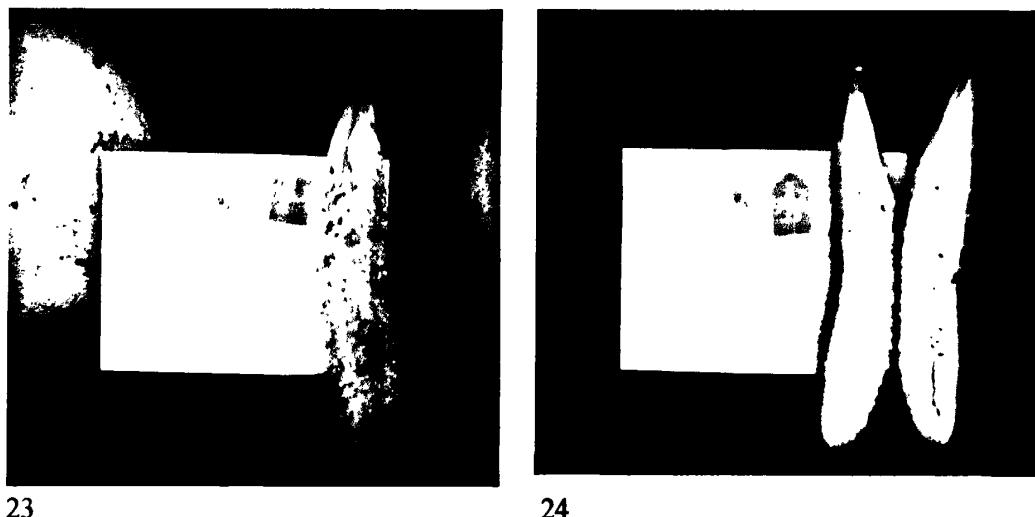
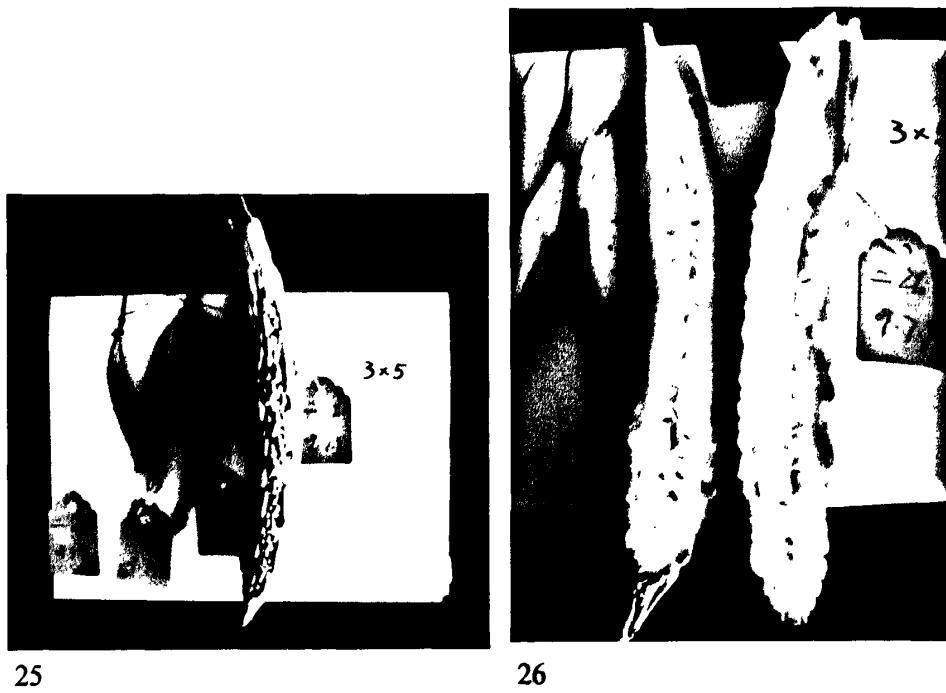


图 23-24 B 苦瓜子房用 20mg/L 甲苯胺蓝溶液处理两周后
Fig. 23-24 The ovary of B sprayed with 20mg/L toluidine blue solution in 2 weeks

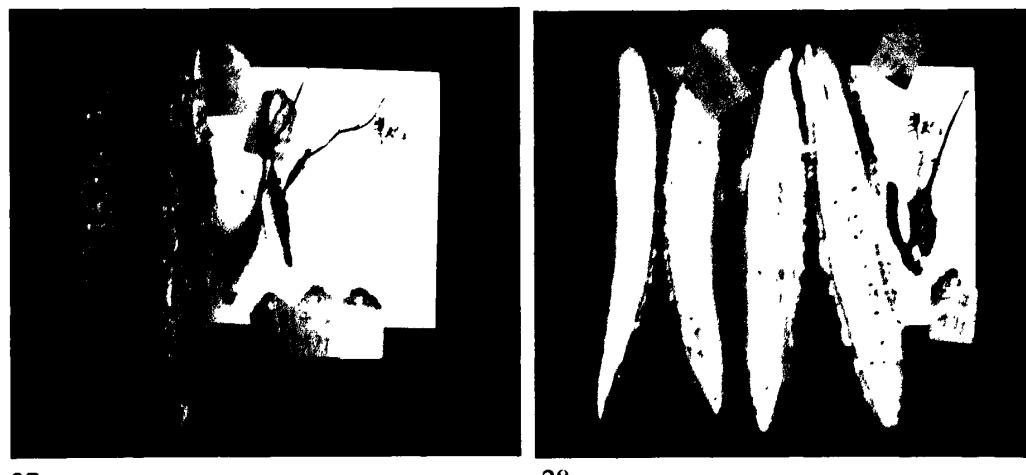


25

26

图 25-26 A 苦瓜子房经过 2% 二甲基亚砜处理两周后

Fig. 25-26 The ovary of A sprayed with 2% DMSO solution in 2 weeks



27

28

图 27-28 B 苦瓜子房经过 2% 二甲基亚砜处理两周后

Fig. 27-28 The ovary of B sprayed with 2% DMSO solution in 2 weeks

表 12 不同浓度甲苯胺蓝溶液对苦瓜子房的影响

Table 12 The effect of different level toluidine blue solution to ovary of bitter gourd

溶液浓度 (mg/L) Concentration of solution (mg/L)	A			B		
	长 (cm) Length(cm)	直径 (cm) Diameter(cm)	质量 (g) Weight(g)	长 (cm) Length(cm)	直径 (cm) Diameter(cm)	质量 (g) Weight(g)
20	19.79 a	3.10 a	59.90 a	21.13 a	3.81 a	80.23 a
40	18.75 b	2.67 b	42.83 b	18.04 b	3.28 b	64.03 b
60	15.32 c	2.45 c	37.23 c	14.64 c	2.40 c	45.90 c
80	11.86 d	2.04 d	20.24 d	10.76 d	1.95 d	28.10 d
100	9.73 e	1.66 e	10.68 c	7.40 e	1.46 e	9.13 e

表 13 不同浓度马来酰肼溶液对苦瓜子房的影响

Table 13 The effect of different level maleic hydrazide solution to ovary of bitter gourd

溶液浓度 (mg/L) Concentration of the solution(mg/L)	A			B		
	长 (cm) Length(cm)	直径 (cm) Diameter(cm)	质量 (g) Weight(g)	长 (cm) Length(cm)	直径 (cm) Diameter(cm)	质量 (g) Weight(g)
0	4.70 a	0.73 a	1.04 a	4.19 a	0.44 a	0.50 a
100	3.42 b	0.42 b	0.18 b	3.23 b	0.24 b	0.09 b
200	3.29 b	0.38 b	0.17 b	3.13 b	0.19 b	0.08 b
300	2.89 c	0.37 b	0.11 b	2.10 c	0.16 b	0.05 b

表 14 不同浓度二甲基亚砜溶液对苦瓜子房的影响

Table 14 The effect of different level of DMSO to ovary of bitter gourd

溶液浓度 (%) concentration of solution (%)	A			B		
	长 (cm) Length(cm)	直径 (cm) Diameter(cm)	质量 (g) Weight(g)	长 (cm) Length(cm)	直径 (cm) Diameter(cm)	质量 (g) Weight(g)
0	6.07 c	0.68 c	1.14 c	3.96 c	0.35 c	0.35 c
1	7.37 b	1.05 b	3.31 b	12.17 b	2.39 b	31.33 b
2	12.96 a	2.52 a	40.1 a	19.25 a	3.10 a	42.67 a

4.4 外植体灭菌处理结果

本实验中苦瓜从 2009 年 3 月 30 日定植，直到同年 12 月中旬罢园。在用外植体做离体培养时，发现在相同的培养条件下春、夏季的污染率高于秋季的污染率。0.1% 升汞灭菌效果最为显著，但对幼嫩外植体有明显伤害。当灭菌时间为 3 min，其能导致胎座组织和胚珠全部发白失活（王林，2009）。故换用较温和的次氯酸钠溶液作为灭菌剂。

在以保证灭菌效果并且对试验材料伤害较小的前提下，实验结果表明，两个苦瓜品种的春、夏季合适的灭菌方案为：用有效氯浓度 3% 的次氯酸钠溶液，灭菌 10 min。进入秋季后，可将灭菌时间缩短到 8 min-9 min，见表（15）。随着有效氯浓度的提高、灭菌时间的延长，胚珠、胎座由白转绿的时间亦越长，其活力降低。

表 15 苦瓜 A, B 在不同灭菌浓度和灭菌时间下的污染率
Table 15 The rate of pollution in A and B

处理 Treatment	A 污染率 (%) Pollution rate (%)	B 污染率 (%) Pollution rate (%)
1	100	100
2	90	85
3	75	72
4	56	50
5	33	30
6	0	0
7	0	0
8	0	0
9	0	0
10	0	0
11	0	0
12	0	0

4.5 苦瓜处理后子房在不同激素和添加剂配比下的诱导培养

将经过甲苯胺蓝溶液处理的苦瓜子房消毒，置于已灭菌的滤纸上，再切成 5 mm×5 mm 的小块，接种于 MS 培养基上。结果发现胎座上的胚珠在培养两周之后就逐渐发白，丧失活力。愈伤组织形成率如表（16），图 29-图 32。而子房块接种到分别含有不同浓度的 6-BA、NAA、CPPU 和 AgNO_3 的 MS 培养基上去，其中以含有 6-BA 1 mg/L、NAA 1 mg/L、 AgNO_3 5 mg/L 的培养基中形成的愈伤组织形成率最高，

愈伤组织体积最大。CPPU 对苦瓜子房块的愈伤组织分化没有明显刺激效应。品种之间的愈伤组织形成率无显著差异，但 B 苦瓜对激素更为敏感，单位时间内形成的愈伤组织体积比 A 苦瓜大。品种内不同成分培养基之间存在显著差异 ($F=147.576$, $p<0.01$)。

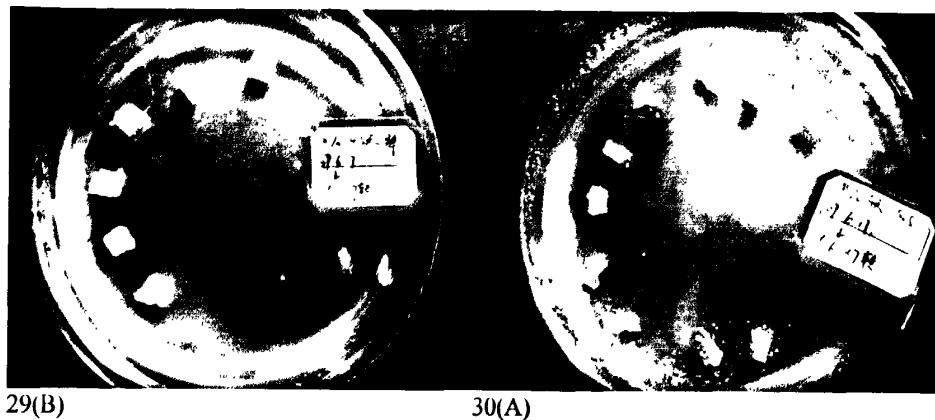


图 29-30 A, B 在无激素或添加剂的 MS 培养基上培养三周后
Fig. 29-30 The ovary of A, B in the medium without hormones or additive in 3 weeks

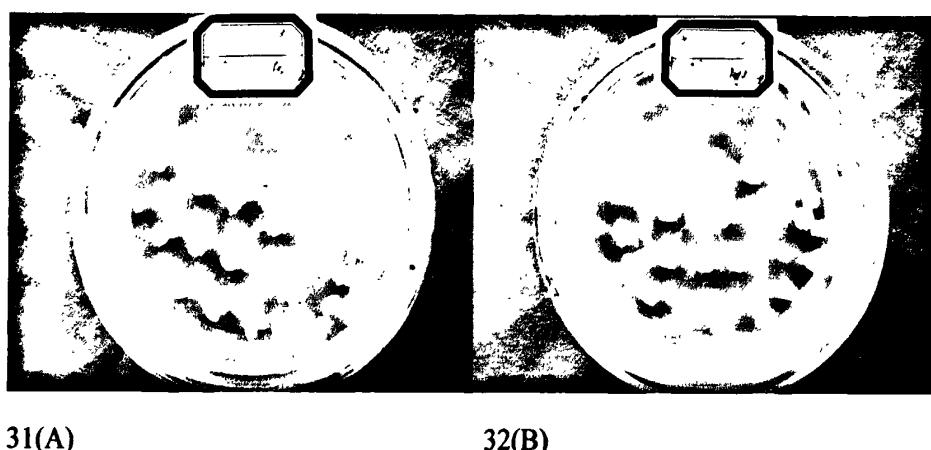


图 31-32 A, B 在含有 6-BA、NAA 和 AgNO_3 的 MS 培养基上培养八周后
Fig. 31-32 The ovary of A, B in the medium with 6-BA, NAA and AgNO_3 in 8 weeks

表 16 不同培养基下苦瓜子房的愈伤组织形成率
Table 16 the callus rate of ovary of bitter gourd in different media

培养基组分编号 Order of medium	A	B
1	0 k	0 k
2	53.14 efg	53.05 efg
3	51.28 efg	51.44 efg
4	57.47 de	53.94 de
5	56.44 de	55.06 de
6	54.43 ef	52.76 ef
7	57.93 de	56.25 de
8	54.19 ef	53.22 ef
9	46.44 fgh	46.15 fgh
10	45.32 gh	43.81 gh
11	41.07 h	39.66 h
12	31.17 i	31.49 i
13	25.09 i	26.46 i
14	42.05 fgh	52.14 fgh
15	43.23 efg	57.07 efg
16	50.30 cd	74.25 cd
17	60.66 c	76.92 c
18	91.43 a	94.76 a
19	81.46 b	90.61 b
20	5.77 j	0.92 j
21	4.76 j	1.19 j
22	4.85 j	1.10 j
23	3.46 j	0.97 j
24	3.40 j	0.83 j
25	3.58 j	0.70 j

4.6 苦瓜未受精胚珠在不同激素和添加剂配比下的诱导培养

将未受精胚珠放在 35 ℃的黑暗条件下热激培养 4 d 以刺激胚珠膨大。预培养 4 d 后，未受精胚珠的颜色由乳白色转变为浅绿色。凡不能转色者即丧失生长活力。将已转色胚珠接种至诱导培养基后，随着培养时间的延长，四种诱导培养基中的胚珠均能逐渐膨大。愈伤组织形成率见表 (17)，图 33-图 36。品种间的愈伤组织形成率没有显著差异，而不同诱导培养基之间存在显著差异 ($F=11.031$, $p<0.01$)。再将愈伤组织在超净工作台上切割成小块，转接到含有不同激素和添加剂的四因素三水平

的分化培养基上, 见表(7), 在配方 3、5、7、9 中, 胚珠培养 25 d 后, 形成的愈伤组织体积能继续膨大, 但未能分化出芽或根。培养两个月之后进行继代处理, 所有由未受精胚珠诱导出的愈伤组织在三个月之内逐渐褐化; 而在余下的配方中, 胚珠在培养 25 d 后, 形成的愈伤组织体积增长不明显或已经褐化。

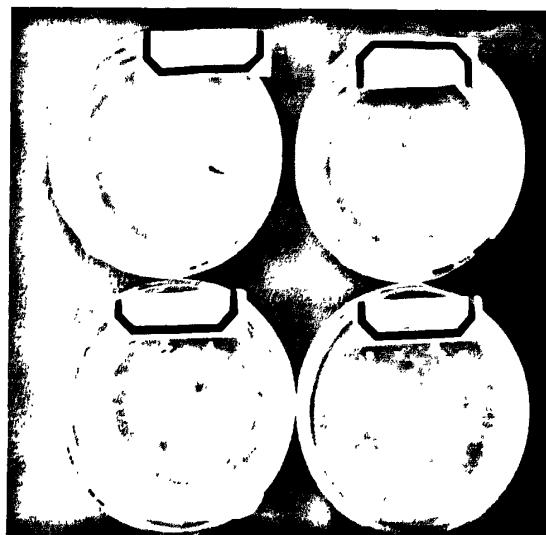


图 33 A 苦瓜未受精胚珠热激之后培养三周胚珠逐渐膨大

Fig. 33 The unpollinated ovary of A after heat shock were enlarged on the medium in 3 weeks

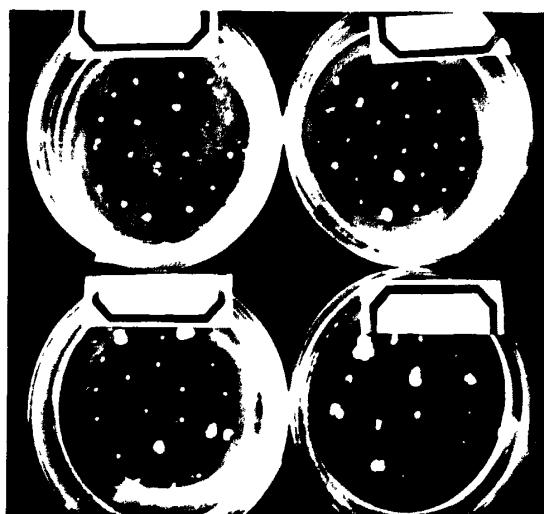


图 34 B 苦瓜未受精胚珠热激之后培养三周之后胚珠逐渐膨大

Fig. 34 The unpollinated ovary of B after heat shock were enlarged on the medium in 3 weeks

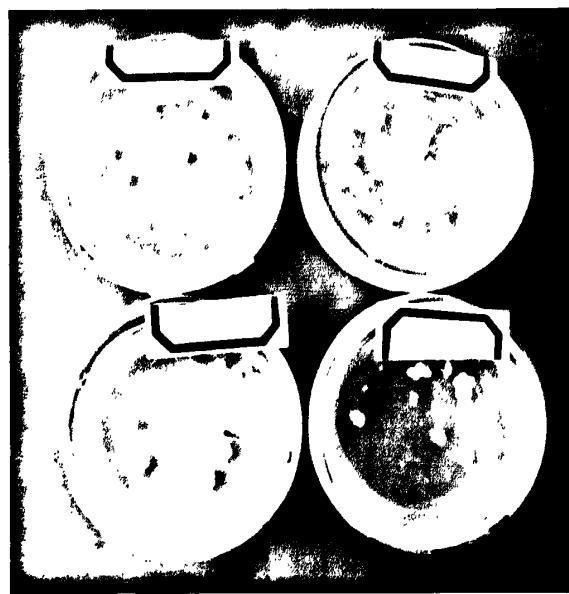


图 35 A 苦瓜未受精胚珠在诱导培养基培养四周后

Fig. 35 The unpollinated ovary of A after heat shock were enlarged on the induced medium in 4 weeks

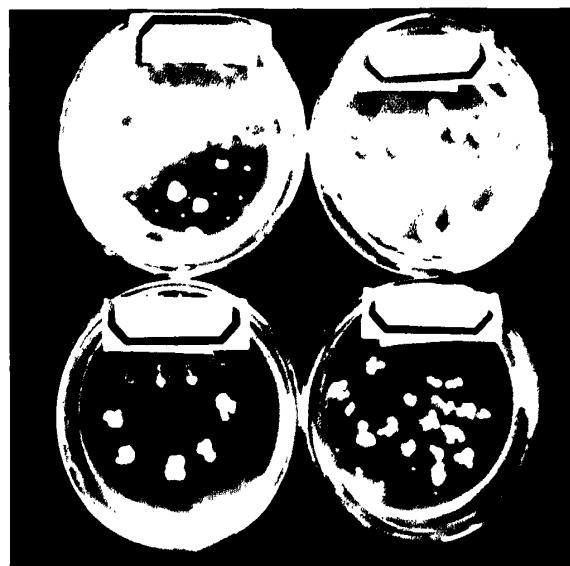


图 36 B 苦瓜未受精胚珠在诱导培养基培养四周后

Fig. 36 The unpollinated ovary of B after heat shock were enlarged on the induced medium in 4 weeks

表 17 胚珠在诱导培养基中的愈伤率

Table 17 Callus rate of ovary in induced medium

诱导培养基编号 Order of induced medium	A	B
1	52.63 b	54.10 b
2	59.59 a	67.27 a
3	42.65 c	28.45 c
4	62.89 a	71.37 a

5 讨论

5.1. 苦瓜花粉灭活处理

花粉的生活力既取决于遗传因子，又受到环境条件的限制。花粉从花药散出后经过一定的时间才会死亡，但其受精能力的丧失则早很多（王俊丽，1997）。影响花粉生活力的环境因素很多，其中温度、湿度和空气是其主要限制因素。在高温、高湿和有氧条件下，离体后的花粉将由于水分丧失、营养基质消耗、酶活性减弱、有害代谢物积累、花粉表膜生理活性改变或者病菌感染等原因，就会加速其衰老和死亡。此外，辐射也是影响花粉生活力的重要因素。

辐射分为电离辐射与非电离辐射。电离辐射包含 α 射线 (α 粒子)、 β 射线 (β 粒子)、中子等高能粒子流与 γ 射线、X 射线等高能电磁波，而被称为宇宙射线的高能粒子射线则两者皆有。电磁波的电离能力，随着电磁波谱 (electromagnetic spectrum) 变化，电磁波谱中的 γ 射线、X 射线几乎可以电离任何原子或分子。电磁波的频率愈高，能量愈强，电离能力愈强。在电磁波谱上，远紫外线 (far ultraviolet) 频率大于紫外线很多，电离能力较强；非电离辐射是指与 X 射线相比之下波长较长的电磁波，由于其能量低，不能引起物质的电离，故称为非电离辐射。如紫外线或近紫外线 (near ultraviolet) 与可见光、红外线、微波和无线电波等电离能力较弱的电磁波。高量的电离辐射对生物有害，会导致癌症、基因突变。而非电离辐射的影响则弱得多，所以紫外线对苦瓜花粉活力的杀伤作用有限，促使其变异的能力较低。

甲苯胺蓝是一种常用的人工合成染料，属于醌亚胺染料类。这类染料一般含有两个发色团，一个是胺基，一个是醌型苯环，构成色原显色。染料除有发色团外，还要有能使色原对组织及其他被染物产生亲和力的原子团即助色团。助色团能促使染料产生电离形成盐类，帮助发色团对组织产生染色力。甲苯胺蓝不仅含有两个发色团，还含有两个助色团，使切片上的组织细胞着色。作为碱性染料，甲苯胺蓝中的阳离子有染色作用，组织细胞的酸性物质与其中的阳离子相结合而被染色。它可使细胞核呈蓝色，并能使高等生物的雄核遗传物质失活。Illies (1975) 就通过对授粉后的欧洲山杨喷施甲苯胺蓝溶液获得过其单倍体；人们亦用其处理鱼类、蛙类精子，使其精核遗传物质失效（胡则辉等，2007）。

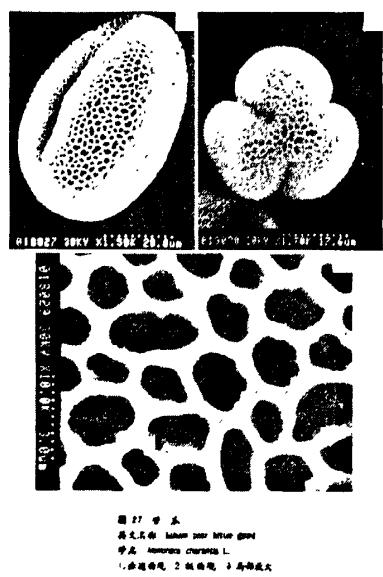
所以相比之下，在单位时间内，烘干处理对花粉萌发力的破坏性最为彻底；紫外线照射能破坏花粉的营养（王俊丽，1997），但破坏其萌发力的能力较弱；甲苯胺

蓝溶液需在其浓度达到80 mg/L及以上时，对花粉萌发能起到明显抑制作用，但是作为使花粉失活的方法来使用时，操作步骤和处理后花粉的收集不如烘干法简便易行。

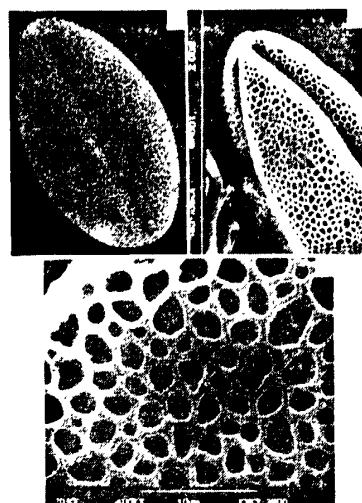
5.2 葫芦科近缘属花粉对苦瓜雌花的影响

葫芦科蔬菜的花粉是能同时长出多个花粉管，但最终仅有一个会继续延长去完成双受精过程，其余在中途就停止生长。对温带地区的植物而言，25-30 °C是适合花粉管萌发的温度。另一个影响花粉管萌发和其生长的重要因素就是花粉与雌蕊之间的亲和程度。若不亲和，花粉不能萌发或花粉管生长缓慢。为避免在柱头处发生不亲和反应，将该苦瓜自身花粉杀死，但花粉壁蛋白未发生变性，用其作为蒙导花粉（mentor pollen）或称识别花粉（recognition pollen），再混入近缘属蔬菜的新鲜花粉。亲和的失活花粉可避免柱头识别出不亲和的花粉，其蒙导实质在于柱头是通过花粉壁中的蛋白来识别花粉的亲和性（胡适宜，1982）。本实验混合普通丝瓜花粉后，子房的生长量最大且与正常授粉的苦瓜子房相比，子房内不会产生种子的雏形。通过观察六种花粉电镜扫描图片可见，普通丝瓜花粉粒在外形、表面沟孔性状、表面纹理等方面均与苦瓜花粉最为近似（马德伟，1999），西瓜花粉粒的相似度较差。而南瓜、瓠瓜、黄瓜、网纹甜瓜的花粉粒则与苦瓜花粉粒有明显不同。由此推测：由于普通丝瓜花粉粒形态上与苦瓜花粉粒相似性较高，用其进行蒙导的效果比其他葫芦科近缘属植物的花粉要明显。

植物种间、属间、族间乃至科间进行花粉蒙导处理，实质是属于远缘杂交的范畴。普通丝瓜染色体数 $2n=2x=26$ ，苦瓜染色体数 $2n=2x=22$ ，用前者的花粉对后者的雌花进行蒙导处理，普通丝瓜花粉花粉管生长正常，但精核未能与卵核融合而在卵的细胞质中解体。卵仍继续发育，可能形成一个具有苦瓜单倍染色体的胚。所以花粉蒙导、远缘花粉授粉成为一些植物获得单倍体的一种方法。在这里，外源花粉诱导卵细胞的分裂与发育（李再云等，2005）。

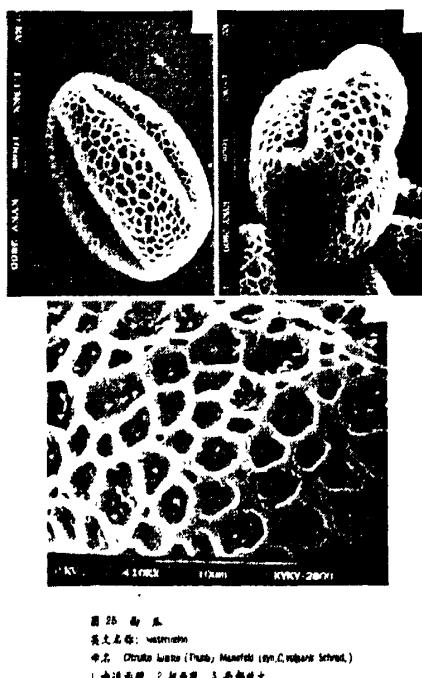


37 (苦瓜)

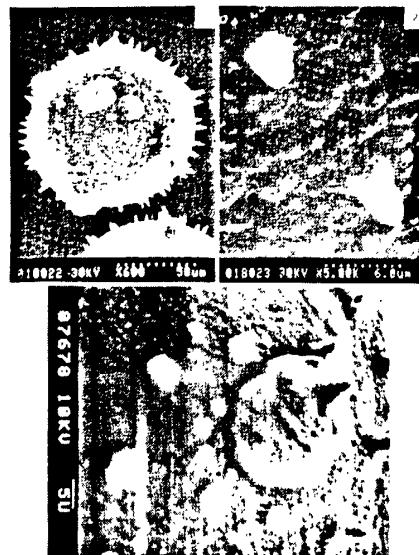


38 (普通丝瓜)

图 37-38 苦瓜、普通丝瓜花粉的电子显微镜扫描图片
Fig. 37-38 The image of bitter gourd and luffa's pollen via electron microscope



39 (西瓜)



40 (南瓜)

图 39-40 西瓜、南瓜花粉的电子显微镜扫描图片
Fig. 39-40 The image of watermelon and pumpkin's pollen via electron microscope

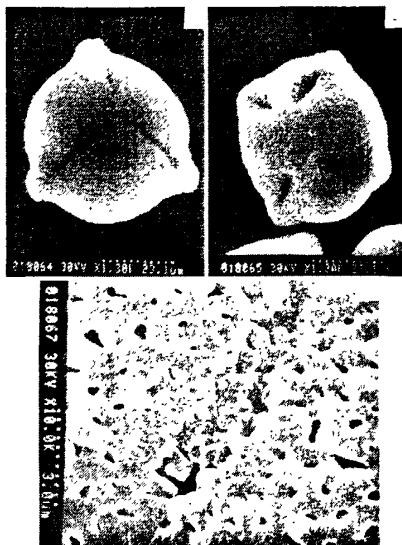


图 41 黄瓜
英文名称: bottle gourd
学名: *Lagenaria siceraria* (Natal) Merr.
1. 整表面(5000倍); 2. 整表面(2500倍); 3. 局部放大

41 (瓠瓜)

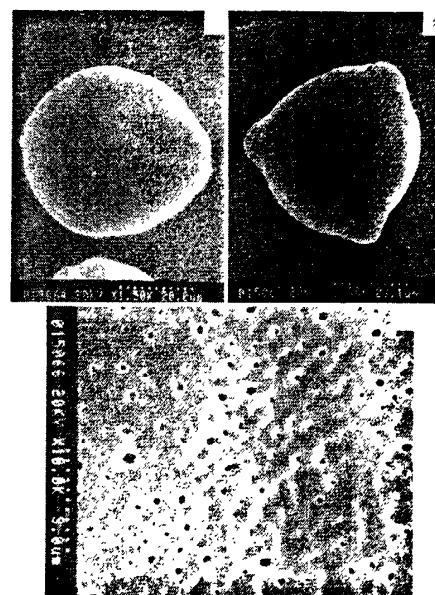


图 42 黄瓜
英文名称: cucumber
学名: *Cucumis sativus* L.
1. 表面观; 2. 表面观; 3. 局部放大

42 (黄瓜)

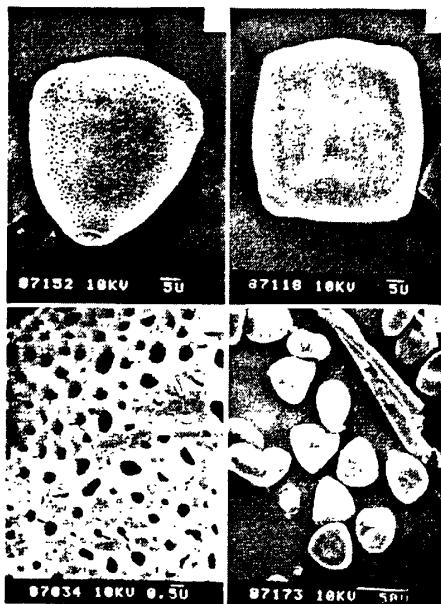


图 43 网纹甜瓜
学名: *Cucumis melo* L. var. reticulatus Huds.
1. 整表面(5000倍); 2. 整表面(2500倍)
3. 局部放大; 4. 花粉群体

43 (网纹甜瓜)

图 41-43 瓢瓜、黄瓜、网纹甜瓜花粉的电子显微镜扫描图片
Fig. 41-43 The image of bottle gourd, cucumber and netted melon's pollen
via electron microscope

5.3 化学药剂对苦瓜子房的影响

马来酰肼（MH），它对植物生理方面所起的作用是对植物体内的生长激素起减低活性的影响，亦或可能是干扰植物的光合作用程度，抑制过氧化物同功酶或细胞膜电势的超极化，或是干扰RNA的合成、核蛋白的代谢。MH有利于葫芦科作物生长、开花和结果。近年印度试验了以150 mg/L的MH溶液用于瓠子，以50 mg/L用于西瓜，比之未经MH处理的植株，能有效地增长主茎，增加每节的分枝，降低雄/雌花比例而增收瓜果（顾培基，1991）。

王熹等（2005）对杂交水稻F₁种子发芽的抑制效应中使用了99%马来酰肼（化学纯、水溶性，美国有利莱路化工有限公司市售产品）。而本试验使用的马来酰肼购自上海晶纯试剂有限公司，它微溶于水和乙醇，易溶于冰醋酸。虽然将溶液稀释3倍-10倍到100 mg/L、200 mg/L、300 mg/L之后，苦瓜子房柱头依旧对溶液中的醋酸非常敏感，以至于柱头萎缩，子房生长受阻，其生长量明显低于清水对照处理。

二甲基亚砜（DMSO）有诱导植物进行无融合生殖的作用，早在20世纪30年代 Модилевский 就发现韭菜的卵细胞、助细胞及反足细胞和珠被细胞都具有胚胎发生能力，在每个胚囊中都有多胚发生，但在种子成熟时，一般只保留合子胚或不定胚。胡适宜（1982）提出韭菜中具有无融合生殖现象，但对此方面的研究还很少（王巨媛等，2005）。通过将0%、1%、2%的二甲基亚砜溶液喷施在Z-1-4×132-3-1、“翠妃”的雌花柱头上，可以发现的确可以使部分苦瓜子房膨大，且剖开子房后未见结籽，说明该药剂能起到类似生长素、赤霉素的作用。而处理14天之后，苦瓜瓜条黄化变软则说明实验处理的浓度尚不足以刺激未受精胚珠进一步发育或者该药剂可能并不能刺激未受精胚珠完成无融合生殖的过程。

5.4 灭菌试剂种类和浓度的选择

本次实验中所选用未授粉子房和未受精胚珠两种材料作为外植体，若采用升汞将对其造成很大伤害，乃至致使其死亡。查阅相关的文献资料，发现次氯酸钠是未受精子房和胚珠培养实验中最为常用的灭菌试剂，使用浓度（以有效氯含量来计量）根据作物种类的不同而改变。常用的有效氯浓度为1.0%、2.0%、5.0%以及10.0%。而浓度愈高、时间愈长，灭菌效果虽然愈好却对材料的伤害也愈大。因此，在本实验中设计几个灭菌处理来确定最佳的灭菌方案——既达到良好灭菌效果，又对试验材料伤害最小。然而对于不同季节采收的外植体，其灭菌效果也不尽相同，这说明

生长在不同季节的外植体所带菌落数量不同。对两种苦瓜的灭菌试验结论都是秋季的灭菌时间均短于春、夏季，表明秋季苦瓜外植体携带菌落数量要少于春、夏季的。

5.5 热激对苦瓜未受精胚珠的影响

热激是当前启动雌核发育应用得较为普遍的诱导手段，在很多作物的未受精子房和胚珠的离体培养中，对不同温度的热激以及热激时间的长短都有所报道。在黄瓜和甜瓜上， 35°C 是常用的热激温度，前人的实验表明，热激能诱导未受精胚珠的雌核启动。本实验参考前人在黄瓜（Gemes-Juhasz et al., 2002; Diao et al., 2009）和甜瓜（韩丽华，2004；王林，2009）上的研究成果，将未受精胚珠在 35°C 的黑暗条件下热激4 d，热激后胚珠由白转绿，并且胚珠有略微膨大。结果表明，热激有一定的诱导效果。由于实验条件所限，未能完成 35°C 黑暗热激处理1 d-5 d的梯度试验，所以苦瓜未受精胚珠最佳热激处理时间有待今后验证。

5.6 基因型的影响

许多研究成果证明基因型是影响诱导效率的重要因素之一，相同的培养条件下，不同的基因型会产生差异较大的诱导效果。阎华等（1988）在研究向日葵未受精胚珠离体培养时，根据对培养反应将品种分为三种类型：能诱导孤雌生殖，未能诱导孤雌生殖和对培养的反应比较钝感，表明了品种特性对诱导效果起着重要的作用。本研究采用了两种表型差异较大的苦瓜品种进行试验，结果显示：多项试验中均表现出品种之间有显著差异，这些结果表明了基因型是影响苦瓜离体培养的诱导效果的重要因素之一。若本研究的苦瓜试验材料能在三份及以上，则将更具备苦瓜基因型对单倍体诱导率有差异影响的说服力。

5.7 生长激素的影响

生长激素是在植物组织培养过程中起着重要作用的因素。常用的生长激素分为细胞分裂素类和生长素类两大类，通常在组培实验中需要对激素种类和浓度比例进行调节以期达到最好的培养效果。在不加任何激素的MS培养基中，苦瓜浅绿色的含胚珠的胎座组织仅仅经过一周的培养，就白化而失去活性。本实验在诱导培养阶段使用了6-BA、NAA和CPPU三种激素以及添加剂 AgNO_3 。两个苦瓜品种在不含激素的MS培养基中未能形成愈伤组织，在含有6-BA、NAA和 AgNO_3 的组合里能

长出大量的愈伤组织。由于实验条件和实验时间所限，本研究未能完成激素 TDZ、ZT、KT 等对诱导苦瓜单倍体离体培养的检测工作，所以可能存在优于 6-BA、NAA 和 AgNO_3 的培养基激素组合。

5.8 AgNO_3 对外植体分化的影响

AgNO_3 中的 Ag^+ 能抑制外植体受到创伤之后大量形成的乙烯，而乙烯是抑制器官发生和体细胞胚胎发生的。由于乙烯的生物合成与多胺的生物合成是相互抑制的，因为两者都以 S-腺苷甲硫氨酸（SAM）作为共有前体（赵巧阳等，2008），所以 AgNO_3 促使多胺的大量合成。合成的多胺转而提高器官发生和体细胞胚胎的发生频率。此外，植物组织在密闭的容器离体培养过程中会产生乙烯，随着培养时间的延长，培养容器中的乙烯含量会逐渐积累，而乙烯的积累会抑制培养材料的生长发育以及芽、胚状体的分化。在本实验中，添加过 AgNO_3 培养基中的外植体，其形成愈伤组织的速度快且愈伤组织体积较大，而较大体积的愈伤组织便于后期切割成小块用于继代培养。从实验结果看， AgNO_3 对离体培养外植体的生长与分化起到重要的促进作用。

5.9 诱导苦瓜单倍体的潜在途径

经过初步实验，可以推测诱导苦瓜单倍体可能存在以下两条途径：

一、早晨苦瓜雌花开放后，对其用普通丝瓜花粉进行花粉蒙导处理，或用其自身花粉授粉后，向柱头喷施浓度为 80 mg/L-100 mg/L 的甲苯胺蓝溶液浸没柱头上的花粉；处理后 3-7 天，采下子房作为外植体进行单倍体诱导培养，培养基中添加 6-BA、NAA 及 AgNO_3 等激素或添加剂寻找最优诱导培养基组合；对产生的愈伤组织诱导其分化出芽与根，或使愈伤组织分化为胚状体，再发育为单倍体植株。

二、选取生长盛期的苦瓜植株，在雌花开花前 12 h 采取试验样品；剥离出来的未受精胚珠在 1/2MS 预培养基 35 °C 黑暗条件下，选取最佳热激时间以刺激胚珠膨大转绿；热激之后将胚珠转移到诱导培养基中，培养 4-5 周来诱导愈伤组织生成；对于形成的愈伤组织诱导其分化出芽与根，或使愈伤组织分化为胚状体。

参考文献

1. 敖光明, 赵世绪, 李广华. 从未受精玉米子房诱导出单倍体植株. 遗传学报, 1982, 9: 281-283
2. 陈学军, 邢国民, 陈竹君. 西葫芦未授粉胚珠离体培养和植株再生. 浙江农业学报, 2000, 12: 165-167
3. 陈云凤, 张春荣, 黄霞, 黄学林. TDZ 对植物体细胞胚胎发生的作用. 植物生理学通讯, 2006, 42: 127-133
4. 陈正华, 许绪思, 廖小群. 三叶橡胶未传粉胚珠培养获得再生植株. 中国科学院遗传研究所工作年报, 北京: 科学出版社, 1984
5. 崔凯荣, 邢更生, 周功克, 刘新民. 植物激素对体细胞胚胎发生的诱导与调节. 遗传, 2000, 22: 349-354
6. 杜胜利, 韩毅科, 魏爱民, 王鸣, 陈启民, 侯锋. 黄瓜倍性鉴定方法的研究. 园艺学报, 2002, 29: 280-281
7. 杜胜利等. 利用生物技术创造黄瓜育种新材料方法研究. 天津科技, 2001: 627
8. 顾培基. 植物生长调节剂-马来酰肼. 上海化工, 1991, 16 (2) : 47-48
9. 韩丽华, 王建设, 陈贵林. AgNO_3 对甜瓜离体胚囊发育的影响. 河北农业大学学报, 2005, 28: 48-50
10. 胡适宜. 被子植物胚胎学. 北京: 人民教育出版社, 1982
11. 胡则辉, 徐君卓. 人工诱导海水鱼类雌核发育的研究进展. 海洋渔业, 2007, 29 (1) : 78-83
12. 景蕊莲, 昌小平, 贾继增, 胡荣海. 用花药培养创建小麦加倍单倍体作图群体生物技术, 1999, 9 (3) : 4-8
13. 雷加文 (美) 著, 杨弘远 译. 双受精-有花植物的胚和胚乳发育. 科学出版社, 2007
14. 兰盛银, 徐秀珍著. 植物花粉剥离观察扫描电镜图解. 科学出版社, 1996
15. 李再云, 华玉伟, 葛贤宏, 徐传远. 植物远缘杂交中的染色体行为及其遗传与进化意义. 遗传, 2005, 27 (2) : 315-324
16. 刘仁祥, 蒋光华, 杨双剑, 黄宁. 秋水仙素浓度、浸苗时间对烟草单倍体幼苗的加倍效应研究. 种子, 2009, 28: 12-15
17. 罗正荣. 新植物生长调节剂 CPPU 及其在果树和蔬菜上的应用. 植物生理学通讯, 1993, 29 (1) : 297-299
18. 吕家龙. 蔬菜栽培学各论 (南方本). 北京: 中国农业出版社, 2003, 180-185

19. 马德伟等著. 中国蔬菜花粉扫描电镜图解. 中国农业出版社, 1999
20. 宋莉英, 苦瓜离体植株再生体系的建立, [硕士学位论文], 西南师范大学图书馆, 2004
21. 宋莉英, 高峰, 邓暑燕. 我国葫芦科植物离体培养研究进展. 植物学通报, 2004, 21: 360-366
22. 陶自荣, 刘敏颂, 祝仲纯. 马铃薯未传粉子房离体培养获得单倍体植株. 遗传, 1985, 7: 24
23. 田惠桥, 杨弘远. 韭菜未传粉子房培养中单倍体的胚胎发生和植株再生. 实验生物学报, 1989, 22: 139-142
24. 王巨媛, 翟胜, 冯辉. 韭菜无融合生殖的化学诱导研究. 江苏农业科学, 2005, 4: 77-79
25. 王俊丽. 花粉学研究. 河北大学出版社, 1997
26. 王林, 甜瓜未受精胚珠离体培养研究, [硕士学位论文], 华中农业大学图书馆, 2009
27. 王文和, 草莓离体雌核发育的研究, [博士学位论文], 沈阳农业大学图书馆, 2001
28. 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. 植物学通报, 2005, 22 (增刊) : 108-117
29. 王熹, 陶龙兴, 谈惠娟, 黄效林, 杨长登. 外源脱落酸和马来酰肼对杂交水稻 F₁穗上种子发芽的抑制效应. 植物生理与分子生物学学报, 2005, 31(4): 396-402
30. 文科, 黎亮, 刘玉强, 陈绍江. 高效生物诱导玉米单倍体及其加倍方法研究初报. 中国农业大学学报, 2006, 11: 17-20
31. 吴伯骥, 郑国鋐. 从未传粉烟草子房诱导单倍体植株. 植物学报, 1982, 24: 125-129
32. 吴克贤, 徐妙珍. 杨树未传粉子房培养诱导出母系单倍体植株. 遗传学报, 1984, 11: 47-51
33. 伍成厚, 梁承邺, 叶秀麟. 被子植物未受精胚珠与子房离体培养的研究进展. 热带亚热带植物学报, 2004, 12 (6) : 580-586
34. 谢冰, 西葫芦的离体雌核发育及植株再生, [博士学位论文], 山东农业大学图书馆, 2006
35. 谢从华, 柳俊. 植物细胞工程. 北京: 高等教育出版社, 2004, 80
36. 徐晓锋, 黄学林. TDZ: 一种有效的植物生长调节剂. 植物学通报, 2003, 20: 227-237
37. 薛皓, 王建设, 刘世鹏, 刘世祥, 张向前. 甜瓜单倍体加倍技术研究. 安徽农业科技, 2008, 36 (29) : 12656-12658

38. 阎华, 周端, 杨弘远. 向日葵未受精胚珠培养中各种影响因素的实验研究. 武汉植物学研究, 1988, 6: 319-326
39. 杨弘远, 周端. 植物实验生殖生物学与生殖细胞工程: 现在与未来. 植物学通报, 1989, 6: 193-196
40. 杨弘远. 植物生殖的细胞生物学: 一个新的学科生长点. 生物科学动态, 1984, 4: 1-5
41. 杨江义, 李旭峰. 植物雌性单倍体的离体诱导. 植物学通报, 2002, 19: 552-559
42. 杨满业, 苦瓜离体再生体系的建立及开花相关基因的研究, [博士学位论文], 四川大学图书馆, 2003
43. 杨晓泉, 傅家瑞. 巴西橡胶树未受精胚珠培养时愈伤组织与胚状体的起源(简报). 热带亚热带植物学报, 1997, 5: 65-68
44. 张献龙, 唐克轩. 植物生物技术. 北京: 科学出版社, 2005
45. 赵巧阳, 赖钟雄. 硝酸银在离体培养和转化中的作用及其机理. 亚热带农业研究, 2008, 4 (1) : 62-66
46. 周端, 杨弘远, 田惠桥, 刘中来, 阎华. 水稻的未传粉子房培养. 武汉大学学报(自然科学版), 1983, 4: 146-154
47. 周端, 杨弘远. 从水稻未传粉的幼嫩子房培养出单倍体植株. 植物学报, 1980, 7: 287-288
48. 周端, 杨弘远. 水稻未受精胚囊的离体胚胎发生. 植物学报, 1981, 23: 176-179
49. 周端, 杨弘远. 未传粉子房与胚珠的离体培养. 武汉大学学报(自然科学版) 1982, 3: 61-72
50. 祝仲纯, 刘振岳, 吴海珊, 安庆坤. 离体培养未传粉烟草子房的胚状体发育. 植物学报, 1981, 23: 499-501
51. 祝仲纯, 吴海珊, 安庆坤. 大叶烟草未传粉子房培养及其细胞学研究. 遗传学报, 1984, 11: 281-287
52. 祝仲纯, 吴海珊, 安庆坤等. 从未传粉的小麦子房诱导单倍体植株. 遗传学报, 1981, 8: 386-390
53. Bhat J G, Murthy H N. Factors affecting in-vitro gynogenic haploid production in *niger* (*Guizotia abyssinica*(L. f.) Cass.). Plant Growth Regul, 2007. 52: 241-248
54. Campion B, Alloni C. Induction of haploid plants in onion (*Allium cepa* L.) by *in vitro* culture of unpollinated ovules. Plant Cell Tissue Org. Cult., 1990, 20: 1-6
55. Campion B, Azzimonti M T, Vicini E, Schiavi M, Falavigna A. Advances in haploid plant induction on onion (*Allium cepa* L.) through *in vitro* gynogenesis. Plant Sci., 1992, 86: 97-104

56. Campion B, Bohanec B, Javornik B. Gynogenic lines of onion (*Allium cepa* L.) evidence of their homozgosity. *Theor Appl Genet.* 1995, 91:598-602
57. Campion B, Perri E, Azzimonti M T. Spontaneous and induced chromosome doubling in gynogenic lines of onion (*Allium cepa* L.). *Plant Breeding,* 1995, 114: 243-246
58. Castillo A M, Cistue L. Production of gynogenetic haploids of *Hordum vulgare* L. *Plant Cell Reports.* 1993, 12: 139-143
59. Chand S, Basu P. Embryogenesis and plant regeneration from callus cultures derived from unpollinated ovaries of *Hyoscyamus muticus* L. *Plant Cell Reports,* 1998, 17: 302-305
60. Chand S, Sahrawat A K. Embryogenesis and plant regeneration form unpollinated ovary culture of *Psoralea corylifolia*. *Biologia Plantarum,* 2007, 51(2): 223-228
61. Endang Sulistyaningsih, Ken-ichiro Yamashita, Yosuke Tashiro. Haploid induction from F1 hybrids between CMS shallot with *Allium galanthum* cytoplasm and common onion by unpollinated flower culture. *Euphytica,* 2002, 125: 139-144
62. Ficcadenti N, Sestili S, Annibali S. In vitro gynogenesis to induce haploid plants in melon (*Cucumis melo* L.). *J. Genet Breed,* 1999, 53: 255-257
63. Gemesne Juhasz A, G Venczel, P Balogh. Haploid plant induction in zucchini (*Cucurbita pepo* L. convar. *giromontiina*) and in cucumber (*Cucumis sativus* L.) lines through *in vitro* gynogenesis. *Hort. Biotech. In Vitro Cult. and Breeding,* 1997, 447
64. Geyt Van J, Speckmann G J Jr, D'Halluin K, Jacobs M. In vitro induction of haploid plants from unpollinated ovules and ovaries of the sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). *Theor Appl Genet,* 1987, 73: 920-925
65. Graner, A., A. Jahoor, J. Schondelmaier, H. Siedler, K. Pillen, G. Fischbeck, G. Wenzel, and R. G. Herrmann. 1991. Construction of an RFLP map of barley. *Theor. Appl. Genet.* 83 :250-256
66. Gurel S, Gurel E, Kaya Z. Doubled haploid plant production from unpollinated ovules of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Plant Cell Reports,* 2002, 19: 1155-1159
67. Halit Yetisir, Nebahat Sari. A new method for haploid muskmelon (*Cucumis melo* L.) dihaploidization. *Scientia Horticulturae,* 2003, 98: 277-283
68. Illies Z M. Induction of haploid parthenogenesis in aspen by postpollination treatment with Toluidine-blue. *Silvae Genet.* 1975, 23, 221-226

69. Jakse M, Bohanec B, Ihan A. Effect of media components on the gynogenic regeneration of onion (*Allium cepa* L.) cultivars of regenerants. *Plant Cell Rep.*, 1996, 15: 934-938
70. Keller J. Culture of unpollinated ovules, ovaries, and flower buds in some species of the genus Allium and haploid induction via gynogenesis in onion(*Allium cepa* L.). *Euphytica*, 1990, 47: 241-247
71. Likyelesh Gugsa, Ashok K Sarial, Horst Lorz, Jochen Kumlehn. Gynogenic plant regeneration from unpollinated flower explants of *Eragrostis tef* (Zuccagni) Trotter. *Plant Cell Rep*, 2006, 25: 1287-1293
72. Lotfi M, Alan A R, Henning M J, Jahn M M, Earle E D. Production of haploid and doubled haploid plants of melon(*Cucumis melo* L.) for use in breeding for multiple virus resistance. *Plant Cell Rep*, 2003, 21: 1121-1128
73. Lux H, Herrmann L, Wetzel C. Production of haploid sugar beet (*Beta vulgaris* L.) by culturing unpollinated ovules. *Plant breeding*, 1990, 104: 177-183
74. Lux H, Herrmann, Claudia Wetzel. Production of Haploid Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.) by Culturing Unpollinated Ovules. *Plant Breeding*, 1990, 104, 177-183
75. Maheswaran, M., Subudhi, P. K., Nandi, S., Xu, J. C., Parco, A., Yang, D. C. and Huang, N. Polymorphism, distribution, and segregation of AFLP markers in a DH rice population. *Theor Appl Genet*, 1997, 94: 39-45,
76. Marylise Doctrinal, Rajbir S Sangwan ,Brigitte S Sangwan-Norreel. In vitro gynogenesis in Beta vulgaris L.: Effents of plant growth regulators, temperature, genotypes and season. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1989, 17:1-12
77. Metwally E I, Moustafa S A, El-Sawy B I, Haroun S A, Shalaby T A. Production of haploid plants from in vitro culture of unpollinated ovules of *Cucurbita pepo* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1998, 52: 117-121
78. Miyoshi K, Asakura N. Callus induction regeneration of haploid plants and chromosome doubling in ovule cultures of pot gerbera(*Gerbera jamesonii*). *Plant Cell Reports*, 1996, 16: 1-5
79. Mukhametzhanov S K. Culture of nonferlilized female gamctophytes in vitro. *Plant Cell Tissus and Organ Culture*. 1997, 48: 111-119
80. Olfa Slama-Ayed, Hager Slim-Amara. Production of doubled haploids in durum wheat (*Triticum durum* Desf.) through culture of unpollinated ovaries. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2007, 19: 125-133

81. Przyborowski J, K iemirowica-zczytt. Main factors affecting cucumber (*Cucumis sativus* L.) haploid embryo development and haploid plant characteristics. *Plant Breeding*, 1994, 112: 70-75
82. Puddephat I J, Robinson H T, Smith B M, Lynn J. Influence of stock plant pretreatment on gynogenic embryo induction from flower buds of onion. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1999, 57: 145-148
83. Rongbai L, Pandey M P, Garg G K, Pandey S K, Dwivedi&Ashima D K. Development of a technique for *in vitro* unpollinated ovary culture in rice ,*Oryza sativa* L. *Euphytica*, 1998, 104: 159-166
84. Serik K, Mukjambetzhhanov. Culture of nonfertilized female gametophytes *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1997, 48: 111-119
85. Sibi M L, Kobaissi A, Shekafandeh A. Green haploid plants from unpollinated ovary culture in tetraploid wheat(*Triticum durum* Defs.). *Euphytica*, 2001, 122: 351-359
86. Tarek A. Factors affecting haploid induction through *in vitro* gynogenesis in summer squash (*Cucurbita pepo* L.). *Scientia Horticulturae*, 2007, 115: 1-6
87. Wei-Ping Diao, Yuan-Yuan Jia, Hui Song, Xiao-Qing Zhang, Qun-Feng Lou, Jin-Feng Chen. Efficient embryo induction in cucumber ovary culture and homozygous identification of the regenets using SSR markers. *Scientia Horticulturae*, 2009, 119: 246-251
88. Yang H Y, Zhou C. In Vitro Inducition of Haploid Plants from Unpollinated Ovaries and Ovules. *Theor Appl Genet*, 1982, 63: 97-104

致 谢

本课题是在导师向长萍教授的悉心指导下完成的。从实验的设计和顺利进行以及最后论文的撰写都倾注了导师无微不至的关怀。从大三到硕士研究生五年里，无论是科研工作还是学习生活，导师都给予了莫大的帮助。导师平易近人、兢兢业业的育人风范以及对于 80 后学生的包容都使我终生难忘。在此毕业之际，谨对向老师表示由衷的感谢。

感谢实验室孔秋生老师从我预备试验直至最终的论文写作过程中不断地给与建议与帮助。

在论文的开题和论证过程中，得到了谢从华教授、叶志彪教授、别之龙教授、汪李平教授、徐跃进教授、匡汉晖教授、李汉霞教授的关心和指导。在此，向他们表示深深的谢意。

在实验实施过程中，杨静老师、夏军辉老师给与了无私的帮助，在此表示感谢，也感谢基地周师傅、徐师傅、汪师傅在田间管理上提供的帮助。

感谢刘芬、何丹、周迅、李俊丽、褚盼盼、张称心、余中伟、刘成平、陈方、王运强、张凌云、汪自松、王林、邢立栋师兄师姐们，以及谭远宝、秦华伟、蔡玉静等同学，他们在试验上都给予了大力的支持和帮助。

感谢陈鑫、张德、黎兰献、鲁旭才、何志俊在试验期间和最后论文的写作和修改过程中给予的帮助。

感谢苏文然在大棚内农药、叶面肥施用上提供的建议和帮助。感谢身在外地求学、工作的同学们给与的帮助。

感谢园艺林学院、国家蔬菜改良中心华中分中心及园艺植物生物学教育部重点实验室给本试验创造的良好条件和环境，使得试验能顺利完成。感谢各兄弟实验室在试验过程中给予的无私帮助。

感谢父母经年累月在学习生活上给予我莫大的支持和关心，使我顺利完成学业。

刘鶴
2010 年 6 月武汉狮子山