

# 葫芦科花药培养再生体系和单倍体育种

缙艳霞, 张明方

(浙江大学农业与生物技术学院园艺系, 园艺植物遗传资源与功能改良实验室,  
园艺植物生长发育与生物技术农业部重点实验室, 杭州 310029)

中图分类号: S642.03.6 文献标识码: A

文章编号: 1001-0009(2006)04-0063-04

葫芦科(Cucurbitaceae)植物包括 118 个属共 825 个种, 广泛分布于热带和亚热带地区。在我国分布约有 130 个种, 且多为人们所喜爱的瓜类蔬菜, 如西瓜(*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai.)、甜瓜(*Cucumis melo* L.)、黄瓜(*Cucumis sativus* L.)和南瓜(*Cucurbita pepo* L.)等, 它们的复合杂交育种需要有某些具有优良性状的材料, 此类材料的制备一般需要经历很长时间的筛选和纯合, 利用杂交一代进行花药培养, 然后再进行加倍, 不但可以获得较多的基因型植株, 找到筛选符合目标性状的材料, 而且可以大大缩短育种时间, 节省人力和物力, 花药培养技术为葫芦科育种材料的制备开辟了一条简便快捷的途径。

葫芦科花药培养受多种条件的影响, 既包括由植株本身所决定的基因型差异、小孢子的发育阶段、花蕾的预处理及供体植株的生理状态等内在条件; 也包括基本培养基成分、糖类、激素及培养条件等外界因素<sup>[1]</sup>。培养基的组成是影响诱导胚状体还是愈伤组织形成和植株再生的关键因素; 糖类是碳和能量的来源, 并且在诱导培养基中起着调节渗透压的作用, 已发现在诱导培养基中糖的类型和浓度影响雄性单性生殖; 氨基酸在花药培养中对于提高胚胎形成和植株再生也起着重要的作用<sup>[2]</sup>。现就影响及可能影响葫芦科花药培养的主要因素、花药培养的目的以及花药培养在育种上的意义做了综合性的论述。

## 1 影响葫芦科花药培养的主要因素

### 1.1 材料因素的影响


1.1.1 基因型 不同基因型的材料, 花药诱导率不同<sup>[3, 4]</sup>, 即使在同一种内、同一方法, 不同的材料间也有很大差别, 有

的材料对某些培养基根本无反应。F<sub>1</sub>代在花药培养中的愈伤组织产量高于其亲本产量, 有个别组合 F<sub>1</sub>代的愈伤组织产量甚至成倍的高于其高产量亲本, 表现杂种优势<sup>[5, 6]</sup>。

1.1.2 供体植株的生长环境和发育时期 许多植物植株的生长状况与花药培养胚发生率呈正相关。取样时材料生长的环境条件对花药培养亦有影响, 不同生长季节、栽培环境、不同部位的花蕾, 其花粉的生理状态均可能不同, 诱导率有明显差异。在人工控温控光的条件下, 同一花蕾中小孢子发育时期相对一致, 适于接种的花期也会大大延长。Chuong 等<sup>[8]</sup>报道生长在控温控光条件下试验供体植株的胚状体诱导频率是非常高的, 生长在较短光照和较低温度下的植物, 其花药具有较高的花粉胚胎发生能力, 光周期会影响花药的发育, 进而影响花药培养的结果。供体植株的花期对培养有一定的影响, 取材于开花一个星期的胚状体诱导率显著高于取材于将要开花和开花两个星期的胚状体的诱导率。

1.1.3 小孢子发育时期 不同作物花药培养要求的最适小孢子发育时期不同。不同时期的花培不仅要求的条件不同, 而且其培养效果也明显不同<sup>[7, 8]</sup>。一般所处发育期越早的花粉, 对培养条件的要求越苛刻, 且培养效果不一定好<sup>[2]</sup>。在实际取材时可以根据花药的长度、花蕾的大小、外观形状和色泽等与花药内的花粉发育进程的相关性有目标地直接采样。几乎绝大部分的试验材料以花粉发育到单核靠边期最佳。但其机理还不是很清楚, 第一种解释是可能由于单核靠边期的小孢子发育是处于胚胎形成的临界期, 即正处于不同分裂方式和发育途径的共同起始点, 不仅较为敏感而且容易诱导成功, 但在接种时花药已经超过了此阶段, 胚状体就不容易形成。Nitsch 等也认为小孢子中淀粉开始形成后, 小植株便不能从花粉中发育出来, 大的花蕾也有一些小植株形成, 可以认为这些花粉在发育过程中受到阻碍, 发育得比别的花粉慢, 因此在接种时还没有越过胚胎形成的临界点。第二种解释是小孢子发育过程中花药内源激素平衡在不断改变, 随着花药的激素平衡变得不适合它的生长和分裂, 或者为生长必需的其它一些成分已被耗尽了。

1.1.4 花药的预处理 多数成功的例子表明: 只有经过预处理的花药才能培养成花粉胚进而得到完整植株。预处理

 第一作者简介: 缙艳霞, 女, 1980 年生, 2004 年毕业于内蒙古农业大学农学院园艺专业, 同年考入浙江大学农业与生物技术学院园艺系, 攻读蔬菜学硕士学位, 师从张明方教授, 研究方向是植物遗传育种与生物技术, 主要从事西瓜花药培养再生体系建立的研究。  
收稿日期: 2006-01-10

有低温预处理、高温预处理<sup>[10]</sup>、离心处理和预培养等方式,其目的就是从形态上改变其极性分布,从生理生化上改变其细胞生理状态,从而改变其分裂方式和发育途径,对于不同的种类、品种和生理状态,花培所要求的预处理及其作用也不同。在葫芦科作物上目前比较普遍的预处理方式是低温预处理。推测是低温处理使花药壁的细胞受到损伤失去分裂增殖的活性,但花药内的部分花粉细胞仍具活性,在进一步的诱导中,则有可能形成愈伤组织,继代培养中仍能保持色泽淡绿、质地相对致密的特征,这种愈伤组织从其形成状况来看,可能是由花粉细胞形成的,但它究竟是花药壁细胞形成的,还是由花粉细胞形成的,需进一步进行倍性的细胞学鉴定<sup>[11]</sup>。魏瑛把小孢子发育至单核期的西瓜花蕾进行低温处理,温度分别为4℃和10℃,时间都为24h和72h,结果表明在4℃下的低温处理能够提高愈伤组织的诱导率,而且4℃的诱导效果比10℃的处理效果好,并且认为在4℃条件下处理72h的效果较佳;甜瓜在4℃下处理36h效果较好;在南瓜上则置于4℃低温处理4d<sup>[12]</sup>;H. G. Ashok Kumar<sup>[13]</sup>等将黄瓜花蕾在4℃和32℃下分别处理1~10d和1d,结果表明在4℃下处理2d的效果最佳。不同基因型的材料其低温预处理的反应不同,不采用任何预处理的小孢子直接培养在一些植物上也取得了胚状体。有关花药预处理的机理还需要进一步地研究。

## 1.2 培养基成分的影响

培养基的组成是影响花药培养成功与否的关键因素。在植物花药培养中一般均采用琼脂固体培养基,琼脂对花培的不利影响早在1978年Kohlenback和Wernicke就有报道,认为琼脂中含有的抑制物质会引起花药培养中胚状体的早期败育。多种作物的花药培养中很早就发现液体培养可极大地提高出愈率,但由于在花药漂浮培养时,一些花粉在培养早期会自动脱离药壁组织散落到培养基中,多数愈伤组织沉在液底,导致缺氧而影响其绿苗再生<sup>[14]</sup>,使其分化能力受到影响。在液体培养基中加入Ficoll增加培养基比重,使形成的愈伤组织浮在表面,改善了通气条件,可显著提高绿苗的分化。

**1.2.1 基础培养基** 花培常用的培养基有MS、Nitsch、White和N6等,培养基的状态、所用的凝胶种类和浓度的不同,都会影响花培的效果,大致上以MS培养基用的最普遍。在西瓜花药培养上,一般使用MS作为基础培养基<sup>[11, 15]</sup>;甜瓜和南瓜<sup>[12]</sup>的花药培养上也使用MS作为基础培养基;黄瓜的花药培养则使用B5为基础培养基。

**1.2.2 糖类** 早期试验证明,培养基中糖的浓度起着提供碳源和调节渗透压的作用,糖的类型和浓度影响着胚胎形成。蔗糖、麦芽糖、葡萄糖和果糖在雄性单性生殖的培养中是主要的碳水化合物,而蔗糖是比较好的碳源,由于不同植

物细胞渗透压差异甚大,因此各种植物花培要求糖的浓度不同,糖的浓度在许多植物中影响着胚状体的形成,较高浓度的蔗糖有利于其的形成<sup>[2]</sup>。在植物体细胞组织培养中,蔗糖一直作为最佳碳源,然而其它糖类物质对植物体细胞培养也产生一定的影响;因此,在体细胞培养中应注重碳源种类和用量的选择。植物花药培养中,过去一般均以蔗糖作为碳源,其适合的浓度因作物种类不同而异,近年来发现其它糖类特别是麦芽糖代替蔗糖能够促进花药培养效率。薛光荣等在西瓜花药培养时使用的蔗糖浓度除了生根培养基为15 g/L外,其它的均为30 g/L;陶正南在甜瓜愈伤组织诱导中用蔗糖浓度为60 g/L,分化培养基中的浓度为30 g/L;在南瓜的花药培养中当诱导培养基中的蔗糖浓度是150 g/L,产生的小植株最多<sup>[12]</sup>;在黄瓜中诱导胚胎形成时蔗糖浓度85 g/L,在分化时则为30 g/L<sup>[13]</sup>。在花培前期,高浓度的蔗糖不仅可诱导花粉胚的形成,而且由于花粉细胞的渗透压比体细胞的渗透压高,在一定浓度范围内能降低花丝等体细胞愈伤组织的发生,而提高花粉愈伤组织发生的比例;在中后期,降低蔗糖浓度可提高培养基水势,促进单倍体细胞的生长与繁殖,有利于愈伤组织和胚状体的发育和分化。

**1.2.3 激素** 在许多报道和试验中人们经常添加一些激素和其它物质,对花培的一系列过程进行调节和控制,培养基中的激素成分常常对花粉细胞的生长和分裂起重要作用。激素是花药培养中显著影响花药胚状体发生的因素,主要包括生长素和细胞分裂素,前者包括2,4-D、吲哚乙酸和萘乙酸等,后者包括激动素和6-苄基嘌呤等。一般低浓度的生长素类物质可以提高胚状体的诱导率。在花药培养时,调节激素成分不但可以影响花粉发育的类型是形成胚状体还是形成愈伤组织,而且还可以影响到是二倍体体细胞组织生长增殖还是单倍体花粉细胞生长增殖的问题,不同品种、不同基因型的植株对培养基中激素的有无、种类和水平的反应是不同的。早期花药培养中常加入天然成分椰乳。从较多的试验中知道,如果花药一直培养于无激素的培养基中,胚状体的诱导率很低,这说明,适当的外源激素对多细胞团发育有重要的促进作用。

## 1.3 培养条件

由于营养和空间上的竞争和选择,接种花药的密度不可过大。有报道表明三十烷醇在适宜浓度下有促进叶绿体形成的作用,袁万良在西瓜花药培养时,加入了三十烷醇进行处理,发现愈伤组织全部变为绿色,并形成深绿色点状组织,提高了再生植株的诱导率,为西瓜单倍体育种工作解决了关键技术。此发现对于大幅度提高花粉植株的诱导率以至形成一套成功的瓜类单倍体育种方法,具有重要的应用价值。

温度和光照对诱导产生愈伤组织和促进其生长非常重要,对花培的影响也最大,对于不同种类和基因型的植株,其

花培所需的培养条件会有很大差异。离体培养的花药对温度比较敏感,早期多用 25~28℃ 的温度进行花药培养。现在知道花药在较高的温度下培养效果更好,特别是最初几天经历一段高温培养出愈率会明显提高,并且许多研究表明变温处理即在高温下处理一定的时间之后再转至低温培养有利于提高胚状体的诱导率;光照并非是愈伤组织发育和分化的必要条件,虽然黑暗有利于愈伤组织的生长,但长时期的黑暗会明显降低愈伤组织的品质和外观,所以应适当的补充光照。

2 花药培养方法

薛光荣等以西瓜“琼酥”的花药作外植体进行培养,获得了再生的花粉植株,其培养方法如下。

2.1 取材

取小孢子发育处在单核期的花蕾,用自来水冲洗干净,先用 70%酒精消毒 30s,再用 0.1%升汞水消毒 10~15min,无菌水冲洗数次,在无菌条件下剥取花药。接种于去分化的培养基上。

2.2 诱导愈伤组织

将花药接种于 MS 附加不同浓度的 2,4-D、BA 和 KT 的去分化培养基中,于 25~30℃ 下进行光照培养。

花药培养在 MS+2,4-D 0.5 mg/L+BA 0.5 mg/L 或 MS+2,4-D 0.5 mg/L+BA 0.5 mg/L+KT 0.5 mg/L 的去分化培养基上,产生黄绿色、质地疏松的愈伤组织,愈伤组织的诱导率达 50%~90%,但将这类愈伤组织转入分化培养基后,一般很快变黄褐色甚至死亡。而花药培养在 MS+BA 2.0 mg/L+KT 2.0 mg/L 的去分化培养基上,能产生黄绿色、质地致密的愈伤组织,并可直接分化出根和绿芽或幼叶组织,但这种愈伤组织的诱导率很低,大约为 0.5%。

2.3 愈伤组织的分化

待愈伤组织长到 2~3mm 时,转移到 MS+5.0~10.0 mg/LGA<sub>3</sub>+4.0 mg/LBA+30~40 mg/L 腺嘌呤的分化培养基上,黄绿色、质地致密的愈伤组织能很快地分化出植株,但大多数植株畸形,个别植株还出现缺绿、白化现象,成苗率很低,如果将这种已进入分化阶段的材料再转入 MS+2.0 mg/L 三十烷醇或 MS+2.0 mg/L 三十烷醇+0.2 mg/LBA 的培养基上,很快分化出发育正常、叶色浓绿的无根植株。

2.4 诱导生根

在分化培养中,对一部分根系生长不好的植株,切取无根植株转入 1/2 MS+0.2 mg/LIBA+1.0 mg/LIAA 或 1/2MS 附加 IAA 1.5 mg/L、蔗糖浓度为 15 g/L 的生根培养基上,10d 左右即可生根,可采取铁钒苏木精染色法观察根尖染色体,鉴定分化的植株是否为花粉植株。

3 花药植株倍性鉴定及染色体加倍

3.1 倍性鉴定

可取再生植株的幼嫩根尖 1~2cm—0.002M8-羟基喹啉 20℃ 处理 2h—乙醇洗涤—乙醇:冰醋酸=3:1 固定液 20℃ 固定 12h—用纯酒精洗涤 2~3 次至材料不含冰醋酸的味道蒸馏水洗涤—用 1mol/L 盐酸保持 45℃ 解离 30min—蒸馏水洗涤—卡宝品红染色—置于显微镜下观察,确定植株的倍性。也可以通过保卫细胞内叶绿体数目和气孔大小的测定;将根尖染色体鉴定确定倍性的植株的叶片下表皮放置于载玻片上,加盖玻片,在显微镜下观察保卫细胞的叶绿体数目。

3.2 染色体加倍

单倍体植株如何加倍成为纯合的二倍体植株,对于将花培技术真正用于实际的育种工作至关重要。目前加倍的途径有二条:自然加倍;人工加倍。

3.2.1 自然加倍 花粉植株群体中自发加倍的频率在不同植物上是不同的。自然加倍可能来源于未减数的配子,或最初几次原胚的核内有丝分裂。自然加倍的优点是不会出现核畸变。

3.2.2 人工加倍 人工加倍的方法通常有两种:一是先移栽后加倍。可以根据花药培养得到的植株的外部形态和正常的二倍体植株比较鉴定或通过染色体数鉴定,然后将单倍体植株根洗净,用 0.1%~0.34% 的秋水仙素浸泡,砍去植株上部,任其重新生长。二是先加倍后移栽。将具有 3~4 叶,1~3 条根的植株通过无菌操作转入 B5 培养基中,附加 10~100 mg/L 秋水仙碱,加倍后移栽入土,开花时,根据花的形态和花粉发育情况判断倍性。

4 葫芦科花药培养的目的及意义

花药培养育种,是将花粉培育成单倍体植株,再经染色体自然或人工加倍得到纯合二倍体的一种育种方法。这种染色体加倍产生的纯合二倍体,在遗传上非常稳定,不发生性状分离,因此,花培育种能极早稳定分离后代、缩短育种年限。利用花药培养可明显缩短育种年限(5~6 个生育世代),提高配子体的选择效率(尤其适于数量性状的选择),缩小育种群体。

凡具有配子染色体数的植物便称为单倍体植株。单倍体培养是现代育种技术的一个重要手段,葫芦科花药培养的目的主要表现在以下几个方面:a.由于从单倍体的染色体加倍可以获得纯合的二倍体和多倍体,可以短期内获得所需要的优良品种,同时可增加重组型的选择几率,这样不仅省去了多代自交,快速获得自交系,并且可以克服杂种性状的分离;b.单倍体植物与诱变育种相结合,可以加速诱变育种的进程;c.单倍体不存在显隐性问题,产生的隐性突变在第一代即可表现出来,其基因型完全可以由表现型反映出来,有利于鉴定和选择。d.新抗元的不断发现,野生资源的利用。

远缘杂交不亲和, 杂种小 孕等障碍, 可采用 试管受精; 有性杂交结合幼胚培养, 细胞融合或 DNA 直接导入及基因转化; 丰富外植体的遗传基础, 一经花药培养, 能快速有效地纯合目标基因, 比以回交、复交、系统选育可超前成功 5 年; e. 只要查明抗病性与其它农艺性状的连锁关系, 利用花培可打破不利连锁, 就垂直抗性基因的转育而言, 只有花培育种才能做到快速有效, 达到抗性基因的取代目的, 不终结优势小种的寄主, 从而使品种处于旺盛的优势时期, 达到高产、稳产<sup>[5]</sup>; 利用花培聚合累加微效多基因抗性于一体, 育成水平抗性品种, 可持续稳产; f. 利用花药和花粉培养的胚状体或愈伤组织不仅可以作为基因工程的受体进行基因转化, 快速获得符合育种目标的植株, 提高育种效率; 而且, 由单倍体技术产生的双单倍体(DH)株系可迅速发展成一个永久的分离群体, 无遗传变异, 可以重复进行检验, 是抗性数量性状分析的良好群体, 且被认为是 AFLP, RFLP, RAPD 等分子标记和基因图谱研究极好的材料, 可在很大程度上提高基因定位、图谱的准确性, 并绘制高密度的遗传图谱。

由于花粉植株是由单倍体直接加倍形成的, 故隐性性状得以纯合表现, 而且花粉植株不论来源于  $F_1$  或  $F_2$ , 其当代株系均表现丰富的多样性, 如株高、生育期、育性及抗性等。这些性状相互交叉, 组成了具有多种形态特征的花培株系, 因此, 花培育种既可充分利用植物的种质资源, 又可获得性状的多样性。

花药培养育种已与常规杂交育种、远缘杂交育种、诱变育种以及转基因技术相结合, 发展形成了一套育种技术体系。花培育种是生物技术在农作物育种中应用最广泛、最有成效的方法之一, 在传统农业向高技术农业的转化中发挥着纽带作用, 是一种快速有效的育种途径。

## 5 问题及展望

葫芦科单倍体育种才刚刚开始, 存在很多需要解决的问题。第一, 对于葫芦科花药培养的研究比较单一, 花药培养中小孢子的发育途径, 大都是经过愈伤组织, 而没有形成胚状体。第二, 尽管愈伤组织诱导率得到了提高, 但其分化和再生能力却不明确。因为愈伤组织的诱导率过高时所形成的半透明状、结构松散的愈伤组织, 虽然生长迅速, 但是只能增殖, 不能分化。第三, 愈伤组织中细胞的倍性变化复杂。第四, 小植株的诱导率很低。大多数文献的试验只是培养到愈伤组织阶段, 对于诱导产生植株的频率却只是说有待于提高。由于前人对于葫芦科花药培养研究比较少, 所做的试验大都偏向于某一个或几个影响因素的作用, 缺少比较系统的花药再生体系研究。

花药培养中进一步提高诱导花粉单倍体植株的频率, 减少体细胞干扰等是应该重视的问题。目前主要通过提高蔗糖浓度, 减少或不用 2, 4-D 来诱导花粉愈伤组织。葫芦科

花粉培养的难度较大, 涉及的因素主要有花粉来源植株的基因型及其所处的生理状态、培养基的物理状态及其成分、培养方式等, 这些必要的因素还有待进一步深入研究, 以建立各作物的离体花粉培养的最适体系, 对于基础研究和育种实践及基因工程操作具有重要意义。

花药培养技术虽有许多优势, 但目前仍未能广泛应用于各种农作物育种中, 所以, 应加强基础研究, 采用分子标记手段, 将控制花培能力的有关数量性状基因组合在一起, 从根本上解决花培效率低的问题。此外, 综合应用已取得的各种改良的花培技术(如低温预处理), 并通过培养过程中某些生理生化指标(如内源激素、氨基酸类物质的含量等)与培养力之间的关系, 寻找更加有效的培养技术措施, 提高花培效率。

花药和花粉培养不仅是获得单倍体的重要途径之一, 是遗传变异的来源并且有益于种间基因转移, 因此花培无论是在育种工作还是基础研究中, 都特有广阔的应用前景。

## 参考文献:

- [1] Bajaj Y.P.S., 1990. In vitro production of haploids and their use in cell genetics and plant breeding. In: Bajaj Y.P.S. (Ed.), Haploids in Crop Improvement. 1. Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol. 12. Springer, Berlin, pp. 3-44.
- [2] Ferrie AM R Palmer CE & Keller WA (1995) Haploid embryo genesis. In: Thorpe TA (ed) In Vitro Embryogenesis in Plants (pp. 309-344). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- [3] Rennie PJ (1996) Botanical microtechnique for plant damhteres de. Priment (capsicum annuum).) anelration des taux de plantes ches diffaents genotypes par. des. traitements B. a+35°C Agromonie. 1981, 1: 859-864.
- [4] MitykoJ. AndiasfalvyA. csillery. g. el. Rl. Anther - culture response in different genotypes and Flhytrids of pepper (capsicum annum L.) plant breeding .1995, 114: 78-80.
- [5] Barro F. Martin A. Response of different genotypes of Brassica to microspore culture. Plant Breeding. 1999 118(1): 79-81.
- [6] Ogawa Rie, Wasaya ishihawa Eiko Niwata Katsuj Oosawa Cryopervation of shoot primordial cultures of melon using a slow preeing procedure. Plant Cell and Organ culture 1997, 49: 171-177.
- [7] Biddington N.L., Robinson H. T. Ethylene production during anther culture of Brussels sprouts(Brassica oleracea var gemmifera) and its relationship with factors that affect embryo production. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 1991, 25(3): 169-177.
- [8] Karakullukcu S., Abak K. Research on anther culture of eggplant: The effects of sugar and growth regulators. Doga Turk Tarim ve Oman cilik Dergisi. 1993, 17: 811-820.
- [9] Ozzambak E., Atasayar A., Cockshull K. E. Anther culture of to matoes and eggplants. Acta Horticulturae 1994, 366: 229-233.
- [10] Ezura H, Oosawa K. Selective regeneration of plants from diploid and tetraploid cells in adventitious shoot cultures of melon(Cucumis melo L.) Plant Tissue Cult. 1994, 11: 26-33.
- [11] 魏瑛. 低温预处理对西瓜花药愈伤组织诱导的影响[J]. 甘肃农业科技 1999, (5) 34-36.
- [12] Metwally, E. I., Moustafa, S. A., El-Sawy, B. I., Shalaby, T. A., 1998. Haploid plantlets derived by anther culture of Cucurbita pepo. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 52, 171-176.
- [13] H. G. Ashok Kumar & H. N. Murthy .Effect of sugars and amino acids on androgenesis of Cucumis sativus. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 2004, 78: 201-208.
- [14] 袁万良, 付润民. 西瓜花培试验初报[J]. 陕西农业科学, 1995, (1) 29-30.
- [15] 郭向荣, 景健康, 胡含. 大麦不同基因型游离小孢子的直接培养再生及培养体系的优化[J]. 遗传学报 1997 24(6): 507-512.