

番茄花药培养研究进展

周 林, 曾国平

(华南农业大学 园艺学院, 广东 广州 510640)

摘 要: 综述了番茄花药培养的研究进展。详细讨论了影响番茄花药培养的主要因素, 如小孢子发育途径、取材时期、植株的基因型、供体植株的年龄和生理状况、花药预处理、培养基及其成分等。指出了目前花药培养研究中存在的主要问题并提出了展望。

关键词: 番茄; 花药培养; 研究进展

中图分类号: S 641.203.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2007)11-0085-03

番茄花药培养可加速育种进程, 提高选择效率, 同时, 花药培养为分子育种奠定基础。从 20 世纪 70 年代开始, 番茄花药离体培养研究取得了一定进展^[1], Sharp 等^[2] 从番茄不成熟的花粉时期获得单倍体愈伤组织, 但到目前为止, 只有 Gresshoff^[3]、高秀云^[4]、Ma^[5] 和 Zagorska^[6] 等人得到单倍体植株。番茄花药离体培养获得单倍体的主要困难在于诱导频率偏低且不可避免地产生体细胞混杂。现综述了番茄花药培养的影响因素及存在问题, 并提出了展望。

1 番茄花药培养的影响因素

1.1 小孢子发育途径

番茄花药离体培养中小孢子发育途径, Gresshoff 和 Doy^[3] 认为小孢子第一次分裂是均等分裂, 即 B 途径。周广栋等^[7] 除观察到 B 途径外, 还观察到 A-V, A-G 途径 与前者的观点不一致, 数据统计的结果支持高秀云等^[4] 的观点, 即番茄小孢子雄核发育以 B 途径为主。

1.2 取材时期

Gresshoff 和 Doy^[3] 以栽培番茄的 43 个品系为材料进行研究, 认为花粉母细胞处于减数分裂时期, 愈伤组织的诱导最易成功, 单核期以后的花粉粒不能产生单倍体愈伤组织和小植株。高秀云等^[4] 也认为番茄花药培养的最适时期为单核期。卫志明等^[8] 以北京早红×402 的 F₁ 为材料, 认为花粉粒处于单核中期的花蕾进行培养最为适宜。而朱丽萍等^[9] 认为, 选择单核靠边期的花药来进行愈伤组织的诱导最适宜。

起初人们以花蕾长度来确定花粉的发育时期, 朱丽萍等^[9] 经过系统的研究发现, 不同果型番茄品种, 花药长度不同, 在花粉发育时期存在的差别极其明显, 并成

正相关关系。小果型番茄品种花药长 2~3 mm 时为小孢子母细胞时期, 3~4 mm 长为单核早期, 4~5 mm 长为单核中期, 5~6.5 mm 长为单核靠边期; 中果型番茄品种花药 2~4 mm 长为小孢子母细胞时期, 4~5.5 mm 为单核早中期, 5.5~7.5 mm 为单核靠边期; 大果型番茄品种花药 2~4 mm 长为小孢子母细胞时期, 4~5.5 mm 为单核中期, 5.5~8 mm 单核靠边期。但这种标准不是很可靠, 因为花蕾长度很容易受到植株的年龄、生长状况、外部环境条件、季节和人为管理的影响。Sibi 等^[10] 指出, 萼片和花瓣的大小相关性是小孢子处于单核期的形态学标志, 但这种相关性并非适用于所有的基因型。Chambonnet^[11] 则建议将颜色作为其形态学的标志更为精确, 呈现一定色泽的花药包含着最多的单核晚期的小孢子, 同时含有约 10% 的双核期的小孢子。采用这种标志的花药在培养时的胚胎诱导率得到了提高。

1.3 植株的基因型

植物基因型是影响离体诱导单倍体成功的最重要的因素之一, 不同基因型的植株对培养的反应不同。其表现为是否可诱导愈伤组织、胚状体的生成及其分化的频率, 以及再生单倍体植株的能力。

Gresshoff 和 Doy^[3] 用 43 个番茄栽培品种和 48 个拟南芥品系进行培养, 都只有 3 个栽培品种或品系能够诱导单倍体组织。高秀云等^[4] 进行了不同品种的花药培养, 在相同培养条件下, 不同品种的花药均可产生愈伤组织, 但其频率随品种不同而有所差异, 杂种的诱导频率一般高于双亲。Zagorska 等^[6] 人的报道与之有不一致的地方, 他们用 80 个番茄品种, 有 53 个诱导愈伤组织, 研究结果同时表明, 杂交种具有微弱的形成愈伤组织的能力, 愈伤诱导率很低。

1.4 供体植株的年龄和生理状况

生理状态对番茄花药培养力有直接影响, 同一遗传背景材料在不同的地理纬度、不同的季节、不同的生态条件、不同的栽培水平、不同的年龄和旺势等, 其培养力

第一作者简介: 周林(1981-), 男, 硕士, 研究方向为蔬菜遗传育种。
E-mail: uncle020@163.com.

通讯作者: 曾国平, 副教授。E-mail: gpzeng@scau.edu.cn.

收稿日期: 2007-07-02

均有较大的差异。

在适合的温度条件下幼龄植株花药培养的反应最好。老龄植株,尤其是接近开花末期的植株通常花蕾较小,这样的花蕾含有各种各样的小孢子,畸形花粉数量增加,导致花药培养的反应降低和推迟。供体植株的生理状况对雄核诱导频率有直接的影响。一般而言,在适宜条件下生长而成的健康植株的雄核诱导率和植株再生率高。从季节上看,冬、春季较夏、秋季更适合于进行花药培养。这可能是由于温度与光周期共同作用的结果。

Shtereva 等人^[12]的研究表明,栽种在温室中的供体植株的愈伤诱导率比大田中的高 10%~25%,这可能是因为冬天温室中有比较高的湿度和短的光周期。因此,首要条件是让植株在最适宜的环境下生长,定期施肥灌水,并应选择年幼的健康植株作供体。

1.5 预处理

在培养前,对花药进行物理或化学处理能够有效地提高小孢子发育成单倍体植株的诱导率^[13-20]。其中最有效的是低温效应。许多研究认为低温预处理可以促进雄核发育,增加花药愈伤组织或胚状体诱导率^[21-23]。周广栋等^[7]的试验结果也表明,4℃低温预处理可提高愈伤组织诱导率,并提早开始雄核发育,但是对于不同的基因型反应不同。经低温预处理,番茄品种 Jerry 愈伤组织诱导率增加 73.17%,毛粉-802 愈伤组织诱导率增加 45.09%。

低温预处理的温度不同,处理时间不同对于愈伤组织诱导率的作用也不同。Shtereva 等^[12]用栽培品种 Roma ms/ms 作为试材,设置对照、4℃2 d、4℃6 d、7℃7 d、10℃9 d、35℃4 d 等 6 个处理,结果表明,4℃2 d 和 35℃4 d 都有利于器官的形成。

关于低温预处理的作用机理,Pechan^[24]认为低温预处理实际上是采用某种形式的胁迫处理,其通过外界逆境因素的刺激,促使花药内离体小孢子完成从活体内配子体发育转向孢子体发育。这与 Huang 和 Sunderland^[25]的观点有相同之处,认为低温预处理的主要作用是能够提供一个更合适的环境,以利于小孢子诱导和在诱导期存活。Nitsch 等^[26]也认为低温预处理提高花粉胚状体的主要原因是均等二核花粉数量的增加,低温处理改变了花粉粒第一次有丝分裂的轴向,从而使花粉朝着胚胎的方向发育。而 Sunderland^[14]认为低温作用的机理不在于改变纺锤取向,而是保持花粉的活力,使营养细胞得以完成细胞质的改组转向胚胎。黄斌^[27]综合前人的工作,提出低温预处理的可能作用机制是:第一,引起花药内源激素发生变化,进而影响愈伤组织的形成。第二,引起小孢子的孤立化,花药壁细胞和绒毡层在低温预处理过程中逐渐退化解体。第三,使绝大多数小孢子保持其生活力。

其他处理也能明显提高花药培养的频率。例如,在

30~35℃的高温下对花蕾进行预处理;将花药直接离心;将花蕾在水中浸泡几天,再在低温下对花药进行离心;在取出花药前将花蕾离心或用乙烯利处理花药;将花蕾用 4Gy 射线和 10℃处理 9 d^[2],都能够增加愈伤组织诱导数量。

1.6 培养基及其成分

培养基成分不仅决定着花药培养的成功,还决定着雄核发育的方式。在番茄花药培养中,基本培养基以 MS 应用最为普遍。在此基础上,激素的种类及配比是影响诱导频率的又一个关键^[2,3,28-32]。6-BA、KT、NAA、IAA、IBA、2,4-D、2ip、GA₃和 zeatin 不同浓度的配比都曾被试用在番茄的花药培养中。视供试品种特点,选用激素的种类和浓度不同。朱丽萍等^[9]用 1.0 mg/L KT + 0.5 mg/L NAA + 4%蔗糖诱导不同品种的番茄,均可产生愈伤组织。周广栋等^[7]经筛选,采用 0.5 mg/L KT + 1.0 mg/L 2,4-D + 0.1%酵母粉 + 3%蔗糖的培养基诱导愈伤组织,也收到了一定的效果。Ma 等^[5]则先在附加 5 mg/L IAA + 2.5 mg/L zeatin 的 MS 培养基中诱导愈伤,然后再转入 0.2 mg/L KT 的培养基中继续培养,最终获得小植株。Zagorska 等^[6]通过 1 mg/L 2ip + 2 mg/L IAA 或者 0.25 mg/L zeatin + 0.5 mg/L IAA 分化出芽,再在 1/2MS + 2 mg/L IBA + 0.5 mg/L GA 培养基中生根,从而得到小植株。

2 目前花药培养存在的问题

通过花药培养获得的单倍体植株,至今尚不能广泛应用于育种,存在如下问题:

诱导频率和分化成苗率低。番茄花药培养的诱导率一般只有百分之几,甚至仅为千分之几以至更低。有些种虽有获得单倍体植株的报道,但其诱导率极低,可重复性差,很难利用。

培养的愈伤组织诱导单倍体或者双单倍体的基因型潜力差异很大,不同基因型的番茄材料花药培养诱导频率差异十分显著。

对从胚状体到诱导成单倍植株的研究仍然很少,许多培养条件尚不十分清楚。

小孢子自身产生核内复制、核融合等倍性变异。

药壁绒毡层细胞对花粉发育的作用机制,还很模糊。如何用人工合成培养基代替绒毡层的作用,目前培养基及其附加成分带有一定的盲目性。

白化苗的问题。在禾本科、百合科、茄科均有发现,只不过严重程度不同而已。

目前的研究多为在单因子水平上的研究,对影响胚状体诱导率的各因子之间互作效应的研究极少。除了分裂素和生长素之间的互作效应,其他如供体植株生长环境条件(如温度、光照和营养)之间的互作、培养条件(如光照、时间、黑暗、温度等)之间的互作以及基因型与各培养条件之间的关系等,尤其是对培养基成分之间的

互作效应尚不十分清楚。

3 展望

花药培养力的大小, 是受多基因控制的数量性状, 因而随着基因型的差异而有很大的变化。所以, 应当加强基础研究, 采用分子标记辅助育种手段, 将控制花药培养力的有关数量性状的基因组合在一起, 既可以显著提高培养效率, 快速纯合植物基因型, 尽快获得纯合转基因植物, 又扩大了花药培养技术的应用范畴。同时, 将目的基因转入单倍体材料, 更容易鉴定和筛选具有外源基因的材料。小孢子作为外源基因的受体, 可以通过离体培养直接获得纯合的转基因材料, 使目的基因易于表达。另外, 可以开发利用新的技术体系, 比如基因敲除技术, 增加单倍体和纯合体的比例。

今后除了要加强以上几方面的研究以外, 还应设法进一步改进培养条件和培养基以拓宽基因型的实用范围; 加强小孢子发育机理的研究以实现对小孢子发育的主动调控; 加强游离小孢子培养技术的研究以便利用小孢子来进行遗传转化和离体选择等。同时要加强花药培养育种的遗传学研究, 特别要重视影响其产业化的理论和技术的问题, 并加速该技术在育种实践上的应用。

参考文献

[1] 奚元龄, 颜敬昌. 植物细胞培养手册[M] . 北京: 北京农业出版社, 1989: 536-537.

[2] Sharp W R, Dougall D K, Paddock E F. Haploid plantlets and callus from immature pollen grains of Nicotiana and Lycopersicon[J] . Bull Torrey Bot Club, 1971, 98: 219-222.

[3] Gresshoff P M, Doy C H. Development and differentiation of haploid Lycopersicon esculentum(tomato)[J] . Planta, 1972b, 107: 161-170.

[4] 高秀云, 王纪方, 金波. 等. 番茄花药离体培养获得植株[J] . 园艺学报, 1980, 7(4): 37-41.

[5] Ma Y H, Kato K, Masuda M. Efficient callus induction and shoot regeneration by anther culture in male sterile mutants of tomato (Lycopersicon esculentum Mill. cv. First)[J] . Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 1999, 68(4): 768-773.

[6] Zagorska N A, Shtereva A, Dimitrov B D, et al. Induced androgenesis in tomato (Lycopersicon esculentum Mill.) I. Influence of genotype on androgenetic ability[J] . Plant Cell Reports 1998, 17(12): 968-973.

[7] 周广栋, 王秀峰, 谢冰, 等. 番茄花药离体培养中低温预处理对小孢子发育的影响[J] . 中国农学通报, 2005, 21(2): 192-195.

[8] 卫志明. 农业科学集刊(第十集): 农作物原生质体培养专辑[G] . 1995(7): 12.

[9] 朱丽萍, 陈火英, 庄天明, 等. 番茄不同花药长短及花粉发育时期其愈伤组织诱导率的相关性[J] . 上海交通大学学报(农业科学版), 2005, 23(3): 239-243.

[10] Sibi M R, de Vaulx D, Chambonnet D. Obtention de plantes haploides par androgenese in vitro chez le piment(Capsicum annuum L.) [J] . Ann. Amelior. Plants, 1979, 29: 583-606.

[11] Chambonnet D. Bulletin interne de la station d'Amélioration des plantes maraicheres d'Avignon Montave[M] . 1988.

[12] Shtereva L A, Zagorska N A, Dimitrov B D, et al. Induced androgenesis in tomato (Lycopersicon esculentum Mill). II. Factors affecting induction of androgenesis[J] . Plant Cell Reports, 1998, 18(3-4): 312-317.

[13] Keller W A, Armstrong K C. Stimulation of embryogenesis and haploid production in Brassica campestris anther cultures by elevated temperature treatments[J] . Theor Appl Genet, 1979, 55: 65-67.

[14] Sunderland N, Wildon D C. A note on the pretreatment of excised flower buds in float culture of Hyoscyamus anthers[J] . Plant Sci Lett, 1979, 15: 169-175.

[15] de Vaulx R D, Chambonnet D, Pochard E. Culture in vitro d'anthers de piment (Capsicum annuum L.): amelioration des taux d'obtention de plantes chez differents genotypes par des traitements a +35°C[J] . Agronomie, 1981, 1: 859-864.

[16] Pickering R, Devaux P. Haploid production: approaches and use in plant breeding. In: Shewry P R (ed) Barley: genetics, biochemistry, molecular biology and biotechnology[M] . CAB International, Wallingford, 1992, 519-547.

[17] Phippen G, Ockendon D J. Genotype, plant, bud size and media factors affecting anther culture of cauliflowers (Brassica oleracea var. botrytis)[J] . Theor Appl Genet, 1990, 79: 33.

[18] Foroughi-Wehr B, Wenzel G. Andro- and parthenogenesis. In: Hayward M D, Bosemark N O, Ramagosa I (eds) Plant breeding principles and prospects[M] . Chapman & Hall, London, 1993, 261-279.

[19] Osolnic B. Stimulation of androgenesis in white cabbage (Brassica var. capitata) anthers by low temperature and anther dissection[J] . Plant Cell Tissue Organ Cult, 1993, 32: 241-246.

[20] Marchetti S, Vischi M, Pappalardo G, Giordano A, et al. Maximizing androgenetic di-haploids in barley[C] . Abstracts 8th Int Cong Plant Tissue Cell Cult, Firenze, 1994, 94.

[21] Genovesi A D, Collins G B. In vitro production of haploid of corn via anther culture[J] . Crop Science, 1982, 22: 1137-1144.

[22] 刘萍, 宋晓华, 马惠萍, 等. 温度处理对春小麦花药愈伤组织诱导率影响初报[J] . 宁夏农学院学报, 1996, 17(1): 152-156.

[23] 原玉香, 耿建峰, 张晓伟, 等. 影响玉米花药培养效率的因素研究[J] . 华北农学院报, 2001, 16(3): 12-16.

[24] Pedan P M, Keller W A. Induction of microspore embryogenesis in Brassica napus L. by gamma irradiation and ethanol stress[J] . In Vitro Cell Dev Biol, 1989, 25: 1073.

[25] Huang B, Sunderland N. Temperature-stress Pretreatment in Barley Anther Culture[J] . Ann Bot, 1982, 49: 77-88.

[26] Nitsch G, Norreel B. Effect d'un choc technique sur le pouvoir embryogénèse du pollen de Datura innoxia cultivé dans l'anthere ou isolée l'anthere[J] . C. R Acad Sci, Paris, 1973, 276: 303-306.

[27] 黄斌. 大麦花药培养中低温预处理对花药愈伤组织形成的影响[J] . 植物学报, 1985, 27(3): 439-443.

[28] Debergh P, Nitsch C. Premier resultats sur la culture in vitro de grains de pollen isolés chez la tomate[J] . C R Acad Sci Paris, 1973, 276D: 1281-1284.

[29] Zagorska N, Abadjeva M, Georgiev G. Morphogenesis and plant differentiation in anther cultures of the genus Lycopersicon Mill[C] . Proc 5th Int Cong Plant Tissue Cell Cult Tokyo, 1982, 539-540.

[30] Jaramillo J, Summers W L. Tomato anther callus production: solidifying agent and concentration influence induction of callus[J] . J Am Soc Hort Sci, 1990, 115: 1047-1050.

[31] Summers W L, Jaramillo J, Bailey T. Microspore developmental stage and anther length influence the induction of tomato anther callus[J] . Hortscience, 1992, 27: 838-840.

[32] Bellamk B, Chlyah A. Callus and shoot formation in anther culture of tomato (L. esculentum) [C] . Abstracts 8th Int Cong Plant Tissue Cell Cult, Firenze, 1994, 94.