

蔬菜类作物游离小孢子培养中的影响因素

申娟¹, 梁秋霞², 曹刚强^{1, 3, 4}, 李峰¹, 应芳卿⁵

(1. 郑州大学 生物工程系, 河南 郑州 450001; 2. 郑州大学 离子束生物工程重点实验室, 河南 郑州 450052;

3. 中国农业科学院 作物研究所, 北京 100081; 4. Department of Botany and Plant Sciences

University of California Riverside, California 92521; 5. 郑州市蔬菜研究所, 河南 郑州 450015)

摘要: 利用单倍体植株快速培育纯系在作物育种中可以缩短育种年限, 加速育种进程, 降低误选。因此利用植物游离小孢子培养获得单倍体植株已成为现代育种技术中的一个重要手段。现着重探讨影响蔬菜类作物游离小孢子胚胎发生及其再生植株诱导的因素, 并且提出了蔬菜类作物游离小孢子培养过程中存在和急需解决的问题。

关键词: 游离小孢子; 胚胎发生; 单倍体育种

中图分类号: S 63; S 603.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001—0009(2008)06—0059—04

早在 20 世纪 70 年代, 从花药培养基础上发展起来的游离小孢子培养在烟草上就有成功的报道; 20 世纪 80 年代, Kyo 和 Harada 在烟草上成功的建立了有效的游离小孢子培养系统; 20 世纪 80 年代后期, 游离小孢子培养技术在十字花科的油菜上得到了迅速发展, 不仅使培养技术日臻完善, 而且有效的利用游离小孢子培养系统进行了作为外源基因受体和离体后发育途径转变的生化标记等其它方面的研究^[1]。

与花药培养相比而言, 游离小孢子培养具有很大的优势, 由于小孢子体积小而数量大, 因此可以采用类似微生物培养的方法进行培养而省工、省时; 由于去除了小孢子和花粉壁绒毛层细胞之间可能存在的营养竞争现象, 使得能在更大的基因型范围内, 以更高的频率诱导小孢子的胚胎发生、以更低的成本获得遗传上完全纯合的双单倍体植株, 由于小孢子的单倍体和单细胞特性, 外源基因经过转移后再通过自发加倍或人工加倍, 可以较大限度地降低嵌合体和杂合体转基因植株的产生; 同时, 利用游离小孢子培养还便于进行离体诱变、突变体筛选等其它的遗传操作。但是, 在植物的游离小孢子培养过程中, 存在许多影响游离小孢子胚胎发生及其再生植株诱导的因素, 下面将逐一对其进行探讨。

1 供体植株

1.1 供体植株的基因型

第一作者简介: 申娟(1982-), 女, 在读硕士, 主要从事植物细胞工程与遗传改良方向的研究。E-mail: shenjuan0000@126.com。
通讯作者: 曹刚强。E-mail: caogangqiang126@126.com。
基金项目: 河南省重大科技攻关资助项目(0522010420)。
收稿日期: 2008—02—06

胚状体的诱导与材料的基因型密切相关, 同一作物的不同基因型材料, 在同样的试验条件下, 小孢子培养诱导的频率差异很大。张丽^[2]等以 20 个不同类型的萝卜品种为材料, 发现只有“山东极叶心里美”一个品种能够形成胚, 其他品种均未能诱导形成胚。可见小孢子胚胎发生能力同其他遗传性状一样, 是一种受基因调控的遗传特性。

1.2 供体植株的生长环境

不同的生长季节、栽培环境, 其花粉的生理状态可能不同, 诱导频率将有明显差异。董艳荣等^[3]研究认为, 生长在大田的植株比在温室中的诱导频率高; 生长在较短光照和较低温度下的植株, 其花药也具有较高的花粉胚胎发生能力。袁亦楠等^[4]对番茄直接进行游离小孢子培养后发现薯叶番茄 10 月份与 5 月下旬花蕾的类胚发生率分别为 0.25% 和 0.01%, 可能是 10 月的夜温较低, 影响了供体植株体内小孢子的发育方向, 从而使在以后的培养中, 偏离了向配子体方向发育, 进行脱分化而形成胚状体或愈伤组织。

1.3 供体植株的花期

依据供体植株开花的时间分为初花期, 盛花期和末花期, 在不同的花期取材培养的结果差异显著, 同时由于材料的差异, 最佳的取材花期也不同。方淑桂等^[5]对 80 份早中熟花椰菜栽培种为试验材料进行小孢子培养, 发现 3 个参试品种均以盛花前期培养的小孢子产胚量最高, 比其他时期培养的均高 20% 以上, 差异达极显著水平; 末花期培养的产胚量极少。而 Shtereva L A 等^[6]在番茄小孢子诱导胚状体的影响因素的研究中发现取开花初期的小孢子的成胚率比 50 d 之后取材的出胚率高 40%~50%, 出胚时间也能提前 30 d。

1.4 供体植株的花粉发育时期

选择合适的花粉发育时期的花蕾是提高植株花粉诱导频率的重要因素。严准等^[7]对甘蓝游离小孢子研究表明,在初花期所取得花蕾营养水平高,小孢子分化水平低,代谢很旺盛,有利于提高胚的诱导效率。刘冬等^[8]以“成都大白菜”为材料,比较不同长度花蕾的小孢子胚胎发生能力,结果表明长度为3 mm的花蕾花药中绝大多数小孢子正处于单核晚期,胚胎发生率最高。其它的一些研究也表明,十字花科小孢子的胚胎发生最佳时期是在单核中期到单核靠边期,茄果类小孢子的胚胎发生最佳时期是单核期到双核期,特别是单核靠边期。

1.5 供体植株的取样时间

刘志文等^[9]研究发现,甘蓝型油菜小孢子培养过程中取样时间也是高效诱导胚状体的一个重要影响因素,而这一因素大多被以前的研究者所忽略;他们认为一天中上午7:00时的田间的温度相对较低,湿度相对较大,可能有利于小孢子培养过程中的胚诱导。

2 对外植体的胁迫处理

对适时取材的离体外植体进行胁迫处理,可以有效的打断小孢子预定的配子体发育途径,启动小孢子形成个体的发育途径,从而大大提高小孢子胚胎发生的频率。通常的胁迫处理包括低温处理、饥饿处理和高温处理等;同时,胁迫处理的程序和时间的长短也将影响到小孢子的胚胎发生频率。

2.1 对花序或花蕾的预处理

朱彦涛等^[10]研究发现,对甘蓝型油菜的花蕾进行0~4℃低温处理时,一般适宜于1 d内取蕾培养,超过1 d则花蕾发黄,小孢子的生活力迅速下降;并且对于同一材料来说,随着花序的增加,花序低温处理的有效时间也需相应延长。

2.2 对小孢子的预处理

十字花科芸苔属植物小孢子胚胎发生的前提条件是热激处理,即高温处理,使对称型的细胞分裂增加,进而形成胚状体。茄果类小孢子的诱导率比较低,Kazumitsu Miyoshi^[11]发现对茄子的小孢子同时进行蔗糖的饥饿处理和高温处理是游离小孢子胚胎形成不可或缺的条件。Wong R S C等^[12]指出新鲜游离出来的大白菜小孢子在经过了48 h的32℃高温处理能有效的提高成胚率。综合前人报道,芸苔属植物的初始培养温度在30~35℃之间以及处理时间一般应在24~48 h较为适宜。

3 小孢子提取分离方法

分离小孢子的方法可归纳为:散落收集法,此法获得游离小孢子的操作简单,不需要专门仪器,而且可以连续收集;挤压法,简便易行,适用于对单个花蕾或花药进行小量的分离。但是,此法重复性受不同操作人员用力大小、时间长短等因素影响,而且不适于大规模游离小孢子的操作,不过由于其简洁性,目前实验室普遍运

用此法分离小孢子;机械法,由于机械上装有调速器和时间控制器,因而操作方便、重复性好,一次可以处理大量材料,提取小孢子所需的时间短、效率高,并且提取的小孢子成活率也较高,这无疑增加了可供培养或离体操作的小孢子群体的数目。但是无论采取哪种分离方法,都要求达到以下标准:小孢子成活率较高,发育期整齐,小孢子达到一定的数量;无菌、无杂质^[13]。

4 小孢子的培养方式

近年来的小孢子培养基本是利用固体培养和悬浮培养两种方式,但是悬浮培养的诱导频率高于固体培养,可以增加胚的数量,胚状体的发育也较好。比较摇床培养与静置培养对胚状体生长发育的影响,何抗军等^[14]对芥蓝游离小孢子培养时发现,在振荡条件下幼胚发育迅速、胚体健壮,且大部分幼胚最终都能发育成子叶胚,而静置培养的幼胚发育迟缓、较幼小,只有少部分能发育成子叶胚。分析其原因,可能由于振荡培养能够改善液体培养基的通气性,使子叶胚产生率大大提高,胚也生长更健壮,提高了胚发育的同步性和胚的质量,促进了胚在成苗培养基上的直接成苗。

5 小孢子的培养密度

目前,小孢子培养多采用悬浮培养,但是不同品种间小孢子的最适培养密度也有一定的差异。方淑桂等^[15]研究了大白菜游离小孢子培养密度对胚胎发育的影响后发现,每蕾产胚30个以下的胚胎发育正常,15 d就可发育成子叶胚;每蕾产胚60~90个的发育到鱼蕾胚时生长缓慢,胚状体变弱,生命力渐弱;每蕾产胚90个以上的胚发育到心型胚时即停止生长。

6 培养基

6.1 培养基中的AgNO₃

AgNO₃常作为一种极性诱导剂和抑制物被使用。一些试验表明AgNO₃对于细胞离体培养后易出现的褐化现象有缓解作用,另外有些试验观察到AgNO₃有改变极性分化现象和促进芽分化的作用,但是浓度过高(10 mg/L)时会导致形成畸形芽,并且浓度越高形成的畸形芽越多,将阻碍进一步发育成苗^[16]。分析其原因可能是Ag⁺为重金属离子,对植物细胞的生理、代谢有一定的毒害作用。

6.2 培养基中的激素

有关激素对胚胎发生和植株再生的影响,目前还未能得出一致的结果。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。对大白菜而言,纯粹的NLN培养基中胚状体的诱导率可以达到很高的水平。而对于小白菜,适量的生长素与细胞分裂素对小孢子胚胎发生有促进作用^[17]。石淑稳等^[18]对甘蓝型油菜及其种间和属间杂种小孢子胚状体的诱导研究后发现,2,4-D和NAA有的表现出促进作用,有

的则表现出负作用; IAA 基本不起作用; 6-BA 则可显著提高胚的产量。Ludmila Rihova 和 Jaroslav Tupy^[19] 在研究土豆小孢子的培养基的成分中发现, 诱导小孢子对称分裂的主要原因是培养基中的谷氨酰胺和水解酪蛋白提供的组织氮源。Ugur Bal 和 Kazim Abak^[20] 的番茄单配体培育综述中评价, 在 MS 培养基中添加 2 mg/L 异戊烯腺嘌呤(2IP)和 2 mg/L IAA 比加 0.25 mg/L 玉米素和 0.5 mg/L IAA 出胚率高。

6.3 培养基中的碳源及蔗糖浓度

有关研究表明, 花药及其游离小孢子培养几乎都以蔗糖作为碳源。在培养基中, 蔗糖的作用可分为两个方面: 提供碳源和调节渗透压。不同的种类、品种和小孢子发育时期所要求的蔗糖浓度也不相同。Kazumitsu Miyoshi^[11] 在茄子的小孢子培养中指出预培养基中的蔗糖浓度对胚胎的形成是一个重要的影响因素, 含 2% 的蔗糖可以获得高产量的胚胎, 而超过 2% 的蔗糖浓度有抑制胚胎发生的副作用, 培养基中缺少蔗糖不会有胚胎的发生。在小孢子培养前期, 高浓度的蔗糖可以诱导小孢子胚胎的形成; 在中后期, 降低蔗糖浓度可以提高培养基的水势, 促进单倍体细胞的生长, 有利于愈伤组织和胚胎的发育和分化。

6.4 培养基中的活性炭

培养基中添加适量的活性炭, 对提高小孢子胚胎发生率有明显促进作用, 尤其是对胚胎发生困难的基因型效果尤为显著。活性炭的适宜添加量为 0.05 ~ 0.1 mg/mL, 添加适量的活性炭对提高胚状体发育整齐性有明显作用, 有助于形成子叶胚。添加活性炭可以克服毒性物质的危害。由于不同的基因型早期释放的有毒物质不同, 活性炭的作用效果也有很大差异, 胚胎发生率低的基因型往往释放有毒物质的能力比胚胎发生率高的基因型要强得多, 所以加活性炭的效果明显^[21]。

6.5 添加和更换培养液

研究初报, 方淑桂等^[7] 在以花椰菜为试验材料中为了维持小孢子的活力, 起始培养用 16% 蔗糖的培养液培养 3 d 后, 重新离心更换 13% 蔗糖的培养液, 产胚量虽有一定提高, 但明显低于加入等量的 10% 蔗糖的培养液培养的。这也是培养中容易忽略的一点。Hansen M 和 Svinnsset K^[12] 对 4 种甘蓝 (*Brassica napus* ssp. *rapifera*) 进行研究发现在培养 3 d 后更换成新鲜培养基可以使高出胚率的 Gry 产胚量上升 200%, 使低出胚率的 Stenhaug 提高到 800%。此外, Gu H H 等^[23] 在芸苔属小孢子研究中发现培养 48 h 后更换培养基和降低蔗糖浓度可以有效提高胚胎的数量和质量。因为在培养中不可避免的有老化的小孢子, 它们没有分化能力但可以释放一些抑制小孢子胚胎发生的有害物质。通过在培养前期更换培养基可以解除老化小孢子的有害物质对

正常小孢子胚胎发生的抑制作用, 此外还发现蔗糖浓度的变化因不同基因型的不同培养阶段而异。

7 蔬菜类作物游离小孢子培养技术存在的问题和展望

虽然小孢子培养技术在作物育种工作和基础研究中有了很多应用, 但是诱导频率不高、物种及基因型间存在的差异是其目前实际应用中的一大障碍, 而且小孢子培养的启动机制也仅是在猜测、探讨之中^[24]。基因型的差异已被所有研究者在不同作物中所证实, 但是差异的原因以及怎样克服诱导率低等问题, 有可能通过分子水平的基因分析, 更确切的说是利用蛋白组学分析解决这一棘手的问题。尽管有试验研究表明内源激素水平差异均不显著, 可能内源激素与诱导率之间并无直接关系, 然而不能否认那些易于胚状体发生的基因型植株可能都具有某种特定的蛋白表达, 但具体的内部原理还有待进一步的试验研究。

蔬菜类作物小孢子的培养影响因素很多, 对某种作物而言就单一的因素分析都没有定论, 更何况胚的发生过程是由内部信号通路控制的, 涉及的因子和因子互作原理不明确。同时, 当前的研究大多集中在单因子的水平上, 对影响胚状体诱导率的多因子之间的互相关效应的极少。目前比较清楚的是激动素和生长素之间的互作效应, 但对诸如供体植株生长环境(如温度、光照、湿度和营养)之间的互作、培养条件(如光照强度、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, 尤其对培养基成分之间的互作效应尚不十分清楚^[25]。为了解决这些问题应建立一个完善的高频率蔬菜类作物小孢子再生体系, 同时加强技术和理论两方面的研究, 不仅要摸索和改善小孢子培养过程中的各种方法和技术, 还应该系统的深入了解和探讨各种蔬菜小孢子的发育途径、启动机理、诱导机制及其与生理生化、遗传因素的关系。

参考文献

[1] 吴晖霞 景建康 胡含. 植物游离小孢子培养的研究进展[J]. 遗传 1996, 18: 11-16.
[2] 张丽. 萝卜游离小孢子培养技术初探[J]. 园艺学报, 2004, 31(5): 676-678.
[3] 董艳荣 龚义勤. 茄果类蔬菜花药和花粉研究进展[J]. 工作与科技 2000(5): 30-32.
[4] 袁亦楠 朱德蔚 连勇, 等. 番茄游离小孢子培养形成胚状体的初步研究[J]. 农业生物技术学报, 1999, 7(1): 85-88.
[5] 方淑桂 朱朝军 曾小玲, 等. 花椰菜游离小孢子培养及影响因子[J]. 福建农业学报, 2006, 21(2): 138-142.
[6] Shtereva L A, Zagorska N A, Dimitrov B D, et al. Induced androgenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) II. Factor affecting induction of androgenesis[J]. Plant Cell Reports 1998, 18: 312-317.

烯效唑在园艺植物上的应用

李宁毅¹, 李之璞²

(1. 沈阳农业大学 园艺学院 辽宁 沈阳 110161; 2. 沈阳市农业科学院 辽宁 沈阳 110034)

摘要: 综述了烯效唑(S₃₃₀₇)在园艺植物上的应用效果。S₃₃₀₇应用于园艺植物后可控制株形, 促进插条生根, 调控花期, 提高抗逆性, 改善品质, 提高产量等。

关键词: S₃₃₀₇; 园艺植物; 壮苗; 生根; 花期; 抗逆性

中图分类号: S 482.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2008)06-0062-03

烯效唑(S₃₃₀₇)是一种高效、低毒、残留量小、不污染环境、植物生长延缓剂, 有着广阔的应用前景。它的应用日益成为热点。目前在园艺植物上主要用于控制株形, 培育壮苗, 促进插条生根, 调控花期, 提高抗逆性, 提高品质和产量等方面。

1 矮化植株、促进壮苗

S₃₃₀₇对园艺作物有明显的矮化作用及促进壮苗的作用。曾焕泰用S₃₃₀₇处理盆栽榕树实生苗, 显著地抑制了

茎的伸长生长, 使其株型矮化, 叶片小型化, 根冠比值增大, 从而使盆栽榕树更符合盆景栽培的要求^[1]。陈敏资等采用不同浓度的S₃₃₀₇处理盆栽万寿菊幼苗, 结果表明, 经处理的万寿菊节间显著缩短, 增加叶厚及花朵数, 提高了观赏价值^[2]。尹敬芳等研究了1.0 mg/L的S₃₃₀₇浸种处理对番茄幼苗生长的影响。结果表明, S₃₃₀₇浸种处理能显著控制番茄幼苗的徒长, 使2~5叶期幼苗的株高显著降低, 使幼苗茎粗、叶面积、地上部干质量和根干质量增加。生理指标的测定结果显示, S₃₃₀₇浸种处理的幼苗根系活力、叶绿素含量都明显提高, 光合速率也高于对照, 在生理上表现出壮苗效应^[3]。黄少华等采用S₃₃₀₇对油菜种子进行浸种处理的试验结果表明, 50 mg/L S₃₃₀₇浸种4 h处理对幼苗缩茎和叶柄的伸长生长具有明显的抑制作用, 同时明显增加叶片叶绿素和可溶性糖含量, 对油菜形成壮苗具有明显的效果^[4]。张远

第一作者简介: 李宁毅(1958-), 女, 副教授, 现从事观赏植物栽培与生理方向研究。E-mail: lnyaaa@163.com。

基金项目: 辽宁省教育厅科学研究资助项目(2004D208, 20060786)。

收稿日期: 2008-02-30

[7] 严准, 田志宏, 孟金陵. 甘蓝游离小孢子培养的初步研究[J]. 华中农业大学学报, 1999, 118(1): 5-6.

[8] 刘冬, 郭平仲, 刘凡, 等. 芥菜(*Brassica juncea* L.)小孢子胚发生和植物再生[J]. 首都师范大学学报(自然科学版), 1997, 18(1): 76-80.

[9] 刘志文, 刘雪平, 傅廷栋, 等. 甘蓝型油菜小孢子培养的胚诱导和加倍效率的研究[J]. 华中农业大学学报, 2005, 24(4): 339-342.

[10] 朱彦涛, 李殿荣, 杨淑慎. 低温预处理和基因型对甘蓝型油菜小孢子胚胎发生的影响[J]. 西北农林科技大学学报, 2005, 3(5): 88-93.

[11] Kazumitsu, Miyoshi. Callus induction and plantlet formation through culture of isolated microspores of eggplant (*Solanum melongena* L.)[J]. Plant Cell Reports, 1996, 15: 391-395.

[12] Wong R S C, Zee S Y, Swanson E B. Isolated microspore culture of Chinese flowering cabbage[J]. Plant Cell Reports 1996, 15: 396-400.

[13] 朱至清. 植物细胞工程[M]. 化学工业出版社, 2003.

[14] 何杭军, 王晓武, 王炳良. 芥蓝游离小孢子培养初报[J]. 园艺学报, 2004, 31(2): 239-240.

[15] 方淑桂, 陈文辉, 曾小玲, 等. 大白菜游离小孢子培养技术研究初报[J]. 福建农业学报, 2003, 18(2): 123-126.

[16] 曹冬孙, 贾士荣. 青椒子叶培养及植株再生[J]. 园艺学报, 1993, 20(2): 171-175.

[17] 郭金英, 申书兴, 陈雪平, 等. 十字花科蔬菜游离小孢子培养研究进

展[J]. 河北农业大学学报, 2002, 25(5): 122-124.

[18] 石淑稳, 刘后利. 甘蓝型油菜及其种间和属间杂种小孢子胚状体的诱导[J]. 华中农业大学学报, 1993, 12(6): 544-550.

[19] Ludmila Rihova, Jaroslav Tupy. Manipulation of division symmetry and developmental fate in cultures of potato microspores[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1999, 59: 135-145.

[20] Ugur Bal, Kazim Akak. Haploidy in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.); a critical review[M]. Springer Science+Business Media B.V., 2007: 410-419.

[21] 史庆馨. 十字花科作物游离小孢子技术研究进展[J]. 北方园艺, 2003(4): 9.

[22] Hansen M, Svinnet K. Microspore culture of swede (*Brassica napus* ssp. *rapifera*) and the effects of fresh and conditioned media[J]. Plant Cell Reports, 1993, 12: 496-500.

[23] Gu H H, Zhou W J, Hagberg P. High frequency spontaneous production of doubled haploid plants in microspore cultures of *Brassica rapa* ssp. *chinensis* Euphytica, 2003, 134: 239-245.

[24] 曹丽娟, 索非时, 李锡香. 植物游离小孢子培养的研究进展[J]. 东北农业大学学报, 2005, 36(5): 660-663.

[25] 龙洪进. 国内外辣椒(*C. annuum*)单倍体育种技术研究进展[J]. 西南农业学报, 2004, 17: 439-442.