

瓜类蔬菜作物花药组织培养研究进展

陈佳 李焕秀 杨永超 张海利

摘要 花药培养技术是蔬菜作物育种中一种重要的辅助育种技术。对影响瓜类蔬菜花药培养的主要因素——基因型、小孢子发育时期、材料发育时期生长环境、基本培养基、碳源、激素、活性炭及培养方法中的相关条件进行了综述。并针对瓜类花药培养中存在的问题提出了今后研究的方向。

关键词 瓜类 花药培养 研究进展

Research Progress of Anther Culture in Cucurbitaceous Vegetable Crops

Chen Jia, Li Huanxiu, Yang Yongchao, Zhang Haili

Abstract Anther culture is a very important assistant breeding technique in vegetable crops. The factors to affect anther tissue culture of gourd vegetable crops, genotype, period of microspore's growth, environment of material's growth, media, carbon sources, plant growth regulators, active carbon and culture conditions were summarized. The future research direction is put out according to existing problems in gourd anther culture.

Key words Cucurbitaceous vegetable crops, Anther tissue culture, Research progress

瓜类是葫芦科(Cucurbitaceae)植物,起源于热带,为一年生植物,高温通过春化阶段,短日照通过光照阶段,多为蔓生植物。在我国人们喜爱的瓜类蔬菜有黄瓜、西瓜、甜瓜和苦瓜等。由于葫芦科植物的常规遗传育种方法育种周期长、难度大和遗传性状不稳定,因此开展以离体培养为基础的生物技术育种研究显得尤为重要。为了得到完全纯合的双单倍体通常采用离体花培技术^[1]。这样不仅可以缩短选择及纯化的过程和时间,对其遗传育种也具有重要的理论和实际意义。

瓜类的花药培养已有一定的历史,西贞夫等^[2]首先对黄瓜花药培养进行了研究,并诱导出愈伤组织和分化出茎叶器官,开创了瓜类花药培养的历史先河。1978年曾淑水、原式琼等分别对甜瓜花药培养进行了研究,经愈伤组织分化成苗。薛光荣等在20世纪80年代初就通过西瓜花药培养获得了再生植株。随后,陶正南(1987)对甜瓜花药进行培养,经愈伤组织诱导获得了完整的再生植株。并有研究者提出利用三十烷醇及低温预处理提高花药愈伤组织诱导率的方法^[3,4],湖南省新宁县农科所对丝瓜花药培养也作了简要介绍。但瓜类花药培养难度较大,我国在这方面的研究还很少,仅西瓜等少数瓜类通过花药培养获得了花粉

植株,且未鉴定其倍性,与甜椒、大白菜、芦笋等花药培养相比,其诱导率太低,仅为千分之几,难以应用于育种实践。为了解决瓜类花药培养单倍体诱导率低的问题,研究者尝试利用黄瓜、西葫芦未授粉胚珠进行离体培养,成功地获得了再生植株^[5,6],这为瓜类作物单倍体育种提供了一条新的途径^[7]。

1 材料因素的影响

1.1 基因型的影响

花药对离体培养的反应在很大程度上受到基因型的影响,不同基因型的植株对培养的反应不同^[8]。Gresshoff(1972)提出,不同品系对愈伤组织的产生有着重要影响,基因型不同,花药的胚状体诱导率也不同。

在瓜类蔬菜中,不同的种属有着不同的表现。黄瓜早在1971年就通过花培获得了不定芽^[2]。哈密瓜、丝瓜、西瓜、甜瓜在此方面也都有不同程度的研究,但以西瓜花培技术的研究是最成熟的。而苦瓜至今没有相关报道。在相同种属的不同品种间,花药培养也有着不同的表现。在谢森等的试验中发现,取同一时期不同品种的黄瓜花药都可以诱导出愈伤组织,但诱导率却不一样,且质量也不一样^[9]。另有研究表明F₁代杂交种在花药培养中表现出杂种优势^[10]。在董艳荣对甜瓜花药培养的试验中也证明了这一点^[11]。

1.2 小孢子发育时期的影响

据研究资料表明,产生单倍体的效率取决于多个因素,最关键的是取花药时的小孢子发育时期。这关系到是否能产生胚性愈伤组织,进而产生单倍体,也

陈佳,四川农业大学 25 舍 509,四川雅安,625014,

E-mail:sky880@gmail.com

李焕秀,杨永超,张海利,四川农业大学

收稿日期:2006-09-10

关系到培养条件及培养效果^[12]。在大多数瓜类花药培养中,选用的都是花粉单核靠边期^[8]。但在黄瓜花药培养中,西贞夫认为不同发育期的花药,几乎同样能够形成愈伤组织^[13]。在谢森等的试验中却认为单核中后期的花药作为外植体较适宜^[9]。而甜瓜花药培养的最佳时期是单核靠边期到双核期^[11]。

1.3 材料发育时期生长环境的影响

除了小孢子发育时期很重要外,材料发育时期的生长环境对花培效果也有一定的影响。研究表明,如果在小孢子形成初期和减数分裂的细线期,整天阴雨连绵,会造成花粉败育和药壁的绒毡层组织细胞发育不良,小孢子的活性就降低,花药愈伤组织诱导率低,并且转移到分化培养基上也容易死亡。另外,光照和光周期也会影响到花粉花药的发育,花粉愈伤组织的诱导、分化及胚状体的形成。在谢森等的试验中发现由于季节的不同,所接种的黄瓜花药最终表现的诱导率不同,春季比秋季的效果好^[9]。生长在日光温室中的甜瓜花药外植体愈伤组织诱导率较生长在大棚中的高,且在开花前两周的花药愈伤组织诱导率比开花中后期的高^[11]。

2 培养基成分的影响

2.1 基本培养基

在大多数的瓜类花药培养中都选用 MS 作为基本培养基,也有选用其他培养基的。谢森等的试验选用了 MS 和 B5 作为基本培养基对黄瓜花药进行培养^[9]。在有关丝瓜花药培养的研究中选用的是 N6。也有选用不同基本培养基改良后的组合。例如,在哈密瓜花药培养中,原式琼采用了 N6 的大量元素、MS 的微量元素加激素作为分化培养基。在甜瓜花药培养中,基本培养基以 MS-KI 较好,即增加一倍的 Fe-EDTA、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 和 VB_1 ,其花药愈伤组织的诱导率最高达到 64.2%^[11]。

2.2 碳源

资料表明,所有瓜类花药培养都是采用蔗糖作为碳源。虽然有学者提出麦芽糖比蔗糖更有利于胚的发生^[14],但在瓜类的花药培养试验中还没有人针对麦芽糖和蔗糖的效果作比较试验。只是在不同的瓜类花培中用了不同的蔗糖浓度,大多数选用的是 3%,个别试验选用的是 5%^[9]。喻财铃认为丝瓜花培,蔗糖浓度为 5%,并添加 15%椰子汁最好^[15]。

2.3 激素

激素是花药培养中显著影响花药胚状体发生的因素。西贞夫认为在不含生长素的培养基上几乎没有

愈伤组织形成,即使偶尔形成,也是极少,不能增殖。在瓜类的花培试验中,多数添加的是 6-BA、IAA、NAA、KT、2,4-D,它们的配比是根据不同的时期和不同需要而变化的。

在瓜类花药愈伤组织诱导过程中,6-BA 是一个关键因素。大多数的瓜类花培试验,在基本培养基上添加 6-BA 都能广泛地诱导出愈伤组织,配合使用 2,4-D 和 KT 效果更好。NAA 在瓜类花药愈伤组织诱导过程中使用浓度不宜过高。董艳荣认为 NAA 的浓度最好不要超过 0.05 mg/L^[11]。在黄瓜花药培养中,NAA 和 2,4-D,配合低浓度的 KT,可使愈伤组织诱导率达 100%^[13]。在愈伤组织分化过程中,BA 的作用仍然很重要,可适当配合使用 IAA,最好它们的浓度是形成一定的比例^[11]。KT 和 NAA 也可以适量添加^[15]。在西瓜的花培试验中,有学者提出高浓度的 GA_3 、6-BA 和腺嘌呤或者再加 500 mg/L LH 愈伤组织能很快分化出植株,三十烷醇或 BA 可加快分化出正常植株^[3,4]。有学者提出,增殖培养中 6-BA 是关键因素^[11]。在大多数瓜类花培试验中,没有提及生根过程。只有在西瓜较为成熟的研究中提到,在添加 IBA 和 IAA 的培养基上可以诱导生根^[9]。

2.4 活性炭

活性炭对一些植物种类的花药培养是有益的,因为它可以吸收培养基、空气及花药本身产生的抑制物质。据 Lars, Johansson 的研究,ABA 抑制胚状体的形成,而活性炭可有效吸收 ABA。但是活性炭也能吸收有益物质 NAA、KT、6-BA、Fe-EDTA,还有报道琼脂中的杂质也可以被吸收。对于不同的种,活性炭的效果可能不同。在辣椒的花药培养中,已有试验表明添加 0.5%活性炭是有益的。但在瓜类的花药培养中,有关活性炭对培养过程的影响报道极少,只有在喻财铃对丝瓜花药培养的研究中明确提出活性炭的效果差,有抑制作用^[15]。

3 瓜类花药培养方法

3.1 预处理

如果花药或花粉从植株上取下直接接种进行培养,愈伤组织及绿苗生成率都很低,因此往往需要对目的花粉进行预处理。在大多数成功的例子中,经过预处理的花药比较容易培养出花粉愈伤组织或者胚状体并进而得到完整的植株^[16]。预处理包括离心、低温、高温和热激^[17-19],目的是从形态上改变极性分布,从生理生化上改变细胞生理状态,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

培要求的预处理及其作用也不同。在瓜类的花培试验研究中表明,4℃是较为适宜的预处理温度。黄瓜的合理处理时间是48~72 h^[9],西瓜为72 h^[3],甜瓜则为36 h^[11]。而在丝瓜的花培试验研究中表明,4~7℃的低温预处理可以显著地提高愈伤组织的诱导率,且在4~8天内随着处理时间的延长,愈伤组织诱导率越高^[15]。

3.2 培养温度和光照

温度和光照对诱导产生愈伤组织和促进其生长都非常重要。对于不同种类和基因型的植株,其花培所需的温度和光照会有很大差异。一般培养温度为25~28℃,温度过高会导致某些种类花药的死亡,有的却可以提高其花粉胚状体的诱导频率。瓜类的花药培养温度比其他种类的要高一些,白天温度一般为25~30℃,夜间则较低^[9,11]。在一些材料的培养过程,暗培养可以促进愈伤组织的诱导^[20]。但试验表明,在对甜瓜花药进行培养时,长时间的黑暗将会使愈伤组织的质量有所下降,而适当的光照反而有助于愈伤组织的生长^[11]。

4 问题及展望

迄今为止,蔬菜植物花药培养的成功主要局限在茄科、禾本科、十字花科。在瓜类植物中,主要研究内容集中于一些小孢子雄核发育过程和小孢子发生期间花药壁的变化。瓜类花药培养的研究报道较少,原因是目前瓜类花药培养还未建立较成熟的植株再生体系,只有西瓜和甜瓜花药培养的研究相对较为成熟。尽管如此,与其他科类的花药培养技术相比,还有很多内容尚未研究透彻,比如碳源、活性炭、培养条件等方面都还有待于更进一步的研究。

在育种工作中,利用花药培养技术建立瓜类的单倍体系,不仅可以缩短材料的纯化时间,还可以通过杂交F₁、F₂的花药培养进行特异性状的选择。另外,针对需要对单倍体系进行加倍,可以建立DH(doubled-haploid)群体。DH群体中的双单倍体植株具有遗传上的纯合基因组,是分子标记和基因图谱的理想材料。因此,瓜类花药培养的意义在不断扩大,应加快在这方面的研究步伐。

参考文献

- [1] Colijin C M, Hakkert J C, Janssen J, et al. Competence for regeneration of cucumber cotyledon is restricted to specific development stages. *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 1994(39):211-217
- [2] 孙兰英,卢淑雯.黄瓜组织培养研究进展.黑龙江农业科学,2004(4):25-27
- [3] 魏瑛.低温预处理对西瓜花药愈伤组织诱导的影响.甘肃农业科技,1999(9):34-35
- [4] 魏瑛,张俊莲,陈年来,等.西瓜花药愈伤组织的诱导.甘肃农业大学学报,1998(33):127-130
- [5] 杜胜利,韩毅科,魏爱民,等.黄瓜倍性鉴定方法的研究.园艺学报,2002,29(3):280-281
- [6] 陈学军,刑国民,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(3):165-167
- [7] 何晓明,谢大森,陈清华,等.我国瓜类细胞工程研究进展.深圳职业技术学院学报,2002(3):18-19
- [8] 陈振光.园艺植物离体培养学.中国农业出版社,1995.23-25
- [9] 谢森,秦丽颖,潘俊松,等.黄瓜花器形态发生、小孢子发育与花药培养.西北植物学报,2005,25(6):1096-1100
- [10] Barro F, Martin A. Response of different genotypes of *Brassica carinata* to microspore culture. *Plant Breeding*, 1999,118(1):79-81
- [11] 董艳荣.甜瓜花药再生体系的基础研究.南京农业大学(硕士论文),2002
- [12] Karakullukcu S, Aback K. Research on anther culture of eggplant: The effects of sugar and growth regulators. *Doga Turk Tarim ve Ormancilik Dergisi.*, 1993,17(3):811-820
- [13] 王纪方.金波.蔬菜组织培养.上海:上海科技出版社,1983
- [14] Karsai L, Belo I, Hayes P M. Effect of induction medium pH and marlstone concentration on in vitro autogenesis of haploid winter critical and wheat. *Plant Cell. Tissue and Org. Cult.*, 1994(39):49-53
- [15] 喻财铃.丝瓜小孢子囊与雄配子体发育的研究和花药离体培养初探.华南农业大学(硕士论文),2001
- [16] Phippen C, Ockendon D J. Genotype, plant, bud size and media factors affecting anther culture of cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*). *Theoretical and Applied Genetics*, 1990,19(1):33-38
- [17] 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
- [18] Tokumo K, Murakami K, Matsubara S. Embryoid and callus formation from eggplant microspore by culture of anthers treated with high and low temperatures. *Scientific Reports of the Faculty of Agriculture, Okayama University*, 1994(84):13-16
- [19] Li W Z, Hu H. The mechanism of the pretreatments in anther pollen culture. *Heredities*, 1995(17):13-18
- [20] 陈晓,詹玉丝,徐小利,等.花药培养建立辣椒DH纯系的初步研究.河南农业科学,2003(9):52-55