

胡雪丹, 张 曼, 徐锦华, 等. 葫芦科作物游离小孢子培养研究进展[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(6): 25–29.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.06.006

葫芦科作物游离小孢子培养研究进展

胡雪丹^{1,2}, 张 曼¹, 徐锦华¹, 刘 广¹, 姚协丰¹, 李革芳¹, 陈学好², 羊杏平¹

(1. 江苏省农业科学院蔬菜研究所, 江苏南京 210014; 2. 扬州大学园艺与植物保护学院, 江苏扬州 225009)

摘要:探讨葫芦科作物在游离小孢子培养中(与花粉培养)的优势, 阐述游离小孢子培养过程中供体植株基因型、供体植株生理状况、预处理、小孢子发育时期、培养基种类、培养基成分、培养条件等诸多因素的影响, 并针对葫芦科蔬菜游离小孢子培养中存在的问题提出后续研究方向。

关键词:葫芦科作物; 游离小孢子培养; 优势; 影响因素

中图分类号: Q943.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)06-0025-05

葫芦科作物在世界园艺作物生产中占有非常重要的地位, 随着人们消费需求的增加, 葫芦科作物的栽培面积逐年增大。葫芦科作物包括 118 属 825 种, 广泛分布于热带和亚热带地区, 中国约有 29 属 142 种, 常见的主要有西瓜、甜瓜、苦瓜、黄瓜、西葫芦等, 栽培面积大且具有较高的经济效益, 在人们日常生活中具有重要作用。由于葫芦科作物的常规遗传育种方法育种周期长、难度大、遗传性状不稳定, 常规育种的不足在实际工作中日渐明显, 各国学者开始寻找育种的新途径和新方法。单倍体育种技术为缩短育种年限、提高育种效率提供了可能, 因此在葫芦科作物中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。获得单倍体葫芦科植物最常见的方法是通过辐射花粉授粉, 诱导单倍体胚胎进行原位孤雌发育。近年来, 离体雄核发育途径生产单倍体技术逐渐受到重视, 离体雄核发育途径有花药离体培养和游离小孢子培养, 其效果可以媲美辐射花粉授粉技术^[1]。早在 1971 年, 西贞夫等在黄瓜花药培养的研究中获得了不定芽。之后的几十年里, 学者们致力于花粉离体培养, 已经在葫芦科作物中的南瓜属、葫芦属、西瓜属、甜瓜属、苦瓜属等获得了单倍体^[2]。与花药离体培养相比, 葫芦科作物游离小孢子培养起步较晚、研究相对较少, 仅在黄瓜、西瓜、甜瓜上获得了胚状体或再生植株。

1 葫芦科作物游离小孢子培养的优势

在葫芦科蔬菜作物中, 自发产生单倍体的频率极低。为获得单倍体植株, 离体雄核发育途径(花药或小孢子培养)、雌核发育途径(未授粉子房或胚珠离体培养、外源化学药剂、正常花粉或辐射过花粉授粉诱导的孤雌生殖)等手段被用来诱导单倍体。近年来, 游离小孢子培养技术的不断成熟为离体培养单倍体带来了曙光。

游离小孢子培养研究于 20 世纪 70 年代初开始, 于 1982 年在芸薹属作物上首次获得成功^[2]。在高等植物的生活史中, 小孢子是雄配子体发育过程中短暂而重要的阶段, 是减数

分裂后四分体释放出的单倍性单细胞。小孢子培养是指将小孢子从花药中游离出来, 在人工培养基上进行培养并获得再生植株的过程。与花药培养相比, 游离小孢子培养开展的并不晚, 但进展较缓慢。早在 1982 年, Licher 首次报道采用甘蓝型油菜游离小孢子培养形成植株^[3]。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以迅速发展并日臻完善。近十几年, 游离小孢子培养技术在甘蓝型油菜上日渐成熟, 已陆续在黑芥、结球甘蓝、芥蓝、嫩茎花椰菜、抱子甘蓝、羽衣甘蓝、皱叶甘蓝、小白菜、大头菜、叶芥等十几种蔬菜上获得成功, 但对葫芦科游离小孢子培养至今尚未见明确成功的报道^[4]。

从概念来看, 花药离体培养是把小孢子发育到一定阶段的花药接种至培养基上, 以改变花药内小孢子粒的发育程序, 使其分裂形成细胞团, 进而分化成胚状体, 形成愈伤组织, 由愈伤组织再分化成植株。小孢子离体培养是指把小孢子从花药中分离出来, 以单个小孢子粒作为外植体进行离体培养的技术。由于小孢子已是单倍体细胞, 诱发它经愈伤组织或胚状体发育而成的植株都是单倍体, 且不受花药的药隔、药壁、花丝等体细胞的干扰。从培养层次来看, 花药离体培养属器官培养, 小孢子离体培养属细胞培养, 但花药离体培养和小孢子离体培养的目的均是诱导小孢子细胞发育成单倍体细胞, 最后发育成单倍体植株。一般来说, 花药培养比游离小孢子培养的技术要求相对简单。从培养过程来看, 花药离体培养相对容易, 技术比较成熟, 但最后须对培养成的植株进行染色体倍数检测; 小孢子离体培养尽管不受花药壁、药隔等二倍体细胞的干扰, 但这种特殊单倍体细胞的培养技术难度较大, 目前仅在少数植物上获得成功。

产生单倍体的方法主要有花药培养和小孢子培养, 但近年来花药培养已逐渐被小孢子培养所取代。与花药培养相比, 小孢子培养方法具有以下几方面优势: (1) 排除了母体组织体细胞的干扰, 培养获得的植株均是由单倍体小孢子发育来的, 避免了嵌合体的发生, 染色体加倍后可获得遗传上纯合稳定的后代。 (2) 有利于提高小孢子胚胎发生的机率。 (3) 小孢子均是单细胞, 数量多、发育快、易获得、诱导率高、易突变, 在自然条件下容易加倍, 操作简便, 得到的胚状体还可应用于育种实践和遗传分析。 (4) 适合作为单一细胞群体系统

收稿日期: 2015-04-08

基金项目: 国家西瓜产业技术体系建设专项(编号: CARS-NO.8)。

作者简介: 胡雪丹(1990—), 女, 江苏泰州人, 硕士研究生, 主要从事

葫芦游离小孢子培养研究。E-mail: 276518157@qq.com。

通信作者: 羊杏平, 研究员。E-mail: xingping@jaas.ac.cn。

的生理生化研究。(5)易于诱发突变和进行离体筛选。小孢子培养技术在育种及基础研究应用上具有以下优势:(1)小孢子培养获得的 DH(doubled haploid, 双单倍体)植株是同源体,因而是真实育种;(2)从杂种中培养得到的小孢子单倍体在遗传上代表随机配子;(3)小孢子培养获得纯合植株一般需要 7~8 个月,而传统育种方法需要 3~4 年,大大节省了时间和成本;(4)与组织培养技术相结合能获得大量成本相对较低的目标材料;(5)小孢子能直接发育成胚胎,因而减少了遗传变异;(6)单倍体小孢子能进行显性和隐性性状的突变诱导。

总体来讲,瓜类蔬菜作物通过离体雄核发育途径生产单倍体难度较大,只有西瓜的花药培养较为成功。薛光荣等利用琼酥西瓜品种,通过培养单核靠边期的花药在国际上首次获得了西瓜单倍体植株,并从其加倍后代中直接选育出优良的新品种^[5],1988 年薛光荣等在周至红这一品种上获得了成功^[6]。在南瓜的花药培养上也有学者进行过尝试。Shail 等培养花药但并未获得单倍体植株^[7];Kurtar 等对 4 个南瓜品种花粉母细胞处于单核期的花药进行培养,并摸索了蔗糖浓度和 2,4-D 浓度对培养效果的影响,但最后得到的 3 个植株均为二倍体^[8];直到 1998 年,Metwally 等成功得到了 10 个单倍体植株,并对培养基进行筛选,发现单核中期、单核晚期的南瓜小孢子接种在 MS+15% 蔗糖+5 mg/L 2,4-D 上培养的效果最好,每块愈伤组织植株再生频率可达 19.2%^[9]。Dryanovska 等曾尝试甜瓜的花药培养,结果以失败告终^[10]。早在 1982 年,Lazarte 等分别取黄瓜四分体、小孢子、成熟期 3 个时期的花粉进行花药培养,并得到再生植株,但直到目前并无进一步研究,所得植株是否起源于小孢子仍未知^[11]。直到 2003 年,Ashok 等成功获得了黄瓜单倍体植株^[12]。詹艳等以 10 个不同基因型的黄瓜为试材进行游离小孢子培养,通过对成胚条件的系统研究,从 7447 和 Poinsett97 中获得了子叶形胚和再生植株,得到的子叶形胚易分化成苗,而其他类型的胚状体未能获得再生植株,但诱导频率仍然很低,难以用于育种实践^[13]。唐懿等针对基因型、小孢子发育时期等影响苦瓜花药培养的主要因素进行综述,讨论了苦瓜花药培养中存在的问题,并为今后苦瓜花药培养提供了研究方向^[14]。Han 等利用子叶节建立了葫芦再生体系^[15],但关于葫芦花药离体培养和游离小孢子培养并无报道。

2 葫芦科作物小孢子培养的影响因素

影响单倍体离体诱导的因素很多,涉及供体植株的基因型、培养基、外植体预处理方式、外植体发育时期、培养条件等方面,且各因素之间存在相互作用。根据关于游离小孢子培养和再生植株的报道,得出小孢子培养的主要影响因素。

2.1 诱导游离小孢子胚胎发生的影响因子

小孢子培养受到供体植株基因型、供体植株生理状况、预处理、小孢子发育时期、培养基种类、培养基成分、培养条件等诸多因素的影响,因此小孢子出胚率受到很大限制,成为实际应用中的一大难题。

2.1.1 供体植株的基因型 供体植株的基因型是影响小孢子培养的关键因素,不同基因型的植株对培养具有不同反应,主要体现在基因型的反应范围、产胚率的差异 2 个方面。基因型的反应范围即有多少基因型有反应,以及有反应的基因

型产胚率的差异。詹艳等对 10 份黄瓜供试材料进行研究,只有 4 份试材获得了胚状体,其中成胚率最高的是 7447,为 31.2 个/皿;成胚率最低的是康德,为 1.5 个/皿;其余 6 份材料中有些游离小孢子出现膨大,有些已启动分裂,但均未能继续分裂形成胚状体^[13]。李娟对西瓜进行研究发现,野生种和栽培种的成胚率有显著差别,前者高于后者^[4]。缙艳霞、董艳荣分别在西瓜、甜瓜花药培养试验中发现,F₁ 代植株的愈伤组织诱导率明显大于亲本,表现出杂种优势,表明小孢子的基因型至少是决定培养能力的因素^[16-17]。

2.1.2 供体植株的生长环境 供体植株的生理状态对小孢子胚胎诱导率具有重要影响,试验中一般选择生长发育健壮、无病虫害的花蕾为试材进行培养,以达到最佳效果。另外,光照、温度、水肥等供体植株生长的环境条件也是影响小孢子培养的关键因素。供体植株生长环境的温度影响最为显著,很多研究表明,适当低温可显著提高供体植株小孢子的出胚率。曹鸣庆等以种植在部分控温温室和露地的 17 个基因型的大白菜为试材,研究供体母株的生长环境条件对小孢子胚胎发生的影响;结果表明,供体植株生长环境的温度为 10~25℃,小孢子的胚产量较高^[18]。张凤兰等利用人工气候室研究光照、温度对小孢子胚胎发生的影响,结果表明,日照时数为 14 h 最有利于小孢子胚胎发生且产胚量最高,最适温度为 20℃^[19]。袁亦楠等在番茄游离小孢子培养中发现,5 月下旬、10 月薯叶番茄花蕾的类胚发生率分别为 0.01%、0.25%,可能是土壤的低夜温影响了供体内小孢子的发育方向,使其偏离配子体方向发育,从而脱分化形成胚状体^[20]。

2.1.3 小孢子发育时期 小孢子发育时期、花蕾大小、取样时期均会影响小孢子培养效果。小孢子发育时期通常分单核期、双核期、三核期,并非任何时期的小孢子都适于培养。单核期又分为单核早期、单核中期、单核靠边期,最适于游离小孢子培养的时期通常为单核靠边期。很多研究表明,小孢子发育时期与花蕾长度、花药长度、花瓣长等花蕾形态指标密切相关,可作为小孢子群体是否适于培养的衡量指标。Thurling 等在进行芸薹属花药培养时指出,虽然花蕾大小是判断小孢子发育阶段的可靠指标,但也随着供体基因型、生长条件、生长时间、花序等的变化而变化,此结论同样适用于瓜类^[4]。

在大多数作物花药培养中,花粉的发育时期均选用单核靠边期,但目前对其作用机理仍不清楚。在黄瓜花药培养中,不同发育期的花药几乎均可形成愈伤组织。詹艳等对黄瓜进行研究发现,只有单核靠边期的小孢子诱导成胚^[13]。谢森等则研究发现,单核中后期的花药适于作为外植体,而甜瓜花药培养的最佳时期是单核靠边期至双核期^[21]。薛光荣等利用琼酥西瓜品种,通过培养单核靠边期的花药在国际上首次获得西瓜单倍体植株,并从其加倍后代中获得了新品种,但并未进行推广^[22]。不能仅凭花蕾的大小来判断花粉发育时期。崔群香等以蜜本南瓜、安生黑钻南瓜开花初期的雄花蕾为试验材料,利用荧光染色技术对南瓜花粉发育时期进行鉴定^[23]。花蕾大小因植株生长状况及采花时期而有所不同,同样大小的花蕾其发育时期也不尽相同;因此,掌握葫芦科作物花蕾的采集时期,须先对葫芦科作物不同发育阶段的花药进行显微观察,了解葫芦科作物花粉发育的特点。

2.1.4 逆境胁迫预处理 预处理可改变小孢子的发育途径,

使其从配子体发育途径转向孢子体发育途径,从而诱导小孢子胚的形成。预处理包括离心、低温、高温、辐射、秋水仙素、饥饿等人为处理,目前广泛应用的预处理方法一般为低温预处理、高温热激处理、甘露醇预处理、秋水仙素预处理。温度胁迫是影响小孢子胚状体发生的最主要因素。一般来说,从植株上采下花蕾后,直接进行小孢子培养很难诱导胚状体发生。温度胁迫可改变小孢子发育途径,从而阻止小孢子向成熟花粉粒方向发展,而是沿着胚胎的发展途径最终形成胚。羊杏平等研究低温、高温、甘露醇、蔗糖、激素、三十烷醇 6 种处理对西瓜小孢子存活率的影响发现,4 ℃ 低温预处理 2 d、35 ℃ 高温热激 4 d、13% 蔗糖处理均可显著提高西瓜小孢子的存活率($P < 0.05$);甘露醇、三十烷醇对不同西瓜品种的小孢子存活率影响不同,在培养基中添加 0.5 mg/L 6-BA + 0.4 mg/L 2,4-D 的西瓜小孢子存活率最高^[24]。

低温预处理和高温热激是游离小孢子培养中最常用的 2 种方法。Ashok 等研究了 *Calyps*、*Cucumis sativus* Lr 等 2 个黄瓜品种在花药离体培养时对温度预处理的反应,结果表明,花蕾在 4 ℃ 预处理 2 d、32.8 ℃ 热激 1 d 时反应最好^[12]。郭尚等通过花粉培养、显微镜观察的方法研究不同温度、营养条件、保藏条件对花粉生活力的影响,结果表明,西瓜花粉萌发的适宜温度为 18~38 ℃,上限、下限温度分别为 48.8 ℃,在较高生长温度条件下形成的花粉生活力较强;低温处理时间越长,对花粉发芽越不利;8 ℃ 低温、干燥条件有利于花粉短期保存;营养充足的大型花蕾花粉萌发较好^[25]。朱迎春等以 4 ℃ 低温预处理 48.72 h 时,西瓜花药培养愈伤组织诱导率较高,均显著高于对照,表明 4 ℃ 低温预处理可作为花蕾的一种保存方式^[26]。詹艳等对 10 份黄瓜供试材料进行研究发现,低温预处理有利于胚状体的诱导,以 4 ℃ 预处理 2~4 d 为宜,以处理 2 d 的胚状体产量最高^[13]。缙艳霞等以具有较多优良性状的 F₁ 代西瓜品种春光、拿比特、喜都的花药为试材,研究影响西瓜花药愈伤组织诱导率的因素,表明 4 ℃ 低温预处理 72 h 可提高西瓜花药愈伤组织的诱导率;30 ℃ 高温预处理 72 h 后置于 25 ℃ 下低温培养也可提高西瓜花药愈伤组织的诱导率^[27]。Labani 等以 0.3 μmol/L 甘露醇预处理、4 ℃ 冷处理小麦小孢子,经过 3、5、6、7、8、10、12 d 等不同时期的培养发现,结合 0.3 g/mol 甘露醇和 7 d 冷处理对胚胎数量有强烈影响^[28]。杨安平等在甘蓝小孢子培养基中添加秋水仙碱,结果发现可使部分培养无反应材料产胚,并提高培养有反应材料的产胚量,同时对胚胎的良好发育具有促进作用^[29]。

2.1.5 小孢子分离方法 获得游离小孢子是进行培养的前提和关键,一般通过自然散落法、机械挤压法 2 种方法获得游离小孢子。(1)自然散落法。将花蕾消毒、清洗后,于无菌条件下取出花药并接种到培养基上,任其花粉自然散落。(2)机械挤压法。把经灭菌、清洗处理后的花蕾放到无菌研钵中,加入少量分离培养基研磨,得到花蕾悬浮液,采用尼龙筛网过滤并滤去残渣,滤液多次离心,调整小孢子密度。

2.1.6 培养基及其成分 大多数瓜类花药培养均选用 MS 作为基本培养基,也可选用 NLN、B₅ 培养基。很多试验采用 B₅ 作为洗涤培养基,之后以 NLN-13 (NLN 基本培养基 + 13% 蔗糖)或 1/2 NLN 培养基作为诱导培养基,也能取得良好效果。谢森等选用 MS 和 B₅ 作为基本培养基对黄瓜花药

进行培养^[21]。在关于丝瓜花药培养的研究中选用的是 N6;在蔬菜作物中常用的胚状体诱导培养基一般为 NLN 或 1/2 NLN 培养基。在黄瓜游离小孢子培养中,NLN 和 B₅ 作为基本培养基诱导获得的胚状体产量差异性虽然不明显,但 NLN 更有利于球形胚进一步发育成子叶形胚。

碳源是植物组织培养不可缺少的物质,它不仅能为外植体提供能量,也能维持一定的渗透压。常用的碳源有果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、山梨醇等,蔗糖能支持绝大多数植物离体培养物的旺盛生长,一直作为植物组织培养的标准碳源被广泛应用。然而近年来许多研究表明,蔗糖并不一定是最佳碳源,不同植物对不同糖类的反应不完全相同,并且多数植物组织培养物以葡萄糖、果糖为碳源时也能良好生长。碳源一般在 6%~12% 变化范围内即可满足瓜类植物的营养需求。黄均元等以茄子、黄瓜、番茄、西瓜、甜瓜 5 种蔬菜作物为研究对象,以不同浓度的蔗糖、硼酸、赤霉素进行处理,观察花粉的萌发情况,结果表明,硼酸、赤霉素、蔗糖均能促进花粉萌发^[30]。小孢子培养过程中会产生有毒物质,进而降低胚状体的发生频率,改变胚的形态,产生畸形胚,而活性炭可有效吸附有毒物质。姜凤英等认为,添加活性炭的培养基有利于鱼雷形小孢子胚成苗,100 mg/L 活性炭的成苗率增大最明显,但对子叶形胚成苗的作用不大^[31]。申书兴等发现,活性炭的适宜添加量为 0.05~0.10 g/L^[32]。Lichter 指出,活性炭不仅能吸收培养基中的有毒物质,也能吸收一些必要元素和植物激素,因此活性炭浓度不宜过高,否则会起负作用^[33]。配制活性炭时最好加少量(0.5% 左右)琼脂糖,因为无琼脂糖的游离活性炭吸附到小孢子上反而会阻止胚状体发生。

杨清等发现,花椰菜花药培养中添加 62.5 mg/L AgNO₃ 能显著促进胚发生^[34]。Ochatt 等发现,AgNO₃ 对花药培养具有促进作用,对某些基因型的促进效果较明显^[35]。Dias 等对甘蓝类蔬菜花药培养进行研究发现,诱导培养基中添加 10 mg/L AgNO₃ 后出胚率大大增加,而在未加 AgNO₃ 的培养基中这些基因型几乎无胚状体形成^[36-39]。Biddington 等指出,对于难出胚的基因型,在培养基中加入乙烯的抑制剂 AgNO₃ 也许能提高其出胚率^[40]。方淑桂等认为,AgNO₃ 可促进青花菜小孢子的胚胎发生^[41]。于文佳等在小苤菜胚芽分化影响的研究中发现,在 B₅ 固体培养基中添加一定质量浓度的 AgNO₃,可显著提高小孢子的胚芽诱导率和平均每胚出芽数^[42]。

常用于植物组织培养的外源激素有 2 类,即生长素类(2,4-D、IAA、NAA、IBA)和细胞分裂素类(KT、6-BA、ZT、TDZ 等)。Metwally 等研究花药培养基中蔗糖和 2,4-D 的用量发现,添加 150 g/L 蔗糖、5 mg/L 2,4-D 的培养基诱导的南瓜单倍体植株最多^[9]。Ashok 等研究了 *Calyps*、*Cucumis sativus* Lr 等 2 个黄瓜品种在花药离体培养时对生长调节剂的反应,认为最佳的诱导胚产生愈伤组织是在 B₅ 培养基中添加 2.0 μmol/L 2,4-D 和 1.0 μmol/L BAP,在添加 0.09 μmol/g 蔗糖、0.25 μmol/L NAA、0.25 μmol/L KN 的 B₅ 培养基中获得分化的胚胎,在添加 5 μmol/L ABA 的 B₅ 培养基中胚胎发育,在含有 0.09 μmol/L 蔗糖的 B₅ 培养基中萌发成苗^[12]。朱至清等认为,外源激素对花粉细胞去分化启动是非必需的,

但可防止多细胞花粉的败育,使较多细胞形成愈伤组织^[43]。薛光荣等证实,适当提高 2,4-D 浓度可提高西瓜愈伤组织诱导率,适当提高 BA 或 KT 浓度可提高直接增殖率和分化率^[6]。生长激素是黄瓜组织培养中的重要因素,其中 2,4-D 作用最明显,NAA 次之,细胞分裂素中 KT 的作用差异显著。甜瓜在较低浓度生长激素调节下具有较高分化率和成苗率。关于葫芦、冬瓜、南瓜、丝瓜等花药培养的报道不多,但许多学者使用未添加任何外源激素的培养基同样获得了数量和质量均较好的胚状体,因此外源激素在小孢子培养中不是必需的。

2.1.7 培养基 pH 值 大多数植物适合在 pH 值为 5.8~6.0 的培养基中生殖,pH 值在该范围内可促进细胞分裂与增殖。Barinova 等研究发现,高 pH 值条件下游离小孢子体内的转化酶活性减弱,同时¹⁴C 标记的蔗糖大量进入小孢子体内,表明处于高 pH 值条件下的小孢子糖代谢能力减弱,从而造成饥饿胁迫,阻断了配子体发育途径,诱导孢子体发育^[44]。可见,适当提高 pH 值可能有利于诱导小孢子胚胎发生。

2.1.8 小孢子密度 小孢子培养密度过大致使培养基养分供应不足,易引发培养基中毒性物质过多释放,导致健康优秀的小孢子难以出胚;密度过低则小孢子的竞争优势得不到体现,胚胎发生比较困难,一般采用的培养密度为 10 万~50 万个/mL。詹艳等采用血球计数板计数,将小孢子密度调整至 10 万个/mL 左右,但每次均采用血球计数板调整小孢子密度使操作过于繁琐,影响试验进程^[13]。不少学者根据 1 mL 培养基中花蕾的数量研究小孢子密度对出胚的影响。

2.2 胚培养发育及植株再生

一般小孢子培养 2~3 d 发生第 1 次分裂,培养 2~3 周后形成胚状体。小孢子胚状体的类型分为球形、心形、鱼雷形、子叶形以及畸形胚。由胚发育成植株的过程,在游离小孢子培养技术的应用中具有重要作用。国内外众多学者在此方面的研究表明,胚的直接成苗率与培养基、胚的质量、供体植株的基因型均有关。詹艳等将获得的子叶形胚、部分球形胚和心形胚转移至胚状体萌发培养基 MS-BA 上,培养 20 d 后,球形胚、心形胚褐化死亡;发育成熟的子叶形胚正常萌发,形成根芽俱全的小植株;处于初期的子叶形胚则大部分未能正常分化,出现未变绿、褐化死亡或仅有根分化的现象^[13]。可见,子叶形胚最易成苗,因此胚状体能否正常发育为成熟的子叶形胚是成苗的关键。甘蓝类蔬菜出现肉眼可见的胚状体后,将其置于摇床上在 60 r/min、25 ℃ 条件下暗培养,形成子叶形胚状体时转入 B₅ 固体培养基,于 25 ℃ 光暗交替条件下继续培养。

谷佳南等研究了黄瓜花药培养愈伤组织诱导及植株再生,将带有芽点的愈伤组织转接到生根培养基中,分化出根状物后,芽的伸长能力明显下降,使植株再生极为困难^[45]。这可能与基因型有关,也可能是黄瓜花药愈伤组织中存在某种激素,在促进根分化的同时阻碍了芽的伸长生长,为植株再生带来一定困难。激素配比尚须调整,黄瓜花药再生植株分化有待进一步研究。

2.3 小孢子再生植株的倍性鉴定

小孢子培养得到的再生植株以单倍体居多,然而培养过程中一般会发生不同程度的自然加倍,因此小孢子再生植株是由不同倍性植株组成的混合群体,为生产应用带来较大不便,有必要对其进行倍性鉴定。常用的倍性鉴定方法有形态

学鉴定法、气孔保卫细胞叶绿体计数法、花粉母细胞染色体计数法、根尖染色体计数法、流式细胞仪 DNA 含量测定法,且这 5 种鉴定方法各有优劣。不同倍性植株的外部形态特征存在差异,单倍体植株的生活力、生长势、各主要器官大小均劣于正常二倍体,而倍性水平高的植株形态优于正常二倍体。

植株形态鉴定法易受植株长势、营养条件等因素的影响,且倍性水平高时不易区分,判断结果不准确,难以有效鉴定。气孔保卫细胞叶绿体计数法具有简便、快捷、准确性高的优点,但须建立不同倍性叶绿体数量与倍性之间的关系,对染色方法、操作技巧等有一定要求。为快速鉴定烟草花粉植株染色体倍性,刘仁祥等采用气孔保卫细胞叶绿体计数法^[46]。为寻求简便、快速的西瓜染色体倍性鉴定方法,施先锋等以二倍体西瓜 TS、0517 及其同源四倍体为试材,通过观察叶片气孔保卫细胞叶绿体数来鉴定西瓜染色体倍性,结果表明,2 种倍性间的叶绿体数差异显著,二倍体叶绿体数在 15 个以下,四倍体叶绿体数≥15 个,气孔叶绿体数随染色体倍性的增加而增加,用气孔保卫细胞叶绿体数预测植株倍性的准确率可达 90.2%^[47]。可见,采用荧光显微镜观察叶绿体数可在苗期快速、准确地确定植株的染色体倍性。

2.4 染色体加倍

小孢子再生植株有很大部分不能自然加倍,须采用人工诱导方法进行加倍。人工诱导方法有很多,通常采用 2 种途径,即培养过程中处理、移栽时诱变剂处理。单倍体人工加倍主要采用 0.2~0.4 mg/g 秋水仙碱处理单倍体植株,使其加倍。采用秋水仙碱溶液处理根、芽等分生组织或直接加至培养基中,均可起到一定加倍作用。周伟军等对刚分离的油菜小孢子、移入固体培养基前的胚体进行秋水仙碱处理和再生植株浸根处理,研究 3 种不同时期秋水仙碱处理对小孢子胚胎发育、成苗、加倍率的影响,结果表明,采用秋水仙碱直接处理的新分离油菜小孢子培养体系获得的自发加倍率显著高于常规培养体系,且分离小孢子直接进行秋水仙碱加倍染色体更为安全、快速、有效^[48]。

3 葫芦科作物小孢子培养存在的问题与展望

近年来,尽管花粉培养取得了很大进展,但对葫芦科作物的研究相对较少,仅在黄瓜、西瓜上获得了胚状体或再生植株。小孢子培养在育种、生物技术等方面用处很大,但关于小孢子培养技术的机制目前仍不清楚。小孢子培养技术在十字花科、茄科、禾本科作物上已得到实际应用,在葫芦科作物上目前仍处于实验室试验阶段。存在的主要问题是小孢子无法启动萌发或成胚率太低,不同物种或不同基因型间差异较大,形成的愈伤组织或胚状体无法进一步发育成为单倍体植株。今后的研究将从碳源、生长调节剂的种类及浓度、活性炭的应用、预培养的温度及时间等方面入手,以期建立葫芦科作物小孢子培养的植株再生体系,使小孢子培养技术在育种及其他生物技术的应用中发挥积极作用,通过建立稳定、高效地获得纯合二倍体的葫芦游离小孢子培养体系来解决上述问题。

参考文献:

- [1] Joanna G, Katarzyna N S. Review of research on haploid production in cucumber and other cucurbits[J]. Folia Hort, 2013, 25(1): 67-78.

- [2]雷 春,陈劲枫. 葫芦科蔬菜作物单倍体材料创制的研究进展[J]. 中国蔬菜,2006(1):33-36.
- [3]Lighter R. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*[J]. Z Pflanzenphysiol,1982,105:427-434.
- [4]李 娟. 西瓜花药和小孢子培养研究[D]. 雅安:四川农业大学,2008.
- [5]薛光荣,余文炎,费开伟,等. 西瓜花药离体培养获得花粉植株[J]. 植物生理学通讯,1983(4):40-42.
- [6]薛光荣,余文炎,杨振英,等. 西瓜花粉植株的诱导及其后代初步观察[J]. 遗传,1988,10(2):5-8,49.
- [7]Shail J W,Robinson R W. Anther and ovule culture of *Cucurbita*[J]. Cucurbit Genet Coop Rpt,1987,10:92.
- [8]Kurtar E S,Uzun S,Esendal E. Haploid plant propagation by anther culture of squash (*Cucurbita pepo* L.)[J]. Ondokuzmayis Universitesi Ziraat Fakultesi Dergisi,1999,14(2):33-45.
- [9]Metwally E I,Moustafa S A,El - Sawy B I,et al. Haploid plantlets derived by anther culture of *Cucurbita pepo*[J]. Plant Cell:Tissue and Organ Culture,1998,52(3):171-176.
- [10]Dryanovska O A,Ilieva I N. *In vitro* anther and ovule cultures in muskmelon (*Cucumis melo* L.)[J]. C R Acad Bulgare Sci,1983,36:1107-1110.
- [11]Lazarte J E,Sasser C C. Asexual embryogenesis and plantlet development in anther culture of *Cucumis sativus* L. [J]. HortScience,1982,17(1):88.
- [12]Ashok K H G,Murthy H N,Paek K Y. Embryogenesis and plant regeneration from anther cultures of *Cucumis sativus* L. [J]. Sci Hortic,2003,98:213-222.
- [13]詹 艳,陈劲枫,Malik A A. 黄瓜游离小孢子培养诱导成胚和植株再生[J]. 园艺学报,2009,36(2):221-226.
- [14]唐 懿,李万宁,刘 继,等. 苦瓜花药培养研究进展[J]. 长江蔬菜,2010(24):4-7.
- [15]Han J S,Oh D G,Mok I G,et al. Efficient plant regeneration from cotyledon explants of bottle gourd (*Lagenaria siceraria* Standl.)[J]. Plant Cell Rep,2004,23:291-296.
- [16]侯艳霞. 西瓜花药离体培养技术研究[D]. 杭州:浙江大学,2006.
- [17]董艳荣. 甜瓜花药再生体系的基础研究[D]. 南京:南京农业大学,2002.
- [18]曹鸣庆,李 岩,刘 凡. 基因型和供体植株生长环境对大白菜游离小孢子胚胎发生的影响[J]. 华北农学报,1993(4):1-6.
- [19]张凤兰,钊一贯靖久,吉川宏昭. 环境条件对白菜小孢子培养的影响[J]. 华北农学报,1994,9(1):95-100.
- [20]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(1):85-88.
- [21]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[J]. 西北植物学报,2005,25(6):1096-1100.
- [22]薛光荣,费开伟. 西瓜花药培养获得花粉植株简报[J]. 中国果树,1982(2):51-52.
- [23]崔群香,刘卫东,吴 敏,等. 用荧光染色法观察南瓜雄配子体发育过程[J]. 江苏农业科学,2012,40(1):135-137.
- [24]羊杏平,陈学好,周 峰. 不同预处理对西瓜小孢子存活率的影响[J]. 江苏农业学报,2012,28(5):1104-1108.
- [25]郭 尚,王秀英. 不同因素对西瓜花粉生活力的影响[J]. 华北农学报,2006,21(3):91-94.
- [26]朱迎春,孙德玺,邓 云,等. 前期处理对西瓜花药培养愈伤组织诱导的影响[J]. 中国瓜菜,2012,25(5):17-19.
- [27]侯艳霞,张明方. 西瓜花药离体培养影响因子研究[J]. 北方园艺,2010,10:117-120.
- [28]Labani Z,de Buyser J,Picard E. Effect of mannitol pretreatment to improve green plant regeneration on isolated microspore culture in *Triticum turgidum* ssp. *durum* cv. 'Jennah Khetifa'[J]. Plant Breeding,2007,126(6):565-568.
- [29]杨安平,张恩慧,郑爱泉,等. 秋水仙碱对甘蓝游离小孢子胚胎发生及发育的影响[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2010,8(8):131-137.
- [30]黄均元,曾安新,郑素秋. 几种蔬菜花粉萌发最适培养基探讨[J]. 湖南农业大学学报,1997,12(6):61-63.
- [31]姜凤英,冯 辉,王超楠,等. 几种影响羽衣甘蓝小孢子胚状体成苗的因素[J]. 植物生理学通讯,2006,42(1):58-60.
- [32]申书兴,梁会芬,张成合,等. 提高大白菜小孢子胚胎发生及植株获得率的几个因素研究[J]. 河北农业大学学报,1999(4):65-68.
- [33]Lichter R. Efficient yield of embryoids by culture of isolated microspores of different Brassicaceae species[J]. Plant Breeding,1989,103:119-123.
- [34]杨 清,曹鸣庆. 通过花药漂浮培养提高花椰菜小孢子胚胎发生率[J]. 华北农学报,1991,6(3):65-69.
- [35]Ochatt S,Pech C,Grewal R,et al. Abiotic stress enhances androgenesis from isolated microspores of some legume species (Fabaceae)[J]. Journal of Plant Physiology,2009,166(12):1314-1328.
- [36]Dias J C D. Effect of activated charcoal on *Brassica oleracea* microspore culture embryogenesis[J]. Euphytica,1999,108:65-69.
- [37]Dias J S. Effect of incubation temperature regimes and culture medium on broccoli microspore culture embryogenesis[J]. Euphytica,2001,119:389-394.
- [38]Dias J S,Correia M C. Effect of medium renovation and incubation temperature regimes on tronchuda cabbage microspore culture embryogenesis[J]. Sci Hort,2002,93:205-214.
- [39]Dias J S,Martins M G. Effect of Silver nitrate on anther culture embryo production of different *B. oleracea* morphotypes[J]. Sci Hort,1999,82(3/4):299-307.
- [40]Biddington N L,Sutherland R A,Robinson H T. Silver nitrate increase embryo production in anther culture of *Brussels sprouts*[J]. Ann Bot,1988,62:181-185.
- [41]方淑桂,陈文辉,曾小玲,等. 影响青菜菜游离小孢子培养的若干因素[J]. 福建农林大学学报:自然科学版,2005,34(1):51-55.
- [42]于文佳,侯喜林,赵晓曼,等. 小松菜游离小孢子培养和植株再生[J]. 南京农业大学学报,2013,36(2):7-12.
- [43]朱至清,孙敬三,王敬驹. 小麦(*Triticum aestivum*)雄核发育的细胞学研究[J]. 植物学报,1978,20(1):6-12,89-90.
- [44]Binarova P,Straatman K,Hause B,et al. Nuclear - DNA synthesis during the induction of embryogenesis in cultured microspores and pollen of *Brassica napus* L.[J]. Theoretical and Applied Genetics,1993,87(1/2):9-16.
- [45]谷佳南,司龙亨,高 兴,等. 黄瓜花药培养愈伤组织诱导及再生的研究[J]. 江苏农业科学,2009(3):37-39,46.
- [46]刘仁祥,黄 莺,陆永旭,等. 烟草花粉植株染色体倍性苗期快速鉴定[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版,2008,34(5):541-544.
- [47]施先锋,彭金光,汪李平. 用西瓜叶片气孔保卫细胞叶绿体数鉴定西瓜染色体倍性[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版,2009,35(6):640-642,663.
- [48]周伟军,唐桂香,张国庆,等. 甘蓝型油菜小孢子秋水仙碱处理提高双单倍体频率研究[J]. 中国农业科学,2002,35(4):410-414.