

番茄花药培养研究进展

刘晓荣^{1,2}, 陶承光², 吕书文², 杨国栋²

(1. 沈阳农业大学 园艺学院, 辽宁 沈阳 110161; 2. 辽宁省农业科学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘要: 对番茄花药培养中基因型、小孢子发育、培养基种类、碳源、激素种类和配比、添加物、预处理和培养条件等方面的国内外研究概况和进展做了综述。

关键词: 番茄; 花药; 研究进展

中图分类号: S641.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2008)增刊-0031-03

Research Progress on Anther Culture of Tomato

LIU Xiao-rong^{1,2}, TAO Cheng-guang², LU Shu-wen², YANG Guo-dong²

(1. College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China;

2. Liaoning Academy of Agriculture Science, Shenyang 110161, China)

Abstract: This paper summarizes research situation and progress of genotypes, microspores development, media types, carbon source, hormone, additives, pretreatment and culture conditions on anther culture of tomato all of the world.

Key words: Tomato; Anther; Research progress

番茄属于茄科(Solanaceae)番茄属(*Lycopersicon*)蔬菜作物, 番茄作为一个模式植物, 在生理生化、遗传及分子生物学方面得到了比其他蔬菜作物更加广泛、深入、系统的研究。通过花药离体培养进行单倍体育种可以省去多代自交快速建立和育纯番茄品系、克服杂种后代性状分离, 加快番茄育种进程。Guha 等^[1]从毛茛陀罗(*Datura innoxia*)花药培养中得到单倍体植株, 从此开创了利用花药培养诱导单倍体的新途径, 之后, 花药培养诱导单倍体在许多重要作物上获得了成功。Sharp 等^[2]从番茄不成熟的花药诱导获得单倍体愈伤组织。Gresshoff 等^[3]经番茄花药培养的愈伤组织诱导出了番茄单倍体小植株, 取得了番茄花药培养的首次成功。以后, 在番茄花药培养的方法、条件上不断有新的进展^[4-6], 本研究就影响及可能影响番茄花药培养的主要因素的研究进展做了综合性论述。

1 材料的影响

1.1 基因型

材料基因型是花药培养成功与否的关键因素。不同基因型的材料, 花培诱导率不同。花药培养力

的大小是受多基因控制的数量性状^[7], 因而随着基因型的差异变化很大。基因型对花培的影响主要有这样几个方面: 产生单倍体的途径(胚状体或愈伤组织)、发生频率、形成的时间、植株再生能力以及在所形成的植株中单倍体与二倍体的频率等。Gresshoff 等^[3], 从 43 个供试品种花药中取得了 3 个单倍体愈伤组织。Zamir 等^[8]依据低温预处理烟草的花药破坏正常小孢子发生而增加单倍体的发生, 研究用 15 种非等位基因的隐性、雄性不育(ms)番茄植株产生单倍体芽。只有 ms10³⁵突变体诱导产生愈伤组织有相当高的增殖。把这种突变引入花药培养不能产生愈伤的几种基因型材料中后, 发现显著增加了愈伤组织的发生。高秀云等^[9]从 5 个不同的番茄材料中均诱导得到了愈伤组织, 但诱导频率明显不同。由此可见, 基因型的影响在花药培养中普遍存在。

1.2 小孢子发育时期

处于不同发育阶段的小孢子, 其花药培养效率差别很大, 只有花粉发育到一定时期的花药, 才对外界的刺激最敏感, 而不同植物的花粉对外界刺激的敏感时期是不同的。对于番茄来说, Gresshoff 等^[3]以栽培番茄的 43 个品系为材料进行研究, 认为花粉

收稿日期: 2008-03-20

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划(2006BAD01A7)

作者简介: 刘晓荣(1981-), 女, 硕士, 主要从事蔬菜遗传育种研究。

通讯作者: 陶承光(1955-), 男, 研究员, 主要从事园艺作物遗传育种研究。

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细小植株。卫志明等^[10]以北京早红×402的F₁为材料,认为取长3~7 mm、花粉粒处于单核中期的花蕾进行培养最为适宜。高秀云等^[9]认为,以花药的长短来确定发育时期比较可靠。番茄花药培养的最适时期为单核期。朱丽萍等^[11]以不同果型番茄品种为试材,研究了番茄花药长短与花粉发育时期及其与愈伤组织诱导率的相关性。结果发现,不同果型番茄品种,花粉发育与花药长度呈正相关。当番茄花粉发育处于单核靠后期时进行花药培养,诱导愈伤组织的频率最高,是最适时期。因而,小孢子发育时期是影响花药培养成功与否的关键性因素。

1.3 供体植株生长状态及环境

一般认为供体植株的生长环境条件对培养效果有影响。采集自适宜环境条件下的供体植株花药培养的胚诱导率和植株再生率高。而不同品种的适宜环境条件不同。从季节上看,Rang Q Y^[12]研究发现,冬春季较夏秋季更适于进行花药培养。袁亦楠等^[13]在对番茄游离小孢子培养研究过程中发现,用夏露地5月下旬花蕾进行游离小孢子培养,只有薯叶番茄有类胚形成,且频率极低,小于0.01%。而秋露地10月份采花蕾进行培养,所供试的几种基因型均有类胚形成,薯叶番茄中类胚的发生频率大大提高,樱桃番茄中还得到了比类胚更进一步发育的球形胚、类心形胚等各种胚状体。供体植株的生长状态对培养效果也有影响。从生长健壮的幼龄植株上选取花药要好一些,如果在接近末期选取花药,不但显著降低植株的再生频率,而且反应迟缓。这表明了供体植株的生长状态和环境是十分重要的,昼夜温可能影响了供体植株体内小孢子的发育方向,从而使其在以后的培养中偏离了向配子体发育,进行脱分化形成胚状体或愈伤组织。

2 培养基及其他添加物质的影响

2.1 基本培养基

基本培养基对花药培养能否成功及提高胚状体诱导频率有着重要的影响。目前番茄花药培养中所采用的基本培养基有以下4种^[14]:①保持培养基(White的改良培养基);②DBM I, DBM II, DBM III培养基;③MS的大量元素及铁盐+H的微量元素及有机物质;④MS培养基。

2.2 碳源

培养基中添加糖,不仅是作为碳源,同时也起到维持渗透压的作用。花药培养中常用的糖有蔗糖、

麦芽糖和果糖,且不同品种所需糖的种类和浓度各不相同。Sharp等^[2]发现蔗糖浓度为1%时,未发现分裂,在2%~13.16%的浓度范围内,细胞分裂的百分率随浓度的增加而提高。蔗糖浓度为13.16%时,细胞分裂的比率达40%上。蔗糖浓度为17.11%时,细胞分裂的百分率显著下降。而王立浩等^[15]试验表明用麦芽糖代替蔗糖能显著地提高胚状体的发生率。Dolcet-sanjuan等^[16]比较了蔗糖、果糖、麦芽糖对辣椒花药培养的效果,认为麦芽糖效果最好,小孢子对蔗糖和果糖很敏感。Rouland^[17]证明在甘蓝花药培养中用蔗糖比麦芽糖的效果好,同时比较了7%,10%,13%蔗糖和麦芽糖浓度下胚的生成率,发现胚的生成频率随蔗糖浓度上升而提高,而麦芽糖浓度超过10%时,即使提高浓度,胚的生成频率也不再增加。而在番茄花药培养中,还未见有用麦芽糖或果糖作为碳源的报道。

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。花药培养中常用的激素有2类:一类为生长素,如2,4-D, IAA, NAA, IBA等;另一类为细胞分裂素,如KT, 6-BA, ZT, TDZ等。这2类物质是花药培养基中最关键的成分,其比例、组成不但可以影响花粉发育的类型(形成胚状体还是形成愈伤组织,形成多少),而且还可以影响二倍体的体细胞组织(药隔、药壁等)生长增殖,还是单倍体花粉细胞生长增殖等。Gresshoff等^[3]认为,在DBM I加NAA 0.11 mg/L和DBM II加NAA 0.1 mg/L、KT 2 mg/L 2种培养基上,均能诱导愈伤组织分化成苗。Gulshan等^[18]提出,NAA+KT对启动单倍体愈伤组织培养体可能是关键,但没找出只产生单倍体芽的激素组合。Zamir等^[8]和Zir等^[19]报道用IAA+ZEA取得了二倍体或双倍体,或用2,4-D+NAA+BA+KT的组合。卫志明等^[10]提出,把IAA(0.12 mg/L)或NAA(0.12 mg/L)与6-BA(2 mg/L)或KT(2 mg/L)配合使用,能诱导愈伤组织分化成苗。高秀云等^[9]诱导产生愈伤组织的培养基为NS+KT 1~2 mg/L+NAA 0.5 mg/L+3%蔗糖。

2.4 有机添加物

Sharp等^[2]发现附加ADE(果汁),YE(酵母提取物),CH(水解酪蛋白)或CW(椰乳)对培养的番茄花药很少促进或不生长。而高秀云等^[9]在番茄花药培养中发现添加3%~5%的椰乳,能够增加愈伤组织诱导频率。部分作物花药培养过程中,在培养基中添加硝酸银能够减轻褐化。王立浩等^[20]发现在辣椒花药培养中添加硝酸银和Vc还可以促进愈伤组

织生成, 提高胚状体的发生率。冉毅东等^[21]在马铃薯花药培养中也得出, 添加 100 $\mu\text{mol/L}$ AgNO_3 不但可以提高胚状体的诱导率, 还提前出胚时间, 延长了胚状体的产生周期。Dias 等^[22]对甘蓝类蔬菜花药培养研究发现, 诱导培养基中添加 10 mg/L AgNO_3 后, 出胚率大大增加, 而在未加 AgNO_3 的培养基中, 这些基因型几乎没有胚状体形成。此外, 在培养基中添加一些氨基酸如谷氨酰胺、丝氨酸、脯氨酸、天冬氨酸和丙氨酸也可以提高花药培养出的胚率。在番茄花药培养中, 这些物质的作用还有待进一步研究。

3 培养方法的影响

3.1 预处理

在大多数花药培养成功的例子中, 想要获得理想的培养效果, 常要进行各种预处理。番茄花药培养方面, Cappadocia 等采用 4 $^{\circ}\text{C}$ 低温和 10 mg/L 的 2, 4-D 预处理处于小孢子单核后期的花药, 使愈伤组织增殖四倍多。周广栋等在番茄花药离体培养中低温预处理对小孢子发育影响的研究中发现, 对离体培养的番茄花药进行低温预处理, 可在一定程度上延缓番茄小孢子退化、提早雄核发育、并增加参与雄核发育小孢子的比率。

3.2 温度和光照

花药培养对温度的反应较为敏感。番茄花药培养常选择在人工光照管 2 000~20 000 lx 下, 光照周期为 12 h/12 h 或 16 h/8 h, 生长温度是常温 25, 27 $^{\circ}\text{C}$ 或室温 24~32 $^{\circ}\text{C}$ 。高秀云等^[9]在番茄花药培养中, 将接种后的花药置于 25~27 $^{\circ}\text{C}$, 日光灯补充光照 10 h 的条件下进行培养。研究发现, 当温度超过 30 $^{\circ}\text{C}$ 时, 接种花药很快变褐甚至死亡, 花药及花丝也均不产生愈伤组织。另外, 愈伤组织的分化也与温度条件密切相关, 在 25~27 $^{\circ}\text{C}$ 的温度下利于幼苗分化, 如温度不适, 愈伤组织不分化。

4 展望

番茄花药培养产生单倍体已有报道, 利用此项技术, 除了可以缩短材料的纯化时间, 通过对杂交 F_1 , F_2 的花药培养选择特异的性状等, 还可以通过花药培养方法建立 DH 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。但通过花药培养产生的愈伤组织诱导分化难、后代植株倍性杂乱, 难于证实二倍体或较高倍数性植株的来源, 未来番茄花药培养的目标是将花药培养的供试品系引入遗传标记基因, 由于番茄已有若干遗传品系, 这是易于做到的。Zamir

等^[8]曾设想用同工酶标记, 作为鉴别单倍体再生植株的有利方法。因为同工酶的互显性表达, 易于从每个同源单倍体类型中分出杂合体。单倍体特别适用于从培养的细胞分离隐性突变, 以及取得 $2n=24$ 染色体的体细胞杂种。另外要进一步改进培养基配方、培养条件, 最大程度地提高花药培养诱导率和愈伤组织分化率。

参考文献:

- [1] Guha S, Mahe shwari S C. In vitro production of embryos from anthers of *Datura* [M]. Nature, 1964, 204: 497.
- [2] Sharp W R, Dougall D K, Paddock E F. 来自烟草和番茄的未成熟花粉粒的单倍体愈伤组织和小植株 [M] // 中国科学院北京植物研究所. 单倍体育种集 (第 3 集). 北京: 科学出版社, 1977: 246~250.
- [3] Gresshoff P M, Doy C H. 番茄单倍体的发育和分化 [M] // 中国科学院北京植物研究所. 单倍体育种集 (第 2 集). 北京: 科学出版社, 1972: 142~153.
- [4] Gulshan T M V, Shama D R. Studies on anther cultures of tomato-*Lycopersicon esculentum* Mill [J]. Biologia Plantarum, 1981, 23: 414~420.
- [5] Shtereva L, Atanasova B. Callus induction and plant regeneration via anther culture in mutant tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) lines with anther abnormalities [J]. Israel Journal of Plant Sciences, 2001, 49: 203~208.
- [6] José M, Seguí-Simarro, Fernando Nuez. Embryogenesis induction, callogenesis, and plant regeneration by in vitro culture of tomato isolated microspores and whole anthers [J]. Journal of Experimental Botany, 2007, 58: 1119~1132.
- [7] Murray F. 石英译. 大豆、玉米、花生和菜豆对 SO_2 、HF 单一和符合暴露的产量反应 [J]. 国外农业环境保护, 1992, 3: 31~32.
- [8] Zamir D, Jones R A, Kedar N. Anther culture of male sterile tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) mutants [J]. Plant Science Letters, 1980, 17: 353~361.
- [9] 高秀云, 王纪芳, 金波. 等. 番茄花药离体培养获得植株 [J]. 园艺学报, 1980, 7(4): 37~42.
- [10] 卫志明. 农业科学集刊 (第 10 集) [M] // 农作物原生质体培养专辑, 1995: 7, 12.
- [11] 李丽萍, 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.
- [12] Rang Q Y. A study of factors affecting anther culture of cauliflower [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1992, 28(3): 289~296.
- [13] 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.
- [14] 司军, 李成琼. 番茄花药培养研究进展及展望 [J]. 生物学杂志, 2002, 18(1): 4~6.
- [15] 王立浩, 张宝玺. 辣椒花药培养研究进展 [J]. 中国蔬菜, 2001(3): 52~53.
- [16] Dolcet-Sanjuan R, Clavetia E, Huerta A. Androgenesis in *Capsicum agglutinum* L. effects of carbohydrate and carbon dioxide enrichment [J]. J Amer Soc Hort Sci, 1997, 122(4): 468~475.
- [17] Roulund N. Effect of genotype, environment and carbohydrate on anther culture response in head cabbage [J]. Euphytica, 1990, 49(3): 237~242.
- [18] Gulshan T M V, Shama D R. Studies on anther culture of tomato-*Lycopersicon esculentum* Mill. [J]. Biologia Plantarum, 1981, 23: 414~420.
- [19] Zir M Hadary D, Kedar N. Dihaploid plants regenerated from tomato anther in vitro [C] // Proc. Fifth Intern. Congress on Plant Tissue Culture, 1982.
- [20] 王立浩, 张宝玺, 郭家珍. 等. 辣椒花药培养中若干影响因素的研究 [J]. 园艺学报, 2004, 31(2): 199~200.
- [21] 冉毅东, 戴朝曦. 马铃薯花药培养硝酸银对诱导双单倍体及单倍体的效果 [J]. 西北农业学报, 1993, 2(4): 43~47.
- [22] Dias J S, Martins M G. Effect of silver nitrate on anther culture embryo production of different *B. oleracea* morphotypes [J]. Scienties Horticulture, 1999, 82(3~4): 299~307.