

植物花药组织培养技术的研究

王万奇,李文龙,王媛媛,廖 棚,穆 丹

(佳木斯大学 生命科学学院,黑龙江 佳木斯 154007)

摘要:植物花药组织培养技术在育种和基础理论研究中已应用广泛,研究阐述了花药组织培养的技术发展现状,系统地论述了植物花药组织培养过程中外植体的不同、培养基配方、接种方式、培养条件的不同对组培结果的影响,并对花药组织培养技术的应用进行概述,使花药组织培养技术研究体系更加清晰系统。

关键词:花药组织培养;影响因素;应用

中图分类号:Q943.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2015)10-0177-03 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2015.10.0177

花药培养是指将一定发育时期的花药在无菌环境下,培养在人工控制的适当条件下,不经过受精过程通过胚发生途径和细胞发生途径形成单倍体植株。在自然界中单倍体植株出现的频率极其低,仅有 0.001%~0.010%,所以花药离体培养是现在获得单倍体及其纯和体的有效途径,在理论研究及育种方面应用较广泛。

1 花药组织培养发展概况

自 1964 年 Guha 等利用曼陀罗花药培养出单倍体^[1-2]以来,各国的科学家都开始致力于花药离体培养的研究,并且发展飞速。1972 年以来,人们陆续开展了对观赏植物进行花药组织培养诱导培育单倍体植株的研究。随着花药组织培养技术的发展,花药培养技术开始应用于其它领域。在植物遗传研究方面,花药培养单倍体可以产生纯种植株,还可以创造突变体;在植物育种研究时,利用花药离体培养技术,可以提高选择效率,加快育种进程。自花药组织培养研究至今,利用花药离体培养技术产生单倍体植株,已经被广泛应用到 28 科 68 属 170 多种植物上^[3]。据不完全统计,已经有 23 科 52 属约 300 种高等植物的花药组织培养取得成功^[4],其中还包括大麦^[5]、玉米^[6]、大豆^[7]、梨^[8]、橡胶^[9]、桃^[10]、杨树^[11]、苹果^[12]、荔枝^[13]、龙眼^[14]多种经济作物。我国科学家在花药离体培养单倍体方面做出了杰出的贡献,从培育出世界上第一个作物新品种到培育出

高产、抗病、适应强的玉米、小麦。近年来在花卉新品种和中药的快繁方面也做出了很大的贡献。

2 花药组织培养的影响因素

花药组织组培过程会受到外植体、培养基、接种方式和培养条件的影响,只有选择合适的材料及培养基,正确的接种并培养在适当的条件下,才能更好地保障花药组织培养的成功。

2.1 植物材料的影响

不同的材料或同一材料的不同时期花药组织培养的成功率存在明显差异。不同基因型的材料,花药组织培养的效果不同,且不同品种之间也存在很大差异。一般茄科植物花药培养较容易成功,同属禾本科的大稻、大麦的培养效果良好,而棉花、大豆的花药组织培养至今未成功。

花药组织培养时植物材料的花药发育时期是决定是否成功的关键因素,不同植物的花药对外界刺激敏感的时期不同。研究者在花药组织培养研究中发现,花药只有发育到一定时期才会对外界刺激敏感,不是任何时期的花药都可以组培出愈伤组织或胚状体。多数植物在花药发育的单核期特别是单核中后期对外界刺激非常敏感,利于组培的成功,但也有些植物稍早或稍迟。例如,小麦、玉米在单核的中期诱导最佳,烟草、水稻的花粉在单核的中期至双核都可以诱导成功,而大麦、番茄最佳花药诱导时期为单核的前期。

2.2 培养基的影响

花药组织培养主要应用 MS、N₆、B₅、Nitsch 等基本培养基,再加以适宜配比的植物调节物质,不同植物花药组织培养的最适培养基配方不同。

2.2.1 基本培养基 基本培养基直接影响培养材料的生长,对花药培养成功的影响很大,目前花药组织培养时广泛应用的基本培养基为 MS。从 20 世纪 60 年代到 80 年代,20 余年的花药组培研

收稿日期:2015-06-04

基金项目:佳木斯大学科技资助项目(Sq2013-027;S2010-55);佳木斯大学校长创新创业基金资助项目(xzyf2013-08)

第一作者简介:王万奇(1993-),女,黑龙江省哈尔滨市人,在读学士,从事园林植物应用研究。E-mail:18745474586@163.com。

通讯作者:穆丹(1980-),女,吉林省吉林市人,博士,副教授,从事园林专业的教学与研究工作。

究中,研究者们不仅证实了一些普遍适用的培养基如 MS、Miller 和 Kitsch,而且根据一些植物花药培养的特殊要求,设计了几种新的培养基配方,如适用于小麦的 C₁₇ 和适用于水稻、玉米的 N₆ 培养基等,从而提高了花药愈伤组织的诱导率和分化成苗的频率。例如,葡萄花药愈伤组织诱导和植株再生的最适基本培养基为改良的 B₅^[15],而枣花药组织培养的最适基本培养基为 MS^[16],红景天花药组织培养使用基本培养基 MS 和 B₅ 都效果较好^[17]。

2.2.2 生长调节剂 培养基中诱导分化和分裂的植物生长调节剂的水平和配比对花药组培起至关重要的作用。据以往研究结果可知,对于大多数禾本科植物,如水稻、小麦、大麦的花药组培中,外源生长素特别是生长素 2,4-D 对于启动小孢子细胞分裂形成愈伤组织是不可缺少的。培养基中激素水平和配比不仅会影响组培的诱导率,还会直接影响花粉的发育,如小麦花粉在 2 mg·L⁻¹ 的 2,4-D 培养基上发育形成愈伤组织,在较低浓度 2,4-D 或较高浓度激动素的培养基上,发育形成胚状体。禾本科植物花药培养时,培养基中必须同时具有生长素和细胞分裂素,而草本植物花药组培时需要的生长调节剂暂未发现固定规律。对于细胞分裂素,在不同植物花药脱分化培养基的配合使用是不同的。如小苹果^[18]、橡胶树^[19]、七叶树^[20] 花药组培时只能用 KIN 与 2,4-D 配合使用;葡萄^[21] 花药组培时用 6-BA、KIN 和 2,4-D 配合使用。

2.2.3 碳源 培养基中碳源的种类及浓度与花粉的发育密切相关。花药组培研究开始一直以蔗糖作为碳源,近 10 年来,开始尝试用麦芽糖、葡萄糖等作为碳源。在矮牵牛花药组培研究中发现,麦芽糖不仅能替代蔗糖,还能提高愈伤组织诱导率,提高分化能力。碳源浓度的不同,决定了培养基的渗透压,还与花药发育成苗密切相关。如烟草花药在不含蔗糖的培养基上培养,不能发育成苗,蔗糖浓度为 1%~4% 时花粉能发育成苗。

2.2.4 其它 花药培养的培养基除了基本培养基、激素和碳源会影响诱导效果,培养基的状态和一些附加物质会影响花粉的发育。例如,小麦花粉培养基中添加水解乳蛋白对愈伤组织的形成有一定影响;玉米花药培养基中添加酪蛋白水解物对组培有显著作用;在烟草花药培养时,加入 1% 活性炭,提高出苗率 1~4 倍;玉米花药愈伤组织诱导时,加入 0.5% 活性炭使诱导率提高一倍;在培养基中加入聚蔗糖,使花药漂浮在液体培养基

表面,保持通气良好,能显著提高培养效果。

2.3 接种的影响

花药组织培养过程中,接种前的预处理、材料的消毒方式及接种的密度都与花药组培的成功及效果密切相关。

2.3.1 预处理的影响 材料在接种前适当的预处理可以提高花药愈伤组织诱导率,常用的方法有低温处理、热处理、化学药剂喷施处理,其中最有效的是低温预处理。对离体花药进行 2~6℃ 的低温预处理,有助于花粉植株的诱导^[22],因为低温可以阻止纺锤丝的形成,打破有丝分裂正常过程,导致发生分化,并且可以抑制小孢子的衰败,延长小孢子存活时间。例如,在烟草花药组织培养时,在 5~8℃ 条件下分别预处理 24、48、96 及 120 h,结果表明处理 48 h 时,诱导率最高;水稻花药组织培养时,稻穗低温预处理 10 d 效果最佳^[23]。

2.3.2 消毒方式的影响 组培中的污染问题严重影响成功率。在自然界采集的花蕾一般都带有各种微生物,接种前的消毒工作十分重要。通常适用于接种的花药大多没成熟,花蕾含苞待放,花药基本上处于无菌状态,所以花药的消毒主要针对对于外部微生物的污染。一般的消毒方法有 2 种,用 75% 酒精对花蕾进行表面擦拭;或先用 70% 酒精表面消毒 30 s,反复无水冲洗,2 次,每次 3 min,然后 0.1% HgCl 消毒 10 min,用无菌水冲洗 4~7 次。

2.3.3 接种密度的影响 在花药组培时,接种在培养基上的花药之间呼吸代谢会相互影响,存在竞争关系,因此花药接种的密度会直接影响愈伤组织的诱导频率和效果。李春玲^[24] 在长期的花药组培研究中发现,50 mL 的锥形瓶培养基接种 10 个花药,其胚状体诱导率最高;梁高涛等^[25] 在对马铃薯花药组培的研究中发现每瓶 40 个花药的接种最适。

2.4 培养条件的影响

花药组培过程中,培养时的温度和光照也是重要的影响因素。一般离体培养的花药对温度十分敏感,大多数植物花药在 25~28℃ 温度下培养是最适的,不同温度条件下培养效果也会有很大差异。如,曼陀罗花药分别在 15、25、30℃ 条件下培养,在高温下胚状体诱导率高,低温下胚状体难以形成。不同植物花药对光反应不同,如烟草花药在低温的白光或红光中效果明显较好,曼陀罗花药培养中,红光抑制花粉胚产生,而紫光 and 蓝光促进芽的形成。

3 花药组织培养的应用

花粉具有数量多、呈游离状、体积小、形态均一以及便于人工控制的特点,花粉花药组织培养技术已成为遗传学、生理学和生化研究的常用方法。通过花药组培技术可获得单倍体组织和植株,通过染色体加倍可获得纯合的二倍体植株,因此,花药组培可应用于育种研究和基础理论研究。花药组培相比较常规的育种方法,具有加速杂种纯合,缩短育种年限和选择效率高的特点。此外,花药组培还可以从远缘杂种的花粉中诱导出单倍体,克服远缘杂交不育的难题。利用花药组培技术,现已培育出大量新品种,尤其是玉米、水稻和小麦的新品种,使其产量和品质都有所提升^[26-27]。

4 花药组织培养存在的问题及其展望

近年来,花药组织培养取得了飞速发展,无论是在遗传研究还是在育种研究中都发挥了巨大的作用,现在已经在经济作物、药用植物的育种方面取得了很大的成绩。但是,在实际生产上的应用推广还存在着一些问题,花药培养方法还没有建立起完善、高频的花药组培再生体系,尚未达到普遍的最优化。在今后的研究中,应该加强各种因素对花药培养影响和遗传机理的探究,建立成熟完善的花药组培体系,提高花粉培养效率;将花药组培技术与细胞工程技术和基因工程技术等结合,拓宽花药组培技术的应用领域,为花粉培养技术的应用开创一个新的局面。

参考文献:

- [1] Guha S, Maheshwari S C. In vitro production of embryos from anther of *Datura* [J]. *Nature*, 1964, 204: 497.
- [2] Guha S, Maheshwari S C. Development of embryoids from pollen grains of *Datura in vitro* [J]. *Phytomorphology*, 1967, 17: 454-461.
- [3] Maheshwari S C, Tyagi A K, Malhotra K, et al. Induction of haploidy from pollen grains in angiosperms- The current status [J]. *Theor Appl Gen-et.*, 1980, 58: 193-206.
- [4] 胡道芬. 植物花药育种进展 [M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1996: 22-42.
- [5] 魏凌基, 王咏星, 张薇. 大麦花药离体培养及植株再生研究初报 [J]. 石河子农学院学报, 1995, 13(4): 60.

- [6] 付迎军. 玉米离体花药培养体系的建立 [J]. 延边大学农学报, 2004, 26(1): 1-5.
- [7] 赵桂兰, 刘艳芝, 尹爱平, 等. 大豆花药培养中胚状体萌发的研究 [J]. 科学通报, 1998, 43(14): 1513-1516.
- [8] 薛光荣, 杨振英, 史永忠, 等. 锦丰梨花粉植株的诱导 [J]. 园艺学报, 1996, 23(2): 123-127.
- [9] 梁国平, 肖三元. 橡胶树花药离体培养及完整植株的诱导 [J]. 热带农业科技, 2004, 27(1): 8-10.
- [10] 渡边庆一. 猕猴桃花药培养再生植株 [J]. 国外特种经济动植物, 1989(2): 50-51.
- [11] Cao T Q. *Advances in Science of China, Biology* (Vol. 1) [M]. Beijing: Science Press, 1986: 295.
- [12] 吴绛云. 苹果花药培养获得单倍体植株 [J]. 园艺学报, 1981, 8(4): 36.
- [13] 傅莲芳, 唐道. 荔枝花粉植株诱导的研究 [J]. 遗传学报, 1983, 10(5): 369-374.
- [14] 杨永青, 魏文雄. 龙眼花粉植株的诱导 [J]. 遗传学报, 1984, 11(4): 288-293.
- [15] 张利平, 曹孜义, 李唯. 影响葡萄花药愈伤组织产生和分化频率的因素 [J]. 甘肃农业大学学报, 1993, 38(3): 247-252.
- [16] 王震星, 张磊. 枣花药培养再生植株及其染色体倍性研究 [J]. 北方果树, 1998(2): 5-6.
- [17] 盖玉红, 魏健. 不同培养基条件对红景天花药愈伤组织生长量的影响 [J]. 黑龙江农业科学, 2015(4): 10-12.
- [18] 吴绛云. 苹果花药培养获得单倍体植株的研究 [J]. 东北农学院学报, 1981, 8(2): 36.
- [19] 陈正华, 陈发祖, 钱长发, 等. 三叶橡胶花粉植株的诱导 [J]. 遗传学报, 1978, 5(6): 99-107.
- [20] Redojevic L. *In vitro* induction of androgenic plantlets in *Aesculus hippocastanum* [J]. *Protoplasma*, 1978, 96: 369-374.
- [21] 邹昌杰, 李佩芬. 葡萄花粉植株的诱导 [J]. 植物学报, 1981, 23(1): 79-81.
- [22] 许智宏. 植物生物技术 [M]. 上海: 上海科技出版社, 1998: 207-212.
- [23] 魏芳勤, 沙志鸿, 张选明, 等. 影响水稻花药培养出愈率的多因子正交试验研究 [J]. 陕西农业科学, 2015, 61(2): 4-6.
- [24] 张树根, 沈火林, 蒋钟仁, 等. 辣椒花药培养单倍体育种技术研究进展 [J]. 辣椒杂志, 2006(3): 67-69.
- [25] 冉毅东, 王蒂, 戴朝曦. 提高马铃薯双单倍体花药培养产生胚状体及再生植株频率的研究 [J]. 马铃薯杂志, 1996, 10(2): 74-78.
- [26] 王卢平. 植物组织培养技术的应用 [J]. 农家顾问, 2014(15): 60, 42.
- [27] 祝剑峰. 植物组织培养在育种中的应用 [J]. 安徽农业科学, 2014, 42(35): 12415-12417.

Research on Tissue Culture Technology of Plant Anther

WANG Wan-qi, LI Wen-long, WANG Yuan-yuan, LIAO Xu, MU Dan
(College of Life Science, Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154007)

Abstract: Plant anther tissue culture technology had been widely used in breeding and basic theoretical research. The development status of anther culture was interviewed, the effects of anthers of the plant tissue culture process of explants of different medium formulations, inoculation on the tissue culture results in different culture conditions systematic exposition were studied, anther tissue culture application was overviewed.

Keywords: anther tissue culture; influencing factors; application