

# 茄子体细胞杂种游离小孢子培养获得再生植株

连 勇<sup>1,2</sup> 刘富中<sup>1</sup> 陈钰辉<sup>1</sup> 宋 燕<sup>1</sup> 张松林<sup>1</sup> Darasinh Sihachakr<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081; <sup>2</sup> 法国巴黎 11 大学植物形态与发育实验室, 法国 ORSAY CEDEX BAT. 360, 91405)

**摘 要:** 应用游离小孢子培养技术, 培养茄子体细胞融合杂种 DSa 不同株系的小孢子。结果表明: 对花药进行 36℃ 高温 6 d 预处理, 能显著提高小孢子脱分化能力; 小孢子离体培养的最佳发育时期是单核期; 小孢子培养的适宜培养基为 KM 附加 PEG 250 mg/L、2, 4-D 0.2 mg/L、ZT 0.5 mg/L、NAA 1 mg/L 及 6.5% 的葡萄糖; 再生植株适宜培养基为 MS 附加 ZT 2 mg/L、IAA 0.1 mg/L、2% 蔗糖和 7 g/L 琼脂。

**关键词:** 茄子; 体细胞杂种; 小孢子培养; 植株再生

**中图分类号:** S 641.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2004) 02-0233-03

## Plantlet Regeneration by Isolated Microspore Culture of Somatic Hybrid of Eggplant

Lian Yong<sup>1,2</sup>, Liu Fuzhong<sup>1</sup>, Chen Yuhui<sup>1</sup>, Song Yan<sup>1</sup>, Zhang Songlin<sup>1</sup>, and Darasinh Sihachakr<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; <sup>2</sup> Morphogenese Vegetale Experimentale, Universite Paris Sud, BAT. 360, 91405 ORSAY CEDEX, France)

**Abstract:** Somatic fusion hybrid DSa (*S. torvum* Sw × *S. melongena* L. 'Dourga') microspore were cultured by using isolated microspore culture. The result show that microspore dedifferentiation ability was markedly improved by using the treatment of anther under the high temperature conditions of 36℃ for continuous 6 days. The best development period for microspore culture is monokaryotic stage; The suitable medium for microspore culture is KM with PEG 250 mg/L, 2, 4-D 0.2 mg/L, ZT 0.5 mg/L, NAA 1 mg/L and glucose 6.5%; The suitable medium for regenerated plantlet is MS with ZT 2 mg/L, IAA 0.1 mg/L, sugar 2% and agar 7 g/L.

**Key words:** Eggplant; Somatic hybrid; Isolated microspore culture; Plantlet regeneration

### 1 目的、材料与方法

应用原生质体融合技术可以将茄子近缘野生种中的抗真菌、抗细菌、抗线虫等基因转育到栽培种中<sup>[1]</sup>。经原生质体融合获得体细胞杂种是四倍体<sup>[2]</sup>, 需要降成二倍体才能进一步应用于育种实践。本研究是通过茄子游离小孢子培养, 获得体细胞杂种小孢子再生植株, 旨在获得双单倍体再生植株, 快速固定植物性状, 获得茄子抗病育种材料。

试验于 1999 年和 2002 年分别在法国巴黎 11 大学和中国农科院蔬菜花卉研究所进行。供试材料取自温室栽培的茄子近缘野生种和栽培种体细胞融合杂种 DSa (*S. torvum* Sw × *S. melongena* L. 'Dourga') 的再生株系 DSa-2、DSa-110 和 DSa-122。取镜检处于花粉母细胞、四分体、单核期小孢子和成熟花粉细胞的花蕾, 表面消毒后在无菌条件下取花药接种在 MS 基本培养基上, 36℃ 高温黑暗处理 6 d, 然后在体视显微镜下用解剖刀剥取小孢子, 抛弃全部药壁等体细胞组织。游离小孢子经计数

收稿日期: 2003-09-12; 修回日期: 2003-12-24

基金项目: 农业部蔬菜遗传与生理重点开放实验室资助项目; 国家 863 计划项目 (2002AA244011-1); 欧盟资助项目 (ICA4-CT-2001-10064)

稀释后进行液体浅层静止培养, 小孢子密度  $4 \times 10^5$  个/mL。以 MS、B5、KM 和 VKM 为基本培养基, 附加不同浓度的聚乙二醇 (PEG)、2,4-D、玉米素 (ZT)、 $\alpha$ -萘乙酸 (NAA)、吲哚乙酸 (IAA) 和赤霉素 ( $GA_3$ ) 等, 筛选游离小孢子愈伤组织诱导培养基。以 MS 为基本培养基, 附加不同浓度的 ZT、6-苄氨基嘌呤 (BA)、NAA 及 IAA, 筛选诱导小孢子愈伤组织不定芽的再生培养基。再生植株染色体倍性检测采用流式细胞计 (Flow Cytometry) 和铁矾-苏木精染色法。

## 2 结果分析与讨论

### 2.1 影响小孢子脱分化的因素

在游离小孢子前对花药进行热激预处理, 能显著提高小孢子脱分化能力<sup>[3]</sup>, 本试验得到同样的结果。图版, 1 所示, 对花药进行 36℃ 高温 6 d 预处理后, 部分小孢子开始膨大, 倒置显微镜下观察膨大小孢子较其它小孢子亮, 核仁部分内含物浓密, 随后的跟踪观察发现这些膨大的小孢子是原始脱分化的小孢子。在供试的四个发育阶段的小孢子中, 花粉母细胞、四分体及成熟花粉细胞没有观察到进一步脱分化、细胞发生分裂现象, 仅单核期的小孢子在离体培养中有分裂。

### 2.2 愈伤组织的形成

不同基本培养基、不同外源激素及其不同浓度配比试验结果表明: 四倍体体细胞杂种植株小孢子在含 PEG 250 mg/L、2,4-D 0.2 mg/L、ZT 0.5 mg/L、NAA 1 mg/L、葡萄糖 6.5% 的 KM 培养基中 27℃ 黑暗条件下游离培养, 小孢子分裂形成愈伤组织频率最高。镜检跟踪观察可见, 小孢子首先体积增大, 继而内部开始分裂 (图版, 2), 培养 18 d 后小孢子壁破裂, 愈伤组织小颗粒形成 (图版, 3), 愈伤颗粒继续分裂 30 d 后形成大块愈伤团 (图版, 4、5)。不同株系间形成愈伤组织频率基本相同, 培养 30 d 计数结果表明均在 20~48 块/花药之间。

### 2.3 植株再生

将小孢子愈伤颗粒转移到含蔗糖 2%、ZT 2 mg/L、IAA 0.1 mg/L 和琼脂 7 g/L 的 MS 再生培养基上, (26±1)℃, 2000 lx 光照 13 h/d 条件下继续培养, 60 d 左右时愈伤组织上开始分化出不定芽 (图版, 6)。不定芽转移至含蔗糖 2%、IAA 0.1 mg/L 和琼脂 7 g/L 的 MS 生根培养基上培养, 形成小孢子再生植株 (图版, 7), 经检测, 83% 以上的再生植株是双单倍体 (表 1)。

### 2.4 再生植株的田间表现

将染色体倍性检测为双单倍体的再生植株, 经温室移栽驯化后定植于露地, 田间表现与其四倍体供体植株植物学性状相近, 但果实、叶片等均小于其供体 (图版, 8), 生长旺盛, 没有病虫害发生 (抗病性有待于进一步鉴定)。由于培养的游离小孢子体是在体视显微镜下用解剖刀剥取并抛弃全部药壁等体细胞组织, 排除了药壁、花药隔层等母体组织的干扰, 通过培养得到的植株都来自小孢子群体, 能快速固定植物性状, 应用于茄子抗病育种材料选育。

顾淑荣<sup>[4]</sup>曾以七叶茄和九叶茄为材料, 用液体浅层静置培养的方法培养小孢子获得了愈伤组织。Kazumitsu<sup>[5]</sup>曾用小孢子培养的方法经愈伤组织得到几株小孢子再生植株, 但还难以应用于育种实践。本试验应用游离小孢子培养技术获得大量体细胞融合杂种株的小孢子再生植株, 为四倍体体细胞杂种降倍成双单倍体进而应用于育种实践提供了可行的技术方法。应说明的是, 应用该培养系统, 培养二倍体栽培种的小孢子同样可以获得大量的小孢子愈伤组织, 但是很难使愈伤组织分化再生植株, 这可能与小孢子倍性有关, 也可能与四倍体体细胞杂种小孢子含有野生血缘有关, 有待于进一步验证。

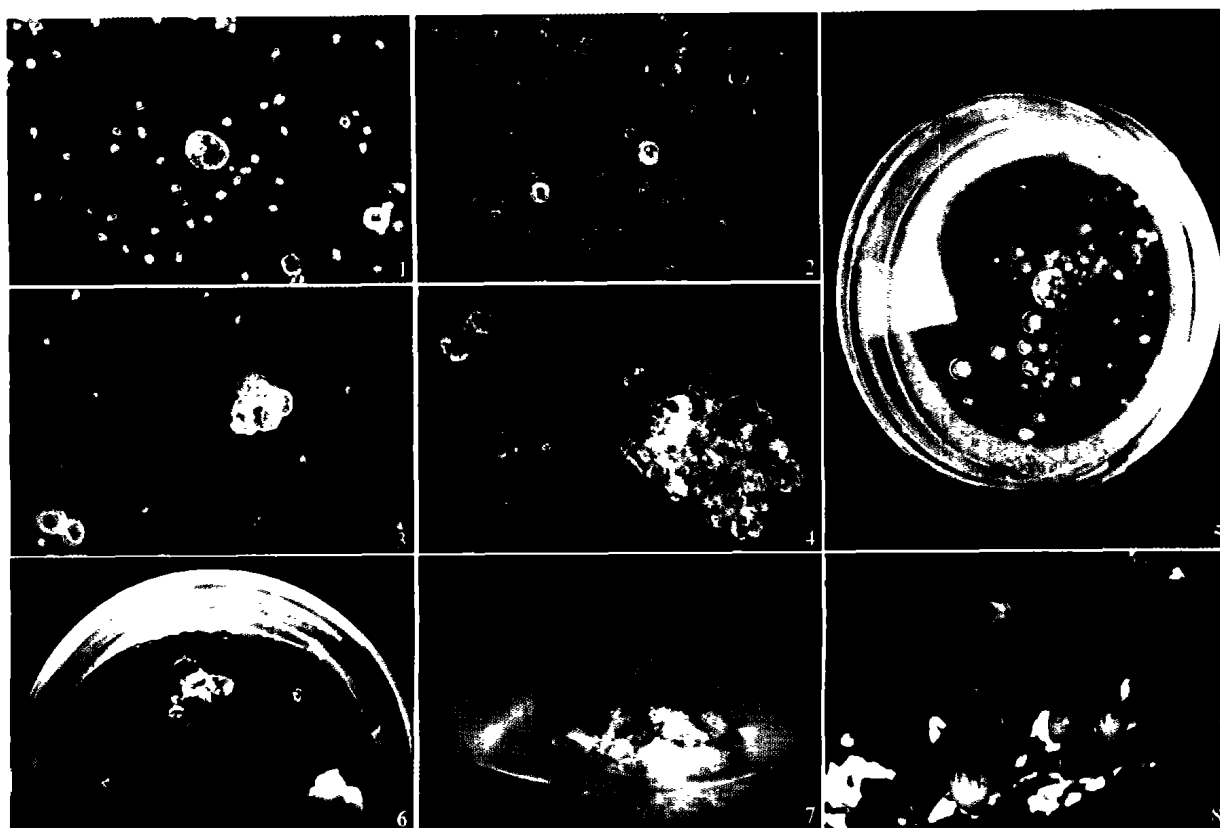
表 1 游离小孢子培养再生植株倍性检测

Table 1 Confirmation of the diploid status of the regenerated plantlets by isolated microspores culture

试材 Materials	再生植株数 Plantlets	双单倍体株数 Dihaploids (DH)	四倍体株数 Tetraploids	DH %
DSa-110	7	6	1	85
DSa-122	41	40	1	97.6
DSa-2	6	5	1	83.3

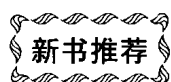
## 参考文献:

- 1 Sihachakr D, Daunay M C, Serraf I, et al. Somatic hybridization of eggplant (*Solanum melongena* L.) with its close and wild relatives. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. 1994, 27: 255 ~ 278
- 2 连 勇, 刘富中, 冯东昕, 等. 应用原生质体融合技术获得茄子种间体细胞杂种. *园艺学报*, 2004, 31 (1): 39 ~ 42
- 3 Rizza F, Mennella G, et al. Androgenic dihaploid from somatic hybrids between *Solanum melongena* and *S. aethiopicum* group gilo as a source of resistance to *Fusarium oxysprum* f. sp. *melongenae*. *Plant Cell Reports*, 2002, 20: 1022 ~ 1032
- 4 顾淑荣. 茄子花粉粒离体培养获得植株. *植物学报*, 1979, 21 (1): 30 ~ 35
- 5 Miyoshi Kazumitsu. Callus induction and plantlet formation through culture of isolated microspores of eggplant. *Plant Cell Reports*, 1996, 15: 391 ~ 395



图版说明: 1. 36℃高温 6 d 预处理后部分小孢子开始膨大; 2. 膨大小孢子内部开始分裂; 3. 小孢子壁破裂后形成愈伤组织颗粒; 4. 小孢子愈伤团; 5. 再生培养基上的愈伤组织; 6. 再生的不定芽; 7. 再生植株; 8. 田间生长的 DH 植株。

**Explanation of plates:** 1. Some microspores begin to enlarge after 6 days and 36℃ high temperature treatment; 2. Division in enlarged microspores; 3. The calli formation of microspores; 4. The clump of callus; 5. The callus in medium for regenerated plantlet; 6. Regenerated adventitious buds; 7. Regenerated plantlet; 8. DH plantlet in field.



## 新书推荐

## 《分子克隆实验指南》(第三版)

作者对图书内容进行了全面升级, 修订了试验的每条方案, 增加了大量新的材料, 拓宽了所涉及试验的领域。前面的章节描述了一些基本的技术, 后面的几章是关于 cDNA 克隆和外显子截留、核酸探针的使用、突变和 DNA 测序的介绍。最后的章节主要解决筛选表达文库、克隆基因在原核和真核细胞的表达、转录物和蛋白质分析、探测蛋白质与蛋白质的相互作用, 附录中包含了试剂、载体、培养基、技术支持等基本信息。定价: 187 元 (上、下册, 含邮资)。

购书者请汇款至北京中关村南大街 12 号中国农科院蔬菜花卉所《园艺学报》编辑部, 邮编 100081。