

·研究报告·

茄子小孢子热激效应和发育潜能的细胞学分析

李 华¹, 孙振英^{1,2}, 连 勇¹, 徐 涵^{1,2,3}

(1. 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081; 2 国家马铃薯工程技术研究中心, 山东 乐陵 253619;
3. 法国图卢兹综合科学研究所 IRIT-ARL, 图卢兹 31300)

摘要: 高温热激处理茄子小孢子是改变其离体发育方向的主要途径,但是热激后小孢子培养的成功率很低。本试验对热激处理 0、2、4、6、8 d 的小孢子进行离体培养和细胞学研究。结果表明,培养中膨大的小孢子活力最高,不膨大的小孢子逐渐死亡。热激 6 d 的小孢子群体的膨大率最高、活力最高。诱导小孢子离体形态发生有必要游离纯化膨大的小孢子,去除衰败小孢子的负面影响。

关键词: 茄子; 热激; 活力; 膨大率; 离体形态发生

中图分类号: S 641. 1 文献标志码: A 文章编号: 1001-4705(2008)10-0001-05

Cytological Analysis of Heat Shock Effects and Developmental Capacity of in Vitro Cultured Microspore in Eggplant (*Solanum melongina* L.)

LI Hua¹, SUN Zhen-ying^{1,2}, LIAN Yong¹, XU XuHan^{1,2,3}

(1. Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China;
2. Chinese National Engineering Research Center for Potatoes, Shandong, Leling 253619, China;
3. Institut de la Recherche Interdisciplinaire de Toulouse, Toulouse 31300, France)

Abstract: Heat shock pretreatment is a main way to change the development pathway for microspore in eggplant. The enlarged microspore showed high FDA stain levels, among which the highest signal level was found in the 6 d-HS population, whereas the unenlarged microspore population showed lower FDA stain levels and underwent degeneration in the further culture steps. It is suggested that to obtain high-level microspore morphogenesis, the enlarged microspore population should be isolated from the small ones for further in vitro culture.

Key words: eggplant; heat; shock; survival ratio; enlargement ratio; in vitro morphogenesis

小孢子培养已成为国内外生物技术领域中最活跃的研究课题之一。随着科学技术的发展,其应用范围日趋广泛,尤其在作物育种方面加快了育种进程^[1,2]。目前大多数小孢子培养成功的例子中,只有在小孢子培养前经过各种预处理(如低温、热激、饥饿等)才能启动小孢子脱分化并进而发育成植株。茄子小孢子培养也不例外,茄子小孢子培养的预处理主要集中在培养前的花蕾、花药预处理或游离小孢子培养的前期阶段。高温热激预处理是促进细胞对称分裂,改变小孢子发育方向的主要途径^[3]。Miyoshi等^[4]关于茄子游离小孢子培养的研究结果表明,热激处理对小孢子愈

伤组织的诱导是先决条件,热激处理对于雄核发育的启动有较好的效果。这在烟草^[5,6]与芸薹属^[7]小孢子培养中也得到了证实。董艳荣^[8]认为,小孢子经过热激等处理后,从形态上改变了极性分布,从生理生化上改变了细胞的生理状态,因而导致其分裂方式和发育途径发生改变,导致小孢子偏离配子体发育方向。连勇等^[9]研究结果表明,经 36 h 高温热激处理后形成胞质致密膨大的小孢子才能进一步分化、分裂成愈伤组织颗粒。

茄子小孢子离体形态发生一直是农业单倍体育种的难题^[10],克服形态发生困难的方法除了热激处理之外,还有改善后期培养条件和筛选高发育潜能群体等方法。最近黄先群等^[11]发现,油菜高发育潜能群体与热激后小孢子的膨大有正相关。

本试验重点研究热激预处理阶段小孢子的活力、膨大率以及小孢子的离体发育潜能,为进一步优化茄子离体小孢子形态发生提供优化试验条件。

收稿日期: 2008 - 05 - 26

基金项目: 国家自然科学基金项目(30571272); 国家高技术研究发展计划(2006 AA 1081 A 6); 农业部蔬菜遗传与生理重点开放实验室资助。

作者简介: 李 华(1981 -),女,硕士研究生,主要从事茄子单倍体育种工作。

通讯作者: 连 勇, E-mail: lianyong@mail.caas.net.cn.

1 材料与方法

1.1 试验材料

茄子二倍体栽培种材料 Z1 (圆杂 2 号)、Z3 (绿抗 F₁)、Z5 (欧长箭)。

试验材料由中国农业科学院蔬菜花卉研究所茄子组提供,种植于廊坊试验基地。

1.2 试验方法

1.2.1 茄子小孢子发育时期的鉴定

A. 取材

摘取发育正常,无表面损伤、花萼包裹紧密的花蕾。花蕾采集的标准:花蕾萼裂基部与花冠长之差为 0~2 mm 的花蕾。

B. 显微观察

取待检花蕾 1 个花药,游离于 70% 的酒精中固定 15 min,离心,倒掉酒精,加入 1 μg/ml DNA 特异荧光染料二盐酸-4,6-脒基-2-苯基吲哚 (异硫酸荧光素,4,6-danidino-2-phenylindole dihydrochloride-DAPI) 水溶液染色。取 1 滴小孢子溶液,滴到载玻片上,盖上盖玻片,然后放到 Axivert 40 CFL 倒置荧光显微镜下观察,鉴定小孢子的发育时期,选取小孢子处于单核靠边期 (图版, a) 的花药进行预培养。

1.2.2 小孢子的细胞学观测

A. 材料的处理

选取小孢子发育处于单核靠边期的花蕾,加入洗涤剂用自来水冲洗干净,再用 75% 的酒精表面消毒 0.5~1 min,然后用 6.5% 的次氯酸钠溶液消毒 15 min,最后用无菌水漂洗 3 次,每次 5 min。在超净工作台中用无菌的镊子从消毒灭菌后的花蕾中剥出花药,接种到含有预处理培养基的培养皿中。每皿接种 2 个花蕾的花药。放入 36 (高温热激) 的培养箱中,进行预处理。

预处理培养基: MS + 2, 4-D 0.2 mg/L + KT 1.0 mg/L + 7 g/L 琼脂 + 3% 蔗糖, pH 5.8, 121 高压灭菌 15 min。

液体 KM 培养基: KM + 2, 4-D 0.2 mg/L + 6-BA 1.0 mg/L + KT 1.0 mg/L, pH 5.8, 过滤灭菌。

固体培养基: MS + 6-BA 2 mg/L + 7 g/L 琼脂 + 2% 蔗糖, pH 5.8, 121 高压灭菌 15 min。

B. 小孢子活力的测定

荧光素二乙酸酯 (fluorescein diacetate, FDA) 溶液的配制: 取 0.05 g FDA 放入 10 ml 离心管中, 加入 10 ml 丙酮, 配制成 0.5% 的 FDA 溶液, 取 200 μl 0.5% 的 FDA 溶液加入 100 ml 液体 MS 培养基得到 0.01% (100 μg/ml) 的 FDA 染液。置于 -4 的冰箱中保存

备用。

活力 = FDA 正染色的小孢子数量 / 视野中所有小孢子的数量 (包括有活力的和无活力的) × 100%。

将热激预处理的花药在处理 0、2、4、6、8 d 后在超净工作台中取出 1 枚花药, 放在载玻片上, 加 1 滴 FDA 染液, 用小刀轻压花药挤出花粉, 加盖玻片, 染色 5 min, 然后放到 Axivert 40 CFL 倒置荧光显微镜下观察。试验重复 3 次, 每次选取 10 个视野, 计算小孢子活力。同时也观察记录小孢子中膨大的小孢子的数量及不膨大的小孢子的数量。萎缩的小孢子只要形态上仍可鉴别出是小孢子则计数, 如果已经解体变成沉淀物而无法鉴别和计数则不予统计。

把镜检中 FDA 亮绿色反应的小孢子记为有活力的小孢子, 把没有或发出微弱绿色荧光的小孢子规定为无活力的小孢子。

C. 小孢子大小和膨大率的测定

将经过热激预处理的花药在处理 0、2、4、6、8 d 后在超净工作台中取出 1 枚花药, 放在载玻片上, 在测定小孢子活力的同时, 在荧光显微镜下用测微尺 (1 小格 = 2.5 μm) 测定有活力小孢子及无活力小孢子的直径。选取 3 个视野, 每个视野各测 10 个小孢子, 重复 3 次。

膨大率 = 膨大小孢子的数量 / 视野中所有小孢子的数量 (包括膨大的和干瘪的) × 100%。

D. 离体培养阶段小孢子的细胞学观察

将在黑暗条件下热激 (36) 处理 6 d 膨大、无污染的花药, 在超净工作台中, 用解剖刀将花药切成两段, 然后轻轻挤压花药, 将小孢子游离于 MS 洗涤培养基 (MS 大量元素、微量元素、铁盐、有机物、3% 蔗糖、pH 5.8~6.0, 121 灭菌 15 min) 中。经 200 目尼龙网膜过滤到 10 ml 离心管中, 滤液在 800 r/min 的速度下离心 5 min, 沉淀小孢子, 弃去上清液。再加入 MS 洗涤培养基, 悬浮离心沉淀物, 再离心。如此重复 3 次。最后倒出上清液, 向离心管中加入 KM 液体培养基悬浮小孢子, 然后分装到直径为 60 mm 的培养皿中 (每皿约 2 个花蕾的花药), 每皿 5 ml 培养基, 用 Parafilm 封口, 25 黑暗条件下培养。

分别在培养的 4、20、30 d 时于显微镜下观察小孢子的离体形态发生情况, 记录小孢子的膨大率、死亡率以及小孢子的形态发生情况。观察方法同上。

2 结果与分析

2.1 热激时间对小孢子活力及膨大率的影响

不同品种的小孢子对温度预处理的敏感性略有差异, 但反应趋势基本一致。热激前 (0 d), 在检测的

Z1、Z3、Z5三个品种的小孢子中都检测出 FDA 正染色,发出强烈的绿色荧光,在3个品种中都超过总数的85%以上。36 热激 2 d时,检测出的小孢子的活力最低。热激处理 4 d和处理 6 d时,小孢子的活力和膨大率有所提高,其中以热激 6 d时的小孢子活力及膨大率最大。之后,热激 8 d时,小孢子的活力及膨大率又下降(图 1)。

在试验中发现,未热激过的小孢子没有膨大。活力并不到 100%。小孢子虽然形态上没有区别,但 25%的小孢子 FDA 染色变暗或没有荧光信号。说明体发育的小孢子已经在生理水平上出现了衰亡和成活的二型性。

热激 2 d后,一般只有膨大的小孢子才能检测出 FDA 正染色。热激 6 d后膨大的小孢子也出现负染色,说明膨大的小孢子也出现了生理水平上的衰亡和成活的二型性。

值得注意的是,小孢子活力和膨大率的数值与小孢子观察统计的方法有关。由于最早衰败的小孢子在热激最初仍然可以计数,因此热激 2 d的小孢子活力和膨大率相对低;当最早衰败的小孢子在热激培养一定时间后变得枯瘪难辨,不可以计数时,小孢子活力和膨大率则相对较高,直到热激 8 d又一次在膨大的小孢子群体中出现衰亡和成活的二型性分化。

活力检测和膨大率观察结果表明,在 36 热激处理 6 d时小孢子的膨大率以及小孢子的活力达到最大,花药热激预处理 6 d时,是茄子小孢子离体培养的最佳时间。因此,在以后的实验中均用热激处理 6 d的小孢子作为材料。

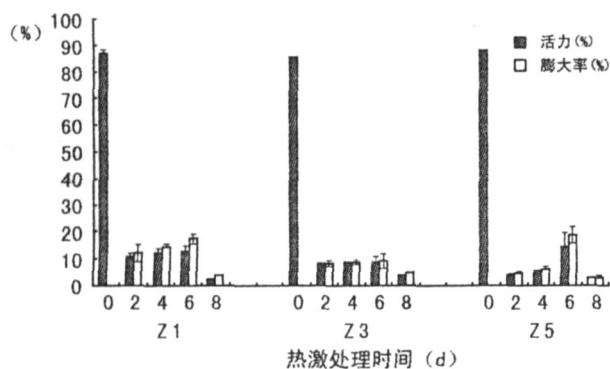


图 1 热激处理时间与小孢子的活力及膨大率的相关性

2.2 不同热激时间对小孢子发育的影响

在荧光显微镜下观察热激后的小孢子,有活力的小孢子具有大的直径、丰富的细胞质和近圆形的外形,而逐渐衰败中的小孢子,直径明显小于有活力小孢子的直径,缺乏细胞质,外壁皱缩(图版 -b)。虽然不同

品种间存在一定的差异,但总的变化趋势相差不大。未经处理时 Z1、Z3、Z5三个品种有活力小孢子的直径分别为 32.59 μm 、32.11 μm 、33.12 μm ,而没有活力的小孢子的直径分别为 24.43 μm 、24.52 μm 、21.87 μm (图 2~4)。

通过显微观察,在热激处理中出现两种不同类型的小孢子。第一种小孢子直径随着培养天数的变化而逐渐增大,6 d时达到最大值;第二种小孢子直径在处理最初的 2 d下降,在以后的处理中变化不大。FDA 染色观察显示,膨大的小孢子在培养初期多数为有活力的小孢子;不膨大的小孢子在培养初期的活力就低,后期逐渐死亡并解体。

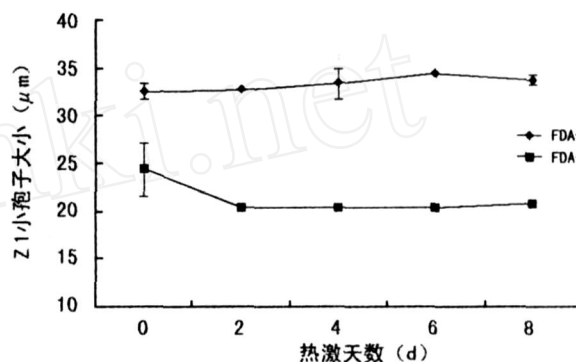


图 2 热激过程中 Z1 小孢子的发育

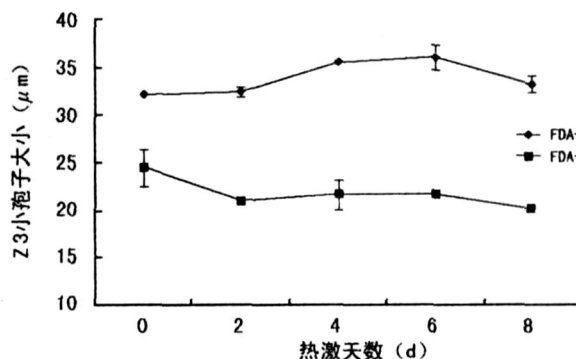


图 3 热激过程中 Z3 小孢子的发育

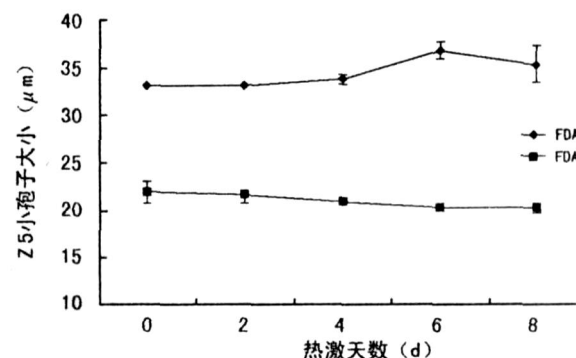


图 4 热激过程中 Z5 小孢子的发育

2.3 离体培养阶段小孢子的细胞学观察

热激处理 6 d 后, 游离 Z1、Z3、Z5 三个品种的小孢子, 在液体 KM 培养基中暗培养。每周对培养的小孢子进行细胞学镜检。结果表明, 小孢子出现明显的二型性分化, 一部分膨大, 绝大多数小孢子不膨大 (图版 -b)。FDA 染色反应表明, 只有热激后膨大的小孢子存在正染色反应, 表明其是有活力的。在膨大的小孢子中, 有些能在培养 20 d 后进行细胞分裂 (见表 1; 图版 -d)。未膨大的小孢子干瘪, 死亡, 没有发现有细胞分裂。

许多膨大的小孢子随着持续培养停止发育并败育。小部分膨大的小孢子在培养 30 d 后产生多细胞团 (图版 -e), 并在转入固体培养基后形成愈伤组织团 (图版 -f)。产生的愈伤组织继而转到固体培养基上进行培养诱导不定芽和再生植株的生成 (图版 -g)。

表 1 热激 6 d 的小孢子在游离培养 20 d 后的细胞学特性

品种	观察小孢子总数	膨大小孢子 (%)	膨大小孢子分裂 (%) [*]	未膨大小孢子分裂 (%)
Z1	943	2.3	22.7	0
Z3	977	2.5	25.0	0
Z5	851	3.6	29.0	0
平均		2.8	25.6	0

注: * 膨大小孢子分裂百分数 = 膨大小孢子分裂数 / 膨大小孢子数 × 100%。

3 讨 论

在小孢子培养中, 一段时间的高温预处理对于小孢子脱分化能力的提高十分有效, 这已在前人的研究中得到证实。北京市农林科学院蔬菜研究中心^[7]在大白菜小孢子培养中给予 24 h 的热激预处理对小孢子胚胎发生具有诱导作用。陈文辉等^[12]的甘蓝和青花菜杂种小孢子培养试验表明, 以 34℃ 热激处理 48 h 产生小孢子胚胎的量最多。本试验的研究结果表明, 36℃ 热激处理 6 d, 小孢子的活力和膨大率最高, 说明了热激处理 6 d 是茄子小孢子游离培养的最佳时间。

本试验揭示了小孢子二型性的 2 次启动时间: 一次是在花药内自然发育的小孢子, 一次是热激 6 d 后膨大的小孢子。同时, 本实验还证明了二型性与活力的相关性和与发育能力的相关性。本试验首先在热激处理前的小孢子的直径和活力检测中发现小孢子生理上出现活力差异而形态仍保持同一, 但一经热激处理 2 d, 就出现了形态的二型性分化。其次, 在热激处理后的小孢子的直径和活力检测中发现小孢子出现诱导性二型性现象, 即一部分小孢子膨大, 另一部分小孢子不膨大。在热激处理 6 d 时出现了膨大小孢子的膨大

率和活力的增大变幅, 并在热激处理 8 d 时出现明显的二型性分化。这种诱导性二型性在后期的发育中表现出与发育的明显联系: 膨大的小孢子有的可以进行细胞分裂, 而不膨大的小孢子完全停止发育。通过 FDA 染色分析证明, 小孢子二型性与活力相关: 凡是不膨大的小孢子在培养稍后期都表现为 FDA 负染色。在大麦^[13]、玉米^[14]小孢子原位发育过程中曾发现二态性现象。本试验小孢子活力镜检结果表明了从小孢子最初培养的单核靠边期开始二型性现象虽然不明显, 但其细胞生理学的差别就已经存在, 表现为 FDA 染色反应的强弱程度。这可能是小孢子在后期离体发育中出现二型性的基础。黄先群等^[11]对甘蓝型油菜游离小孢子胚胎发生的研究表明, 热激培养 2 d 后小孢子的膨大率是衡量小孢子胚胎能否发生的一个有效指标。本试验以温度处理后小孢子膨大作为小孢子脱分化发生的启动标志, 得到相似的结果。

在油菜中黄先群等^[11]发现的, 和在本实验的茄子中发现的膨大率和活力作为小孢子诱导离体形态发生潜能的早期指标, 对单倍体育种生物技术发展具有重要指导作用。由于死亡的小孢子可能释放不利于细胞生长的物质, 对小孢子造成毒害, 从而降低小孢子的离体形态发生率。为得到理想的试验结果, 需要对有高的离体形态发生潜能的小孢子进行纯化, 然后重新设置其细胞密度等培养条件。本试验提供的小孢子二型性特征可以作为通过滤网或梯度离心纯化小孢子的依据。我们的初步实验表明, 通过小孢子纯化, 去除未膨大的衰败小孢子, 可以提高小孢子的离体形态发生率。

参考文献:

- [1] Xu Han X, Jing H-C, Cheng X-F, Iwanowska A., Kieft H, Bergervoet JHW, Groot SPC, Bino RJ, van Lammeren AAM. Polyploidization in embryogenic microspore cultures of *B. rassaica napus* L. cv Topas enables the generation of doubled haploid clones by somatic embryogenesis. *Protoplasma*, 1999, 208: 240 - 247.
- [2] 孙振英. 植物激素对茄子小孢子愈伤组织再生的影响 [J]. 农业生物技术学报, 2007, 15 (增刊): 157 - 159.
- [3] 刘公社, 李岩. 高温对大白菜小孢子培养的影响 [J]. 植物学报, 1995, 37 (2): 140 - 146.
- [4] Miyoshi, K. Callus induction and plantlet formation through culture of isolated microspores of eggplant (*Solanum melongena* L.). *Plant Cell Rep*, 1996, 15 (6): 391 - 395.
- [5] Kyo, M., Harada, H. Control of the developmental pathway of tobacco pollen in vitro. *Planta*, 1986, 168 (4): 427 - 432.
- [6] Kyo, M., Harada, H. Studies on conditions for cell division

and embryogenesis in isolated pollen culture of *Nicotiana glauca*. *Plant Physiol*, 1985, 79 (1): 90 - 94.

[7] 北京市农林科学院蔬菜研究中心. 芸薹属蔬菜作物游离小孢子培养技术及其育种应用研究 [J]. *植物学报*, 1975, 17 (4): 323 - 324.

[8] 董艳荣, 龚义勤. 茄果类蔬菜花药和花粉培养研究进展 [J]. *长江蔬菜*, 2001 (5): 30 - 32.

[9] 连勇, 刘富中, 陈钰辉, 等. 茄子体细胞杂种游离小孢子培养获得再生植株 [J]. *园艺学报*, 2004, 31 (2): 233 - 235.

[10] 佟曦然, 顾淑荣, 朱至清, 等. 茄子游离小孢子培养中小孢

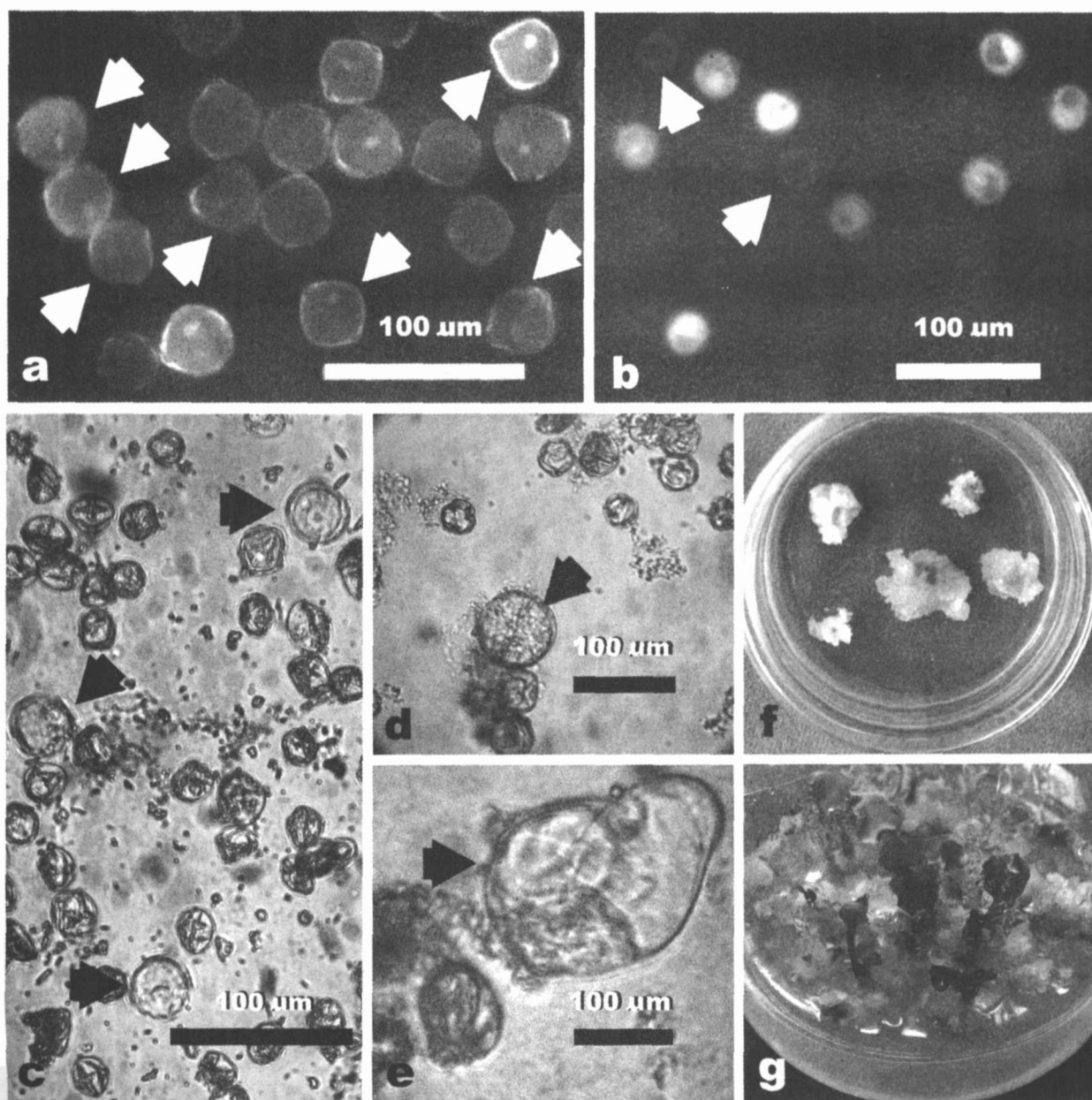
子发育的细胞学观察 [J]. *农业生物技术学报*, 2007, 15 (5): 861 - 866.

[11] 黄先群, 毛堂芬, 李丽, 等. 浅析几个因子对甘蓝型油菜游离小孢子胚胎发生的影响 [J]. *种子*, 2008, 27 (2): 33 - 39.

[12] 陈文辉, 方淑桂, 曾小玲, 等. 甘蓝和青花菜杂种小孢子培养 [J]. *热带亚热带植物学报*, 2006, 14 (4): 321 - 326.

[13] 汪志武, 巩东营. 大麦小孢子原位发育过程中二型性现象的研究 [J]. *山东农业科学*, 2002 (5): 7 - 9.

[14] Chang, M. T., Neuffer, M. G. *Maize microsporogenesis* Genome (Ottawa Print), 1989, 32 (2): 232 - 244.



图版说明: a DAPI 镜检。示单核靠边期的小孢子 (箭头); b FDA 染色后的小孢子活力鉴定。少量小孢子失去活性 (箭头); c 热激处理 6 d 部分小孢子膨大 (箭头); d 热激处理 6 d 的小孢子游离培养 20 d, 小部分膨大的小孢子开始分裂 (箭头); e 热激处理 6 d 的小孢子游离培养 30 d 后, 分裂的小孢子继而形成多细胞结构; f 小孢子游离培养形成的多细胞结构在固体培养基上培养 40 d 后形成的愈伤组织; g 游离小孢子培养所产生的愈伤组织进一步诱导生成的试管苗。