



研究报告 Article Report

茄子花药培养技术研究

乔燕春[✉], 曹翠文[✉], 林鉴荣[✉], 李光光[✉]

广州市农业科学研究院, 广州, 510308

✉ 通讯作者: qyc19790128@163.com; ✉ 作者

分子植物育种, 2013 年, 第 11 卷, 第 19 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2013.11.0019

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放取阅论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式(中文):

乔燕春等, 2013, 茄子花药培养技术研究, 分子植物育种(online), 11(19): 1131-1136 (doi: 10.5376/mpb.cn.2013.11.0019)

引用格式(英文):

Guo et al., 2013, Anther Culture Research on Eggplant, Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding), 11(19): 1131-1136 (doi: 10.5376/mpb.cn.2013.11.0019)

摘要 以茄子未成熟的花药为外植体进行组织培养技术研究。结果表明: 适于进行茄子花药培养的形态特征为: 花药颜色淡花色, 未展开的花瓣高于萼洼处 2-3 mm, 该时期多数处于单核靠边期; 茄子花药培养愈伤组织的最适培养基为: MS+1 mg/L KT+0.5 mg/L 2,4-D+0.25 mg/L TDZ+8 mg/L Vc+3%糖+6g/L 琼脂+8%椰乳, 最佳分化培养基为 MS+2 mg/L 6-BA+0.01 mg/L NAA+0.01 μg/L BR+8 mg/L Vc+2% 糖+6 g/L 琼脂+6%椰乳, 最佳生根培养基为(1/2-1/4) MS+0.1 mg/L IBA+3%糖+5 g/L 活性炭+6 g/L 琼脂, 最终发育成完整的植株。

关键词 茄子; 花药培养; 组织培养

Anther Culture Research on Eggplant

Qiao Yanchun[✉], Cao Cuiwen[✉], Lin Jianrong[✉], Li Guangguang[✉]

Guangzhou Academy of Agricultural sciences, Guangzhou, 510308, P.R. China

✉ Corresponding author, qyc19790128@163.com; ✉ Authors

Abstract The eggplant anther was used as the explants for tissue culture and haploid breeding in this study. The results indicated that the best anther in characteristics for explant processing was that the immature anther in color shall be a light tan, The results also indicated that the best period was mononuclear phase along its ledge, its unexpanded petals was 2-3 mm higher the hollow of calyx. the best inducing medium for callus induction in eggplant anther culture was MS medium with 1.0 mg/L KT, 0.5 mg/L 2,4-D, 0.25 mg/L TDZ, 8 mg/L Vc, 30 g/L sugar, 6 g/L agar, 8% coconut milk (pH 5.8). The best medium for bud differentiation was MS medium with 2.0 mg/L 6 BA, 0.01 mg/L NAA, 0.01 μg/L BR, 20 g/L sugar, 6 g/L agar, 6% coconut milk (pH 5.8). The best medium for root differentiation was MS medium with 0.2 mg/L IBA 20 g/L sugar, 5 g/L active charcoal, 6 g/L agar (pH 5.8). After acclimatization, it was developed the integrated plants.

Keywords Eggplant; Anther culture; Tissue culture

研究背景

茄子是华南地区重要的蔬菜作物之一。多以长茄类型为主, 长茄的颜色也分为紫茄、白茄、青茄、花茄等, 为了不断提高华南型茄子的育种水平, 加快茄子的育种步伐, 丰富茄子资源的多样性, 单倍体育种是实现茄子快速提纯和丰富资源的重要育种手段。

茄子(*Solanum melongena* L.)是茄科(Solanaceae)茄属一年生草本植物。起源于东南亚、印度地区, 古印度为最早驯化地。中国栽培茄子历史悠久, 栽培品种类型繁多, 一般认为中国是茄子第二起源地。自从1969年Yamada等通过合子胚诱导产生愈伤组织和增殖并获得再生植株以后, 茄子各器官几乎都有组织培养及植株再生的报道, 这些外植体包括叶、茎、叶柄、子叶、根、下胚轴、花药等, 但不同外植体、不同基因型的愈伤组织的再生频率、再生途径有很大差异。花粉培养诱导形成单倍体植株对选育有利品种具有重要意义。Miyoshi (1996)以茄

收稿日期: 2013 年 04 月 27 日

接受日期: 2013 年 04 月 29 日

发表日期: 2013 年 06 月 18 日

基金项目: 本研究由广州市科信局应用基础项目(2010Y1-C831)资助



子为试材利用小孢子培养技术获得再生植株,刘独臣等(2008)以茄子为试材进行花药培养,成功建立了茄子花药培养胚状体诱导成苗的技术体系;连勇等(2004)利用直接游离小孢子培养的方法经愈伤组织得到四倍体杂种植株小孢子的再生植株;赵福宽等(2001)用低温胁迫处理进行花药培养诱导花药形成耐冷性愈伤组织,其分化出的再生植株低温伤害率明显低于原品种,为抗寒茄子材料的筛选奠定了基础。程继鸿等(2001)在花药培养接种后,用1 000 Lx弱光胁迫培养不等天数,获得了大量茄子耐弱光的细胞变异系,为茄子耐弱光遗传资源的筛选奠定了一定的基础。

茄子组织培养和花药培养技术已经取得了长足的发展,但受不同基因型材料和环境条件的影响,我们在进行茄子的组织培养过程中,将前人的研究结果应用到本研究材料,很难获得理想的结果,甚至组织不发育。为此本研究针对供试材料进行了合理的设计,最终目标是筛选适合本实验材料基因型的培养基,建立茄子花药培养技术体系。

1 结果与分析

1.1 花粉萌发活力研究

本研究利用花粉萌发测定法对供试材料进行花粉活力的测定,以进一步确定材料的生长环境是否是花粉活力较为活跃的时期。花粉材料选在晴天的上午10点采集,选用0.5%琼脂+10%蔗糖+0.03%硼酸+0.05% $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 和0.5%琼脂+10%蔗糖+1%硼酸两种花粉萌发的培养基,通过多次重复实验,在茄子花粉萌发的培养基中,加入 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 抑制了花粉的萌发,在不加 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 的培养基中花粉正常萌发,花粉萌发0.5 h, 2 h, 4 h, 8 h花粉萌发的情况(图1; 表1),经试验结果可知,具有高萌发活力的花粉,才能在花药培养中其小孢子具有较高的活力,进入愈伤组织状态的花药比例较多,说明该时期的花药适合进行花药培养。

1.2 花药培养技术研究

本研究对供试的十份材料进行花药培养技术研究。结果显示,茄子对温度较为敏感,低于20℃和高于32℃的温度都不适合茄子的花粉萌发,花萼较萼洼高1~2 mm (未展开的花蕾)多数茄子的花粉粒处于单核靠边期,适于进行花药培养。进一步确定了愈伤组织诱导培养基: MS+1mg/LKT+0.5 mg/L

2,4-D+0.25 mg/L TDZ+8 mg/L Vc+3%糖+ 6 g/L琼脂+8%椰乳,初始分化培养基为MS+2 mg/L 6-BA+0.01 mg/L NAA+0.005 $\mu\text{g/L}$ BR+8 mg/L Vc+2%糖+6 g/L琼脂+6%椰乳。生根培养基为1/4MS+0.1 mg/L IBA+2%糖+6 g/L琼脂。在本实验确定的花药培养的培养基中(图2),成株数和成苗数比较低,关键是芽分化的质量较差,成苗率很低,达不到生产的要求。

为了进一步提高芽分化的质量,提高成苗率。本实验进一步对芽分化的培养基和不同基因型的材料进行了研究。由于工作量大,本实验仅对四种不同基因型的茄子材料进行芽分化培养基的筛选。并利用筛选的较好的培养基作为10份材料的固定培养基。本实验设了17个梯度,供试材料(表2)为紫荣6号、S47A、绿霸、长丰2号,经过芽分化情况比较。8号培养基在四种不同基因型材料中分化相对较理想;1号培养基生长缓慢,且组织瘦弱;2-5号培养基分化能力较弱,多数组织存在褐化的现象;6-11号培养基中加入BR之后,分化能力明显得到改善,但BR是一种非常敏感的激素。和6-BA共同作用,8号培养基较其他组合的培养基褐化较少,组织发育相对较好。12-17号培养基中引入TDZ之后,有助于不定芽的萌发。尤以14号培养基组合较为理想,但使用14号培养基后,在根分化过程中,茎不延长,根分化较难,必须在芽分化过程中在茎延长培养基中过渡,才能发育出根,进一步发育出完整的植株。所以本实验确定的最适合的芽分化培养基为8号培养基即MS+0.1 mg/LNAA+2 mg/L 6-BA+0.01 $\mu\text{g/L}$ BR (表2)+ 2%糖+6 g/L琼脂+ 6%椰乳。

表1 茄子花粉的萌发情况

Table 1 Eggplant pollen germination

编号 No.	材料 Material	时间(h) Time (h)	花粉的萌发率(%) Pollen germination rate (%)
1	紫荣6号 zirongNO.6	0.5	3
		2	85
		4	88
		8	89
2	S47A	0.5	4
		2	87
		4	88
		8	88
3	绿霸 Lvba	0.5	5
		2	86
		4	87
		8	89
4	紫荣7号 zirong NO.7	0.5	3
		2	87
		4	88
		8	90

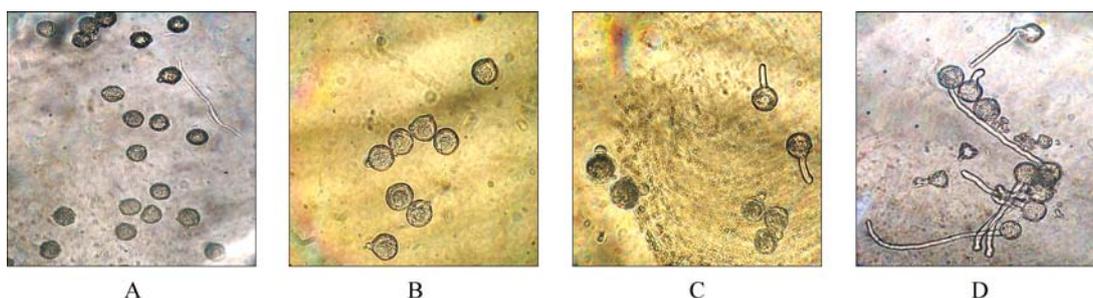


图1 茄子花粉萌发活力的形态特征

注: A,B,C,D: 0.5 h, 2 h, 4 h, 8 h

Figure 1 Eggplant pollen germination dynamic morphological characteristics

Note: A,B,C,D: 0.5 h, 2 h, 4 h, 8 h, respectively

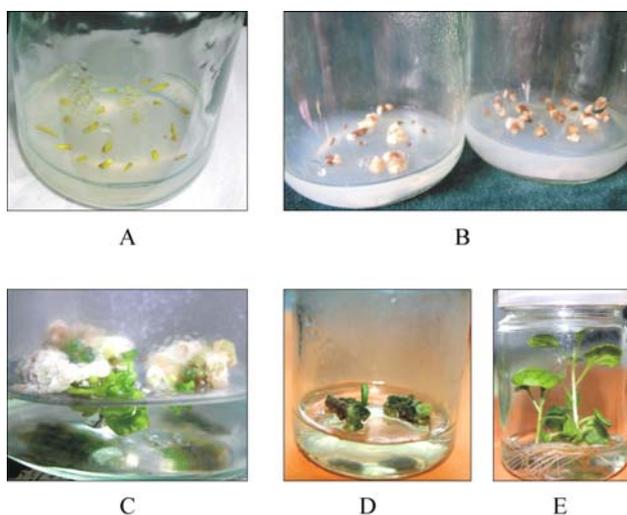


图2 茄子花药培养获得再生植株的情况

注: A,B,C,D,E分别代表花药培养形态、愈伤发育、芽分化、芽发育及再生植株的情况

Figure 2 Eggplant anther culture for regeneration plant

Note: A,B,C,D,E is respectively form of anther culture, callus development, bud differentiation, bud growth and plant regeneration

1.3茄子茎伸长培养技术研究

在茄子的芽分化培养过程中，引入TDZ激素之后，常常芽分化过程中没有茎的延长，将其放到生根培养基中也没有根的分化。本研究在普通的芽分化培养基中加入GA₃，浓度为1-2 mg/L，浓度1 mg/L茎的延长结果就很明显，有效的改善了芽分化的质量和地上部分的发育情况，将分化完善的芽放入生根培养基中，发育出较多的根，并长成完整的植株。

1.4茄子根分化培养基研究

茄子的根分化培养基以1/4MS和~1/2MS培养基均可以发育出根，尤以1/4MS发育的根较理想，

培养基中添加0.1 mg/L或0.2 mg/L的IBA，有助于根的分化，0.1 mg/L的IBA即可满足实验的需要。因此确定的生根培养基为1/4MS+0.1 mg/L IBA+2%糖+6 g/L琼脂。

2讨论

在茄子组织培养和快繁体系的建立过程中，培养基中激素的配比和含量至关重要。本研究对目前组织培养中常用的培养基进行了尝试，确定MS培养基是较为适用的基本培养基，并对激素进行了进一步的探讨。主要的激素为6-BA、NAA、2,4-D、KT等，这些激素在植物的培养基中较为常见。本研究中加入了TDZ和BR，并进一步研究了在本实验中发挥的作用。TDZ是组织培养中广泛使用的高效生物调节剂(艾珊珊等, 2012)，它具有生长素和细胞分裂素的双重效果，低浓度的TDZ可促进不定芽或侧芽的形成，但TDZ不利于芽的延长，容易造成再生植株生根障碍，从而影响完整植株的形成，所以使用TDZ时用量不能过高，否则会影响生根的能力。所以本实验中TDZ的浓度0.1 mg/L TDZ较适合茄子不定芽的萌发。BR 是一种活性很高的新型植物激素(韩宣等, 1998, 吉林蔬菜, (5): 1-3)，它在植物体内单一地或者协同其它激素对某些生理过程起作用，BR最早从油菜的花粉中分离提取出来，是植物的受精过程中促进花粉管快速伸长的物质，具有较高的生物活性(金荣和赵东利, 2009)。单独使用BR时，则不及其它生长素效果好，BR在调节植物体内激素平衡和细胞生长方面起着某种特殊作用。由于BR的活性非常强，活力是普通激素的1 000倍，高浓度的BR对组织的发育没有任何效果。适当浓度的BR和其他激素结合(如6-BA, NAA等)可以促进激素



表2 茄子芽分化培养基的筛选

Table 2 The selection of bud differentiation medium in eggplant

编号 No.	芽分化培养基 Bud differentiation medium	材料 Material	编号 No.	芽分化培养基 Bud differentiation medium	材料 Material
1	MS	紫荣6号, S47A, 绿霸, 长丰2号 Zirong NO.6, S47A, Lvba, changfeng NO.2	10	MS+0.1 mg/L NAA+1 mg/L 6-BA+0.02 μg/LBR	紫荣6号, S47A, 绿霸, 长丰2号 Zirong NO.6, S47A, Lvba, changfeng NO.2
2	MS+0.5 mg/L 6-BA	紫荣6号, S47A, 绿霸, 长丰2号 Zirong NO.6, S47A, Lvba, changfeng NO.2	11	MS+0.1 mg/LNAA+2 mg/L 6-BA+0.02 μg/L BR	紫荣6号, S47A, 绿霸, 长丰2号 Zirong NO.6, S47A, Lvba, changfeng NO.2
3	MS+0.1 mg/L NAA+0.5 mg/L 6-BA	紫荣6号, S47A, 绿霸, 长丰2号 Zirong NO.6, S47A, Lvba, changfeng NO.2	12	MS+0.1 mg/L NAA+0.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L TDZ	紫荣6号, S47A, 绿霸, 长丰2号 Zirong NO.6, S47A, Lvba, changfeng NO.2
4	MS+0.1 mg/L NAA+1 mg/L 6-BA	紫荣6号, S47A, 绿霸, 长丰2号 Zirong NO.6, S47A, Lvba, changfeng NO.2	13	MS+0.1 mg/L NAA+1 mg/L 6-BA+0.1 mg/L TDZ	紫荣6号, S47A, 绿霸, 长丰2号 Zirong NO.6, S47A, Lvba, changfeng NO.2
5	MS+0.1 mg/L NAA+2 mg/L 6-BA	紫荣6号, S47A, 绿霸, 长丰2号 Zirong NO.6, S47A, Lvba, changfeng NO.2	14	MS+0.1 mg/L NAA+2 mg/L 6-BA+0.1 mg/L TDZ	紫荣6号, S47A, 绿霸, 长丰2号 Zirong NO.6, S47A, Lvba, changfeng NO.2
6	MS+0.1 mg/L NAA+0.5 mg/L 6-BA+ 0.01 μg/L BR	紫荣6号, S47A, 绿霸, 长丰2号 Zirong NO.6, S47A, Lvba, changfeng NO.2	15	MS+0.1 mg/L NAA+0.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L TDZ	紫荣6号, S47A, 绿霸, 长丰2号 Zirong NO.6, S47A, Lvba, changfeng NO.2
7	MS+0.1mg/L NAA+1 mg/L 6-BA+0.01 μg/LBR	紫荣6号, S47A, 绿霸, 长丰2号 Zirong NO.6, S47A, Lvba, changfeng NO.2	16	MS+0.1 mg/L NAA+1 mg/L 6-BA+0.5 mg/L TDZ	紫荣6号, S47A, 绿霸, 长丰2号 Zirong NO.6, S47A, Lvba, changfeng NO.2
8	MS+0.1 mg/L NAA+2 mg/L 6-BA+0.01 μg/L BR	紫荣6号, S47A, 绿霸, 长丰2号	17	MS+0.1 mg/L NAA+2 mg/L 6-BA+0.5 mg/L TDZ	紫荣6号, S47A, 绿霸, 长丰2号 Zirong NO.6, S47A, Lvba, changfeng NO.2
9	MS+0.1 mg/L NAA+0.5 mg/L 6-BA+0.02 μg/LBR	紫荣6号, S47A, 绿霸, 长丰2号 Zirong NO.6, S47A, Lvba, changfeng NO.2			

的平衡,提高芽分化的能力。本研究进一步研究了提高茎延长的培养基,提高了芽分化的质量和形成完整植株的比例。

本研究在前人研究的基础上,对激素的使用和配比进行了研究,确定了花药培养芽分化的培养基。同时研究发现,我们在选择材料时,用品种作为研究材料。由于目前的品种多为F1代,杂合度较高,使得我们筛选的培养基不能完全适合所有的材料使用,这也是目前关于茄子花药培养的文献较多,但实际应用生产还存在一些问题。可见F1代材料并不是最理想的研究材料,为此我们请教了北京农林科学院蔬菜研究中心的张凤兰研究员,她的经验认为F3代的材料可作为花药培养较理想的材料。这也是我们今后研究进一步需要改进的方向。同时利用花药培养,不可避免的有花药壁等组织的干扰,使得培养的材料很难区分双单倍体和二倍体,今后研究的方向需要从游离小孢子途径多做尝试,提高单倍体育种的利用潜力。

3材料与方法

3.1材料

3.1.1花药培养材料

材料为华南地区主要栽培茄子,主要有紫荣6号、紫荣7号, S47A绿茄、绿霸、黑茄1号、长丰2号、竹料白茄、翡翠绿茄、D006和M3共计10份材料,取花瓣未展开,花瓣高于萼洼处2-3 mm的未成熟的花蕾。

3.1.2培养基

花药培养基:愈伤组织诱导培养基:①MS+1 mg/L KT+0.5 mg/L 2,4-D+0.25 mg/L TDZ+8 mg/L Vc+3%糖+6g/L琼脂+8%椰乳。初始芽分化培养基为MS+2 mg/L 6-BA + 0.01 mg/LNAA +0.005 μg/L BR +8 mg/L Vc+2%糖+6g/L琼脂+6%椰乳。

芽分化诱导培养基的筛选:①MS,②MS+0.5 mg/L 6-BA,③ MS+0.1 mg/L NAA+(0.5 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L) 6-BA,④ MS +(0.5 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L) 6-BA+(0.01 μg/L, 0.02 μg/L) BR+0.01 mg/L NAA,⑤ MS +(0.5 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L) 6-BA+(0.1 mg/L, 0.5 mg/L) TDZ+0.1 mg/L NAA (每个培养基加8 mg/L Vc+2%糖+6 g/L琼脂+6%椰乳)。

茎伸长培养基: MS+0.1 mg/L NAA+(0.5 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L) 6-BA+(0.5 mg/L, 1 mg/L) GA3。

生根培养基: (1/4~1/2)MS+(0.1 mg/L, 0.2 mg/L)IBA。

3.2方法

3.2.1花药培养预处理和消毒方法

试材取自广州市农业科学研究院花都基地,常规田间管理。上午10点取健壮植株上未展开的花蕾,花药基本形态特征为:颜色淡花色,未展开的花瓣高于萼洼处2-3 mm,该时期多数处于单核靠边期,4℃低温处理24 h,70%的乙醇消毒30 s,0.1% HgCl₂处理8 min,无菌水冲洗3次,将花药接种到愈伤组织培养基上进行培养。

3.2.2花粉活力测定

对供试材料处于盛花期的茄子花粉进行花粉活力测定,采用花粉萌发测定法进行花粉生活力观察。(0.5%琼脂+10%蔗糖+0.03%硼酸+0.05% Ca(NO₃)₂·4H₂O和0.5%琼脂+10%蔗糖+1%硼酸)25℃暗培养0.5 h, 2 h, 4 h, 8 h进行显微观察。

3.2.3茄子花药培养

消毒的花药切去花丝,并将花药一切为二接种到愈伤组织培养基上,进行愈伤组织诱导。诱导的愈伤组织培养2-3代后,将愈伤组织剥离成小块接种到芽分化培养基上,进行芽分生组织的诱导,进一步分化芽,转到增殖培养基上进一步分化,分化的芽长到3 cm的单苗时转到根分化培养基,进一步培养成完整的植株。

作者贡献

乔燕春是本研究的方案设计和直接实施者,完成论文初稿,曹翠文和李光光协助本项目的实施和开展,林鉴荣提供研究材料,并参与此课题研究。全体作者阅读并同意最终文本。

致谢

本研究由广州市科信局应用基础项目(2010Y1-C831)资助。在此,感谢中国蔬菜花卉研究所连勇研究员和北京农林科学院蔬菜研究中心张凤兰研究员的帮助。

参考文献

- Ai S.S., Li J.R., Zeng X.F., and Zhao D.G., 2012, Establishment of the tissue culture and regeneration system of guizhou rice landrace, Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding), 10(4): 469-475 (艾珊珊, 李建容, 曾晓芳, 赵德刚, 2012, 贵州地方稻种香禾糯组织培养再生体系建立, 分子植物育种, 10(4): 469-475)
- Cheng J.H., Zhao F.K., Gao X.H., and Li M., 2001, Anther culture under low light stress in eggplant, Beijing



- Nonxueyuan Xuebao (Journal of Beijing Agricultural College), 16(2): 22-26 (程继鸿, 赵福宽, 高遐虹, 李梅, 2001, 弱光条件下茄子花药培养再生体系的建立, 北京农学院学报, 16(2): 22-26)
- Jin R., and Zhao D.L., 2009, Effect of epibrassinolide on callus growth of *sophora flavescens* in tissue culture, Shengwu Jishu Tongbao (Biotechnology Bulletin) (S): 154-155 (金荣, 赵东利, 2009, 表油菜素内酯对苦参愈伤组织生长的影响, 生物技术通报, (S): 154-155)
- Lian Y., Liu F.Z., Chen Y.H., Song Y., Zhang S.L., and Sihachakr D., 2004, Plantlet regeneration by isolated microspore culture of somatic hybrid of eggplant, Yuanyi Xuebao (Acta Horticulturae Sinica), 31(2): 233-235 (连勇, 刘富中, 陈钰辉, 宋燕, 张松林, Sihachakr D., 2004, 茄子体细胞杂种游离小孢子培养获得再生植株, 园艺学报, 31(2): 233-235)
- Liu D.C., Fang C., LI Y.J., Liu X.J., and Liang G.Y., 2008, Studies on the anther culture technology system for eggplant (*Solanum melongena* L.), Xinan Nongye Xuebao (Southwest China Journal of Agricultural Sciences), 21(6): 1643-1646 (刘独臣, 房超, 李跃建, 刘小俊, 梁根云, 2008, 茄子花药培养诱导胚状体成苗, 西南农业学报, 21(6): 1643-1646)
- Miyoshi K., 1996, Callus induction and plantlet formation through culture of isolated microspores of eggplant (*Solanum melongena* L.), Plant Cell Reports, 15(6): 391-395
<http://dx.doi.org/10.1007/BF00232061>
- Zhao F.K., Gao X.H., Cheng J.H., Fan S.X., and Gu J.T., 2001, Anther Culture under Low Temperature Stress and Chilling Tolerance Induction of Eggplant, Zhongguo Shucai (China Vegetables), (3): 7-9 (赵福宽, 高遐虹, 程继鸿, 范双喜, 谷建田, 2001, 茄子花药低温胁迫培养及耐冷性诱导, 中国蔬菜, (3): 7-9)