

植物胚胎培养技术

山东农业大学生命科学学院

- **胚胎培养应用**

- ◆植物育种、胚胎发育、生理代谢、影响胚发育因素等的研究。
- ◆植物胚乳、胚珠和子房培养，特别是未受精胚珠或子房培养，为离体授粉研究提供了重要技术条件。
- ◆试管受精技术能克服远缘杂交不亲和性。

第1节 植物离体胚的培养

一、植物胚培养的类型

- 离体胚培养可分为幼胚培养和成熟胚培养。
- 这两类胚的成苗途径和所需营养条件不一样。

(一) 植物成熟胚的培养技术

- 成熟胚生长不依赖胚乳的贮藏营养。
- 只要提供合适的生长条件及打破休眠，即可在只含无机盐和糖比较简单的培养基上萌发生长，形成幼苗。
- 成熟胚培养要求不严格。
- 将受精后的果实或种子进行表面消毒，剥取种胚接种于培养基上，诱导培养即可发育成完整植株。

相当于种子萌发！

(二) 植物幼胚的培养

- 幼胚指尚未成熟(即发育早期)的胚，它较成熟胚难培养，技术条件要求高。
- 幼胚培养的两种生长方式：
 - ①继续进行正常的胚胎发育，维持胚性生长。
 - ②不能维持胚性生长，迅速萌发为幼苗，形成的幼苗往往畸形瘦弱，甚至死亡，即早熟萌发。

一般情况下，这也是幼胚培养的本意。

- 幼胚培养的关键是维持胚性生长。
- 幼胚对营养的需求较成熟胚复杂，离体幼胚在人工诱导条件下，可沿着胚胎发生途径生长发育。
- 通过培养远缘杂交后的幼胚获得成熟胚，以生产远缘杂种。
 - 胚培养研究最多的是荠菜和大麦， 陀罗属、柑橘属和菜豆属的植物。

二、植物胚培养的应用

- 1. 克服远缘杂交不亲和性
- 远缘杂交胚乳发育往往不正常或杂种胚与胚乳之间生理上不协调，造成杂种胚早期夭折。
- 将早期幼胚进行离体培养，可克服这种受精后障碍，产生远缘杂种。

- 2. 打破种子休眠，缩短育种周期

- 1) 许多植物的种子发育不完全或有抑制物存在而影响种胚发芽。

①一些无胚乳种子(如兰科)蒴果成熟时，胚龄幼小，需与微生物共生发芽。

②银杏种子脱离母体后，胚龄幼小，继续吸收胚乳营养，4~5个月后才成熟。

③油棕的种胚需要经过几年才能成熟。

- 2) 通过幼胚培养，可促使这些植物的幼胚达到生理和形态上的成熟萌发，形成植株，缩短生活周期。
 - ①通过胚培养可使鸢尾的生活周期由2~3年缩短到1年以下。
 - ②蔷薇属一般需 1 年才能开花，通过胚培养则1年可繁殖两代。

- **3. 提高种子萌发率**

- 长期营养繁殖的植物也具有形成种子的能力，但其种子生活力往往较低，萌发成苗率低，苗的质量差。胚培养可促进这类种子萌发和形成幼苗。
- **如：**芭蕉属有许多结实的品种，在自然情况下胚不能萌发，如果取出胚，在简单的无机盐培养基中就能很快使其萌发形成幼苗。

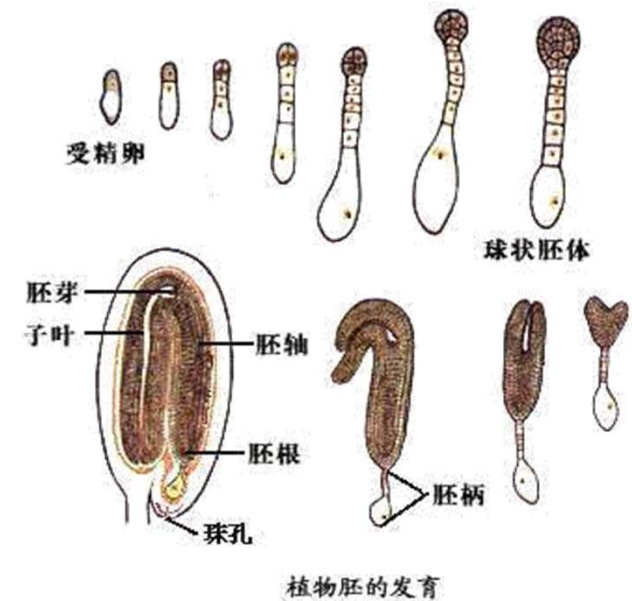
三、植物幼胚离体培养方法

- 1. 材料的选择与灭菌

- 1) 材料的选择

植物类型及实验目的不同，幼胚培养对材料的要求也不一样。

- ①一般性的实验或示范，可选用较大粒种子，如豆科和十字花科植物，便于操作。



- ②希望培养材料的胚发育时期具有一致性，应选择开花和结实习性有规律的植物。
- 如：荠菜具有总状花序，各个胚珠处于不同的发育时期，一般沿花序轴由上而下，胚龄逐渐增加。每个蒴果含20~25个胚珠，且基本处于同一发育时期。
- ③希望培养某一发育时期的胚，则需了解植物授粉时间与胚胎发育的相应关系。
- ④如培养远缘杂种胚，则必须在其夭折前进行。

- 2) 灭菌操作

- ①取大田或温室里授粉后的植物子房，70%酒精表面消毒，时间不宜长（一般10~30s）。
- ②无菌水冲洗3~4次。
- ③ 1 / 1000氯化汞灭菌10~30min。
- ④无菌水彻底冲洗3~4次，用于胚的分离培养。

- **2. 幼胚的分离**

- 灭菌后的材料在无菌条件下切开子房壁，用镊子取出胚珠，剥离珠被，取出完整的幼胚，置培养基上培养。
- 植物的种类及发育时期不同，幼胚分离技术和难度不一样。
- 单子叶植物的幼胚分离以大麦研究较多，一般在体视显微镜下剔除颖壳，即可分离幼胚。

- 如分离不同发育时期的荠菜幼胚时，需将消毒后的蒴果切开胎座区域，用镊子将外壁的两半撑开，露出胚珠。鱼雷形胚或更幼小胚都局限在纵向剖开的半个胚珠之中。
- 剥取未成熟胚时，从胎座上取下一个胚珠用刀片将其切成两半，并将带胚的一半细心剔除胚珠组织，即可将带胚柄的整个胚取出。
- 剥取较老的胚时，在胚珠上无胚的一侧切一小口，将完整胚挤出到周围液体中，操作需小心，以免胚损伤。

- **3. 幼胚的培养**

- 根据营养需要把胚胎发育过程分为两个时期：

- ①异养期

- 幼胚由胚乳及周围的组织提供养分。

- ②自养期

- 胚已能在基本的无机盐和蔗糖培养基上生长。

- 胚由异养转入自养是其发育的关键时期，这个时期出现的迟早因物种而异。

- 1) 胚的单独培养

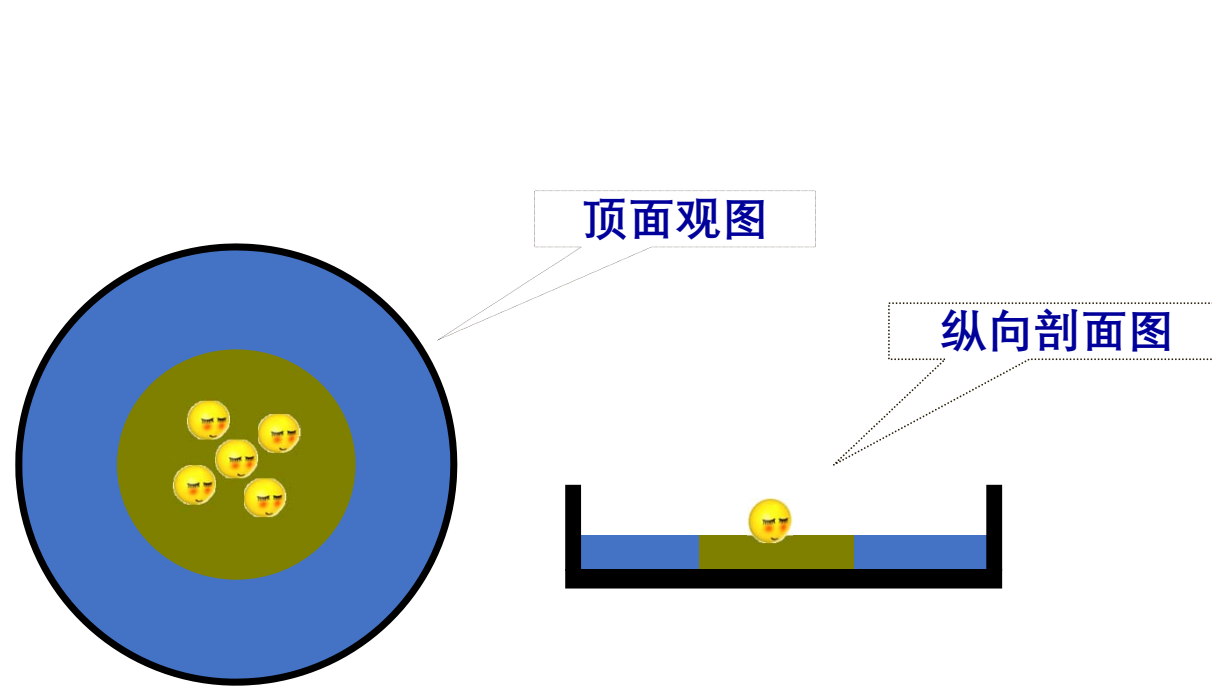
- 培养不同发育时期的荠菜胚，在球形期以前属异养，到心形期转入自养，在这两个时期之内，培养中的胚对外源营养的要求也会随胚龄的增加而逐渐趋向简单。
- 在培养过程中，幼胚从异养到自养先后受到两种成分不同的培养基作用，从而完成幼胚发育的整个过程。
- 改进培养方法，可使球形早期的荠菜胚在同一个培养皿中不需变动原来的位置就可完成全部发育过程，直到萌发。

- 在一个培养皿中装入两种不同成分的培养基，外环是成分较简单的琼脂培养基1，中央是成分较复杂的琼脂培养基2。
- 将幼胚接种于培养基2上培养。



- **培养基制作：**

- ①在培养皿中央先放一个玻璃容器，将培养基1加热融化，注入玻璃容器的外围，形成外环。
- ②待培养基1冷却凝固后，将玻璃容器拿掉，形成一个中央圆盘。
- ③在中央圆盘中注入融化的培养基2，静置，冷却凝固即可。



👤 植物幼胚 🟦 培养基1 🟢 培养基2 ⬛ 培养容器

植物幼胚培养设计示意图

• 2) 胚的看护培养

- 在有些情况下，即使改进培养基，离体胚在发育的极早期仍会发生夭折，很难培养成功。
- 植物正常生长发育的胚，是由胚乳组织供给营养的。
- 在这种情况下，利用胚乳看护培养可显著提高幼胚成活率。
- 在大麦幼胚离体培养时，如果在其周围培养基上存在来自同一物种的离体胚乳，则对胚的生长有明显促进作用。
- 有时，异种胚乳对胚的生长发育比同种的更为合适。



- 把大麦的胚移植到小麦胚乳上看护培养时其生长优于在大麦胚乳上。
- 把大麦x黑麦的属间杂种幼胚放在事先培养的大麦胚乳上培养，可使40%的杂种幼胚发育成苗，而传统胚培养仅1%成功率。



- 3) 胚乳嵌合培养

- 把杂种离体幼胚嵌入双亲之一的胚乳中培养：

- ①将车轴草和山蚂蝗的杂种胚和正常胚的荚果（后者用作看护胚乳的供体）消毒，放在衬有湿滤纸的无菌培养皿中。

- ②从荚果中取出胚珠。

- ③把杂种胚通过脐状口嵌入正常胚的胚乳中，转到培养基上培养，获得成功。

四、影响植物胚培养的因素

(一) 培养基

1. 无机盐

- 用于胚培养的无机盐配方很多。
- 成熟胚培养主要采用一些较简单的培养基如Tukey、Randolph、White等。
- 幼胚培养的培养基主要有MS、B₅、Nitsch、Rijven、White Rangaswang、Norstog等。

- 在一定的培养基上，荠菜幼胚的生长和存活之间并不存在相关性。
- 在MS培养基中，幼胚生长最好，但存活率却低；在Knop培养基中，胚的生长较差。
- 改变MS培养基盐分浓度，提高 K^+ 和 Ca^{2+} 的水平，降低 NH_4^+ 的水平，配制了一种利于幼胚存活和生长的新培养基。



- 2. 碳水化合物

- 糖在胚培养中具有三个方面的作用：

- ①调节培养基渗透压

- ②作为碳源和能源

- ③防止幼胚早熟萌发

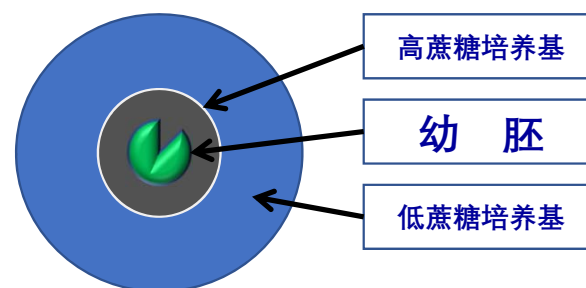
- 培养基中加蔗糖，保持适当渗透压，对未成熟胚培养很重要。

- 最适蔗糖浓度因胚的发育时期而不同。

- 成熟胚在2%蔗糖培养基中就能很好生长。
- 幼胚要求高水平糖, 浓度低会引起幼胚过早萌发。
- 原胚培养蔗糖浓度一般为8%~12%，因在自然条件下，原胚被一种高渗液体包围着。不同时期的胚对糖的需求不同。

胚长mm	1.0 ~ 1.1	2.0 ~ 2.5	5.0 ~ 5.5	10
适合蔗糖浓度	17.5%	16.0%	12.5%	6.0%

- 在培养皿中装两种培养基进行幼胚培养时，中央与幼胚接触的培养基，其蔗糖含量可达18%。
- 在培养过程中，随培养时间增加，必须把胚转移到蔗糖水平逐步降低的培养基上。



- **3. 氨基酸**

- 在胚培养中加入氨基酸，无论是单一的还是复合的，都能刺激胚的生长。
- 加单一氨基酸时，以谷氨酰胺最有效，如500mg/L的谷氨酰胺可促进多种植物离体胚的培养。
- 1600mg/L的谷氨酰胺能强烈促进银杏胚形成的幼苗生长。

- 水解酪蛋白被广泛用于胚培养。
- 如水解酪蛋白和酵母提取物对芥菜及棉花心形胚生长有明显的促进作用。
- 水解酪蛋白是四季橘球形胚培养所必需的。
- 胚对水解酪蛋白的敏感性因物种而异，栽培大麦最适浓度为500mg/L，紫花曼陀罗为50mg/L。

- **4. 维生素**

- 常用于胚培养的维生素有硫胺素、吡哆醇、烟酸、泛酸钙等。

维生素对发育初期的幼胚培养是必需的，而已萌发生长的胚，能合成自身需要的维生素，而外源维生素可能对其形态发生有抑制作用。

硫胺素促进根伸长，烟酸、泛酸钙和生物素促进茎生长。

- **5. 植物生长调节剂**

- 成熟胚一般不需要外源激素即可萌发，但加入激素可促进其生长。
- 激素对启动休眠种胚萌发是非常必要的。
- 幼胚培养应该使加入的生长调节物质和其内源激素间保持某种平衡，以维持幼胚的胚性生长。
- 激素浓度低，不能促进幼胚生长；激素浓度高，幼胚则脱分化。

- 大麦未成熟胚培养中，ABA和 NH_4^+ 可明显抑制由 GA_3 和KT所促进的早熟萌发，使胚正常发育。
- 但是，如果附加的生长调节物质较多，就会引起胚脱分化形成愈伤组织，并再分化形成胚状体或芽。

- **6. 天然有机物**

- 正常植物胚受到胚乳的滋养和保护，加入一些天然的胚乳或种子提取物等，可促进离体胚的正常生长。
- 玉米胚乳组织提取物可促进培养的玉米胚生长。
- 蜂王浆可促进银杏幼胚正常分化，减少胚的死亡率，抑制胚脱分化。

(二) 环境条件

1. 温度

- 多数植物胚培养温度为25~30℃，但也有较低或较高的。
- 马铃薯胚20℃较好。
- 香子兰胚32~34℃生长最好。
- 柑橘、苹果、梨胚25~30℃合适。
- 棉花胚32℃生长最好。
- 有些植物，如桃的胚培养则需变温条件。

• 2. 光照

- 胚在胚珠内发育是不见光的，一般认为在黑暗或弱光下培养幼胚比较适宜，光对胚胎发育有抑制作用。
- 离体培养的幼胚对光的需求因植物种类而异。棉花幼胚先暗培养，再转较强光照培养，子叶叶绿素生成很慢，但转弱光下培养，子叶很容易产生叶绿素。
- 荠菜胚培养每天12h光照比全暗条件好。

(三) 胚柄

胚柄是一个短命的结构，长在原胚的胚根一端，当胚达到球形期时，胚柄也发育到最大。

- 胚柄参与幼胚的发育过程。
- 一般胚柄较小很难与胚一起剥离出来，所以培养的胚都不具备完整的胚柄。

- 胚柄对培养幼胚的存活是关键。
- 红花菜豆较老的胚，不管有无胚柄存在，均能在培养基中生长；但幼胚培养时，不带胚柄会显著降低形成小植株的频率。
- 因为幼胚培养中，胚柄会刺激胚的进一步发育，而且这种作用在胚发育的心形期达到高潮。

- 使用生长调节物质，如5mg/L赤霉素能有效地取代胚柄的作用。
- 红花菜豆胚心形期时胚柄中赤霉素的活性比胚本身高30倍。子叶形成后，胚柄开始解体，GA₃水平开始下降，但胚中GA₃的水平增高。
- 当没有胚柄存在时，一定浓度KT可促进幼胚生长，但其作用难与赤霉素相比。

第2节 植物胚乳离体培养

- **胚乳培养**

将胚乳组织从母体上分离出来离体培养发育成完整植株。

- 目前为止，已对40余种植物进行了胚乳培养，获得了10余种植物的胚乳植株。
- 裸子植物胚乳是由雌配子体发育而成的单倍体。
- 被子植物胚乳是双受精产物，是三倍体。
- 不同属植物，胚乳存在时间长短不一致，有些植物如蓖麻和禾谷类植物等可一直保留到种子成熟，成为贮藏组织。

- 胚乳培养是20世纪30年代从玉米胚乳培养开始的，以后又对檀香科、桑寄生科的热带寄生植物和大戟科植物的成熟胚乳进行培养形成愈伤组织，并进一步诱导形成了芽和根等器官，有的种可形成完整的小植株，从而证实了胚乳细胞同样具有形态发生能力，表现出全能性。

一、植物胚乳的培养方法

- 1. 胚乳外植体的制备

- ①胚乳大的种子，如大戟科和檀香科植物将种子直接消毒，去种皮即可培养。
- ②胚乳被黏性物质包裹的种子，如桑寄生科植物，将种子表面消毒，剥开种皮去掉黏性物质，取出胚乳组织培养。
- ③有果实的种子，如槲寄生植物，将果实消毒，切开幼果取出种子，取胚乳培养。

- 2. 愈伤组织诱导

- 只有少数植物可直接从胚乳中分化出器官，多数被子植物胚乳经愈伤再生植株。
- 胚乳接种6~7d后体积膨大，在切口处形成乳白色愈伤组织突起。
- 多数植物的初生愈伤组织为白色致密型，少数 (如枸杞) 为白色或淡黄色松散型，或绿色致密型 (如猕猴桃)。

- **3. 形态建成**

- 胚乳愈伤组织可通过器官发生和胚胎发生两种途径形成器官。
- 巴豆和麻风树的愈伤组织转到分化培养基上，通过器官发生途径，前者长出根，后者长出三倍体的根和芽。
- 罗氏核实木成熟胚乳愈伤组织茎芽分化率达85%，茎芽在同种培养基上长成了4cm高的小植株。

- 最初通过胚胎发生途径获得再生植株的是柑橘。檀香、橙、桃、枣、核桃和猕猴桃等相继成功。
- 柚的胚乳愈伤组织转到MT+GA₃ 1.0mg/L培养基上，可分化出球形胚状体，之后在无机盐加倍和逐步提高GA₃的培养基上，胚状体进一步发育形成再生植株。

- 4. 三倍体后代的形态特征
- 培养被子植物胚乳可得到三倍体植株或产生无子果实，或加倍产生六倍体植株。
- 无子果实食用方便，多倍体植株粗壮、叶片大而肥厚、叶色浓、花大或重瓣、果实大但结实率低。
- 这些变异可直接利用或用于育种，对花卉和药用植物育种有重要价值。

- 5. 胚乳再生植株的倍性
- 胚乳愈伤组织及再生植株的染色体数常发生变化。
- 如苹果 ($2N=34$) 胚乳植株的根尖细胞染色体数的分布范围是29~56条，多数是37~56条，三倍体细胞只占2%~3%。
- 枸杞、梨、玉米和大麦等胚乳植株染色体数也不稳定，同一植株往往是不同倍性细胞的嵌合体。

- 染色体倍性的混乱现象在胚乳培养中是相当普遍的。
- 但有些植物的胚乳培养，如核桃、檀香、橙和柚等，其倍性表现出相对的稳定性，这些植物的胚乳细胞往往也能长期保持器官分化的能力。
- 影响胚乳细胞染色体稳定性的因素主要有：
 - ①胚乳类型
 - ②胚乳愈伤组织发生的部位
 - ③培养基中外源激素的种类和水平
- 如：猕猴桃来源于同一植株的胚乳，可以培养出三倍体和二倍体两种倍性的植株。

- 在ZT3.0mg/L+NAA0.5mg/L培养基上，由愈伤组织培养出的胚乳植株，根尖染色体为二倍体 ($2n=2x=58$)。
- 在ZT3.0mg/L+2,4-D1.0mg/L培养基上，得到的胚乳植株的根及胚状体的胚根染色体是三倍体 ($2n=3x=87$)。
- 可见，培养基的外源激素配比不仅决定胚乳细胞的增殖和分化，而且还影响胚乳细胞染色体的倍性变化。
- 另外，猕猴桃是雌雄异株植物，通过胚乳培养，对其性别决定的研究也很有意义。

二、影响植物胚乳培养的因素

- 1. 培养基与培养条件
- 胚乳培养常用基本培养基有White、LS、MS等，其中MS使用最多。
- 培养基中添加水解酪蛋白和酵母提取物等有机物质，促进愈伤组织产生和增殖。
- 在小麦、变叶木和葡萄胚乳培养中添加椰子汁，对愈伤组织诱导和生长是必需的。

- 植物激素对胚乳愈伤组织的诱导和生长起重要作用。
- 多数植物在没有外源激素的培养基中，不能或很少诱导胚乳愈伤组织的产生。
- 同时加入细胞分裂素和生长素，其诱导愈伤组织正常生长的效果显著优于使用单一的生长素或细胞分裂素。

- 不同植物对激素的要求不一样

- → 大麦在有2, 4-D的培养基上才能产生愈伤组织。
- → 猕猴桃ZT效果最好。
- → 枣在单一激素或生长素和细胞分裂素配合的培养基上，都能有效诱导胚乳形成愈伤组织。
- → 荷叶芹能在无激素培养基上产生愈伤组织。



- 胚乳培养中，蔗糖浓度一般为3%~5%，但在小黑麦杂种胚乳培养中，8%的蔗糖浓度有利于愈伤组织的形成。
- 胚乳愈伤组织生长的适宜温度为25℃左右。
- 对光照和培养基pH的要求则因物种不同而异。

- 玉米胚乳适合于暗培养。
- 蓖麻胚乳1500lx连续光照生长较好。
- 其他植物胚乳培养多在10~12h/d光照下进行。
- pH一般在4.6~6.3之间。
- 但巴婆适宜pH为4.0。
- 玉米胚乳愈伤组织pH7.0时生长最好。



- 2. 胚在胚乳培养中的作用

- 胚乳培养有带胚培养和不带胚培养两种方式，带胚培养比较容易形成愈伤组织。
- 当愈伤组织形成后，除去胚并不影响胚乳组织的增殖。
- 胚对胚乳培养的影响，与胚乳的生理状态或年龄有关。
- 旺盛生长期的未成熟胚乳，在诱导培养基上无胚存在时可形成愈伤组织，如大麦、柚、橙、苹果、猕猴桃等。
- 成熟的胚乳，特别是干种子的胚乳培养时，由于其生理活动十分微弱，在诱导脱分化前，必须借助原位胚的萌发使其活化。

- 胚对胚乳组织的增殖作用，有人认为是某种胚性因子在起作用。
- 如培养前先用不同浓度GA₃或IAA处理核实木和蓖麻胚乳组织，发现用1~2mg/LGA₃浸泡36h的核实木胚乳组织，在无胚的情况下，可形成愈伤组织并分化出绿色芽，故认为这种胚性因子可能就是赤霉素。

- 3. 胚乳发生类型和发育程度

- 被子植物胚乳发生类型：

- ①核型

- ②细胞型

- ③沼生目型

三种类型，其中核型胚乳占61%。

- 胚乳发生类型直接影响胚乳愈伤组织的产生和诱导频率的高低。



- 被子植物胚乳发生的三种方式：
- ①核型
 - 精核与极核受精后，只以核的分裂方式增殖。
- ②细胞型
 - 精核与极核受精后，以细胞分裂的方式增殖。
- ③沼生目型
 - 精核与极核受精后，有核分裂和细胞分裂两种方式混生增殖。

- 胚乳发育可分为早期、旺盛生长期和成熟期。
- 不论胚乳属于核型或细胞型，发育早期的胚乳，愈伤组织的诱导率较低。
- **如：**细胞期的红江橙 (核型)，前期愈伤组织诱导率低于后期。

枸杞胚乳 (细胞型)，青果期愈伤组织诱导率低于变色期和红果期。

- 无论是草本或木本植物，处于游离核或刚转入细胞期的核型胚乳，难以诱导愈伤组织。
- 旺盛生长的胚乳，最容易诱导产生愈伤组织，如葡萄、苹果和桃的胚乳，此时愈伤组织的诱导率可达90%~95%。

- 胚乳旺盛生长期是取材的最适时期。

- 禾本科植物胚乳培养的最适时期：

✿ 水稻授粉后	4~7d
✿ 黑麦草授粉后	7~10d
✿ 玉米和小麦授粉后	8~12d
✿ 大麦授粉后	10~20d

- 一般情况下，接近成熟和完全成熟的胚乳愈伤组织的诱导率很低。
- **如：**种子发育后期的苹果胚乳，愈伤组织诱导率只有2%~5%。

授粉后12d的玉米和小麦的胚乳不能产生愈伤组织。

- 但成熟期的水稻，却表现出较高的愈伤组织诱导率和器官分化能力。
- 一些木本植物，如大戟科、桑寄生科和檀香科植物，其成熟胚乳能产生愈伤组织，而且有一定程度的器官分化或再生植株的能力。



三、植物胚乳培养的应用

- 1965年以来，许多植物通过胚乳培养获得了三倍体植株，三倍体植株的主要特征是种子败育，这对于以种子生产为目的的植物是不利的。但对无性繁殖的植物，则可利用三倍体进行改良。



无籽西瓜

- 如苹果、香蕉、桑树、甜菜、茶和西瓜等重要经济植物的三倍体已在生产上应用。
- 三倍体满天星花朵较大而重瓣。
- 三倍体毛白杨生长速度快，能制造出质量好的纸浆。
- 一些以营养体为生产对象的植物，其三倍体性状比二倍体好。

- 获得三倍体的方法通常是四倍体与二倍体杂交，但有些植物杂交不容易成功，这样三倍体种子的来源就没有保障。
- 通过胚乳培养可直接生产大量的三倍体植株，以解决三倍体材料的来源问题，满足生产需要。
- 在被子植物中，培养的胚乳细胞以及得到的胚乳植株，并不都是三倍体，如苹果、桃、大麦和小麦等，其胚乳植株的染色体有很大的变化。



- 虽然目前还不能对这样的胚乳植株的育种价值做出完整的评价，但在弄清胚乳植株染色体不稳定的原因和染色体变化的规律后，人们有可能由此得到不同染色体组合的胚乳植株，为染色体工程探索一条有用的途径。

- 胚乳组织是贮藏养料的场所。
- 在自然条件下，胚乳细胞以淀粉、蛋白质和脂类的形式贮存着大量的营养物质，以供胚胎发育和种子萌发的需要。
- 因此，胚乳培养也为研究这些产物的生物合成及其代谢提供了一个很好的实验系统。可利用玉米胚乳培养物研究淀粉在体内合成的途径。
- 用咖啡胚乳愈伤组织研究咖啡碱的生物合成等。

第3节 植物胚珠子房培养

一、植物胚珠的培养

- 幼胚培养中，要取出心形期或更早期的胚进行培养，对培养技术的要求更高，分离也更困难，特别在兰科植物中，即使已经成熟的种子也非常小，操作起来就更困难，而分离胚珠则较容易。
- 胚珠是种子植物的大孢子囊，是孕育雌配子体的场所，也是种子形成的前身。

- **胚珠培养**

- 将胚珠从母株上分离出来，在人工条件下培养，使其生长发育形成幼苗的技术，分为受精胚珠培养和未受精胚珠培养。
- 兰花胚珠培养，缩短了从授粉到种子成熟的时间，加速了幼苗生长。
- 培养授粉后5d的罂粟胚珠，20d内培养成熟，萌发成苗。

- 1. 胚珠培养的意义

①使杂种尽早得到培养，防止杂种胚早期败育，获得杂种植株。

②受精前胚珠及未受精胎座或子房培养，是试管受精的基础。

③未受精胚珠培养能和花药培养一样，诱导出大孢子或卵细胞，进而形成单倍体植株，用于单倍体育种。

- 2. 胚珠培养方法

- ①材料的选择和灭菌

- 培养受精胚珠，可根据培养要求，由大田或温室取回授粉时间合适的子房。
- 培养未受精胚珠，则应在授粉前适当时间摘取子房。
 - ✦ 70%酒精消毒30s，无菌水冲洗3~5次。
 - ✦ 5%次氯酸钠溶液灭菌10min，无菌水冲洗3~5次。
 - ✦ 用解剖刀沿纵轴切开子房取出胚珠，或者将其带胎座一起取下接种。

- ②培养基对胚珠培养的影响

培养基多为White、Nitsch、MS等，Nitsch使用更普遍。

培养授粉后不久的胚珠，要求附加椰子汁、酵母提取物、水解酪蛋白等，
同时还可添加亮氨酸、组氨酸、精氨酸等一些氨基酸。

- 离体胚珠发育中，**培养基的渗透压**起着重要作用，特别是对幼嫩的胚珠。
- 如矮牵牛授粉后7d，胚珠处于球形胚期，将其剥离置于4%~10%蔗糖培养基上，即可发育为成熟的种子。
- 若胚珠内含有合子和少数胚乳核，适宜的蔗糖浓度为5%~6%，而刚受精后的胚珠应为8%。

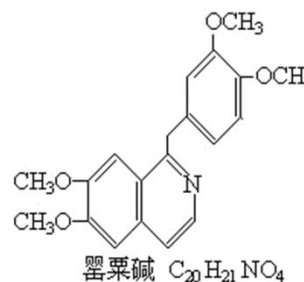
- 不同发育时期的胚珠对培养基的要求也不同罂粟授粉后2~4d的胚珠，培养时所要求的培养基较复杂，在Nitsch培养基上即使附加酵母提取物、水解酪蛋白、细胞分裂素、生长素等，也不能促进胚珠的发育。而采用发育到球形胚期的胚珠，用简单的培养基就能成功。

- ③胎座和子房对胚珠培养的影响

- 胚珠授粉后的天数以及是否带有胎座，对培养胚珠发育有显著影响。
- 罂粟授粉后第6d的胚珠，置添加维生素的Nitsch培养基上培养，它所经历的发育过程与正常胚珠大体相同，培养第 20d的胚珠比自然条件下生长的胚珠大，并可形成成熟种子，继续培养就会发芽形成幼苗。
- 培养带胎座或子房的胚珠，所需培养基较简单，而且受精后的胚珠也容易发育成种子。由此可以推测，胎座或子房的某些组织在胚珠发育初期起着重要的作用。所以，进行单个胚珠培养不能成功时，可考虑连胎座或子房一起进行培养。

• ④胚发育时期的影响

- 胚发育时期对胚珠培养成功与否有很大影响。一般来说，合子和早期原胚期的胚珠较难剥取和培养，对培养基成分也要求严格。
- 在虞美人中也有合子期胚珠培养成功的报道。
- 培养罂粟授粉后5d的离体胚珠，也获得了有活力的种子。
- 培养发育到球形胚期的胚珠，较容易获得种子，对培养基的要求也不高。
- 许多植物在含无机盐、蔗糖和维生素的培养基上即能获得成功，附加水解酪蛋白和椰子汁等，可促进其生长发育。



二、植物子房的培养

- 子房培养

将子房从母体上分离下来，置于培养基上，使其发育成幼苗。

子房是雌蕊基部膨大的部分，由子房壁、胎座、胚珠组成。

胚珠培养时常分离胚珠困难，可改用子房培养。

- 子房培养的意义：

- ①使未受精胚囊中的单倍性细胞诱导发育成单倍体植株。
- ②获得杂种植株。
- ③为试管受精提供一项基础技术。根据培养的子房是否授粉，可将子房培养分为授粉子房培养和未授粉子房培养。

- 1. 培养方法
- ①子房外植体的获得
- 子房培养的方法与胚珠培养相似。
- 若培养未受精的子房，一般选用开花前1~5d大田种植植株的子房；
- 若培养受精后的子房，则应根据培养目的，选择不同授粉后天数的子房作为试材。
- 子房培养与相同胚龄胚培养比较，难度大大降低

- 单子叶植物的幼龄子房包裹在颖壳里，而颖花又严密包裹在叶鞘里，子房无菌，用70%的酒精擦拭幼穗表面，剥取子房直接接种；
- 双子叶植物的花蕾，用饱和漂白粉溶液灭菌处理15min，无菌水冲洗后备用。
- 子房裸露的植物则应按照常规消毒，除去花萼、花冠或颖壳，将子房接种于培养基上。

- ②子房培养的条件

用于子房培养的培养基有 MS、White、B₅、N₆、Nitsch等。

Nitsch(1951)在一种人工合成培养基上培养了小黄瓜、草莓、番茄和菜豆等离体子房，从而为了子房培养技术奠定了基础。

- 培养基的成分对子房的生长发育及成熟有很大的影响。

- 屈曲花授粉后1d的离体子房，在含无机盐和蔗糖简单培养基上，培养生长良好，但形成的胚比自然条件下的小。
- 但在培养基中添加B族维生素后，可获得正常大小的果实。
- 若在无机盐、蔗糖、维生素培养基中附加IAA，离体培养形成的果实比自然生长果实更大。

- ③培养子房的发育
- 子房存在两种细胞，即性细胞和体细胞，都可产生胚状体或愈伤组织，进一步发育成植株，因此，再生植株可能来源于性细胞或体细胞。
- 来源于性细胞，即胚囊里的雌配子体的核，由于它是由大孢子母细胞减数分裂的大孢子发育而来，因此是单倍体植株。
- 来源于体细胞，即由珠被和子房壁表皮二倍体组织产生的植株，则是二倍体。

- 正是由于胚状体或愈伤组织有两种不同倍性的起源，其后代会出现不同倍性的植株。
- 若想通过子房培养从大孢子产生单倍体植株，必须设法控制不同倍性组织中的细胞分裂，为大孢子的细胞分裂创造良好条件。
- 若培养子房中卵细胞已受精的合子，则可通过胚状体或愈伤组织再分化途径，产生二倍体植株，以获得杂种植株。

- 2. 影响子房培养的因素

- 子房培养目的不同，要求其发育途径也不同，可通过控制培养基及激素条件调节子房发育方向。
- 受精后的子房通过离体培养，可形成果实，并得到成熟的种子，所要求的培养基也较简单，常用的培养基有N6、MS、BN等。
- 要想诱导子房中的性细胞和体细胞形成胚状体或愈伤组织，并分化成植株，则对培养基的成分有一定的要求。

- 如诱导未受精子房胚囊核单倍体组织发生就需要在培养基中加入一定量的外源激素。水稻不加外源激素，子房不膨大，也不产生愈伤组织；当加入微量的生长素，可明显促进子房的膨大，并产生愈伤组织。
- 有些禾本科植物，在有IAA的培养基上，可诱导胚产生根，在含有IAA和腺嘌呤的培养基上可产生幼苗。而在苜蓿子房培养中，加入酪蛋白水解物和酵母提取物，可诱导产生多胚。

第4节 植物离体授粉技术

- 在远缘杂交中常遇到受精前的障碍问题，如花粉在柱头上不能萌发；花粉生长受抑而不能进入胚珠，其原因是花柱太长或花粉管生长缓慢；花粉管在花柱中破裂等，使受精作用不能正常进行，这些均属于受精前或合子期前障碍。

- 在另外一些情况下，受精虽然能正常进行，但由于胚和胚乳之间的不亲和性，或胚乳发育不良，杂种不能发育成熟，这些则属于受精后障碍，因受精后障碍而导致远缘杂交的失败，可采用胚培养或子房培养或胚珠培养予以克服。
- 远缘杂交的受精前障碍的克服，可消除柱头和花柱，让花粉直接与胚珠接触，从而实现受精并使种子得到发育和成熟。
- 为此，20世纪60年代初期，人们进行了离体授粉技术的研究。

- 离体授粉

无菌培养未授粉的胚珠或子房，以一定的方式授以无菌花粉，使之在试管内实现受精的技术，又称为：

离体受精 (fertilization in uitro)

试管受精 (test tube fertilization)

离体授粉 (pollination in uitro)

- 根据花粉授于离体雌蕊的位置，离体授粉分为三种方式，即：
 - ①离体柱头授粉
 - ②离体子房授粉
 - ③离体胚珠授粉
- 进行离体授粉时，从花粉萌发到受精形成种子及种子萌发和幼苗形成的整个过程，均在试管内完成。

一、植物离体授粉的类型

（一）植物离体柱头授粉

离体柱头授粉

对雌蕊进行离体培养，将无菌花粉授于柱头上，得到可育的种子和果实。

是一种接近于自然授粉的试管受精技术。

- 离体柱头授粉的方法：
- ①选择生长健康的供体，在花药尚未开裂时切取母本花蕾。
- ②消毒后，在无菌条件下用镊子剥去花瓣和雄蕊，保留萼片。
- ③将整个雌蕊接种于培养基上。
- ④当天或第二天在其柱头上授以无菌父本花粉。
- 1966年以来，烟草、金鱼草及玉米等植物离体柱头授粉获得了成功。
- 1983年，小麦离体柱头授粉获得了90%以上的结实率，并培育出试管苗和成年植株。

- 在节节麦x普通小麦、普通小麦x黑麦草的杂交试验中，离体柱头授粉得到了健康杂种种子和植株。
- 具体方法：
 - ①早上在田间将开花前约2d的母本麦穗连同带有1~2个叶片的茎秆剪下，插入水中，带回实验室。
 - ②将整个麦穗消毒后，在无菌条件下剥去每个小花的外颖(留内颖)，并去掉雄蕊。
 - ③再从穗轴上切下雌蕊，接种于培养基上（MS培养基，糖浓度为5%）。
 - ④培养2d后，柱头展开呈羽毛状，进行授粉。

(二) 植物离体子房授粉

离体子房授粉

又称子房内授粉，人工将花粉直接引入子房，使花粉粒在子房腔内萌发，并进行正常受精，获得具有生活力的种子。把花粉直接送入子房，实现受精作用是克服受精前障碍的有效途径。

- 子房内授粉可分为两种类型：

- ①活体子房内授粉

- ②离体子房内授粉

- **1. 活体子房内授粉**

- **活体子房授粉** 被授粉的子房并不离体，仍然在活体植株上，对其用花粉悬浮液进行授粉，使活体子房发育并形成成熟种子。
- **1926年，在卵形党参中将花粉授于活体子房顶部的切口处，成功地实现了受精。**

- 操作步骤：
- ①确定供试植物的开花和花药开裂时间。
- ②对母本花蕾去雄并套袋。
- ③采集父本花粉。
- ④确定适于父本花粉萌发的溶液。
- ⑤将花粉引入子房。花蕾去雄后
1~2d即可将父本花粉引入活体
母本的子房中。



- 花粉粒引入子房中的方法有两种：即：

★ 直接引入法

★ 注射法

1) 直接引入法

即用锋利刀片在子房壁或子房顶端上开一切口，把花粉从切口处送进子房。

2) 注射法:

- ①用100mg/L硼酸将花粉粒配制成悬浮液，每滴悬液含约300个花粉粒。
- ②母本开花后，将子房用酒精棉表面消毒在子房两侧彼此对应位置上钻两个小孔；
- ③用注射器由一个小孔向子房内注入花粉悬浮液，子房内空气由另一小孔排出，悬浮液要注满子房腔，直到开始由另一小孔中流出为止，注射完毕，将两个小孔用凡士林封闭。
- 这种子房内授粉方法在虞美人、罌粟、花菱草等植物中已获得成功，得到了蓟罌粟和淡黄蓟罌粟之间的杂种。

- **2. 离体子房内授粉**

- 用无菌花粉对离体培养的子房进行授粉，使其发育成为成熟种子。
- 取即将开花的花蕾表面消毒，剥离花萼和花瓣，去掉柱头和花柱，在试管中将异种无菌花粉授于子房顶端切口处，或将异种无菌花粉引入子房内，实现受精。
- 在两性不亲和物种油菜和甘蓝的种间杂交中，利用离体子房内培养方法成功地获得了杂种。



(三) 植物离体胚珠授粉

离体培养未受精的胚珠，并在胚珠上授粉，最终在试管内结出正常种子。

- 离体胚珠授粉既可以将胎座上切下的单个胚珠 (裸露胚珠)接种在培养基，然后撒播花粉于胚珠的表面，实现受精。
- 也可以将带有完整胎座或部分胎座的胚珠接种在培养基上，并撒播花粉进行受精。
- 在培养罂粟未授粉胚珠上撒上花粉粒，15min内花粉萌发，花粉管生长快，2h内胚珠外表就布满了花粉管，许多胚珠中发生了受精。

- 利用此法，还成功地进行了甘蓝x大白菜的种间杂交。
- 在实际应用中，活体子房内授粉适用于子房较大的植物，因为这种方法能使花粉萌发后不需经过柱头和花柱组织进入子房，克服柱头和花柱组织上出现的两性不亲和性。
- 但这种方法仍然是在原植物体上进行的，对子房易脱落的植物不适用。

- 离体柱头授粉由于从授粉开始到果实成熟都是在试管内进行，培养基和培养条件也可控制，解决了子房脱落和因胚乳发育不良使胚败育等问题。但由于整个受精过程仍然是通过柱头进行，所以不能克服因柱头和花柱组织造成的不亲和性的障碍。
- 离体子房和胚珠授粉具有较大的优越性，将花粉直接授于子房或胚珠上，整个受精过程都是在人工控制的试管里进行的，所以它既可排除柱头和花柱组织对于受精的障碍，又可克服活体子房的脱落。

二、植物离体授粉的方法

（一）实验材料的选择

- 离体授粉应选用子房较大并有多个胚珠的植物，如茄科、罂粟科、石竹科植物等。这些植物胎座上着生胚珠数量大，可分离获得许多完好胚珠。
- 上述几科植物花粉易于在胚珠上萌发，花粉管能大量在胚珠和胎座上生长。

- 在单子叶植物中，最先是玉米离体子房和胚珠授粉获得成功。剥除玉米子房壁获取裸露胚珠时，易造成胚珠损伤，可用刀片将未授粉玉米果穗上的子房上部1/3切除，使胚珠外露。
- 此法操作简便，不易伤害胚珠，能在短时间内得到大量正常发育的玉米胚珠。
- 多保留母体花器官组织有利于离体授粉的成功
- **如：**在小麦离体柱头授粉中，保留颖片有利于子粒发育。将尚未开花的水稻穗温汤去雄 (45°C , 5min)后，把父本花药塞入母本颖花中，然后将带有一段枝梗的颖花插在培养基上，带枝梗的颖花受精率高。

(二) 离体授粉的基本程序

1. 做好准备工作

- 确定开花、花药开裂、授粉、花粉管进入胚珠和受精的时间。
- 2. 去雄后将花蕾套袋隔离
- 为了避免非实验要求的授粉，用作母本的花蕾必须在开花之前去雄并套袋。

- **3. 制备无菌子房或胚珠**

- ①开花之后1~2d将花蕾取下，无菌培养。
- ②去掉花萼和花瓣，70%酒精漂洗，用杀菌剂表面消毒，无菌水冲洗3~4次，去掉柱头和花柱，剥去子房壁，暴露出胚珠。
- ③将长着胚珠的整个胎座接种培养，或把胎座切成数块，每块带有若干个胚珠，之后再进行离体授粉。

- ④离体柱头授粉时，对雌蕊表面消毒，但不能使消毒液触及柱头，以免影响花粉在柱头上的萌发和生长。
- 单子叶植物的每一朵花为一个子房 (胚珠)，玉米可用授粉前子房 (子房由若干层苞叶保护，不必表面消毒)，可将果穗切成小块，每块带有多个子房，获得大量无菌胚珠用于离体授粉。

- 4. 制备无菌花粉

- 为了在无菌条件下采集花粉，需要把尚未开裂的花药从花蕾中取出，置于无菌培养皿中直到花药开裂。若从已开放的花中摘取花药，应将花药进行表面消毒，然后将其置于无菌培养皿中直到开裂。

- 5. 胚珠(或子房)的试管内授粉
- 将花粉授于培养的胚珠、胎座、子房、柱头上或其周围。
- 胚珠表面水分常抑制胚珠上花粉管的生长因此胚珠接种后，培养基表面如果有水，应用无菌滤纸吸干，然后再授粉。
- 把花粉授在胚珠或胎座上，比撒在胚珠周围培养基上效果好。

- 离体授粉成功的标志是授粉后能由胚珠或子房形成有生活力的种子。
- 授粉后胚珠(或子房)可在适宜培养基上培养。光照强度为1000lx，光照时间10~12h/d。
- 有的受精胚可发育成种子，如烟草、矮牵牛、康乃馨等。
- 有的受精胚原位萌发，即授粉5周后，子房上可直接长出植株。

三、影响离体授粉的因素

- 离体授粉获得成功的例子不多，限制了这项技术的广泛应用。其影响因素主要有以下几个方面。

- 1. 外植体
- ①柱头和花柱的影响

柱头是某些植物受精前的障碍，要克服这种障碍，必须去掉柱头和花柱；但在烟草实验中发现，保留柱头和花柱，试管受精良好，平均有80%的子房能结种子。去掉部分柱头，对产生种子影响不大。但全部去掉柱头和花柱，子房结实率则较低。

- ②胎座的影响

在试管受精中，子房或胚珠上带有胎座，有利于离体受精的成功；至今试管受精成功的大部分例子，都是用带胎座的子房或胚珠材料。同时多胚珠子房的离体受精也易成功。

- ③外植体的生理状态

胚珠或子房的生理状态对授粉后的结实率有明显影响。开花后1~2d剥离的胚珠比开花当天剥离的胚珠结实率高。

- 玉米果穗离体授粉的适宜时期是抽丝后3~4d。烟草授粉后剥离的未受精胚珠比未授粉雌蕊上剥离的胚珠离体授粉的结实率高。
- 这是因为花粉在柱头上萌发或花粉管穿越花柱会影响子房内代谢活动，刺激子房中蛋白质的合成。
- 因此，在离体授粉中，可以把剥离胚珠的时间选择在雌蕊授粉后和花粉管进入子房之前，从而增加离体授粉成功的机会。

- 2. 培养基

- 试管内授粉后，能否保证花粉迅速萌发且萌发率较高，花粉管迅速伸长并在受精允许的短时间内达到胚囊，完成受精过程，关键是培养基。
- 常用于离体授粉培养基为Nitsch、White、MS等。

- 研究发现：
- ①氯化钙对离体授粉有很大影响，如先将离体胚珠在 1%氯化钙溶液中蘸一下，然后立即用花粉进行授粉，再把授粉的胚珠转到Nitsch培养基上。通过这种方法，获得了具有萌发力的种子。如不用氯化钙处理，则不能形成种子，可见 Ca^{2+} 具有刺激花粉萌发和花粉管生长的作用
- ②培养基中蔗糖的浓度一般为4%~5%，而玉米适合的蔗糖浓度为7%。
- ③常用的有机附加物是水解酪蛋白、椰子汁、酵母提取液等。烟草胎座授粉后加入这些附加物和少量的细胞分裂素、生长素，能显著提高子房的结实数。

- 3. 培养条件

- 在离体授粉中，培养物一般都是在黑暗或光照较弱的条件下培养的；但 Zenktele (1980) 发现，培养物无论在光照还是黑暗条件下培养，离体授粉的结果没有差别。
- 离体授粉培养的温度一般为20～25℃，但水仙属植物中，15℃比25℃更能显著增加子房结实数。而罂粟则需较高的温度。

