

牡丹成熟胚离体培养的初步研究

刘会超¹, 刘磊², 贾文庆¹, 白志川²

(1. 河南科技学院 园林学院 河南 新乡 453003; 2. 西南大学 园艺园林学院, 重庆 400716)

摘要: 研究了不同浓度 GA₃ 浸泡处理对解除‘凤丹’种子上胚轴休眠的影响。结果表明: 浓度为 500 mg/L 的 GA₃ 浸泡种子 48 h, 胚的萌发率 52.6%; 经过对 4 种培养基的筛选, 认为 1/2MS+Ca²⁺ 可以作为胚培养的基本培养基; 胚培养最佳培养基为 1/2MS+GA₃0.5 mg/L。

关键词: 牡丹; 成熟胚; 离体培养

中图分类号: S 685.11; S 603.6 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2009)01-0099-03

牡丹(*Paeonia suffruticosa* Andr.) 为芍药科芍药属植物, 其花富丽端庄、多姿多彩, 被誉为“国色天香”。在生产中, 一些名贵品种由于长期人工栽培导致结实能力降低, 种子发育不良且难以保持优良种性, 而通过常规杂交育种周期较长, 选育一个品种往往需十几年, 甚至数十年。针对牡丹组培的研究已有报道但还不成熟^[1-3], 总结前人经验的基础上对牡丹种子胚培养条件做了进一步探索, 旨在为通过基因工程途径改良牡丹性状提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

‘凤丹’种子采自河南省洛阳市国家牡丹基因库, 2007年9月中旬采收, 室内阴干后贮藏备用。

1.2 方法

1.2.1 不同浓度 GA₃ 浸泡 ‘凤丹’种子选取饱满、颜色光亮的‘凤丹’种子, 用清水洗去表面杂质, 拿滤纸吸干种子表面水分, 然后放入不同浓度的 GA₃ 溶液中, 浓度梯度设置 3 个, 分别为 100、300、500 mg/L, 对照用蒸馏水浸泡处理。每一处理 15 粒种子, 重复 2 次, 浸泡时间为 48 h, 温度为 (20±2) °C。培养时间为 30 d, 统计各个处理的萌发率和褐化率。

萌发率=萌发的胚数/该处理中无污染胚数;

褐化率=褐化的胚数/该处理中无污染胚数。

1.2.2 ‘凤丹’胚培养之基本培养基筛选 以 MS、1/2MS、1/2MS+Ca²⁺ 及 1/2MS+1 g/L 胚乳水提液为 4 种基本培养基, 调查种胚的萌发生长效果。培养 30 d 后统计各个处理的萌发率和褐化率。

第一作者简介: 刘会超(1964), 男, 河南南阳人, 博士, 教授, 现从事花卉栽培生理和分子生物学等方面的教学和研究工作。

基金项目: 河南省创新人才工程资助项目(2005-126-49); 河南科技学院博士基金资助项目(050106)。

收稿日期: 2008-08-21

1.2.3 不同激素组合诱导 ‘凤丹’种胚生长 在基本培养基中附加不同植物激素, 组成 9 种培养基 (见表 1), 所有培养基中均加入蔗糖 35 g/L, 琼脂 5.3 g/L, 调节 pH 值 5.8。培养 30 d 后统计污染胚数、褐化率、玻璃化率、不增大胚率、萌发率、胚轴膨大率。

表 1 ‘凤丹’胚培养培养基成分的组成 mg/L

处理号	BAP	NAA	GA ₃
L1	0.5	0.1	0.5
L2	0.8	0.2	0.5
L3	1.0	0.3	0.5
L4	1.0	0.2	0.5
L5	1.2	0.3	0.5
L6	0.5	—	—
L7	—	—	0.5
L8	0.1	—	—
L9	0.05	—	0.25

注: 试验中的基本培养基为 1/2MS+Ca²⁺。

1.2.4 消毒和接种 选取经过低温层积(4 °C)50 d 的‘凤丹’种子, 流水冲洗干净, 用 800 倍的多菌灵浸泡 15 min 后, 用蒸馏水冲洗 3 次, 在室温下用蒸馏水浸泡 24 h 后置于超净工作台上, 用 75%(v/v)乙醇消毒 30 s, 无菌水冲洗 1 次, 再用 0.1%的 HgCl₂ 浸泡 10 min, 无菌水冲洗 5~6 次, 每次持续 1 min。剥出种胚, 接种于不同培养基上, 每瓶接种 2 个胚 每个处理接种 5~6 瓶, 重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 GA₃对打破 ‘凤丹’种子上胚轴休眠的效果

由表 2 可知, 种子的萌发率与 GA₃ 浓度大小有关。种子的萌发率随 GA₃ 浓度的增加而升高, 由 100 mg/L 时的 16.7%增加到 500 mg/L 时的 52.6%, 增长了 36%。可见 GA₃ 可有效打破凤丹种子上胚轴休眠, GA₃ 浓度对发芽率有较大影响。对照组和 500 mg/L GA₃ 处理其褐化率均为 0%, 而 100 mg/L 和 300 mg/L 的 GA₃ 处理对胚的褐化影响不大。

表 2 不同浓度 GA₃ 处理对‘凤丹’种子萌芽率、褐化率的影响

GA ₃ 溶液浓度/mg · L ⁻¹	接种胚数	萌芽率/%	褐化率/%
CK	24	12.5	0
100	30	16.6	3.3
300	30	23.3	6.7
500	19	52.6	0

2.2 ‘凤丹’胚培养之基本培养基筛选

由表 3 可知,在 4 种处理中萌芽率最高的为 SX2(1/2MS),达到 100%,但是其褐化率较高,故胚培养时不宜采用。而 SX3(1/2MS+Ca²⁺)褐化率较低,并且胚的萌芽率与其它 3 种处理间差异不显著,因此可以作为胚培养的基本培养基。

表 3 ‘凤丹’胚培养基本培养基筛选 30 d

处理号	处理	接种胚数	萌芽率/%	褐化率/%
SX1	MS	19	89.5a	63.2ac
SX2	1/2MS	18	100a	77.7ac
SX3	1/2MS+Ca ²⁺	24	83.3a	25b
SX4	1/2MS+1g 胚乳	23	86.9a	78.3c

注:表中数字后字母表示邓肯氏分析结果。P=0.05。

2.3 不同培养基中的激素组合对‘凤丹’种胚生长的影响

胚根与胚芽的生长主要受培养基中植物激素的影响

表 4 不同植物激素组合对种胚启动培养的影响 30 d

培养基指标	处理编号									
	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	
无污染的胚数	28	30	28	28	28	22	32	14	20	
褐化率/%	53.6	6.7	17.9	35.7	28.6	18.2	6.3	28.6	10.0	
不增大胚率/%	64.3	3.3	17.9	17.9	32.1	27.3	0	50.0	20.0	
萌芽率/%	75	96.7	82.1	78.6	71.4	81.8	93.8	71.4	80.0	
胚轴膨大率/%	57.1	93.3	85.7	75	67.9	81.8	93.8	50	75	

注:b:褐化胚数/a、c:不增大胚数/a、d:萌发的胚数/a、e:胚轴膨大数/a



图 1



图 2

3 结论与讨论

将‘凤丹’种子用 100~500 mg/L 的 GA₃ 浸泡 48 h,对打破‘凤丹’种子上胚轴休眠具有一定作用,胚的萌芽率随 GA₃ 浓度的升高而增加,其中以 500 mg/L GA₃ 处理的效果最好。这与张玉刚等^[4]报道的‘凤丹’种子上胚轴休眠可以被 100 mg/L GA₃ 处理 24 h 打破休眠的结论基本一致。

在胚的启动培养阶段,不加或者少加 BAP、NAA 可以减少胚的褐化和胚轴的愈伤组织化,这对后期幼苗的生根有益,总之 1/2MS+Ca²⁺+0.5 mg/L GA₃ 为胚培养

最佳培养基。在 9 个处理组合中, L1 的褐化率最高,达 53.6%, L7 的褐化率最低仅 6.3%,由此可见,在种胚的启动培养阶段,减少或不使用 BAP、NAA、IBA 对减轻种胚褐化有帮助;林松明等研究发现^[3]在 4℃条件下,打破‘凤丹’种子上胚轴休眠的临界低温期介于 20~25 d 之间,此试验中 4℃低温处理的时间为 40 d。在所有处理中 L1 的不增大胚率最高达 64.3%,而 L7 的所有种胚均正常增大。L2 的萌芽率最高达 96.7%, L5 和 L8 最低,均为 71.4%;在接种种胚 1 周后,胚轴即开始膨大,30d 后 L7 的胚轴膨大率最高达 93.8%,而 L8 的胚轴膨大率最低,仅 50%。

在幼苗的长势方面,所有组合中只有 L2、L3、L7 长势较好,其中 L7 长势最好(见图 1),幼苗的子叶呈现淡绿色,胚轴显著伸长,胚根伸出,并着生少量根毛,其叶柄特长,远较 L2 和 L3 处理中的叶柄长,而 L2 和 L3(见图 2)中的幼苗株型较矮,胚轴膨大,子叶颜色与 L7 同,只是胚根未伸出。L1、L4、L5、L6、L8、L9 这几个处理长势差,叶片和胚轴边缘有轻微的褐色斑点,胚根也均未伸出。

最佳培养基。

试验中,在 1/2MS 培养基中添加 1 g/L 胚乳水提液,‘凤丹’胚的萌发受到抑制,这与杨红超^[5]报道的在培养基中加入胚乳液抑制胚萌发的观点相似,所不同的是在杨红超的试验中,全部胚均没有萌发。而在该试验中,胚的萌发率高达 86.9%,与其相对应,在没有添加胚乳水提液的 1/2MS 培养基中,胚的萌发率达 100%,因此认为胚乳在一定程度上抑制胚的萌发,但并不是完全抑制其萌发,究竟是何种物质抑制其萌发,有待进一步研究。

参考文献

[1] 黄守印. 牡丹胚培养与植株再生[J]. 植物生理学通讯, 1987(2): 54-55.
 [2] 周仁超, 姚崇怀. 紫斑牡丹胚培养与植株再生[J]. 亚热带植物科学, 2001, 30(3): 62.
 [3] 林松明, 徐迎春, 蔡志仁, 等. 打破‘凤丹’种子上胚轴休眠的研究[J]. 江苏农业科学, 2006(1): 84-86.
 [4] 张玉刚, 郭绍霞, 王蓬英. 牡丹容器育苗的初步研究[J]. 中国农学通报, 2004, 20(1): 182-184.
 [5] 杨红超, 裴冬丽. 牡丹种子胚培养研究[J]. 广西农业科学, 2006 3(2): 108-110.

蔗糖和 PEG 对山茶花花粉离体萌发的影响

张 涛, 黄 敏

(重庆师范大学 生命科学院, 重庆 400047)

摘 要:以山茶花为材料, 研究不同浓度的蔗糖和 PEG 对茶花花粉离体萌发的影响。结果表明: 添加适当浓度的蔗糖和 PEG 有利于山茶花花粉的萌发和花粉管的生长, 但是随着浓度的升高对花粉的萌发有一定抑制作用。当蔗糖浓度为 20 g/L、PEG 浓度为 15 g/L 时花粉的萌发率最高。

关键词: 山茶花; 花粉萌发; 蔗糖; PEG

中图分类号: S 685.14 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)01-0101-02

茶花, 又称山茶花(*Camellia japonica* L.), 是我国传统的十大名花之一, 也是世界的名贵花木之一。山茶花的花期一般为 1~3 个月, 始花温度 2℃, 属典型的冬、春花卉, 有着重要观赏价值^[1]。研究发现, 人工辅助授粉或杂交授粉是常规育种研究中培育新品种的重要途径, 而花粉采集、贮藏以及生活力检测是人工授粉的重要环节, 因此, 开展山茶花花粉生活力的研究, 可以为杂交育种提供理论基础。花粉生活力的测定方法常用的有: 花粉萌发、核及原生质染色、酶测试及荧光染色法^[2-3]。其中花粉萌发法更接近自然实际情况, 而且这种方法还为以克服不亲和性为目的的试管受精和通过花粉进行基因转移等新技术研究奠定基础。

目前关于山茶花的离体萌发没有太多的相关报道, 魏岩等报道 5%、10% 的 2 种蔗糖浓度培养液对山茶花粉萌发的影响差异不显著, 而不同的硼酸浓度对山茶花粉的萌发有极其显著的影响^[4]。试验旨在研究蔗糖和

PEG 对山茶花花粉离体萌发和花粉管生长的影响, 为开展山茶花的人工授粉及新品种培育提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

以重庆师范大学校园内山茶花为试验材料, 在早晨 9:00 采集新开放的花蕾, 剥取花药, 盛于培养皿中, 置于人工气候室 25℃ 培养, 使其开裂, 置 4℃ 冰箱中保存备用。

1.2 方法

1.2.1 培养基 花粉培养基以不同浓度蔗糖和 PEG-4000 为主要成分, 组合设计出 8 种培养液, 即 50 mg/L H_3BO_4 + 10 mg/L $MgSO_4$ + 20 g/L 蔗糖 + 不同浓度 PEG-4000 (5、10、15、20 g/L); 50 mg/L H_3BO_4 + 10 mg/L $MgSO_4$ + 15 g/L PEG-4000 + 不同浓度蔗糖 (5、10、20、40 g/L), 用以研究蔗糖和 PEG-4000 对山茶花花粉离体萌发和花粉管生长的影响。

1.2.2 花粉的提取 取即将散粉的山茶花花药置于 1.5 mL 离心管中, 为了降低花粉发育时期不同给试验造成的误差, 每个离心管中置 10 枚采自不同小花的花药。在离心管中分别加入等量的 8 种液体培养基, 用镊子夹破花药, 释放出花粉粒。

第一作者简介: 张涛(1971-), 男, 博士, 教授, 主要从事遗传及细胞生物学研究工作。E-mail: zht2188@126.com.

收稿日期: 2008-08-10

Preliminary Research on Embryo Culture of Peony Seed

LIU Hui-chao¹, LIU Lei², JIA Wen-qing¹, BAI Zhi-chuan²

(1. Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang Henan 453003, China; 2. Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: Dormant effects of treatment with different concentration of GA_3 on peony seeds were studied. The germination ratio was 52.6% when peony seeds were treated by 500 mg/L GA_3 for 48h. The four kinds of medium were studied, 1/2MS + Ca^{2+} was the basic medium of embryo culture. The best medium of embryo culture was 1/2MS + GA_3 0.5 mg/L.

Key words: Peony; Mature embryo; Culture in vitro