

三色堇花药培养技术研究初探

刘 辉, 傅巧娟, 陈 一

(杭州市农业科学研究院 园艺研究所, 浙江 杭州 310024)

摘 要:研究了三色堇花蕾消毒方法、花蕾低温预处理和不同培养基组分对花药愈伤组织诱导率及其分化的影响。结果表明:采用 0.1% HgCl_2 灭菌 20 min 是三色堇花蕾较为理想的表面灭菌时间。基因型不同花药愈伤组织的诱导率也不尽相同,而且愈伤组织的诱导率总体不高。选择合适的培养基组分、激素种类和其配比以及合适的培养条件可能是影响三色堇花药培养成功的关键因子。

关键词:三色堇;花药;组织培养

中图分类号:S 681.9 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2011)16-0161-03

三色堇(*Viola × wittrockiana*)为堇菜科堇菜属多年生草本植物,又名蝴蝶花、猫儿脸,其色彩丰富艳丽、品种繁多、花色多变、花期长、适应性强,是当前我国优良的重要花坛绿化草花。另外,三色堇较耐低温,可耐-15℃低温,在昼温 15~25℃、夜温 3~5℃条件下植株发育良好,因此也是我国冬、春季节不可多得的重要花坛绿化草花。由于三色堇具有明显的杂种优势,观赏性强,目前市面上销售的三色堇种子多为 F_1 代。利用杂种优势进行杂交育种的关键是获得优良性状的纯系父母本(自交系)。为了获得自交系,按常规的自交方法,需要耗费大量的田间土地、时间和劳力,一般需要 5~6 a 的时间,而且手续十分繁琐,最终的纯度也不够理想。而采用花药培养获得单倍体再加倍的方法,只需 1 a 时间就可以获得和多代自交效果相同的纯系,可以极大地缩短杂交育种年限,提高育种效率。

该试验研究了三色堇花药培养的技术和条件,初步探讨了影响三色堇花药组织培养的因素,以期最终获得单倍体植株,并在较短的时间内培育出三色堇育种亲本。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选用生产上常用的 2 个三色堇品种:‘清新绯红’和‘想象力紫色’,种子由浙江虹越花卉有限公司提供。三色堇于 2009 年 9 月中旬种植在杭州农业科学院园艺所试验基地,于 2010 年 3 月上旬开始采集花蕾进行

研究。根据杨宏光等^[1]对三色堇小孢子发育时期与花器形态相关性分析的研究,选取纵径长度 14~15 mm 与横径 3~5 mm 的花蕾,此时期的花蕾多处于单核靠边期。

1.2 试验方法

1.2.1 花蕾消毒方法研究 将选好的花蕾放在自来水下冲洗 5 min,再用蒸馏水冲洗 3 次后用吸水纸吸干水分。在超净工作台上,用 75% 的酒精消毒 1 min,再用无菌蒸馏水冲洗 3 次后用 0.1% HgCl_2 进行消毒,消毒时间设为 10、15、20、25 和 30 min。消毒完后用无菌蒸馏水冲洗 4 次,然后接种在 Nitschl 培养基上,培养室温度(25±1)℃,暗培养。每处理 10 瓶,每瓶接种 6 个花蕾,接种 7 d 后统计 1 次污染率。Nitschl 基本培养基,附加 7 g/L 琼脂和 20 g/L 麦芽糖,pH 5.8。污染率=(污染的花蕾数/接种的花蕾总数)×100%。

1.2.2 花蕾低温预处理 对选定好的花蕾以 5℃冷藏 1、2、3 和 4 d;采用 0.1% HgCl_2 消毒 20 min 对处理好的花蕾消毒,然后用镊子剥去花萼、花瓣,取出花药,去净花丝后接种在 Nitsch2 培养基上,每瓶接种 10 个花药,各接 5 瓶。每隔 3 d 观察 1 次各瓶花药的启动情况,接种后 30 d 统计各花药愈伤组织的启动率情况。培养室温度(25±1)℃,培养条件暗培养。Nitsch2 基本培养基,附加 1.0 mg/L 6-BA、0.5 mg/L NAA、0.5 mg/L IBA、7 g/L 琼脂和 20 g/L 麦芽糖,pH 5.8。启动率=(膨大的花药数/接种的花药总数)×100%。

1.2.3 花药愈伤组织的诱导 对选定好的花蕾以 5℃冷藏 2 d,按上述花蕾消毒方法和花药剥取方法,将花药接种在含不同激素的培养基上,每瓶接种 10 个花药,各接 5 瓶。培养基种类分为 Nitsch 基本培养基和 MS 基本培养基,各培养基附加 7 g/L 琼脂和 20 g/L 麦芽糖,pH 5.8。培养室温度(25±1)℃,培养条件暗

第一作者简介:刘辉(1979-),男,山东泰安人,在职博士,农艺师,现主要从事观赏植物栽培技术与分子育种研究工作。E-mail:liuhui518lh@163.com。

基金项目:杭州市科技局科技计划资助项目(20101032B10)。

收稿日期:2011-05-20

培养。愈伤组织诱导前期每 20 d 换 1 次新鲜的原培养基,待愈伤组织形成后及时将初代愈伤组织转接到新鲜的原培养基上进行继代培养。每隔 3 d 观察 1 次各瓶花药的诱导情况,接种后 40 d 统计各处理花药愈伤组织诱导率。诱导率=(形成愈伤组织的花药数/接种的花药总数)×100%。

1.2.4 花药愈伤组织的分化 将继代 1 次后获得的愈伤组织转接到分化培养基上进行不定芽的分化。各处理共接 10 瓶,每瓶接种 6 块愈伤组织。接种后每 30 d 统计 1 次分化率。分化培养基:Nitsch 基本培养基,7 g/L 琼脂,20 g/L 麦芽糖和 0.5 g/L 脯氨酸,pH 5.8,分别附加 1 mg/L 6-BA 和 1 mg/L KT,或 1 mg/L TDZ 和 0.1 mg/L IBA。培养室温度(25±1)℃,光照培养(光照强度为 200 μmol·m⁻²·s⁻¹),光照周期 14 h(5:00~19:00)。

2 结果与分析

2.1 不同灭菌时间对三色堇花药污染率的影响

由表 1 可知,短时间的 0.1% HgCl₂ 灭菌,三色堇花药污染率较高,而随着灭菌时间的延长,接种的花药污染率逐渐下降,当灭菌时间为 20 min 时,污染率下降到 10%,25 min 以上时基本没有污染。由于 HgCl₂ 是一种杀伤力很强的消毒剂,消毒时间过长会对细胞产生毒害作用,抑制细胞生长。表明 2 个三色堇品种的花药在 HgCl₂ 灭菌时间为 20 min 时污染率较低,因此为了减少 HgCl₂ 对花药内花药的损伤,进而影响愈伤组织的诱导,采用 0.1% HgCl₂ 灭菌 20 min 是三色堇花药较为理想的表面灭菌时间。

表 1 不同灭菌时间对三色堇花药污染率的影响

品种	消毒时间/min	污染数/瓶	污染率/%
‘清新绯红’	10	8	60
	15	5	50
	20	1	10
	25	0	0
	30	0	0
‘想象力紫色’	10	7	60
	15	4	40
	20	1	10
	25	0	0
	30	0	0

注:每一处理 10 瓶,每瓶接种 6 个花药,接种 7 d 后统计 1 次污染率。

2.2 不同低温预处理时间对三色堇花药愈伤组织启动率的影响

已有研究表明,在花药培养前对花药预处理可提高花药的出愈率,花药预处理包括低温、高温等处理,其中低温处理方法比较常用^[2]。该试验以花药初期膨大即表明花药有可能诱导出愈伤组织为判断依据(表 2),不同的低温预处理时间对 2 个品种的花药愈伤组织启动率有明显差异,5℃ 处理 2 d 的 2 个品种花药均有明显膨大现象,‘清新绯红’和‘想象力紫色’的启动

率分别为 25.6% 和 26.3%,表明低温处理 2 d 能明显促进花药愈伤组织的形成。

表 2 不同低温预处理时间
对三色堇花药愈伤组织诱导率的影响

品种	低温处理时间/d	启动率/%
‘清新绯红’	1	13.5
	2	25.6
	3	21.2
	4	18.3
‘想象力紫色’	1	10.5
	2	26.3
	3	24.3
	4	15.6

注:每瓶接种 10 个花药,各接 5 瓶。下同。

2.3 不同培养基组分对三色堇花药愈伤组织诱导率的影响

培养基的种类、激素水平和配比对诱发细胞的分裂、生长和分化起着决定性作用。采用不同的培养基种类和激素配比对三色堇花药愈伤组织诱导率的研究表明(表 3-A),在相同培养基成分的条件下,Nitsch 培养基比 MS 培养基有利于三色堇花药愈伤组织的形成,而 MS 培养基对三色堇花药愈伤组织诱导率差异不明显;结果还表明,在同为 Nitsch 基本培养基条件下,6-BA 对诱导三色堇花药愈伤组织起着重要作用,2 个品种间差异明显,‘清新绯红’在添加有 1.0 mg/L 6-BA 培养基上有最高的花药愈伤组织诱导率,达到 21.4%,而‘想象力紫色’则在 1.5 mg/L 6-BA 培养基上有最高的花药愈伤组织诱导率,达到 25.6%。

表 3 不同培养基水平和配比
对三色堇花药愈伤组织诱导率的影响

A					
培养基种类		生长调节剂		诱导率/%	
	6-BA/mg · L ⁻¹	IBA/mg · L ⁻¹		‘清新绯红’	‘想象力紫色’
Nitsch	0			0	0
	0.5			17.4	12.3
	1.0			21.4	20.8
	1.5			20.3	25.6
	2.0			14.5	18.6
MS	0	0.5		5.6	10.5
	0.5			12.9	14.5
	1.0			15.6	14.6
	1.5			17.3	12.6
	2.0			14.5	13.7

B					
培养基		生长调节剂		诱导率/%	
种类	6-BA/mg · L ⁻¹	IBA	NAA/mg · L ⁻¹	‘清新绯红’	‘想象力紫色’
Nitsch	0.5	0.2	0.5	21.3	19.8
	1.0	0.2	0.5	27.6	22.5
	0.5	0.5	0.5	15.6	17.3
	1.0	0.5	0.5	12.3	26.9
	0.5	0.5	1.0	11.3	12.7

为了获得更为理想的诱导三色堇花药愈伤组织的

激素水平和配比,该试验还研究了 6-BA、IBA 和 NAA 组合对三色堇花药愈伤组织诱导率的影响。由表 3-B 可知,不同激素种类及浓度对 2 个品种的花药愈伤组织诱导率有明显差异,‘清新绯红’在添加有 1.0 mg/L 6-BA、0.2 mg/L IBA 和 0.5 mg/L NAA 培养基上有最高的愈伤组织诱导率,达到 27.6%,而‘想象力紫色’则在 1.0 mg/L 6-BA、0.5 mg/L IBA 和 0.5 mg/L NAA 培养基上有最高的花药愈伤组织诱导率,达到 26.9%。

2.4 不同培养基组分对花药愈伤组织分化的影响

该研究将继代 1 次后获得的各花药愈伤组织选取较好的转接到不同的分化培养基上进行不定芽的诱导,30 d 后的统计结果表明,2 个品种的所有愈伤组织在 2 种培养上均不能分化,最后褐化死亡。可见,三色堇花药虽能诱导形成愈伤组织,但形成的愈伤组织进一步分化难度很大,不能获得再生植株。

3 讨论与结论

目前,三色堇是我国重要的花坛和盆栽花卉,市场需求量大,然而其育种研究远远落后于其广泛的园林应用现状^[3]。国内有关三色堇花药培养的研究特别少,而通过三色堇花药培养成功获得再生植株的研究更是鲜有报道。该文对三色堇花药组织培养进行了初步研究,结果表明,三色堇花蕾通过低温预处理 2 d 后

能提高花药愈伤组织诱导率,但进一步的研究显示,继代后的愈伤组织分化出不定芽的能力很差,不能获得再生植株。有关园艺植物花药培养的研究认为,基因型、小孢子发育时期、培养基成分(基本培养基种类、激素、碳源、附加成分)及培养条件是影响花药培养成功的主要因素^[4]。该研究采用 2 个不同基因型的三色堇品种进行花药培养研究,尽管基因型不同花药愈伤组织的诱导率也不尽相同,但愈伤组织的诱导率总体不高,最高不到 30%,而且最终均没有成功获得再生植株。因此,选择合适的培养基组分、激素种类及其配比以及合适的培养条件可能是影响三色堇花药培养成功的关键因子。在下一步的试验中,将在此基础上对三色堇花药培养做更为深入的研究。

参考文献

- [1] 杨宏光,孙晓梅,王孝鹏,等. 三色堇小孢子发育时期与花器形态相关性分析[J]. 沈阳农业大学学报,2008,39(5):621-624.
- [2] Yu rong-chen,Edward O,Kenaschuk,et al. Plant regeneration from anther culture in Canadian cultivars of flax(*Linum usitatissimum* L.)[J]. Euphytica,1998,102:183-189.
- [3] 张其生,包满珠,卢兴霞,等. 大花三色堇育种研究进展[J]. 植物学报,2010,45(1):128-133.
- [4] 张绿萍,陈红. 园艺植物花药培养研究进展[J]. 安徽农业科学,2007,35(17):5140-5142.

Elementary Study on Anther Culture of Pansy(*Viola × wittrockiana*)

LIU Hui,FU Qiao-juan,CHEN Yi

(Department of Horticulture, Hangzhou Academy of Agricultural and Sciences, Hangzhou, Zhejiang 310024)

Abstract: The effects of different ways of bud sterilization, bud cold pretreatment, different combinations of plant growth regulators on callus induction rate of anther and plant regeneration of Pansy were investigated. The results showed that 20 min with 0.1% HgCl₂ was an ideal bud surface sterilization time, and obvious difference was detected between two genotypes in their effect on callus initiation of anther, but the overall rate of callus induction was not high. It may be suggested that the kind and concentration of hormones and culture conditions should be key factors for successful anther culture of pansy.

Key words: *Viola × wittrockiana*; anther; tissue culture

肥害预防措施

熏伤型肥害主要是施用氨水、碳酸氢铵等肥料,这类化肥在气温较高时施用,容易产生大量的氨气,对农作物造成伤害,轻者使下部叶尖发黄,影响生长发育,重者使全株赤黄枯死。预防:该类肥料应避免在高温时施用。

烧种型肥害为施种肥时用量过大,或用过磷酸钙、碳酸氢铵、尿素、石灰氮等化肥拌种,常常会出现烧种,导致缺苗。预防:种肥用量不可过大,不用过磷酸钙、碳酸氢铵、尿素、石灰氮等拌种。

毒害型肥害有些化肥如石灰氮,施入土壤后,要经过一系列转化才能被植物吸收,但在转化过程中会产生一些有毒物质毒害农作物,使其受害或死亡。预防:在施用肥料时要严格控制施用量,安全合理施用化肥。

(来源:农民日报)