

五种枸杞植物胚乳培养三倍体的诱导研究

米佳丽^{1,2}, 曹有龙², 王 俊¹

(1. 宁夏大学 生命科学学院 宁夏 银川 750021; 2. 宁夏农林科学院 枸杞工程技术研究中心 宁夏 银川 750002)

摘 要: 选取宁夏农林科学院枸杞研究中心培育的 5 种优质枸杞品种(系), 研究了不同激素配比的培养基以及胚因子对不同基因枸杞胚乳诱导及分化的影响, 以选择适合不同品种枸杞胚乳植株再生的最佳条件, 从而进行三倍体育种。结果表明: 5 种材料都诱导出了愈伤组织, 在不去胚情况下, 最高诱导效率达到 80.0%; 将愈伤组织分别转入 5 种激素配比的分化培养基中, MS+0.2 mg/L 6-BA +0.01 mg/L NAA +3%蔗糖+0.4%琼脂为最适分化培养基, 且宁杞 3 号分化率最高达 10.7%; 将分化出的绿色小芽转入 1/2MS+0.01 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA 生根培养基中诱导生根, 15 d 后形成再生植株。

关键字: 枸杞; 胚乳; 愈伤组织; 三倍体植株

中图分类号: S 665.903.6 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2011)09-0141-04

枸杞是我国的一种常用名贵中药, 商品上以粒大、肉厚、籽少者为佳。根据胚乳细胞具有一般植物细胞所有的“全能性”, 以及大多数被子植物的胚乳是精子和 2 个极核融合的产物, 都是三倍体的特点。三倍体植物具有无籽特性, 科学工作者从 20 世纪 30 年代开始就对胚乳组织进行培养的试验, 以期得到三倍体植株, 探索获得无籽、大果品种的新途径^[1]。这方面在果树上取得了进展^[2]。我国自 20 世纪 80 年代, 顾淑荣等就通过枸杞胚乳离体培养得到了再生植株, 并初步鉴定了其再生植株染色体倍性^[3,4]。20 世纪 90 年代初, 顾淑荣等通过枸杞胚乳愈伤组织细胞悬浮培养获得再生植株并进行了细胞学观察^[5]。此后, 对枸杞胚乳培养的研究一直未有过多报道, 并且枸杞育种单一阻碍了枸杞组织培养的发展。该试验选取宁夏农林科学院枸杞研究中心培育的 5 种优质枸杞品种(系), 研究不同激素配比的培养基以及胚因子对不同基因枸杞胚乳诱导及分化的影响, 以选择适合不同品种枸杞胚乳植株再生的最佳条件, 从而进行三倍体育种, 以利用杂种优势, 缩短育种年限和提高育种效率; 加快枸杞育种的选育进程, 为枸杞遗传改良和遗传基础物质研究提供理论依据, 从而推动我国枸杞产业的快速发展。

1 材料与方法

1.1 试验材料

第一作者简介: 米佳丽(1985-), 女, 山西晋中人, 在读硕士, 研究方向为植物资源。
基金项目: 国家科技支撑计划资助项目(2009BAI72B01); 国家自然科学基金资助项目(30760127)。
收稿日期: 2011-02-21

供试材料为宁夏农林科学院枸杞研究中心培育的优质枸杞新品种(系)——宁杞 1 号、宁杞 2 号、宁杞 3 号、0207 号枸杞、0901 号枸杞。

1.2 试验方法

1.2.1 愈伤组织的诱导 采回新鲜果实, 在超净工作台上, 用 70%的酒精中浸泡 30 s 后, 再用 0.1%HgCl₂ 溶液浸泡并充分振荡 6~7 min, 无菌水冲洗 3~4 次, 然后将果实放在覆有滤纸的灭菌培养皿内, 选取饱满的种子, 沿背腹切开, 一部分用解剖针将胚去掉, 取出胚乳接种于 MS 含不同激素配比的 6 种固体培养基上, 另一部分将未去掉胚的胚乳接种于 6 种培养基上(表 1), 带胚培养经过 2 周, 当一定量的胚乳愈伤组织出现时, 再将胚去掉, 以免混淆。蔗糖浓度为 50 g/L, 琼脂浓度为 4 g/L, 每瓶接种 6 个胚乳。在温度为(25±1)℃、光照 12 h/d、2 000 lx 条件下培养, 培养周期为 20~30 d。25 d 统计愈伤组织诱导率。

表 1		不同激素组合配比			mg/L
激素组合	2, 4-D	KT	6-BA	NAA	
P1	0.5	0.5			
P2	1.0	0.5			
P3	0.5		0.5		
P4	1.0		0.5		
P5			1.0		1.0
P6			1.5		1.0

注: 基本培养基为 MS+5%蔗糖+0.4%琼脂。

1.2.2 愈伤组织分化及植株再生 把初生愈伤组织切成 0.5 cm 分别转入 5 种分化培养基中(表 2), 在(25±1)℃、光照 12 h/d、2 000 lx 培养, 40 d 后统计愈伤组织分化率, 将无根的幼苗切下, 转入生根培养基 1/2MS+0.01 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA+3%蔗糖+0.4%琼脂上进行生根培养。

表 2	不同分化培养基	mg/L
培养基	分化培养基	
F1	6-BA 2.0	
F2	6-BA 2.0+NAA 0.5	
F3	6-BA 0.5+NAA 0.5	
F4	6-BA 0.2+NAA 0.01	
F5	6-BA 0.5+NAA 0.01	

注 基本培养基为 MS+3%蔗糖+0.4%琼脂。

2 结果与分析

2.1 胚乳愈伤组织的诱导

胚乳在诱导培养基上培养 1 周后,局部发生膨大,出现淡绿色愈伤组织,同时,局部发生褐化,20 d 左右部分愈伤组织已至蚕豆大小,并且渐变为淡黄色,疏松。

2.1.1 不同基因型及激素配比对愈伤组织诱导的影响

由表 3.4 可知,所有材料在不同激素配比的培养基上都获得了愈伤组织,但诱导率因材料和培养基配方不同而存在区别。从培养基激素配比方面来看,无论去胚培养与否,5 种材料在 P1、P2 培养基上的愈伤组织诱导率均显著高于其它培养基。并且,在去胚培养下,供试材料中以宁杞 2 号在 P1 培养基中诱导率最高,达 72.2%,在不去胚培养下,宁杞 2 号在 P2 培养基上诱导率最高,达到 80.0%。可见,2,4-D 和 KT 组合是大多数枸杞胚乳较为适用的一种培养基配方。其次,P3、P4 培养基愈伤组织诱导率较高,均与 P5、P6 培养基呈极显著差异。3 种激素组合的培养基诱导出的愈伤组织有不同的特点:①2,4-D 和 KT,愈伤组织为淡黄色,松散且生长较快。②2,4-D 和 6-BA,淡黄绿色或黄色愈伤组织,较松

散。③6-BA 和 NAA,诱导率极低,形成少量绿色致密型愈伤组织,生长缓慢。前二者的愈伤组织诱导率、质地与生长状况可以说明,2,4-D 在枸杞胚乳愈伤组织诱导中起到了相当大的作用。另外,不去胚情况下,虽然 P2 诱导率偏高,但愈伤组织有部分呈松散柔软状,易褐化,不利于分化培养,因而 2,4-D 0.5 mg/L 时,诱导效果最佳。从不同基因型来看,去胚培养,供试材料中以宁杞 2 号诱导率最高,平均达 59.0%,与其它材料的差异均达到极显著水平。宁杞 1 号、宁杞 3 号、09-01 之间诱导率差异不大,而 02-07 诱导率最低,平均达 43.0%,与以上 3 种呈极显著差异。不去胚培养,供试材料中宁杞 2 号、宁杞 3 号诱导率差异不显著,分别为 70.1%和 68.5%,宁杞 1 号与 09-01 诱导率之间的差异不大,而 02-07 诱导率仍为最低,达 47.8%。可见,宁杞 2 号比较容易诱导,而 02-07 相对比较难诱导。

2.1.2 不同材料在胚因子影响下愈伤组织的诱导率 Srivastava(1971)推测,原位胚的参与之所以能对胚乳产生活化的作用,是因为胚在萌发时能产生某种物质,即所谓“胚因子”。通过试验证明,无论胚是否存在,5 种材料胚乳均可诱导出愈伤组织,胚的存在可明显提高诱导率。胚存在的情况下,接种 4~5 d 后,胚产生绿色愈伤组合,6~7 d 胚乳局部也开始产生白色或淡绿色愈伤组织(图 1-1),而去胚的胚乳在接种 9~10 d 后才局部膨大产生愈伤组织。由表 3.4 可知,不去胚培养中诱导率最高为 80.0%,而去胚培养中最高诱导率为 72.2%。5 种基因型材料不去胚培养平均诱导率高于去胚培养。

表 3 去胚培养对枸杞胚乳诱导的影响

试材	培养基代号						平均值
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	
宁杞 1 号	58.3	56.7	58.3	52.8	40.0	37.5	50.6bB
宁杞 2 号	72.2	66.7	61.1	60.0	47.2	46.7	59.0aA
宁杞 3 号	56.7	58.3	55.6	56.7	43.3	41.7	52.1bB
02-07	46.7	50.0	44.4	43.3	37.5	36.1	43.0cC
09-01	55.6	53.3	54.2	53.3	44.4	38.9	50.0bB
平均值	57.9aA	57.0aA	54.7abA	53.2bA	42.5cB	40.2cB	

注 不同大、小写字母表示 LSD 法多重比较在 0.01 和 0.05 水平上差异显著。下表同。

表 4 不去胚培养对枸杞胚乳诱导的影响

试材	培养基代号						平均值
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	
宁杞 1 号	69.4	73.3	69.4	66.7	53.3	52.8	64.2bB
宁杞 2 号	76.7	80.0	75.0	73.8	58.3	56.7	70.1aA
宁杞 3 号	77.8	75.0	73.3	76.7	55.6	52.8	68.5aAB
02-07	50.0	52.8	50.0	47.2	46.7	40.0	47.8cC
09-01	70.0	72.2	66.7	63.9	55.6	54.2	63.8bB
平均值	68.8abA	70.7aA	66.9abA	65.7bA	53.9cB	51.3cB	

2.2 愈伤组织的分化和植株再生

将5种材料产生的愈伤组织切割成0.5 cm左右的小块,接种于5种分化培养基上。转接7 d后愈伤组织有明显的膨大,并且由淡黄色渐渐转变为淡绿色或绿色,半个月后,愈伤组织上有绿色的芽点产生,绿色芽点产生约15 d后有分化出的1~2 cm的无根幼苗。其中有的绿色芽点颜色较深,之后分化出一种膨胀状态的大型叶状体,这种状态是玻璃化严重而造成的。分化出的幼苗有茎和叶,茎较长,这种分化苗较易生根成活(图1-2);另外一种再生幼苗最先只有叶且有的成簇,之后分化出的茎很短,这种幼苗在接种于生根培养基上往往不易成活。将分化出的无根幼苗转入到生根培养基(1/2MS+0.01 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA+3%蔗糖+0.4%琼脂)上进行生根培养,得到再生植株(图1-1~3)。

表 5 不同激素配比对不同枸杞胚乳愈伤组织分化的影响

试材	培养基代号					平均值
	P1	P2	P3	P4	P5	
宁杞1号	0	0.7	2.0	5.3	3.3	2.3abAB
宁杞2号	0	0	2.7	3.3	4.7	2.1abAB
宁杞3号	0	0.7	2.0	10.7	7.3	4.1aA
02-07	0	0	0.7	2.7	2.0	1.1bB
09-01	0	0	0.7	4.0	2.0	1.3bB
平均值	0bC	0.3bC	1.6bBC	5.2aA	3.9aAB	

注:统计中出苗个数不包括玻璃化苗。

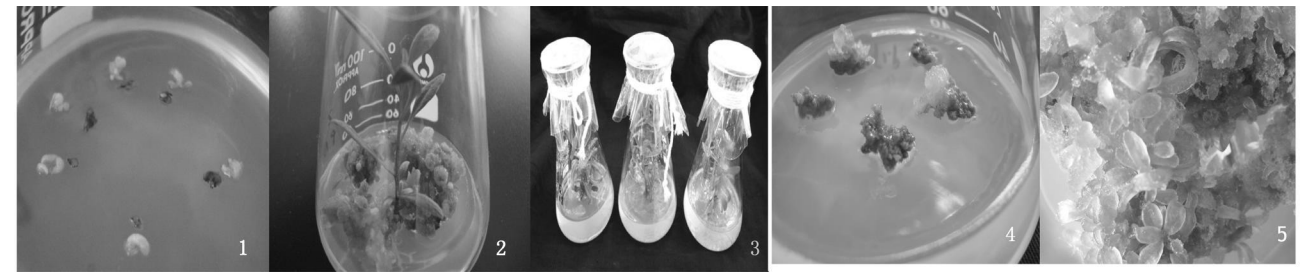


图 1 枸杞胚乳培养愈伤组织诱导、分化及其再生植株

注:1. 不去胚培养的胚乳;2. 分化出有茎和叶的幼苗;3. 再生植株;4. F1 分化培养基中褐化的愈伤组织;5. 分化过程中成簇玻璃化的愈伤组织。

3 结论与讨论

供体植株的基因型是影响胚乳培养的关键因素,不同基因型植株的胚乳对培养基的反应不同,表现在胚乳培养力如愈伤组织诱导率、分化率等。试验结果表明,5种材料在不同激素配比的培养基上都获得了愈伤组织,但诱导率因材料和培养基配方不同而存在区别。不同品种的材料在同一培养基上诱导率及分化率不同,但仍然可以通过5种材料的试验结果来推断更适合各个品种的培养基和影响因子。对于愈伤组织的诱导,2,4-D和KT组合是大多数枸杞胚乳较为适用的一种培养基配方,并且2,4-D在枸杞胚乳诱导中起到很大作用。在5种供试材料中,宁杞2号、宁杞3号比较容易诱导,02-07最难诱导。另外,诱导过程中,胚因子存在与否,5种材料均会产生愈伤组织,可见,枸杞胚乳愈伤组织的

由表5可知,宁杞3号比较容易分化,与其它材料分化率呈极显著差异,且在F4(MS+0.2 mg/L 6-BA + 0.01 mg/L NAA + 3%蔗糖 + 0.4%琼脂)培养基上分化率最高,达到10.7%。宁杞2号在F5培养基上分化率最高,达到4.7%,可见宁杞2号更适合这种激素配比的分化培养基。从不同激素配比的分化培养基上看,F4平均诱导率最高为5.2%,明显高于其它培养基。

不同激素配比培养基上愈伤组织分化表现出不同的特征,F1培养基上愈伤组织多褐化,生长差(图1-4);F2中愈伤组织多为深绿色,玻璃花苗成簇出现(图1-5),生长一般;F3中愈伤组织为绿色,生长较差;F4中愈伤组织多为黄绿色,芽多为正常且生长较旺盛;F5愈伤组织黄绿色,玻璃化现象较轻,芽正常居多,生长一般。

产生和胚存在与否无关,但胚存在会大大提高愈伤组织诱导率。分化过程中,MS+0.2 mg/L 6-BA + 0.01 mg/L NAA + 3%蔗糖 + 0.4%琼脂分化培养基上,5种材料的平均分化率最高,且宁杞3号的平均分化率远远高于其它材料。

参考文献

[1] 朱登云,李浚明.被子植物胚乳培养研究的历史与现状[J].农业生物技术学报,1996,4(3):205-215.
[2] 刘建福,吴清,杨道茂,等.阳桃胚乳愈伤组织诱导和不定芽发生的研究[J].热带亚热带学报,2004,12(4):367-370.
[3] 顾淑荣,桂耀林,徐廷玉.枸杞胚乳植株的诱导[J].植物学报,1985,27(1):106-109.
[4] 顾淑荣,桂耀林,徐廷玉.枸杞胚乳植株的诱导及染色体倍性观察[J].遗传学报,1987,4(1):37-41.
[5] 顾淑荣,桂耀林,刘淑琼,等.枸杞胚乳愈伤组织细胞的悬浮培养及无丝分裂的活体观察[J].植物学报,1991,33(6):478-481.

红提葡萄组织培养的研究

高志明, 闻 杰
(周口职业技术学院 生物工程系, 河南 周口 466001)

摘 要:以葡萄的茎尖为外植体, 研究了不同的灭菌剂对葡萄外植体萌发的影响, 并筛选出最佳消毒剂, 同时筛选出不同培养基和激素浓度配比。结果表明: 不同的灭菌剂对无菌苗的萌发与生长有显著的影响, 使用 70%乙醇灭菌 30 s, 0.1%升汞灭菌 10 min, 可以达到最佳灭菌效果。筛选出 1/2MS+BA 0.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 7 g/L, pH 5.8 的培养基为外植体萌发的最适培养基配比。

关键词: 葡萄; 组织培养; 激素
中图分类号: S 663. 103. 6 **文献标识码:** B **文章编号:** 1001—0009(2011)09—0144—02

红提葡萄又名晚红、红地球、红提子, 商品名称红提, 属欧亚种, 是由美国加利福尼亚州立大学于 20 世纪 70 年代用(皇帝×L12-80)×S45-48 杂交育成。果穗大, 整齐度好, 果皮中厚, 易剥离, 肉质坚实而脆, 细嫩多汁, 硬度大, 刀切而不流汁, 香甜可口, 风味独特, 耐贮运, 品质上等, 市场竞争力强, 是鲜食葡萄品种中最珍贵和最具有商业价值的品种之一, 发展前景广阔。因此近年来红提葡萄的种植面积越来越大, 为了在短时间内扩大栽培面积, 采用组织培养的方法进行快速繁殖, 利用葡萄茎尖进行诱导再生, 不改变原有品种性状, 组培优势明显, 短期内可培养出大量的试管苗。

1 材料与方法

1.1 试验材料

第一作者简介: 高志明(1974), 男, 本科, 讲师, 现主要从事植物学和植物生理学的教学研究工作。E-mail: gzmgzm1@126.com。
收稿日期: 2011—02—28

取自周口市园艺场的红提葡萄, 取优良母株新生枝条嫩梢作为材料。

1.2 试验方法

1.2.1 材料消毒 选取优良母株新生枝条嫩梢。均用自来水冲洗 5~10 min, 阴干后用表 1 方法进行消毒, 最后用无菌水冲洗 3~5 遍。在无菌条件下剥去外层幼叶, 在解剖镜下用镊子剥取茎端分生组织, 切取 0.3~0.5 mm 长的茎尖接种于分化培养基上。

表 1 不同消毒剂和消毒时间					
序号	消毒剂	消毒时间/s	消毒剂	使用浓度/%	消毒时间/min
1	70%酒精	30	次氯酸钙	9	10
2	70%酒精	30	过氧化氢	10	10
3	70%酒精	30	氯化汞	0.1	10

1.2.2 培养基的配制 各培养基的配制按表 2 的配方进行, 分装后, 经 121℃灭菌 20 min 备用。

Five Triploid Plants of *Lycium barbarum* L. Induced from Endosperm-cultural

MI Jia-li^{1,2}, CAO You-long², WANG Jun¹
(College of Plants Resource, Ningxia University, Yinchuan 750021)

Abstract: Take five genotypes of *Lycium barbarum* L. as material, the endosperm which removal and not removal the embryo on 6 kinds MS medium with different hormone content. The results showed that the callus was successfully induced from the endosperm of five genotypes. With the embryo, the highest induction ratio of the endosperm callus was 80.0%. The callus were then transferred to 5 kinds differentiation medium with different hormone content. The best medium was MS+0.2 mg/L 6-BA+0.01 mg/L NAA+3% Sucrose+0.4% Agar, and the differentiation ratio of Ningqi No. 3 was the highest reached 10.7%. After culturing the buds on rooting medium (1/2MS+0.01 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA) for 15 d, complete plants were obtained.

Key words: *Lycium barbarum* L.; endosperm; callus; triploid plan