

怀地黄花药培养影响因素的初步研究

周春娥¹, 朱凤荣², 周延清¹

(1. 河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453007; 2. 新乡学院 生命科学与技术系, 河南 新乡 453000)

摘 要:以怀地黄花药为外植体, 研究花药发育时期和激素对怀地黄花药愈伤组织诱导率和分化率的影响。结果表明: 怀地黄花药在 4℃ 条件下预处理 3 d 后接种在含有 2,4-D 2.0 mg/L、6-BA 0.5 mg/L 和 KT 2.0 mg/L 的 MS 培养基上对花药愈伤组织诱导最有利, 而最适的愈伤组织分化培养基为 MS+IAA 0.5 mg/L+6-BA 1.0 mg/L。

关键词:怀地黄; 花药培养; 植株再生

中图分类号:S 567.23⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)04-0128-03

怀地黄(*Rehmannia glutinosa* Libosch)为玄参科地黄属多年生草本药用植物, 为著名的“四大怀药”之一。其块根入药, 具有滋阴养血、清热凉血、补肾、生津止渴等功效^[1], 有重要的药用价值和经济价值。因此, 获得优质怀地黄品种是非常重要的。但因其是异花授粉植物, 种子不能繁殖, 长期采用块根营养繁殖, 易受多种病虫害侵袭, 感染率达到 100%, 病毒在体内代代相传, 致使品种退化, 产量下降, 质量变差^[2-3], 对于地黄病毒病的防治还没有特效药, 利用组织培养培育怀地黄脱毒苗是解决怀地黄病毒病非常有效的一个途径, 特别是通过茎尖脱毒。李明军等^[4]用切离的 0.2~0.5 mm 怀地黄的茎尖进行离体培养, 既能保证较高的脱毒率又能保证较高的出苗率。但茎尖培养要求技术难度大, 特别是对茎尖大小要求非常严格, 太大达不到非常好的脱毒效果, 太小了既不容易操作又不容易成活。乔奇等^[5]对草莓花药培养脱毒技术做了研究, 获得的脱毒苗生长势明显增强, 产量增加。查中萍对草莓花药培养脱毒的可行性做了研究。认为草莓花药培养是获得无病毒植株的主要途径之一。花药培养在草莓脱毒上的成功应用, 充分证明通过花药培养培育脱毒苗的可行性。该研究利用怀地黄花药作为外植体, 诱导形成完整植株的方式来达到一定的脱毒效果。脱毒原理有人认为是通过诱导花药脱分化形成愈伤组织, 由于愈伤组织内细胞分裂旺盛, 细胞需消耗大量的能量和酶类, 所以病毒在愈伤组织阶段得不到充足的能量和酶类, 因而在花药愈伤组织中病毒含

量极低或没有病毒, 再由花药愈伤组织通过器官发生途径再生形成的完整植株, 病毒含量也极低甚至没有病毒, 从而获得脱毒苗, 提高怀地黄的产量和品质。

1 材料与方法

1.1 试验材料

怀地黄材料由河南师范大学生命科学学院作物与微生物遗传实验室提供, 种植于河南师范大学生命科学学院试验田内。在 2011 年 4 月份怀地黄花期采集不同大小的花蕾。

1.2 试验方法

在怀地黄的初花期采集不同大小的花蕾放入 4℃ 条件下预处理 3 d, 把不同发育时期的花蕾用 75% 的酒精浸泡 30 s, 再用 0.1% 升汞消毒 4 min, 然后用无菌蒸馏水冲洗 5 次, 然后在无菌条件下剥出花药, 除尽花丝, 平放, 接在不同处理的培养基上, 每瓶接种 20 个花药, 每个处理接种 4 瓶, 然后放入人工气候箱培养, 20 d 左右诱导出花药愈伤组织, 然后把愈伤组织转入分化培养基上, 诱导形成花粉植株(图 1~4)。

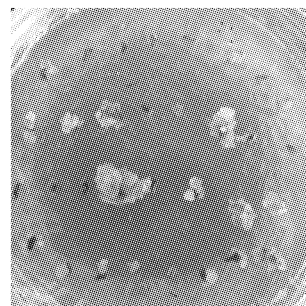


图 1 花药愈伤组织

Fig. 1 The callus from anther

1.2.1 花蕾的采集 在初花期采集不同大小的花蕾, 并用尺子量出花蕾的长度, 每一大小的花蕾接种 4 瓶, 试图找出最适合诱导花药愈伤组织的时期。

1.2.2 花药脱分化形成愈伤组织 在研究激素对花药

第一作者简介:周春娥(1977-), 女, 山西寿阳人, 硕士, 讲师, 现从事植物分子与细胞育种研究工作。E-mail: 041106@htu.cn。

基金项目:国家高技术研究发展计划“863”项目子课题资助项目(2006AA100109); 河南省教育厅自然科学研究计划资助项目(2009B180016); 河南省教育厅自然科学研究计划资助项目(2011B180035); 河南师范大学青年科学基金资助项目。

收稿日期:2011-10-31



图 2 愈伤组织分化的不定芽
Fig. 2 Adventitious bud differentiation from callus

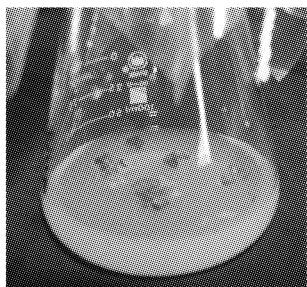


图 3 不定芽转接
Fig. 3 Reinoculation of adventitious bud



图 4 花药再生植株
Fig. 4 Plant regeneration of callus

愈伤组织诱导的影响过程中,利用正交实验设计了四因素三水平来研究不同激素配比浓度及不同品种对愈伤组织诱导率的影响(表 1)。按 $L_9(3^4)$ 正交设计,将花蕾消毒后放入设计好的不同培养基中,每处理接种 4 瓶,放入 26℃ 条件下培养,20 d 后观察结果。

表 1 正交实验的因素与水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal design

因素 Factors	水平		
	Level 1	Level 2	Level 3
a:2,4-D	0.5	1.0	2.0
b:6-BA	0.5	1.0	2.0
c:KT	0.5	1.0	2.0
d:品种 Breeds	小黑英	串地龙	金皇后

1.2.3 愈伤组织不定芽分化 在对怀地黄花药愈伤组织诱导分化的过程,采用了不同的激素配比。

2 结果与分析

2.1 花蕾大小对愈伤组织诱导率的影响

通过对不同大小花蕾中的花药愈伤组织诱导率进

行方差分析和显著性比较(表 2)。结果表明,花蕾长度为 0.8~1.0 cm,与 0.5~0.6 cm 达到差异显著水平,没达到极显著水平,与 1.0~1.5 cm 和 1.5 cm 以上都达到极显著水平,从而得出花蕾长度为 0.8~1.0 cm 时最适合花药愈伤组织的诱导。

表 2 不同花蕾长度花药愈伤组织诱导率的显著性比较(LSD 法)

Table 2 The least significant difference of anther callus inductivity of different long alabastrum

花蕾长度 The length of alabastrum/cm	诱导率 Inductivity/%				\bar{x}_i
	1	2	3	4	
0.5~0.6	43	43	40	39	41.25bA
0.8~1.0	46	48	47	44	46.25aA
1.0~1.5	23	20	19	17	19.75cB
1.5 以上	8	7	6	4	6.25dC

注:小写字母表示差异达到 5%,大写字母表示差异达到 1%。
Note:The small letters mean significant difference at 5%, the capital letters mean significant difference at 1%.

2.2 不同激素配比和品种对怀地黄愈伤组织诱导率的影响

对不同激素配比和品种的正交实验结果进行直观分析(表 3),可看出 4 个因素的极差相差不多,而 2,4-D 和品种的 $|R|$ 分居第 1、2 位,但与其它二因素的极差差别不大,所以 4 个因子对怀地黄花药愈伤组织的诱导都有一定的影响。另外,根据各试验因子的总和平均数可以得出最佳因素组合为:2,4-D 2.0 mg/L+6-BA 0.5 mg/L+KT 2.0 mg/L+串地龙,即第 7 处理组合。

表 3 怀地黄花药愈伤组织诱导率正交实验结果的直观分析

Table 3 The visual analysis of anther callus inductivity of different length of alabastrum

处理组合 Experimental groups	2,4-D /mg · L ⁻¹	6-BA /mg · L ⁻¹	KT /mg · L ⁻¹	品种 Breeds	诱导率 Inductivity/%
1	0.5	0.5	0.5	小黑英	15
2	0.5	1.0	1.0	串地龙	16
3	0.5	2.0	2.0	金皇后	16
4	1.0	0.5	1.0	金皇后	17
5	1.0	1.0	2.0	小黑英	15
6	1.0	2.0	0.5	串地龙	18
7	2.0	0.5	2.0	串地龙	47
8	2.0	1.0	0.5	金皇后	44
9	2.0	2.0	1.0	小黑英	10
T1	47	79	77	40	
T2	50	75	43	81	
T3	101	44	78	77	
\bar{x}_1	15.67	26.33	25.67	13.33	
\bar{x}_2	16.67	24.75	14.33	27.00	
\bar{x}_3	33.67	14.67	26.00	25.67	
$ R $	18.00	11.66	11.34	14.97	

2.3 不同激素对比对怀地黄愈伤组织分化率的影响

把诱导出的愈伤组织接种到 3 种不同的分化培养基中,结果见表 4,其中 3 号培养基的诱导率达到 40%,可确认为是最适培养基。

表4 不同激素配比花药愈伤组织平均分化率

Table 4 The average differentiation rate of different hormone match

培养基序号 The number of medium	生长素 Auximone /mg · L ⁻¹	6-BA /mg · L ⁻¹	平均分化率/% Average differentiation rate
1	2,4-D 0.5	1.0	3
2	NAA 0.5	1.0	10
3	IAA 0.5	1.0	40

2.4 建立怀地黄花药再生植株

在怀地黄开花初期选择长度为0.8~1.0 cm的花蕾接种在愈伤组织诱导培养基中,即MS+2,4-D 2.0 mg/L+6-BA 0.5 mg/L+KT 2.0 mg/L,经过20 d左右诱导出愈伤组织(图1);再把愈伤组织接种在不定芽分化培养基上,最适培养基为:MS+IAA 0.5 mg/L+6-BA 1.0 mg/L,同样经过20 d左右在愈伤组织分化出不定芽(图2),把不定芽接种在MS培养基上(图3),大约2周建立花药植株(图4),花药植株在MS就可以生根,所以不需再去诱导生根。通过该研究,建立了怀地黄花药培养再生植株体系,为今后怀地黄单倍体育种技术的应用奠定了坚实的基础。

3 讨论与结论

植物的花药培养受多种因素制约,王立浩^[6]和蔡连华等^[7]对辣椒、梁彦涛等^[8]对马铃薯花药培养的影响因素做了深入的分析,该研究主要探讨花药的发育时期和生长调节剂对花药培养的影响,大多数研究表明,选择合适的花粉发育时期是提高花粉植株诱导率的重要因素,处于单核晚期的孢子最适宜花药培养^[9-10]。而在该研究中,怀地黄在花蕾长度为0.8~1.0 cm时花药诱导率最高,经过前期研究,当花蕾长度为0.8~1.0 cm时,花药正好处于单核期。植物生长调节剂对花药愈伤组织的诱导和分化极其重要,不同植物、基因型和外植体对激素种类和配比有不同的要求。丹参添加2.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA诱导效果最好^[11]。‘甜查理’草莓花药培养技术最佳的激素配比为6-BA 1.0 mg/L+2,4-D 2.0 mg/L^[12]。而在菠萝花药愈伤组织诱导中的最佳激素配比为2 mg/L 2,4-D+0.08 mg/L TDZ^[13]。而该研究表明,2,4-D 2.0 mg/L+6-BA 0.5 mg/L+KT 2.0 mg/L激素组合在怀地黄花药愈伤组织诱导中的效果最佳。

在花药愈伤组织分化过程中,激素仍然是一个主要

影响因素,愈伤组织分化成植株,需转入较低浓度生长素和较高浓度细胞分裂素于培养基中^[14]。云南疣粒野生稻花药愈伤组织分化培养基为:N6+KT 2.0 mg/L+NAA 0.25 mg/L^[15]。该研究中,最佳分化培养基为MS+IAA 0.5 mg/L+6-BA 1.0 mg/L。

综上所述,通过该研究可以获得完整的花药植株,但整个过程中某些环节的设计还不是很完善,有待进一步去优化,比如愈伤组织分化阶段。在下一步的试验中,将对所获得的花药植株做倍性分析,对花药培养做更进一步的研究,期望能很好地把怀地黄花药培养应用于育种实践中。

参考文献

- [1] 刘红彦,陈玉红,杨贵军. 85-5 怀地黄优质栽培管理技术[J]. 河南农业,2004(3):25-26.
- [2] 王太霞,李景原,胡正梅. 怀地黄块根的形态发生和结构发育[J]. 西北植物学报,2003,23(7):1217-1223.
- [3] 陈敏艳,梁宗锁,王喆之,等. 地黄组织培养及植株再生的研究[J]. 西北植物学报,2004,24(6):1083-1087.
- [4] 李明军,张晓丽,杜琳,等. 怀地黄试管苗脱毒技术研究[J]. 河南师范大学学报(自然科学版),2008,36(2):103-106.
- [5] 乔奇,张振臣,靳秀兰. 草莓花药培养脱毒技术研究[J]. 中国农学通报,2003,19(2):26-27,56.
- [6] 王立浩. 辣椒花药培养中若干影响因素的研究[J]. 园艺学报,2004,31(2):199-204.
- [7] 蔡连华,雷建军,陈国菊,等. 彩色甜椒花药培养若干影响因子的研究[J]. 中国瓜菜,2005(4):16-19.
- [8] 梁彦涛,邸宏,卢翠华,等. 马铃薯花药培养影响因素的研究[J]. 东北农业大学学报,2006,37(5):604-609.
- [9] 孙爱华,李哲,黄天带. 橡胶树花药的培养[J]. 植物生理学通讯,2006,42(4):785-789.
- [10] 余叔文,汤章诚. 植物生理与分子生物学[M]. 北京:科学出版社,2003.
- [11] 解玉丽,王建华,宋振巧. 丹参花药愈伤组织诱导因素的研究[J]. 山东农业科学,2010(8):5-7,10.
- [12] 晁慧娟,刘敏,姬嫌龙,等. ‘甜查理’草莓花药培养脱毒技术[J]. 北京农学院学报,2010,25(2):18-21.
- [13] 蒋晶,赛美安,孙伟生. 菠萝花药愈伤组织诱导及褐变影响因素[J]. 中国农学通报,2010,26(11):366-369.
- [14] 闫立霞,胡春根,姚家玲. 盾叶薯蓣花药培养及单倍体植株的获得[J]. 云南植物研究,2007,29(1):33-37.
- [15] 丁玉梅,黄兴奇,程在全. 云南疣粒野生稻花药离体培养与植株再生[J]. 植物生理学通讯,2006,42(1):74.

Study on Influential Factors on Anther Culture of *Rehmannia glutinosa* Libosch

ZHOU Chun-e¹, ZHU Feng-rong², ZHOU Yan-qing¹

(1. College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxing, Henan 453007; 2. Department of Life Science Biotechnology, Xinxing University, Xinxing, Henan 453000)

Abstract: Taking the anthers from *Rehmannia glutinosa* Libosch as explants, several factors such as the stage of anther and different hormone treatments were studied on anther callus induction and shoot differentiation induction. The results showed that the optimum callus induction could be obtained by inoculation on MS culture medium containing 2,4-D 2.0 mg/L, 6-BA 0.5 mg/L and KT 2.0 mg/L after storage at 4°C for 3 d, and the optimum shoot differentiation medium was MS+IAA 0.5 mg/L+6-BA 1.0 mg/L.

Key words: *Rehmannia glutinosa* Libosch; anther culture; plant regeneration