

万寿菊雄性不育系离体保存及快繁体系的建立

伍亚平, 唐道城

(青海大学 高原花卉研究中心, 青海 西宁 810016)

摘要:以 9 个万寿菊雄性不育系植株的腋芽为外植体, 进行诱导、继代和生根培养基配方的优化研究。结果表明: 适合万寿菊雄性不育系腋芽诱导丛生芽的培养基最佳配方是: MS+6-BA 0.3 mg/L+NAA 0.10 mg/L; 适合丛生芽继代增殖培养的培养基最佳配方是: MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.10 mg/L; 适合生根的培养基最佳配方是: 1/2MS+IBA 0.10 mg/L。初步建成了万寿菊雄性不育系离体保存体系。

关键词:万寿菊; 雄性不育系; 腋芽; 培养基配方; 离体保存

中图分类号:S 681.903.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)01-0116-03

万寿菊(*Tagetes erecta*)为菊科万寿菊属 1a 生草本植物, 又名蜂窝菊、臭芙蓉^[1]。杂交种繁育常利用雄性不育两用系的系作母本, 与强优势的恢复系杂交, 配制 F₁ 杂交种用于生产^[2]。万寿菊的雄性不育两用系即不育株和可育株共存于同一群体中。不育株小花呈丝状, 只有雌蕊, 无雄蕊和花瓣, 为结构型雄性不育, 自交不能结实, 即不育系; 可育株为两性花, 能自花结实^[2-3]。在杂种优势利用中, 采用姊妹交保持其不育性, 即两用系, 用不育系与恢复系杂交完成杂交种制种。万寿菊雄性不育繁殖株来之不易, 如何保存万寿菊雄性不育性状, 为接下来的杂交制种利用及雄性不育遗传机理方面的研究提供材料来源是一个极其重要的问题^[4]。

第一作者简介:伍亚平(1986-), 女, 在读硕士, 现主要从事植物遗传育种工作。E-mail: wuyaping812@163.com.

责任作者:唐道城(1954-), 男, 硕士, 教授, 博士生导师, 现主要从事高原花卉研究工作。E-mail: tangdao Cheng6333@163.com.

基金项目:农业部科技成果转化资助项目(2009GB2G200396)。

收稿日期:2012-09-19

目前, 雄性不育的保存与繁殖主要采用“两用系”自交和组织培养的方法保存。其中组织培养可以不受生长季节限制, 繁殖速度快、繁殖系数大, 基本能保持原有品种的优良性状等特点, 所以建立万寿菊雄性不育系离体保存及快繁体系, 对育种和种子生产非常重要^[5]。该试验以青海大学高原花卉中心选育的 9 个万寿菊雄性不育系的幼嫩腋芽为外植体, 研究适宜的诱导、继代及生根培养基配方, 以期建立简单有效的离体保存及快繁体系, 为后续研究及种子生产奠定资源基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料均来自青海大学高原花卉中心试验田。清晨于试验田内剪取 9 个万寿菊雄性不育系健壮无病害植株的幼嫩腋芽, 放入采样袋内并分别编号, 然后置于低温采样箱中保存。以 MS 培养基为基本培养基, 进行组织培养。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的灭菌 取出腋芽放入小烧杯中, 先用洗

Karyotype Analysis of the Chromosome of *Agriophyllum squarrosum*

WANG Qian^{1,2}, CHEN Hai-kui³, WANG Jun-li¹

(1. College of Life and Environmental Science, Minzu University of China, Beijing 100081; 2. Badaling Forest Farm, Beijing 102112; 3. College of Biological Sciences and Engineering, Beifang University of Nationalities, Yinchuan, Ningxia 750021)

Abstract: The chromosomes were tested and analyzed through normal method for preparing slides with the technique of microphotography. The results showed that the karyotype formula was $2n=2\times=18=14m+4sm$ and belongs to '1A' type of Karyotypic. The chromosome complement based on relative length formula was $10M_1 + 8M_2$. The total length of all set of chromosome was $24.09 \mu m$, the AS.K was 58.86%. The total volume of chromosome was $85.95 \mu m^3$.

Key words: *Agriophyllum squarrosum* (Linn.) Moq.; chromosome; karyotype analysis

衣粉溶液浸泡 5 min,然后用自来水冲洗干净并剪去残伤部分,盖上纱布,再在流水下冲洗 1 h。用 70%酒精进行表面灭菌 30 s,然后迅速用无菌蒸馏水冲洗 2 次。再将外植体在 0.1%氯化汞中浸泡 4、7、10 min 进行彻底灭菌,其间稍加摇动以充分灭菌,无菌蒸馏水冲洗 6 次。

1.2.2 接种外植体 用无菌镊子夹出腋芽置于滤纸上吸干水,用手术刀切掉伤口一段,留下长 5 mm 左右的腋芽作为外植体,然后用镊子将外植体接种于各培养基内。暗培养 1 周后放置在培养架上培养。培养基含蔗糖 30 g/L,琼脂 6.5 g/L, pH 为 5.8,培养基在 121℃下高压灭菌 15 min。温度在 23~25℃,光照强度 1 400~1 800 lx,光照时间 14 h/d,相对湿度保持在 70%~80%。

1.2.3 培养基的配方筛选 丛生芽诱导培养基:试验采用 MS 为基本培养基,以细胞分裂素 6-苄基嘌呤(6-BA)和细胞生长素萘乙酸(NAA)作为植物生长调节剂,6-BA 设置 4 种浓度:0.1、0.3、0.5、0.7 mg/L;NAA 设置 3 种浓度:0.05、0.10、0.15 mg/L。共设 12 种处理。每种处理接种 10 瓶,每瓶 4 个腋芽。培养 30 d 后,统计其丛生芽诱导数(表 1)。

表 1 丛生芽诱导培养基的植物生长调节剂浓度处理

Table 1 Plant growth regulators concentrations of cluster buds inductive medium

处理号	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
6-BA /mg · L ⁻¹	0.1	0.1	0.1	0.3	0.3	0.3	0.5	0.5	0.5	0.7	0.7	0.7
NAA /mg · L ⁻¹	0.05	0.10	0.15	0.05	0.10	0.15	0.05	0.10	0.15	0.05	0.10	0.15

1.2.4 丛生芽继代增殖培养基 以 MS 为基本培养基,用 6-BA 和 NAA 作为植物生长调节剂进行丛生芽继代增殖培养试验研究,6-BA 设置 4 种浓度:0.1、0.5、1.0、1.5 mg/L; NAA 设置 4 种浓度:0.01、0.05、0.10、0.15 mg/L。共设 16 种处理。取由万寿菊雄性不育系腋芽诱导分化出的丛生芽分别接种在含不同浓度的 6-BA 和 NAA 的 MS 培养基上,培养 20 d 后再统计分析,每 25 d 继代 1 次(表 2)。

1.2.5 生根培养基 以 1/2MS 为基本培养基,培养基内添加 3 种不同浓度的吲哚丁酸(IBA),共设 3 种处理即 1/2MS+IBA 0.05 mg/L、1/2MS+IBA 0.10 mg/L、1/2MS+IBA 0.15 mg/L。

2 结果与分析

2.1 外植体的灭菌效果分析

由表 4 可知,外植体的灭菌采用 70%的酒精和 0.1%的氯化汞,70%酒精灭菌 30 s,氯化汞消毒 7 min 灭菌效果最好。

表 2 丛生芽继代增殖培养基的植物生长调节剂浓度处理

Table 2 Plant growth regulators concentrations of cluster buds subculture medium

处理号	6-BA/mg · L ⁻¹	NAA/mg · L ⁻¹
B1	0.1	0.01
B2	0.1	0.05
B3	0.1	0.10
B4	0.1	0.15
B5	0.5	0.01
B6	0.5	0.05
B7	0.5	0.10
B8	0.5	0.15
B9	1.0	0.01
B10	1.0	0.05
B11	1.0	0.10
B12	1.0	0.15
B13	1.5	0.01
B14	1.5	0.05
B15	1.5	0.10
B16	1.5	0.15

表 3 生根培养基的吲哚丁酸(IBA)浓度处理

Table 3 IBA concentrations of rooting medium

处理号	C1	C2	C3
IBA/mg · L ⁻¹	0.05	0.10	0.15

表 4 氯化汞灭菌时间对外植体灭菌效果的影响

Table 4 Sterilization effects of HgCl₂ sterilization time on explants

氯化汞灭菌时间/min	接种外植体数/个	外植体(腋芽)状况
4	20	11 个污染,无褐化
7	20	无污染,无褐化
10	20	无污染,18 个褐化

2.2 不同植物生长调节剂对腋芽丛生芽诱导的影响

由表 5 可知,在添加不同植物生长调节剂的培养基中,丛生芽的诱导率不同。其中 A5 号培养基(MS+6-BA 0.3 mg/L+NAA 0.10 mg/L)的丛生芽诱导率最高,达到 67.5%,其次是 A6 号培养基,不定芽诱导率为 62.5%。A12 号培养基中的丛生芽诱导率较低,为 17.5%。

表 5 不同植物生长调节剂的 MS 培养基对腋芽诱导丛生芽的影响

Table 5 Effects of MS culture medium with different plant growth regulators on inducing cluster buds from lateral buds

处理号	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
接种腋芽数/个	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
丛生芽数	14	11	13	18	27	25	11	13	10	8	8	7
丛生芽诱导率/%	35.0	27.5	32.5	45.0	67.5	62.5	27.5	32.5	25.0	20.0	20.0	17.5

2.3 不同植物生长调节剂对丛生芽继代增殖培养的影响

由表 6 可知,B7 培养基(MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L)的增殖率最高,达到了 543.3%。其次是 B8

和 B11 培养基,丛生芽增殖率为 513.3% 和 503.3%。B14 和 B16 培养基中的丛生芽增殖率较低,为 193.3% 和 186.7%。

表 6 不同植物生长调节剂的 MS 培养基对丛生芽继代增殖培养的影响

Table 6 Effects of MS culture medium with different plant growth regulators on subculture of cluster buds

处理号	接种丛生芽数/块	新增丛生芽数	增殖率/%
B1	30	68	226.7
B2	30	70	233.3
B3	30	91	303.3
B4	30	89	296.7
B5	30	95	316.7
B6	30	100	333.3
B7	30	163	543.3
B8	30	154	513.3
B9	30	136	453.3
B10	30	140	466.7
B11	30	151	503.3
B12	30	97	323.3
B13	30	137	456.7
B14	30	58	193.3
B15	30	69	230.0
B16	30	56	186.7

2.4 不同吲哚丁酸(IBA)浓度对生根的影响

在继带增殖培养基中培养 25 d 左右后,切下再生的丛生芽单株芽苗接种在生根培养基中,培养 15 d 后观察并统计生根情况(表 7)。发现在 1/2MS+0.10 mg/L IBA 培养基中生根数目最多,因此较适宜万寿菊组培苗生根。

表 7 不同吲哚丁酸(IBA)浓度对生根的影响

Table 7 Effects of different concentration of IBA on root formation

处理号	接种丛生芽数/个	丛生芽生根数/个	生根率/%	生根数/条
C1	30	17	56.7	93
C2	30	26	86.7	242
C3	30	19	63.3	138

3 结论与讨论

该试验结果表明,万寿菊雄性不育系腋芽诱导丛生芽的培养采用 MS+6-BA 0.3 mg/L+NAA 0.10 mg/L 培养基效果最好。在此培养基上能在较短的时间内诱导出芽的分化并且诱导出的丛生芽数最多。通过对 16 种继代增殖培养基配方进行的筛选试验,认为适合丛生芽继代增殖培养的培养基最佳配方是:MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.10 mg/L。适合生根培养的培养基最佳配方是:1/2MS+IBA 0.10 mg/L。万寿菊为 1 a 生草本花卉植物,其生长寿命有限。在进行离体保存及快速繁殖过程中,高继代数及长继代天数可能导致染色体数量或细胞的畸变,这种畸变在培养中会逐代积累、增加,从而致使万寿菊雄性不育系离体保存的目的不能实现,所以在万寿菊雄性不育两用系的离体保存过程中,当继代增殖培养达到一定的继代数后应及时更换组培材料,采集新的万寿菊腋芽再进行组织培养。万寿菊的组培苗比较容易生根,继代 20 d 后在继代增殖培养基上即可生根,继代天数越长越易生根。

参考文献

- [1] 苏福才,钱国珍,李巧玲,等. 万寿菊茎段组织培养[J]. 内蒙古农牧业学院学报,1999(3):108-111.
- [2] 田海燕. 万寿菊雄性不育性的遗传规律研究[D]. 沈阳:沈阳农业大学,2007.
- [3] 田海燕,王平,沈向群,等. 万寿菊 W205 雄性不育两用系的遗传及植物学特征研究[J]. 北方园艺,2007(2):105-107.
- [4] 张华丽,赵剑颖,张睿鹏,等. 万寿菊杂交亲本的离体培养[J]. 西北植物学报,2011,31(12):2545-2550.
- [5] 邹永梅,黄雪芳. 万寿菊的组织培养和瓶苗开花研究[J]. 江苏林业科技,2005,32(6):17-19.

Conservation *in vitro* and Establishment of the Propagation System on Male Sterile Lines of Marigold

WU Ya-ping, TANG Dao-cheng

(Center of Plateau Flower Research, Qinghai University, Xining, Qinghai 810016)

Abstract: Lateral buds in nine male sterile lines of marigold were used as explants to screen their culture medium of induction, subculture and rooting *in vitro*. The results showed that the culture medium was suitable for lateral bud in male sterile lines of marigold in inducing cluster buds was MS+6-BA 0.3 mg/L+NAA 0.10 mg/L; The culture medium was suitable for subculture of cluster buds was MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.10 mg/L; the best culture medium for rooting was 1/2MS+IBA 0.10 mg/L. So far the conservation system *in vitro* of male sterile lines on marigold were preliminarily established.

Key words: marigold; male sterile line; lateral bud; culture medium formula; conservation *in vitro*