

温度及暗培养对枸杞花药胚状体诱导的影响

罗 青, 张 波, 李彦龙, 曹有龙

(国家枸杞工程技术研究中心, 宁夏 银川 750002)

摘 要:以“宁杞1号”花药为试材,进行离体培养诱导胚状体发生并获得完整植株,分别研究了低温预处理、高温热处理及暗培养对花药胚状体诱导的影响。结果表明:低温预处理5 d能显著提高胚状体诱导率,诱导率达1.43%;而33℃高温热处理和暗培养胚状体诱导率低于对照。

关键词:枸杞花药;离体培养;胚状体;诱导率

中图分类号:R 33 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)17-0111-03

我国枸杞花药培养始于20世纪80年代,顾淑荣^[1]、樊映汉等^[2]利用花药培养出了单倍体植株,曹有龙等^[3]也通过枸杞花药愈伤组织细胞悬浮培养获得了再生植株。段丽君等^[4]、钱春燕等^[5]对8种不同基因型的枸杞花药进行培养,获得大量再生植株。纵观这些试验,大多数都是从愈伤组织途径获得再生植株,这种培养途径易造成染色体发生突变和倍性不稳定,对研究枸杞基因组学和生产应用不利。该试验直接采用胚状体诱导途径,诱导单倍体植株发生,通过自然加倍获得纯和二倍体植株,以期对枸杞基因组测序和新品种培育提供材料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料选取宁夏(国家)枸杞工程技术研究中心种质资源圃提供的“宁杞1号”。

1.2 试验方法

1.2.1 低温处理 于初花期或盛花期采集处于单核靠边期的花蕾,置于4℃下分别放置1~7 d。在超净工作台上,将低温预处理的花蕾,在75%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,置于覆有滤纸的无菌培养皿内备用。将消毒过的花蕾用镊子剥开(注意:避免机械损伤,花柱和花丝取干净),取出花药,接种到盛有50 mL MS固体培养基的三角瓶中,胚状体诱导培养基为MS+1.0 mg/L

6-BA+0.1 mg/L NAA+5%蔗糖+4 g/L琼脂,每瓶接种6个花蕾。接种后放入温度(26±1)℃、光照时间12 h/d、光照强度2 000 lx的培养室,培养60 d后统计结果。

1.2.2 高温处理 花药接种到胚状体诱导培养基上,在人工气候箱33℃下处理1~4 d。取出后放置在温度(26±1)℃、光照时间12 h/d、光照强度2 000 lx的培养室,培养60 d后统计结果。

1.2.3 暗处理 花药接种到胚状体诱导培养基上,在人工气候箱(26±1)℃下暗处理1~3 d,取出后放置在温度(26±1)℃、光照时间12 h/d、光照强度2 000 lx的培养室,培养60 d后统计结果。

2 结果与分析

2.1 低温预处理花蕾对花药胚状体诱导的影响

从表1可知,随预处理时间的延长,花药胚状体诱导率呈先升高后降低的趋势。0 d(CK)处理优于1 d低温处理,处理1~6 d胚状体发生率呈显著提高,处理5 d诱导率达到最高为1.43%,与其它处理有极显著差异,

表 1 低温预处理花蕾对花药胚状体诱导的影响

Table 1 Effect of low temperature pretreatment on embryoid induction

低温预处理 Low temperature treatment/d	接种花药数 No. of anther incubated/枚	胚状体发生数 No. of embryoids/个	平均诱导率 The average induction rate/%
CK(0)	6 000	24	0.40DEde
1	6 000	13	0.22EFef
2	6 000	41	0.68BCDbc
3	6 000	52	0.87BCb
4	6 000	33	0.55CDEcd
5	6 000	86	1.43Aa
6	6 000	55	0.92Bb
7	6 000	2	0.03Ff

注:采用Duncan法进行方差分析,不同大小写字母表示在0.01和0.05水平上差异显著。下同。

Note: The variance analysis using the Duncan method, the different capital and lowercase letters indicate significant difference at 0.01 and 0.05 levels, the same below.

第一作者简介:罗青(1964-),女,副研究员,现主要从事枸杞遗传育种等研究工作。E-mail:luoqing640603@163.com.

责任作者:曹有龙(1963-),男,博士,研究员,现主要从事枸杞遗传育种及分子生物学等研究工作。E-mail:youlongchk@163.com.

基金项目:国家科技厅枸杞育种专项资助项目;宁夏农林科学院自主研发资助项目;宁夏回族自治区自然科学基金资助项目(NZ13126)。

收稿日期:2014-04-17

处理 6 d 后诱导率开始有下降趋势。因此,低温处理有利于花药胚状体的诱导,“宁杞 1 号”花蕾的最佳冷藏天数为 5 d。

2.2 高温处理对花药胚状体诱导的影响

从表 2 可知,随着高温热处理天数的变化,胚状体的诱导率逐步降低,处理第 4 天,花药全部死亡。说明高温热处理不利于枸杞胚状体的诱导。

表 2 高温处理对花药胚状体诱导的影响

Table 2 Effect of high temperature treatment on embryoid induction

高温处理 High temperature treatment/d	接种花药数 No. of anther incubated/枚	胚状体发生数 No. of embryoids/个	平均诱导率 The average induction rate/%
CK(0)	6 000	24	0.40Bb
1	6 000	42	0.70Aa
2	6 000	22	0.37Bb
3	6 000	20	0.33Bb
4	6 000	0	0.00Cc

2.3 暗处理对花药胚状体诱导的影响

由表 3 可知,暗处理 3 d 后,诱导率仅为 0.32%,明显低于对照。

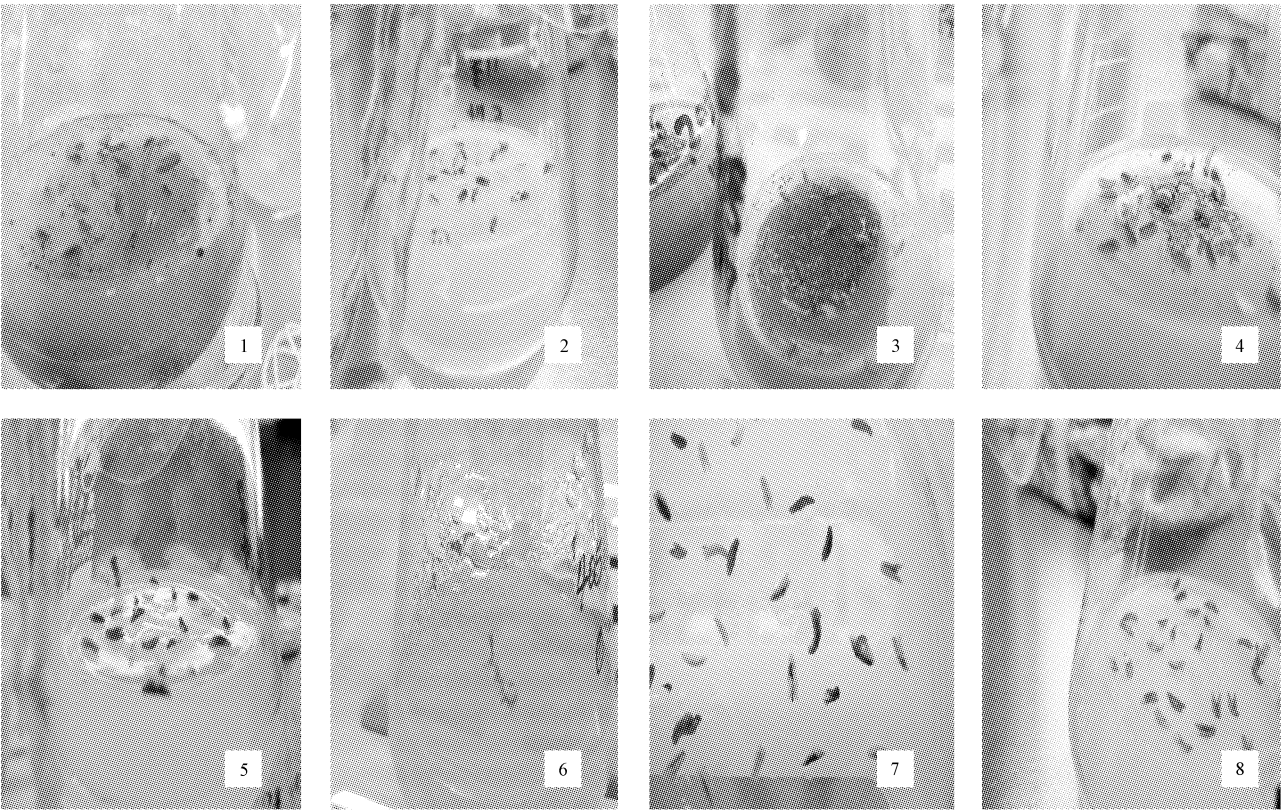
2.4 观察诱导获得的胚状体

观察诱导获得的胚状体,诱导产生胚状体的时间最短为 20 d,与查阅文献一致。统计胚状体发生的时间文献记载通常为 60 d,而该试验甚至 150 d 仍有极个别花药有胚状体发生。从胚状体的形态来看,形态较多,由图 1 可知,完整植株、白化苗、茎绿叶尖白、白色或绿色突起、棒状、白色线形、扇形叶、筒状叶、玻璃化等诸多形状。这些形状不同的胚状体,发现后及时转接到生根培养基培养后,一部分能长成完整植株,也有部分死亡。部分白化苗接种到生根培养基 7 d 后,开始变绿。这类材料应是重点培养的对象,因为它具有单倍体转二倍体的特征。

表 3 暗处理对花药胚状体诱导的影响

Table 3 Effect of dark treatment on embryoid induction

暗处理 Dark treatment/d	接种花药数 No. of anther incubated/枚	胚状体发生数 No. of embryoids/个	平均诱导率 The average induction rate/%
CK(0)	7 500	24	0.40Aa
1	7 500	0	0.00Bb
2	7 500	1	0.01Bb
3	7 500	24	0.32Aa



注:1.完整植株,2.白化苗,3.茎绿叶尖白,4.叶片大小不一,5.棒状,6.筒状叶,7.扇形叶,8.白色、绿色突起。

Note:1. complete plant,2. albino seedling,3. stem green and tip white,4. different size of leaves,5. stick,6. tubular leaf,7. fanshaped leaf,8. protuberance of white and green

图 1 胚状体形态

Fig. 1 Embryoid form

3 结论与讨论

3.1 低温预处理对花药胚状体诱导的影响

自从 Nitsch 等^[6]提出低温处理毛叶曼陀罗的花药能提高花药培养的诱导频率以来,在许多作物的研究报道中也证实了这一看法。顾淑荣等^[7]曾对枸杞花药低温预处理和未经低温处理的正常花药进行了研究,认为低温处理一方面使正常的物质代谢发生了改变,低温增加了淀粉酶的活性,使淀粉迅速水解,转变成可溶于溶液里的糖,因此为花粉的脱分化提供了丰富的营养物质。另一方面,由于低温处理造成细胞质凝聚,致使有丝分裂的正常进行受到影响,造成花粉细胞分裂的异常情况。该试验在研究中发现,在接种前 4℃ 低温预处理枸杞花蕾对其胚状体诱导率有显著影响,低温预处理 5 d 诱导率达到最高,这验证了顾淑荣的研究结果。另外在段丽君等^[8]关于低温预处理对枸杞花药愈伤组织诱导率影响的研究中,也是 5 d 愈伤组织诱导率达到最高。说明低温预处理对胚状体和愈伤组织诱导都有明显影响。

3.2 高温热处理对花药胚状体诱导的影响

刘广霞等^[9]研究表明,高温处理的作用是阻止小孢子沿正常途径形成成熟的花粉粒,使其连续进行细胞分裂,经胚胎发育途径形成胚状体。该试验对接种后的花药进行 33℃ 热处理,研究表明,热处理 1 d 的胚状体的发生率较高,高于其它处理,这与钱春燕等^[10]研究的热激处理 1 d 能提高枸杞花药胚状体诱导率一致。但随着热处理时间延长胚状体诱导率呈显著下降趋势,4 d 后诱导率为零。

3.3 暗处理对花药胚状体诱导的影响

暗处理通常是对花药愈伤组织培养采取的措施之一,段丽君等^[8]在研究不同光照条件对花药愈伤组织诱导的影响中认为,在黑暗条件下花药愈伤组织诱导率最高,均高于光照和弱光条件培养。该试验结果表明,光照条件下进行花药离体培养诱导胚状体发生,胚状体发生率高于黑暗条件下,暗处理 1~2 d,并没有提高花药胚状体的发生率,但暗培养 3 d 的胚状体发生率接近对照,该试验仅做了 3 d 的处理,随着时间的延长是否能提高胚状体诱导率,有待下一步证实。

参考文献

- [1] 顾淑荣. 枸杞花粉植株的获得[J]. 植物学报, 1981, 23(3): 246-248.
- [2] 樊映汉, 臧淑英, 赵敬芳. 两种枸杞植物花药培养单倍体的诱导[J]. 遗传, 1982, 4(1): 25-26.
- [3] 曹有龙, 贾勇炯, 陈放, 等. 枸杞花药愈伤组织悬浮培养条件下胚状体发生与植株再生[J]. 云南植物研究, 1992, 21(3): 346-350.
- [4] 段丽君, 周军, 曹有龙, 等. 6 种枸杞植物花药培养单倍体的诱导[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(2): 531-532.
- [5] 钱春艳, 曹有龙, 段安安, 等. 枸杞花药培养体系优化[J]. 安徽农业科学, 2010(2): 1079-1081.
- [6] Nitsch C, Norreel B. 变温对于在花药中或从花药分离的毛叶曼陀罗 *Datura innoxia* 培养的花粉胚胎发生能力的影响[C]// 单倍体育种资料集(第 3 集). 北京: 科学出版社, 1973: 178-182.
- [7] 顾淑荣, 桂耀林, 徐廷玉. 理化因子对枸杞花粉植株诱导频率和花药内淀粉动态的影响[J]. 植物学报, 1984, 26(2): 156-162.
- [8] 段丽君, 曹有龙. 枸杞花药离体培养技术体系的建立[J]. 江苏农业科学, 2009(5): 58-60.
- [9] 刘广霞, 张晓伟, 蒋武生. 温度及培养基中添加物对辣椒花药培养胚状体诱导的影响[J]. 河南农业科学, 2009(5): 97-100.
- [10] 钱春燕, 曹有龙, 段安安. 枸杞花药培养若干影响因子的研究[J]. 江苏农业科学, 2010(6): 76-78.

Effect of Temperature and Dark Culture on Anther Embryoid Induction of *Lycium barbarum*

LUO Qing, ZHANG Bo, LI Yan-long, CAO You-long

(National Wolfberry Engineering and Technology Research Center, Yinchuan, Ningxia 750002)

Abstract: Taking 'Ningqi No. 1' as test material, using method of anther embryoid induction to obtain regenerated plants. Some factors such as the pretreatment of low temperature, high temperature heat treatment, and dark culture were studied. The results showed that, the embryoid induction rate was significantly improved when the anther was treated 5 days under the low temperature (4℃), and inducing rate was 1.43%. But embryoid induction rate was lower than the comparison by culture under high temperature (33℃) and darkness.

Keywords: wolfberry anther; *in vitro* culture; embryoid; induction rate