

宁夏枸杞花药培养胚状体的诱导

张 波, 罗 青, 张 曦 燕, 曹 有 龙

(国家枸杞工程技术研究中心, 宁夏 银川 750002)

摘 要:以宁夏枸杞新优品系为试材,利用花药培养技术,研究了不同基因型、激素配比、低温预处理、热激处理、添加活性炭对其胚状体诱导率的影响。结果表明:宁夏枸杞新优品系‘06-16’在基因型筛选中,诱导率最高为 0.95%,通过对试验体系进行优化,2.0 mg/L KT 与 0.2 mg/L 2,4-D 的组合诱导率达到 2.07%。4℃低温预处理 3 d 或 5 d、33℃热激处理 5 d、活性炭浓度为 0.8%,均能提高新优品系‘09-106’的胚状体诱导率。

关键词:宁夏枸杞;花药培养;胚状体

中图分类号:S 567.1⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)09-0105-04

宁夏枸杞(*Lycium barbarum* L.)是我国重要的特色药用植物资源之一^[1],其根、茎、叶、果均可入药^[2],具有生态、经济及社会效益^[3]。采用群体选优、杂交的方法选育新品种耗时耗力、效率低^[4]。而利用花药培养直接成苗技术,可快速获得纯系和突变体^[5],同时可为分子

理论研究提供基础材料。

我国枸杞花药培养起源于 20 世纪 80 年代,顾淑荣^[6]首次获得宁夏枸杞花粉植株,樊映汉等^[7]通过胚状体途径获得 2 种枸杞植物花药单倍体。曹有龙等^[8]通过枸杞花药愈伤组织细胞悬浮培养获得了单倍体再生植株。段丽君等^[9]通过激素、活性炭、蔗糖、低温预处理等因素对枸杞花药愈伤组织诱导率进行研究,建立了“宁杞 1 号”花药离体培养技术体系。钱春艳^[10]在前者研究基础上,采用 $L_{32}(2 \times 4^5)$ 正交设计对影响枸杞花药培养的几个因素进行了系统的研究,认为影响花药愈伤与胚状体诱导的主次因素顺序不同。罗青等^[11]认为低温预处理有利于“宁杞 1 号”胚状体的诱导。现以宁夏枸杞新优品系为试材,利用花药培养技术,研究了不同基因型、激素配比、低温预处理、热激处理、添加活性炭

第一作者简介:张波(1984-),女,宁夏中宁人,硕士,研究实习员,现主要从事枸杞遗传育种等研究工作。E-mail:zhang_bo_0309@126.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:yulongchk@163.com.

基金项目:宁夏回族自治区自然科学基金资助项目(NZ13126);国家科技厅枸杞育种专项资助项目(2013NYYZ0105);宁夏农林科学院自主研发资助项目(NKYJ-14-08)。

收稿日期:2015-12-22

Tissue Culture of *Vaccinium corymbosum* ‘O’Neal’

LI Sen¹, GAO Lixia², LIU Nian³, ZHANG Shijun³

(1. Science and Technology Department, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou, Guangdong 510225; 2. Institute of Health and Agriculture, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou, Guangdong 510225; 3. College of Horticulture and Landscape Architecture, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou, Guangdong 510225)

Abstract: Taking stems with buds of *Vaccinium corymbosum* ‘O’Neal’ as explants, the effect of different combination of ZT, 6-BA, NAA and IBA added into the media were tested. The results showed that the optimal disinfection treatment was soaking into 0.1% $HgCl_2$ for 4 min with induction rate of 71.4%. The optimal medium for bud induction was WPM+1.0 mg/L ZT on which some branches germinated and plantlet length reached to be 4.7 cm. The suitable proliferation medium was WPM+2.0 mg/L ZT and the proliferation coefficient achieved to be 13.0. The optimum medium for root induction was 1/2WPM+0.1 mg/L IBA. The plantlets reached to be 5 cm in length and could be transplanted outside and the survival rate exceeded 80%.

Keywords: *Vaccinium corymbosum* ‘O’Neal’; tissue culture; proliferation

对其胚状体诱导率的影响,以期提高胚状体诱导率,为新品种的选育提供更多的基础材料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料宁夏枸杞新优品种(系)“宁杞1号”、“宁杞7号”、“09-09”、“09-106”、“06-16”均来自国家枸杞工程技术研究中心枸杞种质资源圃。

1.2 试验方法

1.2.1 不同基因型对胚状体诱导率的影响 将供试材料直接将其接种于 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA+0.4%琼脂+5%蔗糖的诱导培养基上进行培养。光照时间 10 h/d,光照强度 2 500 lx。5~6 周后,统计各个材料的花药胚状体数及诱导率。

1.2.2 激素配比对胚状体诱导率的影响 将“06-16”的花药接种于以 2,4-D(0.2、0.6、1.0 mg/L)和 KT(1.0、2.0、3.0 mg/L)为激素组合的培养基中培养,培养条件同上。5~6 周后,统计花药胚状体诱导率。

1.2.3 4℃低温预处理对胚状体诱导率的影响 以“09-106”为试材,将其花蕾放入 4℃冰箱内分别保存 0~6 d 后,剥取花药,接种于添加 1.0 mg/L KT 与 0.2 mg/L 2,4-D 的诱导培养基中培养,以不进行低温预处理为对照,培养条件同上。

1.2.4 热激处理对胚状体诱导率的影响 将“09-106”的花药接种于添加 1.0 mg/L KT 与 0.2 mg/L 2,4-D 的诱导培养基上后,置于光照培养中,在 33℃的高温下培养 1、3、5、7、9 d,以不进行热激处理为对照,培养条件同上,5~6 周后统计花药胚状体诱导率。

1.2.5 添加活性炭对胚状体诱导率的影响 将“09-106”的花药接种于添加不同浓度活性炭(0.2%、0.4%、0.6%、0.8%)的诱导培养基中培养,以不添加活性炭为对照,5~6 周后统计花药胚状体诱导率。

1.3 项目测定

接种后开始每 5 d 观察 1 次花药胚状体发生情况,包括发生的时间、部位、形态、花药褐化情况等,40 d 后统计胚状体诱导率。诱导率(%)=产生胚状体的花药数(枚)/接种花药数(枚)×100。

1.4 数据分析

试验数据采用 DPS 统计分析软件进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 基因型对胚状体诱导的影响

相同培养条件下,不同枸杞基因型出胚率不同。由表 1 可知,“06-16”胚状体诱导率最高为 0.95%,其次是“宁杞7号”、“宁杞1号”、“09-106”,分别为 0.60%、0.30%、0.07%,而“09-09”最低为 0.06%。

表 1 不同基因型对宁夏枸杞花药胚状体诱导率的影响

Table 1 Effect of different genotypes on induction rate of embryo from the anther of Ningxia wolfberry

基因型 Genotype	接种花药数 No. of anther incubated	胚状体数 No. of embryo	平均诱导率 The average induction rate
	/个	/个	/%
“宁杞1号”	2 010	6	0.30
“宁杞7号”	2 606	14	0.60
“09-106”	2 880	2	0.07
“06-16”	1 680	10	0.95
“09-09”	3 630	2	0.06

2.2 激素配比对胚状体诱导的影响

以“06-16”的花药为材料,接种于 9 种培养基中培养,由表 2 可知,在 9 种培养基中,除 F6、F8 外,其它培养基均能诱导出胚状体,且 F4 最高,为 2.07%,与其它组合差异显著,F3 次之为 1.44%,F2 与 F9 诱导率相同为 0.10%。说明在激素 KT 与 2,4-D 组合的 9 种培养基中,2.0 mg/L KT 与 0.2 mg/L 2,4-D 组合较适宜诱导“06-16”花药胚状体。

表 2 不同激素配比对胚状体诱导的影响

Table 2 Effect of different hormone ratio on induction rate of embryo from the anther of Ningxia wolfberry

试验编号 Number	激素浓度 Hormone levels		接种花药数 No. of anther incubated/个	胚状体数 No. of embryo/个	平均诱导率 The average induction rate/%
	KT /(mg·L ⁻¹)	2,4-D /(mg·L ⁻¹)			
F1	1.0	0.2	900	6	0.67c
F2	1.0	0.6	990	1	0.10f
F3	1.0	1.0	900	13	1.44b
F4	2.0	0.2	870	18	2.07a
F5	2.0	0.6	1 020	5	0.49d
F6	2.0	1.0	1 020	0	0.00g
F7	3.0	0.2	930	2	0.22e
F8	3.0	0.6	960	0	0.00g
F9	3.0	1.0	990	1	0.10f

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

Note: The variance analysis using the Duncan method, the different lowercase letters indicate significant difference at 0.05 level.

2.3 低温预处理对胚状体诱导的影响

由表 3 可知,低温预处理可以提高枸杞花药胚状体的诱导率。“09-106”在培养过程中第 3、5 天分别达到 1.06%、1.07%,二者均高于对照,且差异极显著,而其它处理均比对照低。即低温预处理 3 d 或 5 d 均有利于宁夏枸杞新优品系“09-106”花药胚状体的诱导,且能够极显著提高其胚状体诱导率。

2.4 热激处理对胚状体诱导的影响

由表 4 可知,一定时间的热激处理能够促进宁夏枸杞胚状体的诱导。随热激时间的延长,胚状体诱导率呈先上升后下降的趋势,处理 3~9 d,均与对照差异极显著,其中处理 5 d 的诱导率达到最高值,为 1.14%。表明“09-106”热激处理 3~9 d 较适宜诱导胚状体。

表 3 4℃低温预处理对宁夏枸杞花药胚状体诱导率的影响

Table 3 Effect of cold temperature pretreatment on embryoid induction from the anther of Ningxia wolfberry

处理天数	接种花药数	胚状体数	平均诱导率
Processing days	No. of anther incubated	No. of embryoid	The average induction
/d	/个	/个	rate/%
0	564	5	0.89bB
1	590	3	0.51cC
2	618	2	0.32dD
3	470	5	1.06aA
4	554	3	0.54cC
5	560	6	1.07aA
6	591	2	0.34dD

注:同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$)。下同。

Note; Different lowercase letters in the same column indicate significant difference at 0.05 level; different capital letters indicate highly significant difference at 0.01 level. The same below.

表 4 热激处理对宁夏枸杞花药胚状体诱导率的影响

Table 4 Effect of heat shock pretreatment on embryoid induction from the anther of Ningxia wolfberry

处理天数	接种花药数	胚状体数	平均诱导率
Processing days	No. of anther incubated	No. of embryoid	The average induction
/d	/个	/个	rate/ %
0	420	0	0.00dD
1	410	0	0.00dD
3	420	2	0.48cC
5	350	4	1.14aA
7	420	4	0.95bB
9	420	2	0.48cC

2.5 活性炭对胚状体诱导的影响

由表 5 可知,在添加活性炭后,其诱导率均比对照高。活性炭浓度范围 0.4%~0.8%,其胚状体诱导率随活性炭浓度的增大而增大,在活性炭浓度为 0.8%时,诱导率达到最大值为 4.44%。可见一定浓度的活性炭能有效促进宁夏枸杞花药培养胚状体的诱导。

表 5 活性炭对宁夏枸杞花药胚状体诱导率的影响

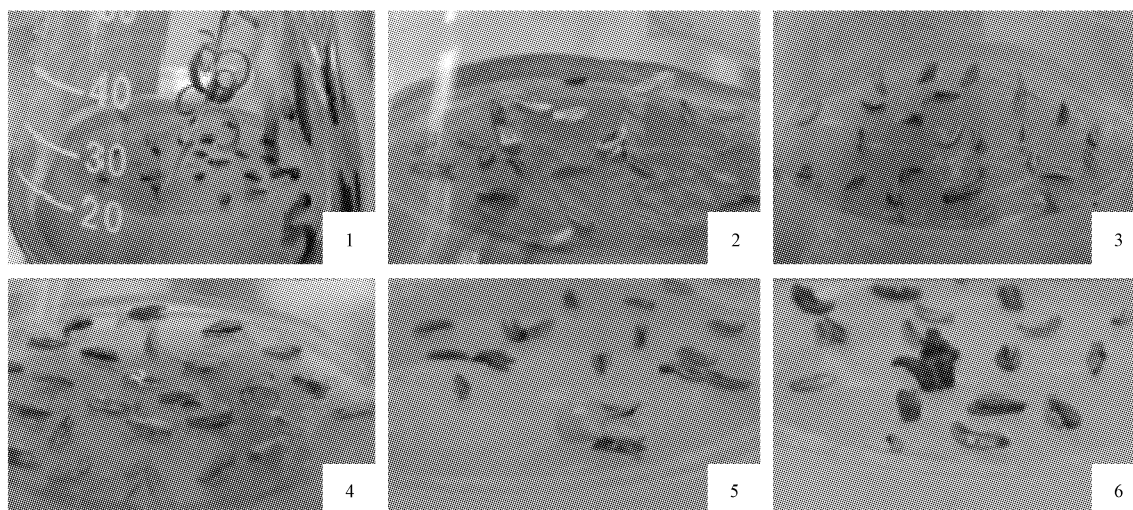
Table 5 Effect of activated carbon on induction rates of
embryoid from the anther of Ningxia wolfberry

活性炭浓度	接种花药数	胚状体数	平均诱导率
Concentration of carbon/ %	No. of anther incubated /个	No. of embryoid /个	The average induction rate/ %
0.0	210	2	0.95
0.2	150	2	1.33
0.4	120	2	1.67
0.6	150	4	2.67
0.8	180	8	4.44

3 讨论与结论

通过试验可知,5个宁夏枸杞新优品种(系)均可诱导出胚状体,其中“宁杞1号”、“宁杞7号”、“06-16’花药均具有较高的胚状体诱导率,且正常植株较多,以上材料可以通过胚状体直接成苗技术进行花药培养,以此获得枸杞单倍体材料。

在整个花药培养过程中,出现了不同类型的胚状体,一是正常完整的植株(图 1-1),具有根、茎、叶,一是不正常的胚状体,主要表现为肉眼可见的黄、绿、黄褐色小芽(图 1-2)、棒状芽(图 1-3)、白化苗(图 1-4)、肉质单叶



注:1. 正常的植株;2. 肉眼可见的小芽;3. 棒状芽;4. 白化苗;5. 肉质单叶;6. 白色或嫩黄色小圆点(愈伤组织)。

Note: 1. Normal plant; 2. Visible small bud; 3. Rod-shaped bud; 4. Albino seedling; 5. Single leaf fleshy; 6. Dots of white or bright yellow (callus).

图 1 不同类型的胚状体

Fig. 1 Different types of embryoid

(图 1-5)、白色或嫩黄色小圆点(愈伤组织)(图 1-6),其中小芽能够继续生长,而白化苗生长缓慢,且新抽出的叶转为嫩绿色,白色小圆点处于停滞生长状态,肉质单叶及棒状芽生长缓慢且玻璃化严重,愈伤组织在进行继代培养后开始迅速增殖。因此,如何在提高宁夏枸杞胚状体诱导率的同时,降低畸形胚的比例是亟待解决的问题。

利用该试验中胚状体诱导率最高的‘06-16’进行激素配比表明,2.0 mg/L KT 与 0.2 mg/L 2,4-D 组合最好,1.0 mg/L KT 与 0.1 mg/L 2,4-D 次之。在统计过程中发现,胚状体的发生持续进行,这可能是胚状体发育程度不同步性的一种表现,与早期细胞分裂的不同步性有关^[12],后期对获得的胚状体进行生根、扩繁后,F4 获得 5 个株系,F3 获得 6 个株系。说明通过激素调节能够提高宁夏枸杞胚状体的诱导率,但能发育成正常植株的胚较少。

大量文献报道,对离体花蕾进行 0℃ 以上低温预处理有助于花粉植株的诱导^[13]。低温预处理的时间及温度因材料种类不同而异,一般处理温度为 4℃ 左右^[14-19],在该试验中以新优品系‘09-106’为试验材料,4℃ 低温预处理 5 d,诱导率达到最高值与“宁杞 1 号”相同^[11],说明 4℃ 低温预处理有利于“宁杞 1 号”、‘09-106’胚状体的诱导。这主要可能是低温在一定程度上抑制花药离体后小孢子的衰败,使小孢子存活的时间延长,从而有更多的小孢子启动雄核发育^[9]。对新优品系‘09-106’进行高温预处理,发现高温热激处理 5 d 有利于胚状体的诱导,这与前期的研究认为高温预处理不利于胚状体的诱导有所不同^[11],这可能与枸杞基因型有关,这还有待于进一步的研究。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中国药典 2010 年版:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:132-133.
- [2] 李时珍. 本草纲目[M]. 北京:人民卫生出版社,1982.
- [3] 曹有龙、巫鹏举. 中国枸杞种质资源[M]. 北京:中国林业出版社,2014.
- [4] NGUYEN T, THANH V, 陈劲枫. 黄瓜(*Cucumis sativus* L.) 花药培养[J]. 中国瓜菜,2012,25(2):1-5.
- [5] 李守岭, 庄南生. 植物花药培养及其影响因素研究进展(综述)[J]. 亚热带植物科学,2006,35(3):76-80.
- [6] 顾淑荣. 枸杞花粉植株的获得[J]. 植物学报,1981,23(3):246-248.
- [7] 樊映汉, 藏淑英, 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.
- [8] 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,1999,21(3):346-350.
- [9] 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):58-59.
- [10] 钱春艳. 枸杞花药培养体系优化[D]. 昆明:西南林业大学,2010.
- [11] 罗青, 张波, 李彦龙, 等. 温度及暗培养对枸杞花药胚状体诱导的影响[J]. 北方园艺,2014(17):111-113.
- [12] 刘凡, 赵泓, 陈斌, 等. 辣椒游离小孢子细胞团培养的胚状体形成[J]. 分子细胞生物学报,2007,40(6):371-379.
- [13] 许智宏. 植物生物技术[M]. 上海:上海科技出版社,1998.
- [14] RAJASEKARAN K, MULLINS M G. Influence of genotype and sex-expression on formation of plantlets by cultured anthers of grapevines[J]. Agronomie,1983,3:233-238.
- [15] 史永忠, 杨振英, 薛光荣, 等. 梨花药培养获得胚状体[J]. 遗传,1992,14(4):43.
- [16] 徐振南, 万蜀渊. 影响草莓花药培养效率的若干因素[J]. 上海农业学报,1995,11(3):27-30.
- [17] 王震星, 杨恩芹. 金丝小枣花药离体培养再生植株研究[J]. 河北果树,1996(3):9-10.
- [18] 张磊, 刘贵仁. 石刁柏花药培养与染色体倍性变化的探讨[J]. 中国蔬菜,1990(2):4-6.
- [19] 裘文建. 园艺植物组织培养[M]. 上海:上海科技出版社,1996.

Embryoid Induction of *Lycium barbarum* L. Anther Culture

ZHANG Bo, LUO Qing, ZHANG Xiyang, CAO Youlong

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

Abstract: Taking Ningxia wolfberry new superior strain as the materials, using anther culture technology, the effect of different genotypes, hormone ratio, cold and hot temperature pretreatment, carbon on embryoid induction from the anther of Ningxia wolfberry was studied. The results showed that the ‘06-16’ was easy to be induced. The medium adding 2.0 mg/L KT and 0.2 mg/L 2,4-D was suitable for the induction of embryoid, the induction rate was 2.07%. When the flower bud was treated 3 days or 5 days under 4℃, cultivated in the high temperature (33℃), adding 0.8% active carbon in media, the induced rate could be improved.

Keywords: *Lycium barbarum* L.; anther culture; embryoid