

微扦插法保存茄子远缘杂交后代技术研究

张婷婷, 罗双霞, 王星, 申书兴, 陈雪平

(河北农业大学 园艺学院, 河北 保定 071001)

摘要:以茄子远缘杂交 F_2 代群体为试材,研究了不同杀菌剂、处理时间和培养基成分对接种茎段及其腋芽生长情况的影响。结果表明:酒精处理 30 s 后再用 0.1% 升汞处理 7~8 min, 茎段杀菌效果最好,健康茎段率为 40%~55%;酒精处理 30 s 后再用 0.1% 升汞处理 2~3 min, 新芽杀菌效果最佳,新芽健康可用率最高为 73.33%;适宜的新芽增殖培养基为 $MS+0.02\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{NAA}+1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{6-BA}$ 。

关键词:茄子;微扦插;远缘杂交后代;保存

中图分类号:S 641.103.6 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2016)11-0092-04

茄子是人们日常膳食中不可或缺的十大蔬菜种类之一,其世界年产量达 $4.94\times 10^7\text{ t}$,我国茄子年产量位居世界之首。近年来,因设施栽培茄子发展迅猛,使得我国茄子生产基本实现了周年供应。但由于长期人工栽培,许多病虫害及低温逆境引起茄子减产,甚至造成毁灭性损失。而茄子野生种具有许多优良的抗性基因,多年来许多育种工作者试图通过远缘杂交手段向栽培种导入这些珍贵的性状以进行栽培种的品种改良,但远缘杂交障碍限制了茄子野生资源与栽培种间 F_1 代及其衍生后代的获取,阻碍了茄子野生资源中抗性基因的研究与利用。

F_2 代群体是进行遗传作图和 QTL (quantitative trait locus, 数量性状位点) 研究的重要材料,但它是临时分离群体,无法获得多年多点的重复试验数据,严重影响

了 QTL 定位的准确性。因此,探索长期保存茄子远缘杂种及其衍生后代的高效方法,对于茄子野生资源中优异基因的利用和重要数量性状的遗传研究具有十分重要的意义。

微扦插法是指在无需或仅需少量激素条件下,离体培养带 1 个芽的茎段(单个茎节或微型插条),使顶芽或腋芽发育成苗^[6-7]。该方法结合扦插和组织培养技术,具有繁殖系数高、占地面积小、培养周期短^[8-9]、环境条件易控制和适于材料长年保存等特点。目前微扦插法多用于东北红豆杉、欧美山杨等木本植物的快速繁育^[6,10-12],在茄子远缘杂交后代长期保存方面的研究还鲜见报道。现以茄子远缘杂种的 F_2 代群体为试材,比较研究了不同杀菌剂、处理时间和培养基成分对接种茎段及其腋芽生长情况的影响,以期建立高效的茄子远缘杂种及其衍生后代的长期保存方法提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为河北农业大学蔬菜育种课题组提供的茄子远缘杂种 11-435(栽培茄)×11-587(野生茄)的 F_2 代群体。

1.2 试验方法

1.2.1 茄子远缘杂交 F_2 代群体茎段选择与处理 于晴

第一作者简介:张婷婷(1990-),女,硕士研究生,研究方向为蔬菜育种。E-mail:472351822@qq.com.

责任作者:陈雪平(1971-),男,博士,教授,研究方向为蔬菜遗传育种。E-mail:chenxueping@hebau.edu.cn.

基金项目:“十二五”农村领域国家科技计划资助项目(2012BAD02B02-3);河北省现代农业产业技术体系蔬菜创新团队资助项目。

收稿日期:2016-02-25

Abstract: Taking *Fragaria*×*ananassa* cv. Toyonaka as material, a cytosolic ascorbate peroxidase gene *Faapx-c* was cloned by RT-PCR and 3'-RACE technology, and the bioinformatic analysis of *Faapx-c* was carried out. The results showed that *Faapx-c* was 1 034 bp in length coding a protein FaAPX-c, which was a stable, hydrophilicity and non-secreted protein. The secondary structure of FaAPX-c contained mainly α -helix and random coil, with reliable 3D structure. And the protein belonging to a member of plant peroxidase superfamily. Expression analysis of *Faapx-c* gene showed that it was induced by low temperature in roots, stems, leafs, and the expression amounts were increased firstly and then decreased, but gradually disappeared in flowers. This study laid the foundation for further research on the function of *Faapx-c* gene.

Keywords: *Fragaria*×*ananassa*; *Faapx-c* gene; RACE; cloning; expression; bioinformatics

天 10:00 左右选择生长旺盛、健康无病的茄子植株,采集长约 15 cm,未生花序,在叶腋处隐约可见腋芽的新生侧枝,截去顶端,剪掉叶柄,斜剪成带有 1 个腋芽的小茎段 2~3 个。

1.2.2 茎段消毒与扦插 用流动自来水洗净茄子茎段,70%酒精处理 30 s,转至盛有灭菌剂的锥形瓶中进行消毒处理(表 1)。用无菌水冲洗 4~5 次,将形态学下端扦插于微扦插培养基上。每处理 20 个茎段,3 次重复。微扦插培养基为 MS 基本培养基+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.10 mg·L⁻¹ NAA,培养条件为光照时间 16 h·d⁻¹、温度 26℃。调查并计算微扦插茎段的污染率、死亡率和健康茎段率。污染率(%)=污染茎段数/接种茎段数×100;死亡率(%)=茎段或腋芽死亡的茎段数/接种茎段数×100;健康茎段率(%)=长出健康腋芽的茎段数/接种茎段数×100。

表 1 茄子远缘杂交 F₂ 代茎段消毒处理组合

Table 1 Sterilization combinations of segments form F₂ of eggplant distant hybridizationstem

灭菌剂	灭菌时间 Sterilization time/min							
Sterilant	2	4	6	8	10	12	14	16
5%NaClO	+	+	+	+	+	+	+	+
0.1%HgCl ₂	+	+	+	+	+	+	+	+
0.2%HgCl ₂	+	+	+	+	-	-	-	-

注:十代表设置的消毒处理组合;一代表未设置此消毒处理组合。

Note: + presents existence; - presents absence.

1.2.3 新芽灭菌与转接 茎段培养一段时间后,会陆续在叶腋处长出新芽,待新芽长 1.0~2.0 cm 时,将其从基部切下(不要切到茎段),用酒精灭菌 30 s 后,再用 0.1% HgCl₂ 分别灭菌 1、2、3、4、5、6 min,每处理 10 个新芽,3 次重复。然后无菌水冲洗 3~4 次,转接至新芽增殖培养基(成分同茎段扦插培养基)上,培养条件同上,每天记录健康生长的新芽数并计算健康芽率。健康芽率(%)=健康芽数/接种芽数×100。

1.2.4 新芽增殖培养基的优化 以茎段扦插培养基为

对照,以 MS 为基本培养基,添加 0.7%琼脂和 3.0%蔗糖,调整激素配比(表 2),pH 调至 5.8~6.0,每瓶接种 1 个新芽,每种培养基接 20 瓶,1 个月后调查新芽与愈伤组织生长状况。

表 2 不同新芽增殖培养基配方

Table 2 Different components of axillary buds proliferation medium

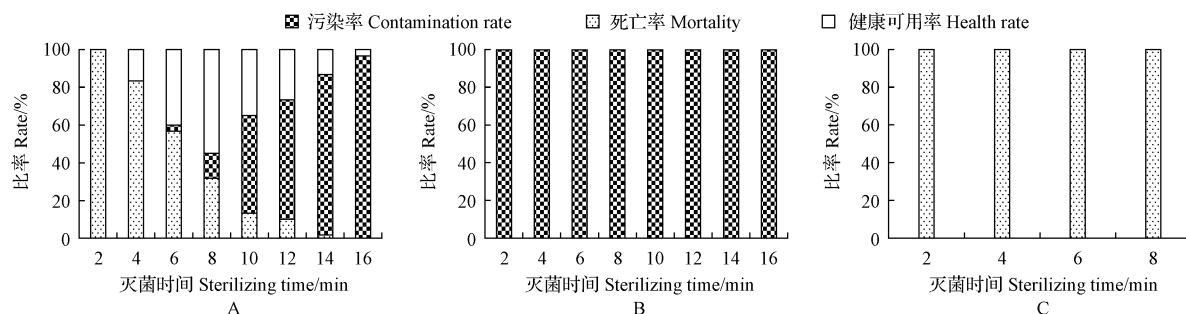
培养基代码	6-BA 浓度	NAA 浓度
Medium code	Concentration of 6-BA	Concentration of NAA
A1	1.0	0.00
A2	1.0	0.02
A3	1.0	0.05
A4	1.0	0.07
A5	1.0	0.12
A6	0.5	0.05
A7	0.7	0.07
CK	1.0	0.10

1.2.5 生根与定植 新芽培养 25~30 d 后,转接至无激素的 MS 固体培养基^[13]进行生根培养。15~20 d 后,敞开口瓶练苗,每天向瓶内喷无菌水保湿。4 d 后将小苗取出,洗掉根部的培养基,于生根液(0.1%多菌灵+0.1%生根壮苗剂原粉)中浸 30 s,定植在装有灭菌基质的营养钵中,继续练苗 20 d 后移栽至大田,调查移栽苗成活率。

2 结果与分析

2.1 茄子远缘杂交 F₂ 代茎段灭菌方法的筛选

从图 1 可以看出,在不同时间内经 5%NaClO 处理的茄子远缘杂交 F₂ 代茎段污染率达 100.00%,而经 0.2%HgCl₂ 处理的茎段死亡率为 100.00%,说明二者不宜作为茄子接种茎段的灭菌方法。用 0.1%HgCl₂ 处理茄子茎段时,随着灭菌时间的延长,茎段的污染率逐渐下降,死亡率逐渐升高,处理 8 min 时健康茎段率,达最高为 55.00%。说明先用 70%酒精灭菌 30 s,再用 0.1% HgCl₂ 灭菌 7~8 min 是茄子茎段灭菌的最佳方法。



注:A. 0.1%HgCl₂ 处理;B. 5%NaClO 处理;C. 0.2%HgCl₂ 处理。

Note: A. 0.1%HgCl₂ treatment; B. 5%NaClO treatment; C. 0.2%HgCl₂ treatment.

图 1 茎段杀菌效果比较

Fig. 1 Comparison of sterilization effect of eggplant stems

2.2 新芽灭菌时间选择

由图 2 可知,健康芽率随处理时间延长呈现出先升高后降低的趋势,在 3 min 时达到最高,为 73.33%。为转接新芽最佳的灭菌时间。

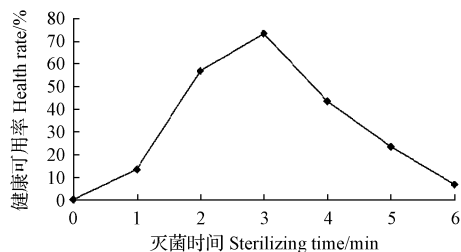


图 2 茄子远缘杂交 F_2 代新芽灭菌效果

Fig. 2 Sterilization effect of axillary buds form F_2 of eggplant distant hybridizationstem

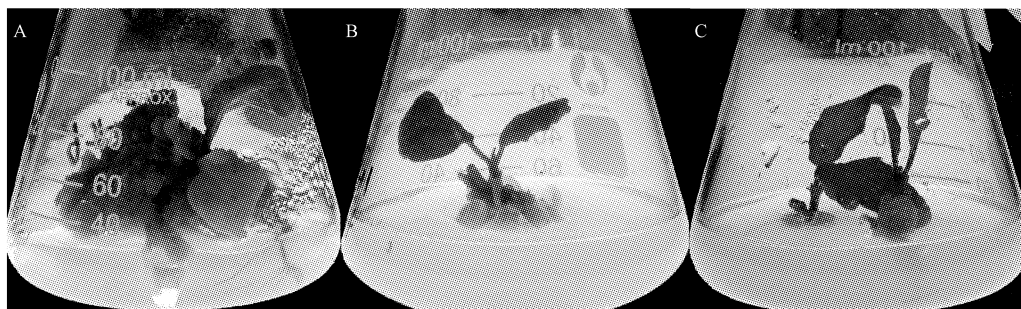


图 3 不同增殖培养基上茄子远缘杂交 F_2 代茎段新芽生长情况

Fig. 3 State of axillary buds form F_2 of eggplant distant hybridizationstem in multiplication medium

2.4 新苗生根与成活情况

在生根培养基上培养 15 d 后,新苗生根率 98%~100%。在营养钵中再次练苗 20 d 后将新生苗定植到大田中,成活率 95%~100%。

3 讨论

有学者利用组织培养法建立茄子再生体系^[14-20],多为先诱导愈伤组织形成,由愈伤组织再分化形成芽,继代培养后生根,过程比较繁琐,所用时间较长;所用的茄子材料大部分为纯合自交系,鲜有关于保存远缘杂种 F_2 代的报道;更重要的是不同基因型对培养基成分和激素配比有着较强的选择性,从而影响了该方法的推广应用。还有一些学者利用扦插法将远缘杂种 F_2 代保存下来,如 FRARY 等^[21]通过扦插法将一个茄子远缘杂交 F_2 代群体从美国成功运到了法国进行后续研究,LORENZO 等^[22]为了得到更为合理准确的花青素含量测定结果,利用扦插的方法将‘305E40’×‘67/3’的 F_2 代群体复制了 3 次以供调查。但是扦插法存在占地面积大、容易感染病虫害、管理过程繁琐和难以获得恒定的培养条件等缺点,而茄子茎段微扦插法可以解决上述问题,它

2.3 新芽增殖培养基的选择

比较新芽在 7 种分生培养基上的生长及愈伤组织形成情况,由图 3 可知,不同分生培养基上愈伤组织发育速度不同,与新芽生长间存在竞争。据一定时间内愈伤组织形成的大小,大致可将培养基分为 3 类:1) A5、A6、A7 和 CK 愈伤组织发育快,新芽的生长受到抑制(图 3A),2) A3 和 A4 新芽基部有较大的愈伤组织块形成,但发育速度较缓,对新芽生长的影响不大(图 3B);3) A1 和 A2 新芽基部几乎没有愈伤组织形成,或形成的愈伤组织块很小。表明 A1 和 A2 利于新芽分生培养。进一步比较发现, A1 培养基上的新芽常易出现叶片发黄的现象,因此 A2 培养基更适于茄子转接新芽的分生培养。

不仅可以保存茄子远缘杂交后代,还省去了愈伤组织再分化的步骤,直接从外植体上长出新芽,用时短且占地面积少,没有病虫害的侵染,培养条件容易控制,便于管理。用该试验获得的消毒方法和新芽增殖培养基,不仅可以用于 F_2 代群体的保存,为分子遗传连锁图谱的构建及 QTL 准确定位提供保证,也可将茄子远缘杂种 11-435(栽培茄)×11-587(野生茄)的 F_1 代成功保存下来,为研究克服远缘杂种不稔性的有效方法赢得时间。因此,此方法在遗传和育种研究中具有十分重要的应用价值。

由该试验可以看出,茄子微扦插对激素种类和配比的依赖性不强。如转接的茄子新芽在各培养基上均可发育成苗,对 6-BA 和 NAA 2 种激素间不同配比依赖性较弱。这与朱顺莲等^[23]在辣椒上的研究结果基本一致。但适宜的激素种类和配比可以显著提高茄子茎段微扦插的效果。如该试验中 6-BA 和 NAA 浓度配比较高时(A1 和 A2 培养基)利于茄子新芽生长发育,新芽基部形成的愈伤组织很小,甚至几乎没有愈伤组织形成。这可能与 6-BA 具有促进细胞分裂和芽的形成,以及低浓度的 NAA 能促进茎的伸长有关。同时,NAA 具有促进作

物的新陈代谢和光合作用的生理功能,缺少 NAA 后(A1培养基)新芽常易出现叶片发黄的现象。因此,在植物茎段培养中也应当考虑适量加入适宜种类和配比的激素,以提高微扦插效果。

参考文献

- [1] KALDA T S, SWARUP V, CHOUDHURY B. Studies on resistance to *Phomopsis* blight in eggplant (*Solanum melongena* L.) [J]. Vegetable Science, 1976, 3(1): 65-70.
- [2] DATAR V V, ASHTAPUTRE J U. Studies on resistance to *Phomopsis* fruit rot in eggplant [J]. Indian Phytopathology, 1988, 41(4): 637-638.
- [3] 刘富中, 连勇, 冯东昕, 等. 茄子种质资源抗青枯病的鉴定与评价 [J]. 植物遗传资源学报, 2005, 6(4): 381-385.
- [4] ROBINSON R W, SHAIL J W, GAO Y X. Interspecific hybridization of eggplant for *Verticillium* wilt resistance and other useful traits [M]//van den BERG R G, BARENDSE G W M, van der WEERDEN G M, et al. Advances in taxonomy and utilization. Netherlands: Nijmegen University Press, 2001: 279-291.
- [5] 高青海, 徐坤, 高辉远, 等. 不同茄子砧木幼苗抗冷性的筛选 [J]. 中国农业科学, 2005, 38(5): 1005-1010.
- [6] 孙琳, 李晓燕, 张俊红, 等. 亮叶桦微扦插快繁技术研究 [J]. 浙江林业科技, 2014, 34(4): 79-82.
- [7] 吴伟民, 袁骥, 钱亚明, 等. 宿晓红葡萄单芽茎段组织培养研究 [J]. 江苏农业科学, 2007, 1(5): 98-100.
- [8] 朱学栋, 刘奕清, 赵荣隆, 等. 红阳猕猴桃快速繁殖体系的建立 [J]. 湖北农业科学, 2012, 51(11): 2369-2371.
- [9] 刘彤, 赵虎基, 陈芳, 等. 啤酒花茎段培养及快速繁殖技术研究 [J]. 西北植物学报, 2000, 20(5): 778-783.
- [10] 赵志新. 北美海棠微扦插繁殖试验 [J]. 天津农业科学, 2012, 18(1): 123-125.
- [11] 王淑杰, 袁丽娜, 刘丽丽, 等. 东北红豆杉微扦插生根育苗技术研究

[J]. 园艺学报, 2011, 38(增刊): 2637.

- [12] 武晓东. 欧美山杨杂种微扦插技术及生根机理研究 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2011.
- [13] 黄志银, 曹必好. 茄子组织培养高效再生植株体系的优化 [J]. 长江蔬菜, 2012(10): 4-7.
- [14] 郝爱平, 魏继承, 国会艳. 非洲红茄组培快繁技术研究 [J]. 北方园艺, 2009(12): 112-113.
- [15] 吴耀武, 马彩萍. 茄子茎愈伤组织的产生与植株的再生 [J]. 西北植物研究, 1981(2): 52-54.
- [16] 余波澜, 张利明, 孙勇如, 等. 茄种子叶和下胚轴的组织培养和植株再生 [J]. 植物生理学通讯, 2003, 39(4): 317-320.
- [17] 龚静, 褚云霞, 许爽, 等. 茄种子叶下胚轴立体再生体系建立 [J]. 北方园艺, 2011(15): 151-154.
- [18] CHAKRAVARTHI D V N, RAO Y V, RAO M V S, et al. Genetic analysis of *in vitro* callus and production of multiple shoots in eggplant [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2010, 102(1): 87-97.
- [19] CLAUDIA M, ELISABETH M. Eggplant (*Solanum melongena* L.): tissue culture, genetic transformation and use as an alternative model plant [J]. Acta Botanica Brasilica, 2005, 19(1): 139-148.
- [20] 张国刚, 韩洪强, 蒋明敏, 等. 茄子再生体系研究 [J]. 分子植物育种, 2014, 12(4): 810-816.
- [21] FRARY A, DOGANLAR S, DAUNAY M C, et al. QTL analysis of morphological traits in eggplant and implications for conservation of gene function during evolution of *solanaceous* species [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2003, 107(2): 359-370.
- [22] LORENZO B, SERGIO L, EZIO P, et al. A RAD tag derived marker based eggplant linkage map and the location of QTLs determining anthocyanin pigmentation [J]. PLoS One, 2012, 7(8): e43740.
- [23] 朱顺莲, 龙明华, 武鹏, 等. 紫色盆栽辣椒微扦插快速繁殖初步试验 [J]. 广西农学报, 2010, 25(1): 18-21.

Technology Research on Reserving Descendants From Distant Hybridization of Eggplant by Micro-cutting

ZHANG Tingting, LUO Shuangxia, WANG Xing, SHEN Shuxing, CHEN Xueping
(College of Horticulture, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071001)

Abstract: Taking the F_2 descendants from distant hybridization of eggplant as material, the effects of different sterilants and treatment time, and medium components on the growth of stem segments and axillary buds were studied. The result showed that the rate of healthy stem segments was 40%—55% after sterilizing with alcohol for 30 seconds and then 0.1% $HgCl_2$ for 7—8 minutes; the method to sterilize eggplant axillary buds with alcohol for 30 seconds and then 0.1% $HgCl_2$ for 2—3 minutes was effective and the highest rate of the axillary buds was 73.33%; the optimum multiplication medium for axillary buds was MS supplemented with 0.02 $mg \cdot L^{-1}$ NAA and 1.0 $mg \cdot L^{-1}$ 6-BA.

Keywords: eggplant; micro-cutting; distant hybridization descendant; reserve