

百合远缘杂交未成熟子房的离体培养研究

赵兴华, 吴海红, 杨佳明

(辽宁省农业科学院 园艺分院, 辽宁 沈阳 110161)

摘 要:以不同百合种间杂交获得的子房为外植体,根据子房的发育程度,采用子房切片、胚珠或者小胚进行离体培养,观察子房切片、胚珠和小胚的萌发和生长情况,以期筛选出适合小胚、胚珠和子房切片萌发和生长的培养基。结果表明:适合子房切片培养的培养基为 MS+NAA 0~0.3 mg/L+蔗糖 30 000 mg/L;适合胚珠培养的培养基为 1/2 MS+BA 0~0.2 mg/L+蔗糖 30 000 mg/L;适合小胚培养的培养基为 1/2 MS+BA 0~0.2 mg/L+NAA 0~0.2 mg/L+蔗糖 30 000 mg/L。

关键词:百合;远缘杂交;子房;离体培养

中图分类号:S 682.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)04-0090-04

百合是一种重要的观赏植物,具有较高的经济价值。其中麝香百合(Longiflorum)、亚洲百合(Asiatic)、东方百合(Oriental)及喇叭百合(Trumpet)是商业上最重要的百合四大杂种系,具有独特的优良性状。百合远缘杂交指不同种、属或亲缘关系更远的物种间杂交,产生的后代为远缘杂种。远缘杂交是育种的重要手段,可打破种(或科、属)之间的界限,使不同物种间的遗传物质进行交流或结合,将 2 个或多个物种经过长期进化积累起来的有益特性结合起来,再经过染色体组加倍

和选择,形成生命力更强的新物种和新品种。花型好、花色佳且具香气的东方百合(Oriental)与麝香百合(Longiflorum)是目前花卉市场上较受欢迎的百合种系,具有重要的经济价值,但由于其抗寒及抗病害能力差^[1],在我国产业化生产过程中需要较好的设施及较高的管理水平,致使生产成本升高,经济利润降低,削弱了市场竞争能力。通过与抗寒、抗病害能力较强的亚洲百合(Asiatic)进行杂交,获得兼具二者优良品质的杂交种,是解决此问题的重要途径之一^[1-2]。但远缘杂交一般存在不同程度的不亲和性,有受精前和受精后 2 种障碍,受精前障碍表现在花粉排斥、花粉管在花柱内延伸缓慢甚至停止,受精后障碍表现在子房提早开裂、胚乳、胚胎败育等,最终导致杂交成功率较低^[3]。该试验通过对百合远缘杂交未成熟子房的人工培养,可有效解决百合受精后的发育障碍,使大量远缘杂交胚继续发育成正常种

第一作者简介:赵兴华(1973-),男,吉林镇赉人,硕士,副研究员,现主要从事百合育种与花卉栽培技术等工作。E-mail:zhaoxh@163.com.

基金项目:沈阳市科技攻关资助项目(F10-085-3-00-1)。

收稿日期:2013-11-01

Establishment of Efficient Plantlet Regeneration System From Petiole Explants for *Brassica pekinensis* cv. 'Luoyang baotou'

DU Li, YAO Yao, LI Yong-peng

(School of Life Science and Technology, Nanyang Normal University, Nanyang, Henan 473000)

Abstract: Taking the no vaccine petiole of *Brassica pekinensis* cv. 'Luoyang baotou' as explant, the cabbage plant regeneration system was established by direct organogenesis. The results showed that the effects of different plant hormones combinations at different concentrations on seedlings propagation, adventitious buds induction from petiole explants and seedling rooting were different. The optimal medium for propagation of seedlings was MS supplemented with BA 1.0 mg/L+IBA 0.3 mg/L, and the induction rate was 86.7%; the highest adventitious buds induction frequency was 76.7% by using MS supplemented with BA 2.5 mg/L+IBA 0.3 mg/L, the optimal medium for rooting was MS supplemented with IBA 1.0 mg/L and the rooting rate was 90.0%.

Key words: *Brassica pekinensis* cv. 'Luoyang baotou'; petiole; tissue culture; plantlet regeneration

子,以加快育种进程,缩短育种周期,同时可获得大量的远缘杂交后代,实现百合属种间远缘杂交,创造新种质;同时胚抢救技术与百合瓶内结球技术的结合,能有效缩短百合杂交后代的培育周期并提高杂种的成活率。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以不同百合远缘杂交子房为外植体,根据子房发育程度的不同,分别取其幼胚、胚乳或者直接进行子房切片培养。所取的百合子房来自于以下杂交组合:I“蒙特祖玛”(OO)×“信使”(LA);II“穿梭”(AA)×“信使”(LA);III“瓦迪所”(AA)×“多顿”(OO);IV“美少女”(OT)×“皮兰德娄”(LA);V“美少女”(OT)×“蒙特祖玛”(OO)。I~V杂交组合有胚率情况见表1。

表1 I~V杂交组合有胚率情况^[4]

Table 1 I~V the status of embryo in different crossing combination^[4]

编号	杂交组合 Hybrids	有胚率 Embryo rate/%
I	“蒙特祖玛”×“信使”(OO×LA)	1.5
II	“穿梭”×“信使”(AA×LA)	2.8
III	“瓦迪所”×“多顿”(AA×OO)	5.7
IV	“美少女”×“皮兰德娄”(OT×LA)	5.4
V	“美少女”×“蒙特祖玛”(OT×OO)	5.3

1.2 试验方法

1.2.1 外植体处理 取杂交授粉后10~30 d的子房,在无菌条件下先将子房在75%的酒精中浸泡1~2 s,然后用镊子夹着放到酒精灯火焰上方燎烧进行表面杀菌,将处理完的子房放在培养皿中备用。

1.2.2 子房切片培养 将表面灭菌的子房在超净工作台上横切成0.5 cm厚的小片,平铺在MS+NAA 0~0.3 mg/L+蔗糖30 000 mg/L的培养基中,NAA的浓度分别为0、0.1、0.2、0.3 mg/L。

1.2.3 小胚培养 将表面灭菌的子房在超净工作台上用手术刀沿着腔室切开,剥离膨大的胚珠,取出线状的小胚,直接接种在1/2 MS+BA 0~0.2 mg/L+NAA 0~0.2 mg/L+蔗糖30 000 mg/L的培养基上,BA浓度分别为0、0.1、0.2 mg/L,NAA浓度分别为0、0.1、0.2 mg/L。

1.2.4 胚珠培养 将百合子房的腔室切开将胚珠接种在1/2 MS+BA 0~0.2 mg/L+蔗糖30 000 mg/L的培养基上,BA浓度分别为0、0.1、0.2 mg/L。

1.2.5 籽球培养 将胚抢救所得小籽球,去掉根和叶转接到MS+BA 0~1.0 mg/L+NAA 0~0.1 mg/L+蔗糖30 000~50 000 mg/L的增殖培养基上,BA浓度分别为0、0.5、1.0 mg/L,NAA浓度分别为0、0.05、0.10 mg/L。经过2~3个月的培养,直径达到1 cm左右,即可达到出瓶标准。

2 结果与分析

2.1 百合远缘杂交未成熟子房的离体培养时间、培养部位的选择

2.1.1 子房切片培养 在子房没开裂前,子房授粉时间相对比较短,大约10~15 d,这时子房比较小,表面也看不到明显的凸起,因此,宜选择子房切片培养的方法(图1)。

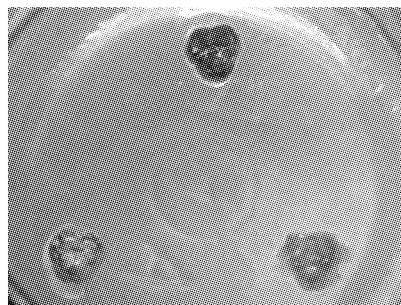


图1 子房切片培养

Fig. 1 Ovary biopsy culture

2.1.2 小胚培养 杂交授粉后20~30 d表面能看到明显的凸起子房,在超净工作台上打开表面灭菌的子房,剥离膨大的胚珠,剥去种皮,有的能看到明显的线状的小胚,将其剥离出来进行培养(图2)。

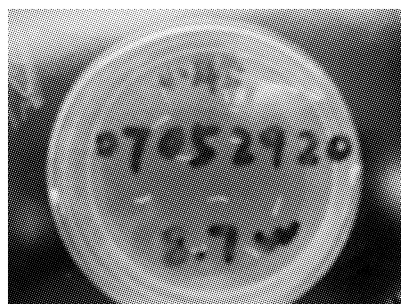


图2 小胚培养

Fig. 2 Immature embryo culture

2.1.3 胚珠培养 杂交授粉后20~30 d表面能看到明显的凸起的子房,在超净工作台上打开表面灭菌的子房,剥离膨大的胚珠,剥离种皮。有的胚珠只是水泡状,将种皮轻轻去掉直接放在培养瓶中培养;有的胚珠已经很成熟,看不到胚,直接将其放在培养瓶中培养(图3)。

2.2 不同培养部位的发育情况

2.2.1 子房切片培养 培养7 d后,可明显看到子房膨大现象,20 d后子房内的胚珠生长肥大后向切口两端突出,露出子房外(图4)。再经过20 d后切开子房壁,将胚珠剥离出来培养,在胚珠培养基中15 d左右可发芽。

2.2.2 小胚和胚珠培养 经过15~20 d左右的培养,发育成具有根、鳞茎、叶的小苗,如图5为胚珠培养出的苗。小胚培养出苗的时间比胚珠早5 d左右,在小籽球的附近没有胚乳的残骸。

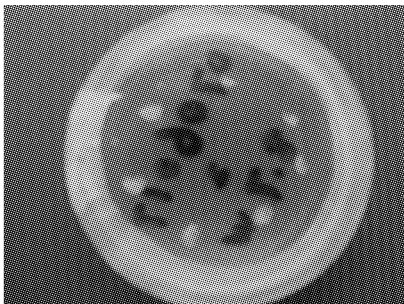


图3 胚珠培养
Fig.3 Ovule culture

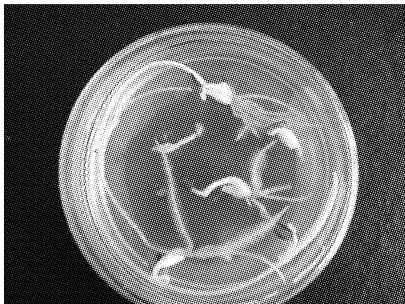


图5 胚珠培养出的苗
Fig.5 Seedlings from ovule culture

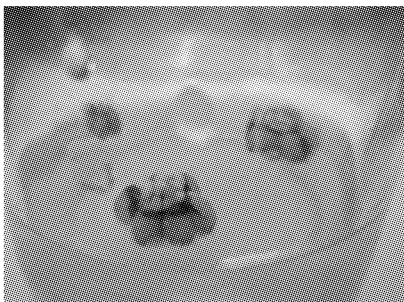


图4 子房切片培养 20 d 的培养状况
Fig.4 The status of ovary slice cultured 20 days

表2 不同培养基子房切片诱导情况

Table 2 The status of ovary slice culture in different medium

序号 Numbers	培养基 Culture medium/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	接种子房切片数 Inoculation of ovary slice numbers/个	切片膨大数 Section enlargement numbers/个	诱导率 Inductivity rate/%
1	MS+蔗糖 30 000	30	26	86
2	MS+NAA 0.1+蔗糖 30 000	30	28	93
3	MS+NAA 0.2+蔗糖 30 000	30	27	90
4	MS+NAA 0.3+蔗糖 30 000	30	25	83

表3 不同培养基对小胚、胚珠诱导小籽球情况

Table 3 The situation of inducing of immature embryo,ovule into bulbs in different medium

序号 Numbers	培养基 Culture medium $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	接种小胚数 Inoculation of small embryo numbers/个	诱导出苗数 Induced seedling numbers/个	诱导率 Inductivity rate /%	接种胚珠数 Inoculation of ovule numbers/个	诱导出苗数 Induced seedling numbers/个	诱导率 Inductivity rate /%
1	MS+BA 0+NAA 0+蔗糖 30 000	5	5	100	20	16	80
2	MS+BA 0+NAA 0.1+蔗糖 30 000	5	5	100	20	15	75
3	MS+BA 0+NAA 0.2+蔗糖 30 000	5	5	100	20	17	85
4	MS+BA 0.1+NAA 0+蔗糖 30 000	5	5	100	20	18	90
5	MS+BA 0.1+NAA 0.1+蔗糖 30 000	5	5	100	20	14	70
6	MS+BA 0.1+NAA 0.2+蔗糖 30 000	5	5	100	20	15	75
7	MS+BA 0.2+NAA 0+蔗糖 30 000	5	5	100	20	16	80
8	MS+BA 0.2+NAA 0.1+蔗糖 30 000	5	5	100	20	14	70
9	MS+BA 0.2+NAA 0.2+蔗糖 30 000	5	5	100	20	18	90

表4 百合小籽球鳞片液培情况

Table 4 The status of growth of scales from small bulbs in liquid medium

培养方式 Training methods	部位 Position	瓶数 The number of bottles/瓶	每瓶接种数 Each bottle of inoculation numbers/个	诱导小籽球数 Induced small seed balls/个	出球时间 The ball time/d
液培	小鳞片	18	5	157	10
固培	小鳞片	18	5	152	15

2.3 不同培养部位培养基的选择

2.3.1 子房切片培养 由表2可知,子房切片培养对培养基要求不严格,诱导率均在80%以上。

2.3.2 小胚、胚珠培养 由表3可知,小胚培养对培养基要求也不严格,诱导率均为100%;胚珠对培养基的要求同样不严格,但是诱导率没有小胚的高,在70%以上。

2.4 液培对百合小鳞片诱导小籽球和小籽球增大的影响

2.4.1 小鳞片液体悬浮培养 对小鳞片切块进行了液体悬浮培养,有的液培的鳞片切块比固体培养的早5 d 诱导出小籽球,20 d后统计诱导小籽球数量见表4。

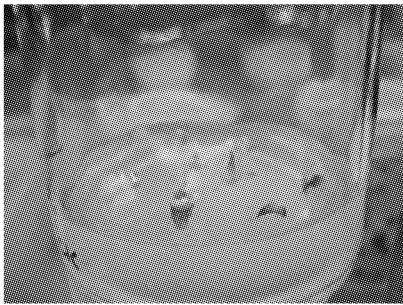


图6 固培鳞片情况

Fig. 6 Scales in solid medium

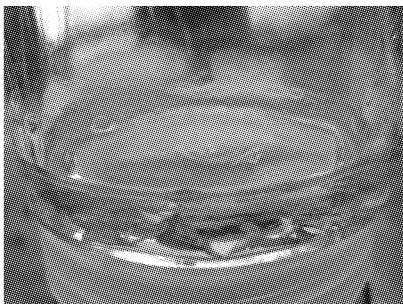


图7 液培鳞片情况

Fig. 7 Scales in liquid medium

2.4.2 小籽球液体悬浮培养 对小籽球进行了液体悬浮培养,15 d后观察液体悬浮培养的小籽球大小与对照相差不大,但水培的根很短,看着比较干净;固培的须根(气生根)比较多、比较长,看着有点乱,转接的时候切着比较费工。

3 结论与讨论

屈云慧等^[5]选择包括云南野生百合及国内外各类优质百合为亲本,以东方百合杂种系为母本,配制了5个不同的杂交组合类型,包括4个远缘杂交组合类型,以子房切片培养方法为主,对授粉后8~23 d的子房和幼胚进行了离体培养挽救。胚龄最小的为8 d,最大的为23 d,均可培养出杂交后代。但胚龄不同,胚萌发时间有一定的差异。胚龄越小,胚萌发需要的时间越

长。王丹菲等^[6]认为40~60 d胚龄的种胚是较为适宜离体胚培养的,具体胚龄对胚培养的影响与不同杂交组合有关。

该试验筛选出的子房切片适宜培养基为MS+NAA 0~0.3 mg/L+蔗糖 30 000 mg/L;胚珠培养的培养基为1/2 MS+BA 0~0.2 mg/L+蔗糖 30 000 mg/L;小胚培养的培养基为1/2 MS+BA 0~0.2 mg/L+NAA 0~0.2 mg/L+蔗糖 30 000 mg/L。孙晓梅等^[7]认为在基本培养基中,MS培养基对百合幼胚萌发和生长效果最好。蔗糖为最好碳源,萌发及成苗率高,且苗生长势好,分生多,白糖效果与蔗糖相差不大。通过正交实验设计得出最佳组合培养基为基本培养基MS附加琼脂 10 g/L, pH 5.0,并加入蔗糖 60 g/L、6-BA 0.1 mg/L、NAA 0.001 mg/L、CH 和 VB₆。赵珺等^[8]研究麝香百合杂种系的子房离体培养最佳愈伤组织诱导培养基为MS+2,4-D 0.5 mg/L+6-BA 1.0 mg/L,最佳分化培养基为MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.3 mg/L。

液培对百合小鳞片诱导小籽球的数量影响不大,只是能够提早诱导出小球。数量与对照固培差异不显著,液培可以节省琼脂的费用,但是需要振荡仪进行震荡培养;液体悬浮培养对小籽球的增大影响也不大。

参考文献

- [1] 穆鼎. 观赏百合[M]. 北京:中国农业出版社,2005.
- [2] 李守丽,石雷,张金政,等. 百合育种研究进展[J]. 园艺学报,2006,33(1):203-210.
- [3] 郝瑞娟,穆鼎,张檀,等. 百合品种间杂交的初步研究[J]. 西北林学院学报,2005,20(3):87-89.
- [4] 赵兴华,苏胜举,王洪波,等. 不同百合品种间杂交亲和性研究[J]. 中国农学通报,2011,27(25):103-107.
- [5] 屈云慧,熊丽,吴学尉,等. 百合不同远缘杂交基因型对胚培养效果的影响[J]. 西南农业学报,2007,20(4):711-715.
- [6] 王丹菲,代汉萍,雷家军. 百合种间杂种胚离体培养研究[J]. 北方园艺,2006(4):157-159.
- [7] 孙晓梅,罗凤霞,王亚斌,等. 百合幼胚离体培养基的筛选[J]. 沈阳农业大学学报,2002,33(1):22-26.
- [8] 赵珺,宋阳,雷家军. 麝香百合子房离体培养的研究[J]. 辽宁农业科学,2006(5):11-13.

Study on Lily Distant Hybridization *in vitro* Culture of Immature Ovary

ZHAO Xing-hua, WU Hai-hong, YANG Jia-ming

(Horticulture Branch, Liaoning Academy of Agriculture Sciences, Shenyang, Liaoning 110161)

Abstract: Taking different inter specific hybridization obtained lily ovary as explants, according to the degree of development of the ovary, the slice using ovary, ovules or small embryos were cultured *in vitro* to observe sliced ovary, ovules and small embryo germination and growth, and filter out suitable germination and growth medium for small embryo, ovule and ovary slices. The results showed that good ovary slice culture medium was MS+NAA 0~0.3 mg/L+ sucrose 30 000 mg/L; suitable ovule culture medium was 1/2 MS+BA 0~0.2 mg/L+ sucrose 30 000 mg/L; suitable for small embryo culture medium was 1/2 MS+BA 0~0.2 mg/L+NAA 0~0.2 mg/L+ sucrose 30 000 mg/L.

Key words: lily; distant hybridization; ovary; *in vitro* culture