

红王子锦带花药离体培养中花粉胚诱导的研究

王 丹¹, 马 静², 舒 钰¹, 李 晶¹

(1. 黑龙江省林业科学研究所, 黑龙江 哈尔滨 150081; 2. 黑龙江省农业科学院 园艺分院, 黑龙江 哈尔滨 150069)

摘要:通过对红王子锦带花粉胚发育的细胞学观测与统计分析,对适宜红王子锦带花粉启动分裂的因子、适宜的花粉发育时期、适宜的接种时期以及适宜的培养基组合等条件进行了筛选。结果表明:适宜花粉启动分裂的因子为6-BA与MS基本培养基,6-BA的浓度越高,MS的浓度越低,出胚率越高;适宜花粉启动分裂的发育时期为四分体时期,出胚率为6.73%;适宜诱导的接种时期为6月;适宜的培养基组合为:1/3MS+6-BA 2.0 mg·L⁻¹+NAA 1.0 mg·L⁻¹+1% SUC。

关键词:红王子锦带;花粉胚;正交试验

中图分类号:S793.9

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2012)06-0019-05

红王子锦带 (*Weigela florida* cv. 'Red Prince') 是近几年刚从美国引进的木本植物^[1], 其观赏价值很高, 具有生长快、花期长和抗逆性强等优良性状。因此, 对它的研究得到了广泛的关注。由于木本植物长期异花授粉, 植株高度杂合, 影响了其优良性状的延续。虽然花药培养不是获得单倍体的唯一方法, 但这种方法一旦完善起来, 不仅能使花粉植株的性状得以充分表达, 而且可直接供植物育种家及园林绿化应用, 因而较其它方法更具优越性^[2]。自从在水稻和小麦等主要粮食作物的花药离体培养工作中取得了突出成就后^[3], 近年来, 很多双子叶植物都已能通过花药的离体培养直接由花粉细胞发育成花粉植株, 但目前的诱导率还很低, 致使单倍体育种工作艰难进行^[4]。

花粉愈伤组织分化苗的频率比较低, 而胚状体成苗率可大大提高, 所以研究胚状体的形成规律在实践角度上有它的意义^[5]。花粉胚的诱导, 除与培养基、激素和其它环境因素有关外, 花粉发育时期也很重要^[6]。现通过正交试验对红王子锦带进行花药离体培养, 研究影响诱导花粉胚的各种因子及其作用, 以找出适宜诱导花粉胚的培养

基及适宜花粉发育时期, 为进一步控制花粉胚的形成提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

花药在接种前, 预先用醋酸洋红压片法镜检, 以确定花粉的发育时期^[7] (见表1)。花蕾的外部形态与花粉发育时期的关系 (见图版 I, 1~3)。

表1 花蕾形态与小孢子发育时期的关系

Table 1 Relationship between developmental stage of microspore and the size of flower buds

花蕾形态 Bud morphology	小孢子发育时期
花药颜色 花蕾长度/cm	Developmental stage of microspore
Color of flower buds Length of flower buds	
粉色至淡粉色 2.0~4.0	单核靠边期
淡粉色至淡黄色 1.0~2.0	单核期
淡黄色至淡黄绿色 0.3~1.0	四分体时期

由于其花朵不间断地开放, 故在6~8月期间, 将以上3个花粉发育时期的花药同时接种。

1.2 方法

1.2.1 消毒及接种 将采取的花蕾包好放入冰箱冷藏48 h左右, 取出放在超净工作台上, 用75%的酒精喷洒灭菌30 s, 再用灭菌后的滤纸吸干, 用镊子剥开花蕾, 取出花药, 接种到诱导培养基上。然后将其进行暗培养, 观察其诱导情况。

1.2.2 培养 离体花药在培养基上先暗培养一段时间(28~56 d), 培养温度为(25±1)℃, 待诱导出花粉胚之后放到光下培养, 光源采用日光灯, 光照强度为2 000 lx。

收稿日期: 2012-03-12

基金项目: 黑龙江省科技厅科技攻关资助项目(GB07B303-02)

第一作者简介: 王丹(1982-), 女, 黑龙江省密山市人, 在读硕士, 研究实习员, 从事单倍体育种研究。E-mail: wd_snail@163.com。

通讯作者: 李晶(1963-), 女, 黑龙江省哈尔滨市人, 硕士, 研究员, 从事园林景观树种的引种与繁育研究。E-mail: lijing0426@163.com。

1.2.3 培养基的影响 试验采用不同比例的MS基本培养基附加不同浓度细胞分裂素、生长素和蔗糖进行正交试验(见表2)。

表2 红王子锦带花药培养的 $L_9(3^4)$ 正交表
Table 2 Orthogonal table $L_9(3^4)$ of anther culture on *Weigela florida* cv. 'Red Prince'

序号 No.	基本培养基 Basic medium	6-BA /mg·L ⁻¹	NAA/mg·L ⁻¹	蔗糖% SUC
1	MS	0.5	0.5	1
2		1.0	1.0	2
3		2.0	2.0	4
4	1/2MS	0.5	1.0	4
5		1.0	2.0	1
6		2.0	0.5	2
7	1/3MS	0.5	2.0	2
8		1.0	0.5	4
9		2.0	1.0	1

2 结果与分析

2.1 花粉胚发育过程的形态特征

在离体条件下,由于改变了花粉原来的生活环境,花粉正常发育途径受到了抑制,不能像常规的花粉那样萌发,而是像胚细胞一样持续进行分裂增殖^[8]。通过观察,发现花粉细胞并不是按照单一的途径进行分裂,而是大致按照两种途径进行分化产生花粉胚的^[9]。

当花药接入培养基7d后,花药壁表面颜色逐渐变深,体积逐渐变大。大约经过14d的诱导期,一部分没有分裂的花粉退化、积累淀粉或形成巨大花粉^[10](见图版I,4)。而另一部分花粉细胞经过了第一次的有丝分裂后,形成了两种不同类型的二核花粉(见图版I,5)。此时,花粉细胞大致通过两种途径进行分化^[11-12]。第一种途径是均等分裂,花粉细胞经过有丝分裂形成两个均等的营养核,两个核的大小、形态和着色程度上完全相似(见图版I,6~7),以后二核间产生壁而形成两个子细胞(见图版I,8),进而发育成多细胞团,破壁后形成胚状体或愈伤组织;第二种则是不均等分裂。即花粉细胞沿着正常的发育途径演化,经第一次有丝分裂形成不均等的营养核和生殖核。其生殖核较小,一般不分裂或分裂几次就退化。而较大的营养核经过一次分裂形成两个大的营养核,这两个大的营养核与较小的生殖核共同组成一个三核

花粉细胞,此后营养核继续分裂形成多个游离核,游离核形成细胞壁,发育成胚状体(见图版I,9~14),而较小的生殖核则逐渐退化消失。

花药接种后20d左右,不但体积明显变大、变粗,有的花药在其中部或端部的药室内形成裂缝,从中长出白色不透明的圆形愈伤组织(见图版II,1)。花药接种35~40d,有的花药从中部裂缝处直接长出类似幼胚的物体,可见到顶端较粗,形似火柴头,呈淡绿色或淡黄色(见图版II,2)。显然,药壁在花粉胚发育的过程中起着类似胎座的作用^[4]。在双目立体显微镜下观察是尚未展开的两片子叶。用小尖镊子很容易将胚状体从花药上剥离下来,此时可见到胚轴的基部为圆锥形的胚根(见图版II,3)。因此,从外形基本上可以确定它是由花粉发育而来的花粉胚。

2.2 花粉发育时期对出胚率的影响

6月中旬以四分体、单核期、单核靠边期3个时期的花药进行接种试验,结果表明:单核靠边期接种效果最差,经40d的培养,在9种培养基中均无花粉胚的产生,说明单核靠边期的花药不宜作为离体培养之用。单核期的花药接种后,仅在3号培养基MS+6-BA 2.0 mg·L⁻¹+NAA 2.0 mg·L⁻¹+4% SUC中产生了少量花粉胚,出胚率为0.87%。花粉发育为四分体时期的花药接种后,效果有明显提高,在9种培养基组合中有7种出现了花粉胚,四分体时期的出胚率为6.73%,是单核期的7倍以上(见图1)。这表明在6月份接种以花粉发育至四分体时期的花药进行离体培养最为适宜,这可能与此时的花粉细胞活力旺盛有关。

2.3 不同接种时期对出胚率的影响

同样以花粉四分体时期的花药为外植体,在

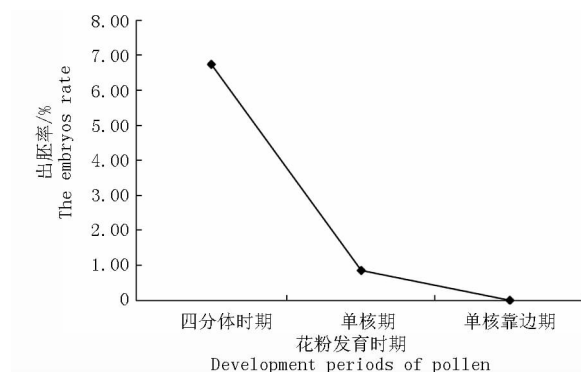


图1 不同花粉发育时期出胚率

Fig. 1 The induction rate of different pollen development periods on embryos

6 月中旬、7 月中旬和 8 月中旬取材接种。

从图 2 可以看到,6、7、8 三个月比较,以 6 月

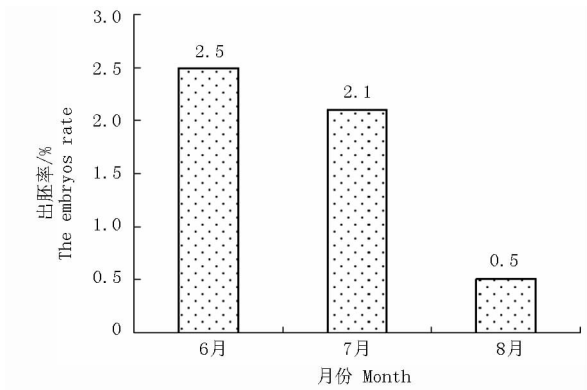


图 2 不同接种时期对出胚率的影响
Fig. 2 The effect of different inoculating date on embryo rate

表 3 不同基本培养基及激素组合对花粉胚形成的影响

Table 3 The effects of different mediums and phytohormone combinations on the formulation of pollen embryo

序 No.	基本培养基 Basic medium	因素 Factor			诱导率/% Induction rate
		6-BA/mg·L ⁻¹	NAA/mg·L ⁻¹	蔗糖/% SUC	
1	MS	0.5	0.5	1	0±0h
2		1.0	1.0	2	5.41±0.29e
3		2.0	2.0	4	5.56±0.22e
4	1/2MS	0.5	1.0	4	2.13±0.18g
5		1.0	2.0	1	7.41±0.32d
6		2.0	0.5	2	9.62±0.40c
7	1/3MS	0.5	2.0	2	4.46±0.68f
8		1.0	0.5	4	12.50±0.23b
9		2.0	1.0	1	15.15±0.31a
K1	10.97	6.59	22.12		
K2	19.16	25.32	22.69		
K3	32.11	30.33	17.43		
X ₁	3.66±2.75b	2.18±1.97b	7.37±5.67a	7.52±6.56a	
X ₂	6.36±3.37b	8.44±3.18a	7.56±5.89a	6.50±2.41a	
X ₃	10.70±4.84a	10.11±4.18a	5.81±1.35a	6.71±4.60a	
R	7.04	7.93	1.75	1.02	

注:小写字母表示在 0.05 水平上差异显著。
Note:The lowercase letters mean significant difference at 0.05 level.

此,将注意力放在细胞分裂素和基本培养基的调整上是正确的。

据李文卓等认为,6-BA 作为人工合成的细胞分裂素,与天然的细胞分裂素结构十分相似,很可能比其它的细胞分裂素更适用于花药培养^[13]。当培养基中 6-BA 浓度为 0.5、1.0 和 2.0 mg·L⁻¹ 时,花粉胚的平均诱导率分别为 2.18%、8.44%和 10.11%,呈明显上升趋势,而且 6-BA 为 2.0 mg·L⁻¹

份取材接种效果最好,花粉胚诱导率可达 2.5%;7 月份接种效果次之,花粉胚诱导率为 2.1%;8 月份接种效果最差,诱导率仅为 0.5%。这说明 6 月份的花粉成熟度最佳,生命力最强。随着时间的推迟,花虽然继续开放,但花粉的成熟度却越来越差。到 8、9 月份时,花虽然能勉强开放,但花粉已不能发育完全,因而此时已不能进行花药接种。

2.4 培养基组合对诱导率的影响

由表 3 可知,在试验条件下,基本培养基、细胞分裂素、生长素和蔗糖 4 个因子的极差分别为 7.04、7.93、1.75 和 1.02,可得 4 因子的主次顺序:6-BA→MS→NAA→SUC。说明这 4 个因子中,对花粉胚形成影响最大的是细胞分裂素,其次是基本培养基,生长素和蔗糖的影响最小。因

在 1/3MS+6-BA 2.0 mg·L⁻¹+NAA 1.0 mg·L⁻¹ +1%蔗糖的组合中,花粉胚诱导率达到试验中最高的 15.15%,若再适当提高 BA 用量,诱导率可能还会有所提高,有待进一步试验验证。

从表 3 中可见,基本培养基从 MS、1/2MS 到 1/3MS 中,平均花粉胚的诱导率从 3.66%、6.36%增长到 10.70%。这说明随着基本培养基浓度的降低,有利于花粉胚诱导率的提高,若继续

将培养基浓度适当下调,当其它条件适合时,其诱导率仍有上升的空间。

相比之下,NAA和蔗糖的R值仅为1.75和1.02,说明这两个因子在试验条件下对花粉胚诱导率的影响相对较小。可能与这两个因子的浓度梯度较小有关,因而未能产生较大的影响。

2.5 主效应分析

应用SPSS软件对主效应进行数据分析,并对4个因素进行了单因素分析,得出各个因素对诱导率影响较大,具有统计学意义。

对MS因素进行方差分析表明:1/3倍的与1/2倍和1倍的相比较诱导率分别提高了0.68和1.92倍,具有统计学意义,差异显著($P < 0.05$)。

对6-BA进行分析,1.0和2.0 mg·L⁻¹分别与0.5 mg·L⁻¹相比诱导率都大大提高,分别提高了2.87和3.64倍,具有统计学意义,差异显著($P < 0.05$)。

虽然NAA和SUC在影响诱导率为主要因素,但是通过单因素分析表明不同浓度的NAA和SUC对诱导率的影响不显著。

因此将诱导率表现最高的9号培养基(1/3MS+6-BA2.0 mg·L⁻¹+NAA1.0 mg·L⁻¹+1%SUC)作为最适宜诱导红王子锦带花粉胚的培养基。

3 结论与讨论

该试验结果表明,供试材料的花粉发育时期、接种时期、基本培养基及外源激素等因子对诱导花粉胚有显著影响。通过对花粉的不同发育时期(四分体时期、单核期、单核靠边期)诱胚率的比较,得出四分体时期的诱导率最佳;花药的接种时期则选择6、7月最佳,尤其是在始花期——6月份为最佳,诱导率较8月份高出20%左右;基本培养基及外源激素则通过正交试验L₉(3⁴)表筛选出9号培养基:1/3MS+6-BA2.0 mg·L⁻¹+NAA1.0 mg·L⁻¹+1%SUC为最佳培养基,取得

了较高的花粉胚诱导效果,诱导率达15.15%,并通过SPSS软件对各因子进行了单因素分析,得出MS基本培养基与6-BA对诱导率具有统计学意义,差异显著($P < 0.05$),NAA与蔗糖在影响红王子锦带花粉诱导率方面不具有统计学意义,差异不显著。

应该指出,由花药离体培养产生花粉胚,进而形成单倍体植株这一研究工作仍存在问题,如目前的诱导率还很低,胚状体转瓶之后能否继续分化发育成小植株还很困难,因此需进一步改良培养条件及培养基成分,从而提高花药培养力。

参考文献:

- [1] 吕艳,谭晶军,方芳,等.红王子锦带的繁殖栽培技术[J].中国园艺文摘,2010(10):132-133.
- [2] 黑龙江省林业科学院林业研究所.花药离体培养诱导杨树单倍体植株[J].遗传学报,1976,3(2):145-149.
- [3] 陈晓,詹玉丝,齐卫强.建立辣椒DH纯系中花药培养的研究[J].辣椒杂志,2003(2):13-16.
- [4] 何艳.苦瓜果花药离体培养初探[D].成都:四川农业大学,2008.
- [5] 郭仲琛,陆文樑.玉米花粉愈伤组织产生胚状体的细胞形态学研究[J].植物学报,1984,26(1):19-23.
- [6] 张子君,徐矿红.辣椒花药培养诱导胚状体成苗[J].辽宁农业科学,2000(4):43-45.
- [7] 蒋武生,鄧玉宝,栗根义,等.提高青花菜花粉胚状体诱导频率的研究[J].信阳农业高等专科学校学报,1998,8(3):8-11.
- [8] 郑万珍,郭丽娟,关月兰,等.从玉米花药培养中诱导胚状体的发生[J].遗传学报,1978,5(4):274-280.
- [9] 沈海龙.植物组织培养[M].北京:中国林业出版社,2005.
- [10] 郭奕明,杨映根,郭仲琛.玉米花药培养和单倍体育种的研究新进展[J].植物学通报,2001,18(1):23-30.
- [11] 付迎军.玉米离体花药培养体系的建立[J].延边大学农学报,2004(1):5.
- [12] 王子霞,杨克锐,海热古丽,等.玉米花药培养的初步研究[J].新疆农业科学,2001(6):346-347.
- [13] 姜丽静.马铃薯花药培养影响因素的研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2008.

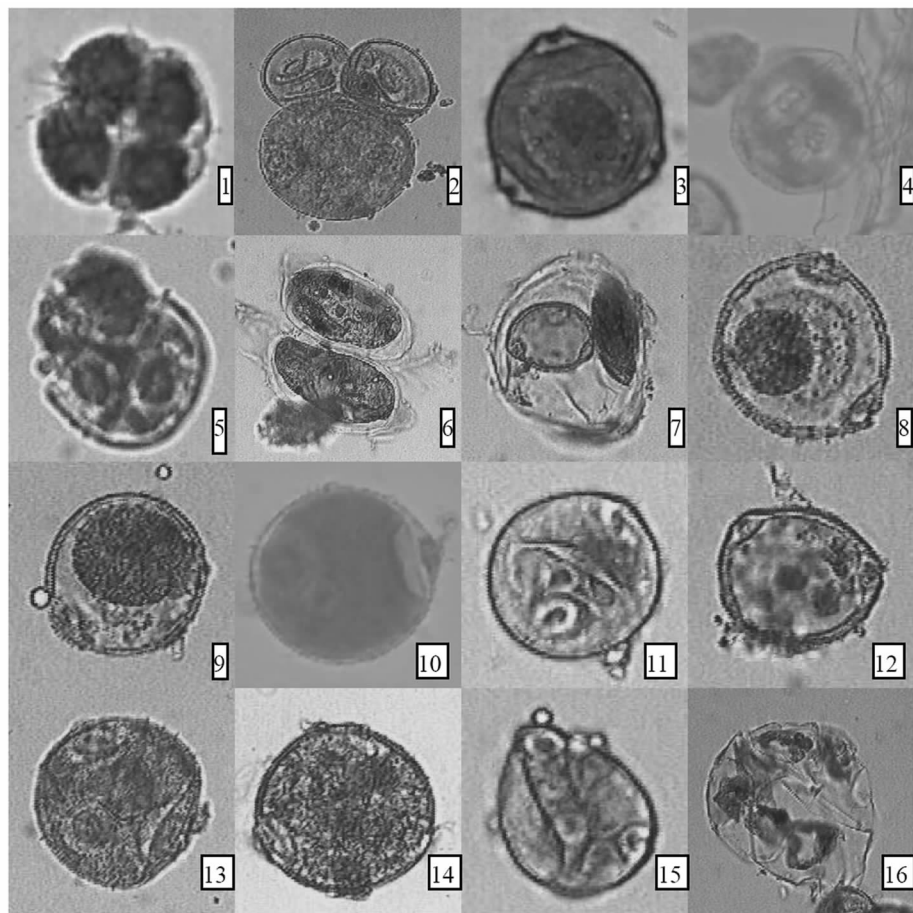
Study on the Induction of Pollen Embryo in Anther Culture *in vitro* of *Weigela florida* cv. 'Red Prince'

WANG Dan¹, MA Jing², SHU Yu¹, LI Jing¹

(1. Landscape Department of Heilongjiang Academy of Forestry Institute, Harbin, Heilongjiang 150081; 2. Horticulture Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150069)

Abstract: Through cytologic observation and statistical analysis on the pollen embryos of *Weigela florida* cv. 'Red Prince', the factors of suitable pollen starting division, suitable pollen development stage, suitable inoculating stage, suitable medium combination and other conditions were screened out. The results of showed that the main factors of suitable pollen starting division were 6-BA and MS basic medium, the higher level of 6-BA and the lower level of MS basic medium, the higher rate of embryos; The suitable development stage of pollen starting division was tetrad stage, the rate of embryos was 6.73%; The suitable inoculating stage induction was in June; The suitable inducing medium was 1/3MS+6-BA(2.0 mg·L⁻¹)+NAA(1.0 mg·L⁻¹)+1%SUC.

Key words: *Weigela florida* cv. 'Red Prince'; pollen embryo; orthogonal text

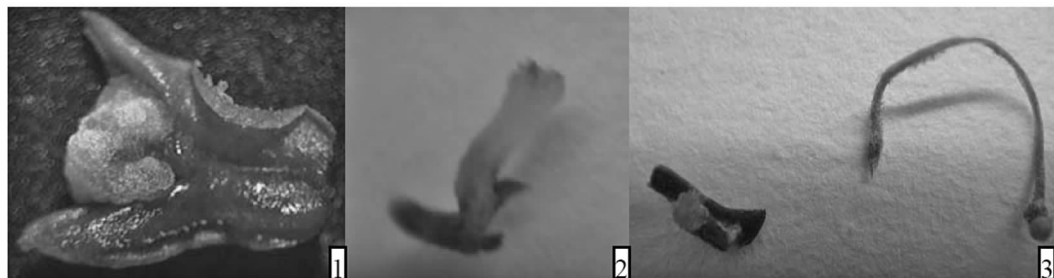


图版 I 花粉细胞启动分裂

1. 四分体时期;2. 巨大花粉;3. 单核期;4~5 经过有丝分裂形成两个均等的营养核;6. 二核间产生壁形成两个子细胞;7. 单核靠边期;8. 生殖核逐渐退化;9. 分裂前细胞核内细胞质疏松;10~11. 分裂成两个核;12~15. 继续分裂形成多个游离核;16. 游离核形成细胞壁

Chart I Pollen cells starting division

1. Tetrad stage;2. Giant pollen;3. Uninucleate stage;4~5. Two equal nutrition nuclear developed by mitosis;6. Cell wall between two nuclears formed two daughter cells;7. Mononuclear margination stage;8. Generative nucleus gradually degradation;9. The cytoplasm from nuclear was porous at anterior division;10~11. Division into two nuclear;12~15. Continued to division and formed more free nuclear;16. Free nuclears formed cell wall



图版 II 花药诱导分化

1. 花药一端裂开长出愈伤组织;2. 分化出幼胚;3. 具有胚轴、胚根、子叶的完整胚

Chart II Anther induced differentiation

1. One end of anther split and merit callus;2. Differentiation young embryo;3. The complete embryo with hypocotyl, radical, cotyledon