

不同因素对甘蓝花药愈伤组织诱导的影响^{*}

许忠民, 张恩慧, 欧承刚, 程永安

(西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 以F₂代甘蓝品种P192和P194为材料,研究了激素、温度、光照、活性炭及取材部位对甘蓝花药愈伤组织诱导培养的影响。结果表明,2,4-D在甘蓝花药诱导培养中具有重要作用,各激素组合中以2.0 mg/L 2,4-D+2.0 mg/L KT处理的诱导率最高,达到41.67%;在甘蓝花药培养前对花蕾同时进行低温预处理3 d、高温预处理3 d和初期暗培养处理3 d的效果较任何一种单独处理效果好,其诱导率为25.00%;添加活性炭的诱导率较不添加活性炭略低;同一生长时期同一植株的不同部位的材料对甘蓝花药诱导培养无显著影响。

[关键词] 甘蓝; 花药培养; 愈伤组织; 诱导率

[中图分类号] S635.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)09-0065-04

自1964年印度Guba等^[1]首次从毛曼陀罗(*Datura innoxia* Mill.)花药培养中获得单倍体植株以来,花药培养技术一直受到遗传育种工作者的广泛关注,并已经在50多种植物上得到单倍体植株。目前,我国已在花椰菜^[2]、辣椒^[3]、萝卜^[4]、绿菜花^[5]、甘蓝^[6-7]等蔬菜作物上通过花药培养获得单倍体植株,但在实际应用中均存在产胚率低等诸多问题。因此,寻求花药培养的最佳培养条件,进一步提高花药培养的效率是目前花药培养的一个主要研究内容。

甘蓝(*B. rassaica oleracea* L. var. *capitata*)是主要的蔬菜作物之一,利用常规方法进行甘蓝育种费时费力,且国内甘蓝种质资源匮乏,而采用花药培养技术能在短期内育成大量遗传性状稳定的材料。因此开展甘蓝花药培养和单倍体育种研究,是甘蓝优良种质资源的获得和新品种培育的一条新的有效途径。此方面国内已有成功的报道^[6-7],但存在诱导率较低等问题。本试验以F₂代甘蓝品种P192和P194为材料,研究激素组合、温度、光照、活性炭及取材部位等对甘蓝花药诱导培养的影响,以期提高甘蓝花药培养的诱导率,为甘蓝花药培养育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

F₂代甘蓝品种P192和P194,由西北农林科技大学园艺学院提供。于2004-07种植于园艺学院试验田,常规管理。

培养基:以B₅为基本培养基^[8],用8 g/L琼脂固化,蔗糖浓度为60 g/L,pH 5.8。

主要药剂:2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D),购自成都科龙化工试剂厂;6-苄氨基嘌呤(6-BA)和激动素(KT)均购自上海化学试剂公司。

1.2 材料的采取

2005-04于初花期从生长健壮、无病虫害的甘蓝植株上取绿色、长2~4 mm的花蕾带回实验室,立即置于4℃冰箱低温预处理3 d。

1.3 甘蓝花药培养

取经过低温预处理的材料,用体积分数70%酒精浸泡10~15 s,再浸入体积分数0.1% HgCl₂溶液中消毒10 min后,用无菌水冲洗4次,然后置于垫有消毒滤纸的培养皿中,吸去多余水分,用镊子剥开花蕾,取下花药,接种到培养基中。接种后先在30℃高温下暗培养3 d,再转入光培养室,在温度25~28℃、光强3 000~4 000 lx条件下培养12 h。

1.4 不同激素组合的确定

以F₂代甘蓝品种P192为材料,以B₅培养基为基础培养基,分别向其中添加0.5, 1.0, 2.0 mg/L 2,4-D, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L 6-BA和0.5, 1.0, 2.0 mg/L KT,进行甘蓝花药培养,统计各种激素组合的甘蓝花药培养愈伤组织的诱导率,筛选甘蓝花药培养诱导愈伤组织的最佳激素组合。

^{*} [收稿日期] 2006-02-28

[基金项目] 国家“863”计划项目(04-145-88);陕西省自然科学基金项目(2004C117)

[作者简介] 许忠民(1971-),男,陕西大荔人,讲师,在读博士,主要从事蔬菜种质资源和遗传育种研究。

[通讯作者] 张恩慧(1960-),男,陕西扶风人,副研究员,主要从事甘蓝遗传育种和育种技术研究。

1.5 温度和光照对甘蓝花药诱导培养的影响

以F₂代甘蓝品种P192为材料,以B₅+2.0 mg/L 2,4-D+2.0 mg/L KT为诱导培养基,设单独低温预处理(培养前对花蕾进行4℃低温预处理3 d)、单独高温预培养(花药培养前进行30℃高温预培养3 d)和单独初期暗培养(花药培养初期进行30℃暗培养3 d)及3个单独处理同时进行共4个处理,统计各处理甘蓝花药愈伤组织的诱导率,研究温度和光照对甘蓝花药诱导培养的影响。

1.6 活性炭对甘蓝花药诱导培养的影响

以F₂代甘蓝品种P192为材料,以B₅+2.0 mg/L 2,4-D+2.0 mg/L KT为诱导培养基,并添加0.1 mg/mL活性炭,以不添加活性炭为对照,分别统计2种诱导培养基甘蓝花药愈伤组织的诱导率,研究活性炭对甘蓝花药诱导培养的影响。

1.7 取材部位对甘蓝花药诱导培养的影响

以F₂代甘蓝品种P194为材料,诱导培养基为B₅+2.0 mg/L 2,4-D+2.0 mg/L KT,于初花期分别取同一植株主茎、一级分枝和二级分枝上花蕾中的花药进行培养,统计不同取材部位的甘蓝花药愈伤

组织的诱导率,研究同一植株不同取材部位对甘蓝花药诱导培养的影响。

1.8 数据统计与分析方法

诱导率/% = 花药胚状体或愈伤组织块数/接种花药数 × 100%。

采用邓肯氏新复极差法进行方差分析,试验数据利用DPS软件进行处理。

2 结果与分析

2.1 不同激素组合对甘蓝花药诱导培养的影响

由表1可以看出,2.0 mg/L 2,4-D+2.0 mg/L KT处理的甘蓝花药诱导率最高,为41.67%;0.5 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L KT处理的甘蓝花药诱导率最低,只有11.67%。3种激素组合的极差分析结果表明,2,4-D的极差最大,为19.65,表明2,4-D对甘蓝花药诱导培养的影响最大,在甘蓝花药诱导培养中起着重要作用。本研究结果表明,2.0 mg/L 2,4-D+2.0 mg/L KT激素组合处理的诱导效果最好。

表1 激素组合对甘蓝花药培养诱导率的影响

Table 1 Influence of hormone treatment on the induction rate of cabbage anther

试验编号 No. of test	激素质量浓度/(mg·L ⁻¹) Hormone treatment			诱导率/% Induction rate	试验编号 No. of test	激素质量浓度/(mg·L ⁻¹) Hormone treatment			诱导率/% Induction rate
	2,4-D	6-BA	KT			2,4-D	6-BA	KT	
1	0.5	0	0.5	12.73	6	1.0	2.0	0.5	36.67
2	0.5	1.0	1.0	11.67	7	2.0	0	2.0	41.67
3	0.5	2.0	2.0	16.67	8	2.0	1.0	0.5	31.67
4	1.0	0	1.0	35.00	9	2.0	2.0	1.0	26.67
5	1.0	1.0	2.0	25.00					

2.2 温度和光照对甘蓝花药诱导培养的影响

由表2可以看出,单因素处理中,初期暗培养效果最好,诱导率为16.67%,与高温预培养差异不显著,但显著高于低温预处理($P < 0.05$);单独高温预培养次之;单独低温预处理效果最差,诱导率仅为5%。说明初期暗培养和高温预培养对甘蓝花药诱导培养的影响较大,而低温预处理的影响作用较小,因

此在花药培养初期进行暗培养和高温预培养是提高甘蓝花药诱导率的必要措施。由表2还可以看出,同时进行低温预处理、高温预培养和初期暗培养对甘蓝花药培养的效果较任何一种单独处理好,其诱导率为25.00%,与单独高温预培养和单独低温预处理差异显著($P < 0.05$)。

表2 温度和光照对甘蓝花药诱导培养的影响

Table 2 Influence of temperature and light treatment on the induction rate of cabbage anther

试验编号 No. of test	低温预处理 Low temperature treatment	高温预培养 Culture at high temperature	初期暗培养 Darkness culture at initial stage	诱导率/% Induction rate
1	+	+	+	25.00 a
2	+	-	-	5.00 c
3	-	+	-	13.33 bc
4	-	-	+	16.67 ab

注: +, 表示处理; -, 表示不处理; 表中同列数据后标不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。下同。

Note: +, means treatment; -, means CK; Small letters indicate the significant at 5% levels respectively. Same in the following tables

2 3 活性炭对甘蓝花药诱导培养的影响

活性炭对甘蓝花药诱导培养影响的试验结果表明,添加活性炭的诱导培养基的诱导率为52.50%;不添加活性炭的诱导培养基的诱导率为58.89%,略高于添加活性炭的处理。说明活性炭对甘蓝花药诱导培养具有一定的抑制作用。

2 4 取材部位对甘蓝花药诱导培养的影响

表3表明,主茎的花药诱导率最高,为32.50%;二级分枝的诱导率最低,为29.27%;甘蓝花药诱导率的大小次序为:主茎>一级分枝>二级分枝,但3个取材部位之间的诱导率差异不显著。说明取材部位对甘蓝花药诱导培养无显著影响。

表3 取材部位对甘蓝花药诱导率的影响

Table 3 Influence of different material positions on the induction rate of cabbage anther

取材部位 Material position	接种数 No. of inoculated anther	出愈数 No. of inducing embryo	诱导率/% Induction rate
主茎 Main stem	80	26	32.50 a
一级分枝 First branch	72	22	30.56 a
二级分枝 Second branch	82	24	29.27 a

3 讨 论

培养基中激素的种类、用量和配比,对诱发小孢子启动、分裂、生长和分化具有作用。陈晓等^[3]研究认为,培养基中加入激素可以提高植物胚的诱导率,不同基因型要求的激素组合和浓度不同,辣椒花药培养时培养基激素组合以0.1 mg/L 2,4-D + 0.1 mg/L KT 效果最好,愈伤组织诱导率为1.59%,同时认为2,4-D 对许多作物花粉的启动、分裂、形成愈伤组织和胚状体起着决定性的作用。张恩让等^[9]研究认为,辣椒花药培养的激素组合为0.5 mg/L NAA + 0.5 mg/L KT 时,出胚率达到最高,为5.77%。本研究结果表明,2,4-D 对甘蓝花药诱导培养的影响最大,2.0 mg/L 2,4-D + 2.0 mg/L KT 的诱导率最高,为41.67%,与上述研究结果有所不同。这可能是由于不同作物对不同激素配比的敏感性存在差异。本试验中关于2,4-D 质量浓度的上限没有体现,还有待于进一步深入研究。

有研究^[5,10]表明,在花药培养中低温预处理和高温预培养有利于提高诱导率。本研究结果表明,单独初期暗培养效果最好,单独高温预培养次之,单独

低温预处理效果最差,但三者配合处理甘蓝花药培养的诱导率最高,这与庄军平等^[10]的研究结果不一致。低温预处理和高温预培养有利于花药培养,其主要原因是经过4℃低温预处理,花粉可以完成雄核发育所需要的诱导过程,同时低温预处理后显著延长了花药壁的退化时间,并在花药壁中积累了大量的淀粉,为花粉的进一步生长发育提供了物质基础;而经过高温预培养的花药,其花粉在第一次有丝分裂过程中,出现一定频率的核对称分裂,可明显提高花药再生植株的诱导率^[11]。

张德双等^[5]研究认为,添加活性炭可提高胚状体诱导率。但在本试验中,添加活性炭的诱导率较对照组低,这可能是由于活性炭在吸附有毒物质的同时,也吸附一定量的激素和螯合物,从而影响花药诱导培养的效果。因此,在甘蓝花药培养中添加少量或不添加活性炭有利于提高出胚率。

本研究结果表明,主茎、一级分枝和二级分枝3个部位花药培养的诱导率差异不显著,说明同一时期同一植株的不同部位对甘蓝花药的诱导培养无显著影响。

[参考文献]

[1] Guba S, Maheshwari S C. *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura* [J]. *Nature*, 1964, 204: 497.

[2] 陈国菊, 雷建军, 曹必好, 等. 花椰菜花药培养研究 [C] // 中国园艺学会第六届青年学术讨论会论文集. 西安: 陕西科技出版社, 2004: 392-396.

[3] 陈晓, 詹玉丝, 徐小利, 等. 花药培养建立辣椒 DH 纯系的初步研究 [J]. *河南农业科学*, 2003 (9): 52-55.

[4] 梅时勇, 杨保国, 姚芳, 等. 萝卜花药培养实验 [J]. *中国蔬菜*, 2002 (1): 35-36.

[5] 张德双, 曹鸣庆, 秦智伟. 影响绿菜花游离小孢子培养的因素 [J]. *华北农学报*, 1999, 14 (1): 68-72.

[6] 耿建峰, 张晓伟, 原玉香, 等. 早熟春甘蓝新品种豫生一号的选育 [J]. *河南农业科学*, 2002 (3): 36-37.

[7] 方淑桂, 陈文辉, 曾小玲, 等. 结球甘蓝游离小孢子培养及植株再生 [J]. *园艺学报*, 2006, 33 (1): 158-160.

[8] 李俊明. *植物组织培养教程* [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2002.

[9] 张恩让, 须海丽, 胡勇, 等. 贵州地方辣椒花药培养体系的初步研究 [J]. *辣椒杂志*, 2005 (4): 27-30.

- [10] 庄军平, 巩振辉, 苏 菁. 温度对辣椒花药愈伤组织形成的影响[J]. 西北农业学报, 2001, 10(2): 49-51.
- [11] 陈兆贵, 韦鹏霄. 光(温)敏核不育水稻花药培养及遗传育种的研究进展[J]. 广西农业生物科学, 1999, 18(1): 84-87.

Studies on effect of different factors on inducing callus in cabbage anther culture

XU Zhong-m in, ZHANG En-hui, OU Cheng-gang, CHENG Yong-an

(College of Horticulture, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract Using hybrids of F₂P192 and P194 as the materials, effects of factors, such as hormone, temperature and light, active carbon and material positions on induction culture of cabbage anther were studied. The results showed that: 2, 4-D had important effect on anther induction culture. Hormone composition of 2, 4-D 2.0 mg/L and KT 2.0 mg/L was best to promote induction culture among all hormone compositions, and its induction rate was 41.67%. The composition treatment with low temperature pretreatment, pre-culture at high temperature and darkness culture at initial stage was better than any kind alone to process before anther culture of cabbage, its induction rate was 25.00%. Induction rate of active carbon treatment was lower than that of contrast treatment slightly. Materials gotten from different positions of the same plant at the same growth period had no significant influence on induction culture.

Key words: cabbage; anther culture; callus; induction rate

(上接第59页)

Abstract ID: 1671-9387(2006)09-0055-EA

Effect of low temperature storage on senescence physiology of the Chinese herbaceous peony flowers

WANG Rong-hua¹, ZHAO Hai-jun², PANG Ran-qi², LI Ji-rui¹

(1 Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Institute of Peony, Heze, Shandong 274000, China)

Abstract The blooming rate and vase life and senescence physiology of Chinese herbaceous peony flowers 'Xuefeng' and 'Taohuafeixue' in low temperature storage were studied. The results showed that the change trends of the blooming rate and vase life of Chinese herbaceous peony flowers were shortened. ACC oxidase and CAT activity increased and then decreased. SOD activity rose slowly at earlier stage and then fell down quickly. However, the MDA content and the relative membrane permeability of Chinese herbaceous constant increased during storage time. The Chinese herbaceous peony had higher blooming rate and absorption after 60 days storage in low temperature. The disease resistance of 'Xuefeng' is weaker than 'Taohuafeixue'. The balance of water was lost, the increase of membrane permeation caused by membrane lipid peroxidation and the decrease of SOD and CAT activity were the main reasons leading to senescence of the cut flowers.

Key words: the Chinese herbaceous peony; low temperature storage; ACC oxidase; SOD activity; CAT activity