

非洲菊未授粉胚珠的离体诱导和植株再生

王丽花¹, 瞿素萍¹, 杨秀梅¹, 熊丽², 王继华^{2,*}

云南省农业科学院¹农业部花卉产品质量监督检验测试中心,²花卉研究所, 昆明 650205

摘要: 通过不同培养基及培养条件的筛选, 离体诱导 12 个品种的非洲菊未授粉胚珠的结果表明: MS 中的大量元素 + Heller 中的微量元素 + 1/2 铁盐 + 0.2 mg·L⁻¹ 6-BA + 0.1 mg·L⁻¹ IAA 较适宜于非洲菊未授粉胚珠愈伤组织的诱导和芽的再生, 8 个品种中以品种 'E19' 诱导愈伤组织的诱导率最高(为 23.1%); 5 个品种可再生形成不定芽, 再生率为 4.8%~19.6%。用根尖染色体鉴定法鉴定再生的 23 个植株的倍性的结果显示, 21.7% 为二倍体, 43.5% 为单倍体, 34.8% 为混倍体。

关键词: 非洲菊; 未授粉胚珠; 离体诱导

In vitro Induction and Plantlet Regeneration from Unpollinated Ovules of *Gerbera jamesonii* Bolus

WANG Li-Hua¹, QU Su-Ping¹, YANG Xiu-Mei¹, XIONG Li², WANG Ji-Hua^{2,*}

¹Supervision and Testing Center for Flowers and Ornamental Plant Quality, Ministry of Agriculture; ²Flower Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650205, China

Abstract: By screening of culture media and conditions, the unpollinated ovules *in vitro* inductions of 12 cultivars of *Gerbera jamesonii* were studied. The more suitable culture medium for callus and buds induction was consisted of the macronutrients and vitamins of MS, Heller micronutrients, 1/2 Fe-EDTA, 200 mg·L⁻¹ 6-BA and 100 mg·L⁻¹ IAA. Among 12 cultivars, the callus from 8 cultivars were successfully induced. Cultivar 'E19' had highest rate of callus-forming (23.1%); five cultivars regenerated shoots (4.8%~19.6%). Ploidy was identified by chromosome counting in root tips. The results showed that in those regenerate plantlets diploid was 21.7%, haploid was 43.5%, and mixoploid was 34.8%.

Key words: *Gerbera jamesonii*; unfertilized ovules; *in vitro* induction

非洲菊又名扶郎花, 为菊科大丁草属植物, 其花色艳丽, 可用作切花生产或盆栽观赏, 全世界广泛分布, 是一种观赏价值较高的花卉(鲁雪华等 1999; 雷加容等 2003)。目前, 生产中迫切需要耐低温、耐弱光、抗疫病和抗病毒病的新优高产品种, 但常规育种周期长而且变异谱范围有限, 不易捕捉目标性状。未授粉胚珠或子房的离体培养作为人工诱导单倍体的有效技术, 在快速获得纯合体、高效利用种质资源和提高选育效率中有一定的理论和应用价值(陈学军等 2000), 人们对此曾做过许多探索工作, 先后对小麦、烟草(冉邦定 1980)、玉米(敖光明等 1982)、杨树(吴克贤和徐妙珍 1984)、甜菜(Hosemans 和 Bossourtrot 1983)等作物进行过研究, 并成功获得部分单倍体植株。就非洲菊来说, Ahmim 和 Vieth (1986)用切花非洲菊的雌配子为材料, 进行培养获得单倍体植株。Tosca 等(1990)和 Honkanen 等(1991)通过培养非洲菊的未授精胚珠也获得再生植

株。Miyoshi 和 Asakura (1996)在盆栽非洲菊的胚珠培养中曾获得单倍体植株, 并通过染色体的加倍成功获得纯合二倍体。但尚未见有用非洲菊未授粉胚珠培养获得单倍体植株的报道, 因此本文以非洲菊 12 个品种的未授粉胚珠为试材, 研究影响其诱导与再生的主要因素, 成功获得再生植株, 这对采用细胞工程和生物技术进行作物育种来说可能有一定的参考价值。

材料与方法

于非洲菊(*Gerbera jamesonii* Bolus)外轮舌状花完全开放、内轮管状花开放 1~2 轮和花序吐粉前选取 12 份无病和无伤的未授粉材料, 品种分别为

收稿 2007-07-16 修定 2007-11-01

资助 云南省科技攻关计划(2006NG14)。

* 通讯作者(E-mail: wjh0505@gmail.com; Tel: 0871-5895788)。

‘E19’、‘Y1’、‘YR6’、‘R6’、‘Y8’、‘紫贝拉’、‘S8’、‘菊派王’、‘LP5’、‘RB12’、‘LP10’和‘OY’,均来自云南省农业科学院花卉研究所。

以MS为基本培养基,参照文献(Bajaj 1983; Miyosh和Asakura 1996; Rogers和Tjia 1990)资料,采用以下培养基:(1) MS中的大量元素和有机物+Heller中的微量元素+1/2铁盐+0.2 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ IAA;(2) MS中的大量元素和有机物+Heller中的微量元素+1/2铁盐+0.2 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L⁻¹ 2,4-D+0.1 mg·L⁻¹ IAA;(3) MS中的大量元素和有机物+Heller中的微量元素+1/2铁盐+0.2 mg·L⁻¹ 6-BA+0.05 mg·L⁻¹ 2,4-D+0.1 mg·L⁻¹ IAA;(4) MS+0.6 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA;(5) MS+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA;(6) 1/2MS+0.1 mg·L⁻¹ NAA。(1)~(3)为诱导培养基,pH 5.6,加1%蔗糖;(4)~(6)的pH为5.8,加3%蔗糖;所有培养基均加0.6%琼脂。

无菌条件下,沿花萼剪去舌状花,0.1%升汞浸泡10~15 min,以无菌水冲洗2次,再放入1.5%次氯酸中浸泡5~8 min,期间不断摇动,以蒸馏水洗3~5次后,用无菌的吸水纸吸干花托上残留液体,放在超净台上,待用。取花序最外面的1~3层小花在解剖镜(NIKON C-DS型)下切取子房,分别移入装有培养基(1)~(3)的口径为6.5 cm的培养瓶中进行预培养。每瓶接种10~12个子房,置于每天光照14 h,光照强度20~30 μmol·m⁻²·s⁻¹,温度为22~24 °C的培养室中培养。

接种25~40 d后,子房中的胚珠萌动膨大形成圆形或近圆形的白色或绿色组织,当子房壁即将被胀破时,于无菌条件下取出子房内硬实胚珠,接种于诱导培养基上,在培养20~40 d期间,部分硬实胚珠形成愈伤组织,并再生出绿色芽苗及叶状结构,分别统计愈伤组织诱导率和芽苗再生率。当芽苗伸长至0.5~1.0 cm时将其转接于培养基(4)上,待小苗长至1.5 cm左右时,将苗从基部切下,转至培养基(5)上继代培养,后将不定芽移入培养基(6)上进行生根培养。

无根苗根长至0.5 cm左右时,切取根尖进行预处理(固定、离析及染色),后在显微镜(Nikon E800型)下压片镜检,采用根尖染色体计数法观察倍性(Murashige和Skoog 1962; Sato等2000; Tosca等1995)。于室温下以5种方法进行预处理:

(1) 0.1%秋水仙素处理5 h;(2) 0.1%秋水仙素处理6 h;(3) 0.05%秋水仙素处理6 h;(4) 0.05%秋水仙素处理12 h;(5) 0.025%秋水仙素处理24 h。

结果与讨论

1 不同培养基对非洲菊愈伤组织诱导率的影响

接种培养60 d后,观察胚珠在诱导培养基(1)~(3)中愈伤组织诱导的结果(表1)表明,12个品种在培养基(1)~(3)上分别有8个、6个、7个品种诱导出愈伤组织,有4个品种(‘LP5’、‘RB12’、‘LP10’、‘Y1’)都未诱导出愈伤组织。接种于培养基(1)中的子房,25~40 d后表面开始发白,体积加大,胚珠萌动突出形成圆形或近圆形的白色或绿色组织,其中,7个品种的愈伤组织诱导率高于4.0%,‘E19’最高达到23.1%。预培养后,培养基(2)和(3)中子房的胚珠并无膨大现象,其愈伤组织为子房壁长出的颗粒状白色疏松蓬状物,这可能是2,4-D诱导子房壁产生大量的愈伤组织,培养基中营养物质向胚珠的量和速度减少,胚珠生长变差而不萌动所致。可见,在预培养和愈伤组织诱导阶段,培养基(1)即MS培养基中的大量元素+Heller培养基中的微量元素+1/2铁盐+0.2 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ IAA较适宜于非洲菊未授粉胚珠的愈伤组织诱导(图1-a)。

2 2,4-D对非洲菊诱导胚珠愈伤组织的影响

比较12个品种在培养基(1)和(2)上的愈伤组织诱导率的结果(表1)表明,培养基(1)能够诱导出苗的‘紫贝拉’和‘S8’,培养基(2)则不能诱导出其愈伤组织;在培养基(2)和(3)中2,4-D浓度由0.2 mg·L⁻¹减至0.05 mg·L⁻¹时,在培养基(3)上能够诱导出‘S8’的愈伤组织,培养基(2)则不能;SPSS 10.0软件方差分析表明,2,4-D对愈伤组织诱导的差异极显著。可见,2,4-D对非洲菊未授粉胚珠愈伤组织的诱导有抑制作用。

3 非洲菊不同品种不定芽的再生率

8个品种的愈伤组织经1~2次继代培养后,并在培养基(1)~(3)中诱导不定芽的结果显示,培养基(2)和(3)上的愈伤组织未诱导出不定芽,只有培养基(1)中有部分未授粉胚珠愈伤组织块发生绿色芽点状突起,并长出芽苗(图1-b)。

从表2可以看出,培养基(1)中有8个品种可

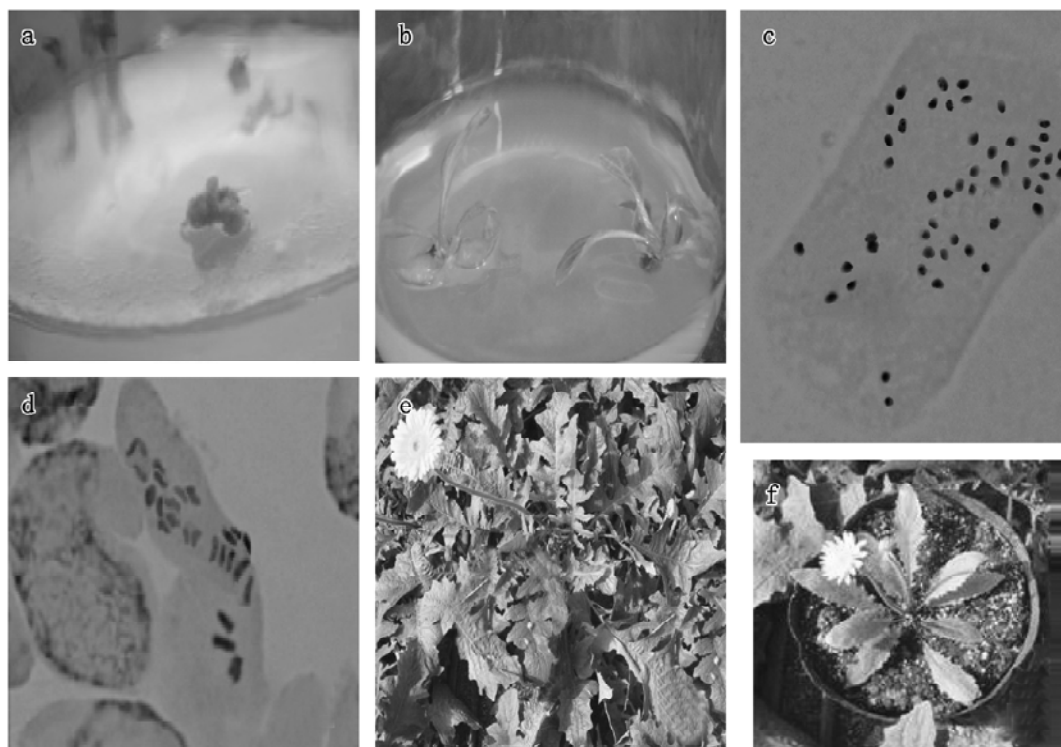


图1 非洲菊未授粉胚珠的离体诱导和倍性观察

Fig.1 *In vitro* induction and ploidy identification from unpollinated ovules of *G. jamesonii*

a: 未授粉胚珠诱导产生愈伤组织; b: 愈伤组织诱导产生不定芽; c: 二倍体植株根尖染色体数 $2n=2x=50$; d: 单倍体植株根尖染色体数 $2n=x=25$; e: 品种‘E19’二倍体植株的开花; f: 品种‘E19’单倍体植株的开花。

表1 不同培养基对非洲菊愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effects of different media on callus induction of *G. jamesonii*

品种	培养基(1)			培养基(2)			培养基(3)		
	胚珠数/个	愈伤组织数/个	愈伤组织诱导率/%	胚珠数/个	愈伤组织数/个	愈伤组织诱导率/%	胚珠数/个	愈伤组织数/个	愈伤组织诱导率/%
‘E19’	399	92	23.1	45	8	17.8	48	4	8.3
‘Y8’	240	21	8.8	65	6	9.2	55	1	1.8
‘菊派王’	119	18	15.1	91	4	4.4	44	2	4.5
‘Y1’	100	19	19.0	62	4	6.5	62	4	6.5
‘R6’	70	4	5.7	80	7	8.8	80	3	3.8
‘YR6’	65	12	18.5	104	8	7.7	40	1	2.5
‘S8’	64	1	1.6	50	0	0	45	1	2.2
‘LP10’	60	0	0	66	0	0	57	0	0
‘LP5’	52	0	0	94	0	0	38	0	0
‘紫贝拉’	50	2	4.0	65	0	0	53	0	0
‘RB12’	49	0	0	43	0	0	54	0	0
‘OY’	43	0	0	52	0	0	33	0	0

诱导出愈伤组织, 其中, 有5个品种(‘E19’、‘Y1’、‘YR6’、‘Y8’、‘菊派王’)可再

生出绿色芽苗或叶状结构, 再生率为4.8%~19.6%, ‘E19’的再生率最高, 达19.6%。‘R6’、‘紫

表2 非洲菊不同品种不定芽的再生率
Table 2 Regeneration rate of bud in different varieties of *G. jamesonii*

品种	培养基(1)		
	愈伤组织数/个	再生不定芽数/个	不定芽的再生率/%
'E19'	92	18	19.6
'Y8'	21	1	4.8
'Y1'	19	2	10.5
'菊派王'	18	1	5.6
'YR6'	12	1	8.3
'R6'	4	0	0
'紫贝拉'	2	0	0
'S8'	1	0	0

贝拉'和'S8'三个品种未诱导出不定芽。可见,非洲菊未授粉胚珠诱导出的愈伤组织,其芽的再生率因品种不同而异,其机制尚不清楚,有待进一步研究。

4 非洲菊根尖的倍性观察

以0.1%和0.05%秋水仙素在室温下分别处理5和6h的中期及中前期细胞比例较大,形状正常,染色体收缩至粗短状,可用于染色体计数,其中,以0.05%秋水仙素预处理6h的效果最好。观察未授粉胚珠诱导产生的23个再生植株根尖染色体的结果表明:其二倍体植株的染色体数为 $2n=2x=50$ (图1-c),单倍体植株的染色体数为 $2n=x=25$ (图1-d);再生植株的倍性为:5个二倍体占21.7%,10个单倍体占43.5%,8个混倍体占34.8%。可见,诱导源于子房的非洲菊未授粉胚珠所产生的再生植株并不完全是单倍体,还有二倍体和混倍体植株发生,这与Miyosh和Asakura(1996)的报道一致。此外,温室中栽培的单倍体植株(图1-e)比正常二倍体植株(图1-f)矮小,其体积不足正常植株的二分之一,植株长势较弱,生长速度慢,花朵大小也只有二倍体植株的一半,花期较正常植株推迟3个月。

总之,通过诱导非洲菊未授粉胚珠获得单倍体植株是完全有可能的,在含有一定配比生长调节剂的培养基中胚珠可以诱导出愈伤组织,继而分化出幼苗,其愈伤组织诱导和芽的再生能力取决于品种和培养基的差别,并非所有非洲菊品种都能诱导出愈伤组织和分化出苗成为完整植株。

另外,我们还观察到:(1)胚珠的适时剥离可有效提高愈伤组织和芽的诱导率,并能提早芽苗的萌发;(2)3~5月底的愈伤组织诱导率较高,诱导出的愈伤组织也较易分化出苗;6月以后的诱导率明显下降,且污染率增加;8月以后,随着气温的逐渐下降,培养物的褐化严重,甚至死亡。可见,非洲菊未授粉胚珠的诱导与外植体生长状况也有很大关系,其机制尚待进一步研究。

参考文献

- 敖光明,赵世绪,李广华(1982).从未受精的玉米子房培育出单倍体植株.遗传学报,(9):281~283
- 陈学军,邢国明,陈竹君(2000).西葫芦未授粉胚珠离体培养和植株再生.浙江农业学报,12(3):165~167
- 雷加容,张跃非,刘兴华,邓晓蓉(2003).非洲菊的组培快繁技术研究.西南农业学报,16(2):123~124
- 鲁雪华,郭文杰,林勇(1999).几种因素对非洲菊离体培养再生植株的影响.植物生理学通讯,35(5):372~374
- 冉邦定(1980).从未受精的烟草胚珠诱导出单倍体植株.中国烟草,(3):25~26
- 吴克贤,徐妙珍(1984).杨树未授粉子房离体培养诱导母系单倍体小植株.遗传学报,11(1):47~51
- Ahmim M, Vieth J (1986). Production de plantes haploids de *Gerbera jamesonii* par culture *in vitro* d'ovules. Can J Bot, 64: 2355~2357
- Bajaj YPS (1983). *In vitro* production of haploids. In: Evans DA, Sharp WR, Ammirato PV, Yamada Y (eds). Handbook of Plant Cell Culture. New York: MacMillan, 4: 256~277
- Honkanen J, Aapola A, Seppanen P, Tormala T, Wit JC, Esendam HF, Stravers LJM, De Wit JC (1991). Production of doubled haploid *Gerbera* clones. Acta Hort, 300: 341~346
- Hosemans D, Bossourtrot D (1983). Induction of haploid plants from *in vitro* culture of unpollinated beet ovules (*Beta vulgaris* L.). Z Pflanzenzucht, 91(1): 74~77
- Miyosh K, Asakura N (1996). Callus induction regeneration of haploid plants and chromosome doubling in ovule cultures of pot gerbera (*Gerbera jamesonii*). Plant Cell Rep, 16: 1~5
- Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol Plant, 15: 473~479
- Rogers MN, Tjia BO (1990). Gerbera Production for Cut Flowers and Pot Plants: Growers handbook series. Portland OR: Timber Press, vol 4
- Sato S, Katoh N, Yoshida H, Iwai S, Hagimori M (2000). Production of doubled haploid plants of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) by pseudofertilized ovule culture. Sci Hort, 83: 301~310
- Tosca A, Lombardi M, Marinoni L, Conti L, Frangi P (1990). Genotype response to *in vitro* gynogenesis technique in *Gerbera jamesonii*. Acta Hort, 280: 337~340
- Tosca A, Pandolfi R, Citterio S, Fasoli A, Sgorbati S (1995). Determination by flow cytometry of the chromosome doubling capacity of colchicine and oryzalin in gynogenetic haploids of *Gerbera*. Plant Cell Rep, 14: 455~458