

不同供体材料对非洲菊胚珠离体培养的影响

单芹丽¹, 王继华¹, 吴丽芳², 王丽花¹, 汪国鲜², 李绅崇^{1*}, 杨春梅^{2,*}

¹云南省农业科学院花卉研究所, 国家观赏园艺工程技术研究中心, 昆明650205; ²玉溪云星生物科技有限公司, 云南玉溪652604

摘要: 以非洲菊胚珠为试材, 研究供体材料的基因型、取材季节、发育时期和小花类型对胚珠培养的影响。结果表明: 45个非洲菊基因型胚珠诱导培养90 d时, 有29个基因型能诱导出不定芽, 不定芽的诱导率超过10%的基因型仅有3个, 不定芽诱导率最高达17.7%。胚珠诱导不定芽的效果为: 夏季>春季>秋季>冬季; 非洲菊花药未吐粉前, 花序越成熟, 不定芽诱导率越高, 诱导时间越短; 舌状花的诱导效果略好于管状花。四因素对非洲菊不定芽诱导效果的主次关系是基因型>季节>发育时期>小花类型, 基因型是决定非洲菊不定芽诱导效果的重要因素, 小花类型对不定芽的诱导效果没有显著影响。

关键词: 胚珠培养; 基因型; 季节; 发育时期; 小花类型

Effects of Different Donor Material on Ovule Culture *in Vitro* in *Gerbera jamesonii*

SHAN Qin-Li¹, WANG Ji-Hua¹, WU Li-Fang², WANG Li-Hua¹, WANG Guo-Xian², LI Shen-Chong^{1,*}, YANG Chun-Mei^{2,*}

¹Flower Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, National Engineering Research Center for Ornamental Horticulture, Kunming 650205, China; ²Yuxi Yunxing Biotechnology Co., Ltd., Yuxi, Yunnan 652604, China

Abstract: Ovules of *Gerbera jamesonii* were selected as materials. The effects of genotype, season, developmental stage and flower type on the induction of adventitious buds were studied. Results showed that ovules of 45 genotypes were cultured at 90 days, there were 29 genotypes could induce adventitious buds, and adventitious bud induction rate of only 3 genotypes were more than 10%. The induction rate of adventitious buds highest reached 17.7%. The relationship of effects that ovule induced adventitious buds was summer>spring>autumn>winter; before anther spit out pollen, inflorescence more mature, the higher the rate of adventitious buds, the shorter induction time; the induction effect of ray florets were slightly better than tubular flowers. The relationship of primary and secondary effects that 4 factors on adventitious buds induction was genotype>season>developmental stages>flower type, *Gerbera* genotype was an important factor in determining the induction effect of adventitious buds, flower type had no significant effect on the induction of adventitious buds.

Key words: ovule culture; genotype; season; growth period; flower type

非洲菊(*Gerbera jamesonii*)为典型的异花授粉作物, 由于长期无性繁殖, 保存着基因型的高度杂合性, 其性状遗传极为复杂(李绅崇等2007)。为充分利用杂种优势, 排除显隐性的干扰, 必须提高亲本的纯合性(何启谦2009)。常规育种方法需进行多代自交才能获得纯合的自交系, 花费时间较长。利用花粉(花药)或未授粉子房(或胚珠)培养获得单倍体植株, 经染色体加倍成为纯系, 可缩短纯合体的选育时间(张献龙和唐克轩2004)。同时, DH群体即加倍单倍体的特点是群体中的每一个系都是完全同质纯合, 所含信息量小, 无遗传变异, 是数量性状位点分析的良好群体(张树根等2008)。

在许多植物中, 花培(花药及花粉培养的简称)往往是获得单倍体植株的主要途径(孙强2007)。

但非洲菊花粉或花药取材困难, 灭菌难度较大, 因此通过未授粉子房(或胚珠)培养是获得非洲菊单倍体植株的有效途径。近年来离体雌核发育研究取得了很大进展, 筛选出了一些重复性好的培养程序, 但总体来说诱导频率都还偏低(杨江义和李旭锋2002)。Miyoshi和Asakura (1996)、王丽花等(2007)通过非洲菊未授粉胚珠先后获得了单倍体

收稿 2015-06-01 修定 2015-06-30

资助 国家观赏园艺工程技术研究中心项目(2012FU125X10)、云南省战略性新兴产业发展专项资金项目(昆财企一[2013]118号)和云南省科技厅科技创新强省计划项目(2014AB014)。

* 共同通讯作者(E-mail: 693243551@qq.com, Tel: 13759115792; E-mail: 1577225885@qq.com, Tel: 13368713967)。

植株, 但不定芽的诱导率都很低, 研究主要都集中在基因型、培养基及激素的选择上。

供体材料的基因型、取材季节、发育时期和小花类型对胚珠培养的影响程度如何还未见相关比较试验的报道。通常情况下, 影响胚珠培养成败及其效率高低的因素很复杂, 并且不是独立存在的, 是几个因素对整个诱导过程共同发生作用, 单纯分析某一个因素的效益是困难的, 必须经过大量的比较试验才能得到有价值的结果(葛志东2009)。为了提高非洲菊胚珠诱导愈伤组织和不定芽的效率, 本试验在研究45个非洲菊基因型胚珠诱导不定芽情况的基础上, 采用正交设计提高试验效率(白厚义2005; 荣廷昭1993), 比较分析供体材料的基因型、季节、花序发育时期和小花类型对非洲菊胚珠培养的影响, 旨在避免供体材料选择的盲目性, 为高效诱导非洲菊单倍体植株, 快速构建DH群体和选育优质新品种奠定基础。

材料与amp;方法

1 试验材料

非洲菊(*Gerbera jamesonii* Bolus)的花是由许多小花组成的单生头状花序, 花序由两类小花构成, 一类为舌状花, 着生于花序边缘, 只具有雌蕊, 为单性花; 另一类小花为管状花, 着生于花序中舌状花的内轮, 形状相对较小, 位于外面几轮的管状花, 雌雄蕊发育完全, 为两性花, 而中间的管状花只具有雄蕊, 雌蕊退化, 为单性花(图1-A)。本试验所用试验材料为云南省农业科学院花卉研究所非洲菊育种资源圃中的非洲菊切花品种或杂交后代。

2 方法

2.1 试验设计

在非洲菊育种资源圃中随机抽取综合性状较优良的45个基因型, 采摘花序处于半开放状态的花枝, 剥取舌状小花的胚珠进行培养, 每个品种为1个处理, 共计45个处理。

从上述45个基因型中, 筛选出4个不定芽诱导率存在显著差异的基因型‘红极星’、‘白马王子’、‘阳光露’和‘多利’为试验对象, 设置4个水平; 季节设置冬季、春季、夏季、秋季4个水平, 即在1月(冬季)、4月(春季)、7月(夏季)、10月(秋季)中旬取材; 花序发育时期设置舌状花未开放, 花瓣已显

色1 cm以上(图1-B)、舌状花处于半开放状态(图1-C)、舌状花已开放但管状花未开放(图1-D)、管状花已开, 见花药1轮以上, 但未吐粉)(图1-E) 4个水平; 小花类型分单性舌状花(图1-F)和两性管状花(图1-G) 2个水平, 采用拟水平法将所设的2个水平各重复1次(白厚义2005)。正交表选用 $L_{16}(4^4)$, 一共16个处理。

2.2 无菌外植体的获得

根据试验设计要求, 采摘非洲菊的花枝带入室内, 用洗衣粉水清洗花枝, 清水冲洗干净后, 在超净环境下, 用刀片切除花梗与舌状花边缘; 在0.1%的氯化汞溶液中消毒15 min, 再用2%的次氯酸钠溶液加2滴吐温20的混合液中消毒10 min, 无菌水冲洗3次后, 在解剖镜下剥取着生于花序中外面1~2轮舌状花或外面1~2轮管状花的胚珠, 选择外观饱满, 无机械损伤的胚珠作为外植体(图1-H)。

2.3 培养方法及数据统计

将胚珠放入 $MS+BA 0.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}+NAA 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 附加食用白糖 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 琼脂 $7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 5.5~5.8的培养基中。每个处理接种5~12瓶, 每瓶接种10~12个胚珠, 置于温度 $(22 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$, 光照强度 $40\text{--}50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 的培养室中, 光照时间为 $10 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 。每30 d用相同的培养基转接一次。

采用目测方法, 每天定时观察一次, 记录每个处理非洲菊胚珠培养的情况。培养90 d时, 统计各处理不定芽的诱导率及诱导时间, 每个处理设3次重复。不定芽诱导率(%)=诱导出不定芽的胚珠数/刚接种的胚珠数 $\times 100$, 诱导时间为各处理每个胚珠从接种到刚诱导出芽所需时间的平均值。诱导时间以90 d统计, 超过90 d还未诱导出不定芽的处理, 不定芽诱导率计为0。试验数据采用Excel工作表和DPS软件进行统计分析, 利用随机区组设计结合Duncan新复极差法对各处理进行差异显著性检验。

实验结果

1 不同基因型胚珠的培养结果

试验中非洲菊胚珠诱导再生植株的过程为: 胚珠接种后体积逐渐膨大(图1-I), 而后长出愈伤组织(图1-J), 由愈伤组织诱导分化出不定芽(图1-K),

但也有少量胚珠不经过愈伤组织诱导即可直接诱导分化出不定芽(图1-L), 所需时间相对较短。通

过90 d的培养, 45个非洲菊基因型胚珠的不定芽诱导率见图2, 有29个基因型能诱导出不定芽, 约占

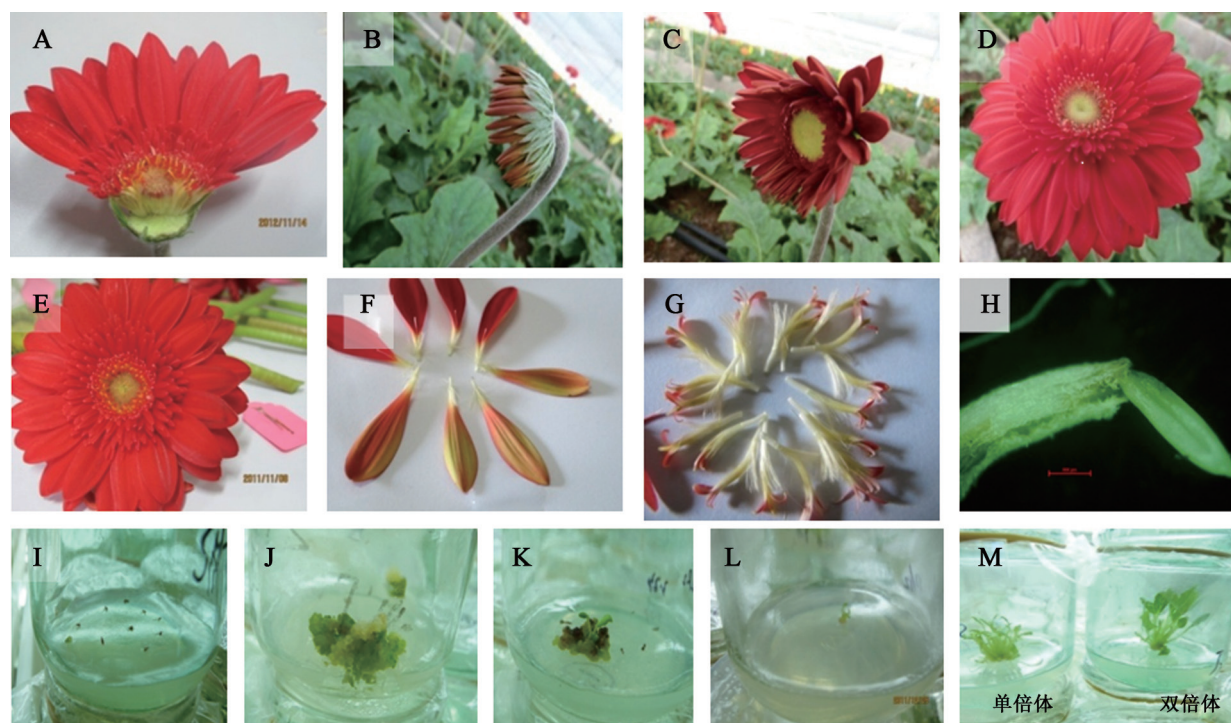


图1 非洲菊供体材料选择及胚珠植株再生

Fig.1 Selection of ovule donor material and plant regeneration of ovule in *G. jamesonii*

A: 花序结构; B: 舌状花未开放; C: 舌状花处于半开放状态; D: 舌状花已开放但管状花未开放; E: 管状花已开, 但未吐粉; F: 舌状花; G: 管状花; H: 解剖的胚珠(显微镜下放大); I: 体积膨大的胚珠; J: 愈伤组织; K: 通过愈伤组织诱导出芽; L: 未通过愈伤组织直接诱导出芽; M: 丛生芽形态特征对比。

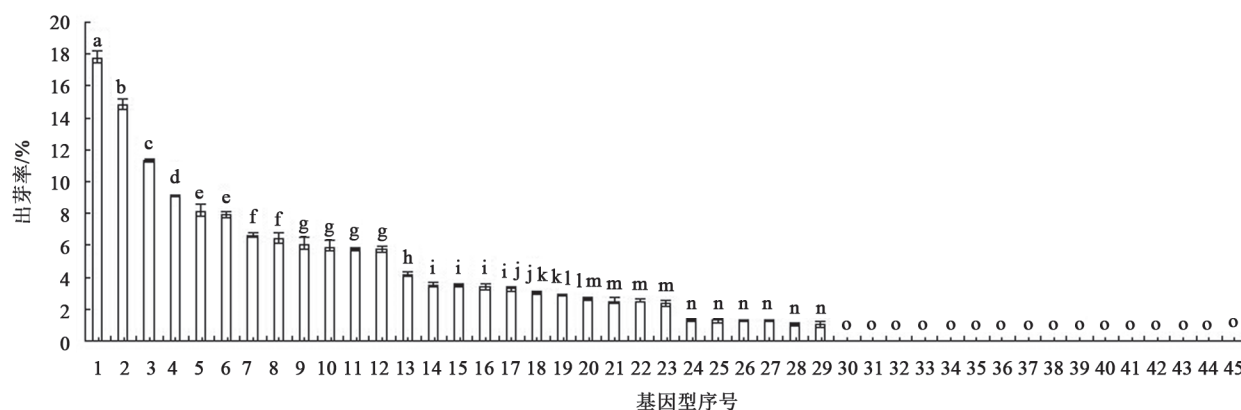


图2 45个基因型不定芽的诱导率

Fig.2 Induction rate of 45 genotypes adventitious buds

横坐标上的45个非洲菊基因型序号对应的品种或株系名分别为: 1: '白马王子'; 2: '秋日'; 3: P2; 4: '阳光露'; 5: GX023; 6: Mi-P0804; 7: '彩云金花'; 8: '双色'; 9: '金葵花'; 10: W068; 11: R045; 12: '红运当头'; 13: '红帽子'; 14: '云锦紫薇'; 15: '云锦红雪'; 16: '婚纱'; 17: '靓粉'; 18: '红地毯'; 19: '红极星'; 20: '热带草原'; 21: '绮华'; 22: '淑女'; 23: '金凤凰'; 24: GP0511; 25: '红色妖姬'; 26: '菊派王'; 27: '美丽莎'; 28: GR063; 29: '清心'; 30: '彩云无瑕'; 31: '大臣'; 32: '大香槟'; 33: '冬日'; 34: '多利'; 35: '妃子'; 36: '过火者'; 37: '红艳'; 38: '拉丽莎'; 39: '玲珑'; 40: '罗斯'; 41: '蜜糖'; 42: '倾城公主'; 43: '温馨'; 44: '阳光海岸'; 45: '紫衣皇后'。各柱形上不同小写字母表示在0.05水平上差异显著。

基因型的64%，不定芽诱导率超过10%的基因型仅有3个，超过5%的基因型仅有12个，不定芽诱导率最高达17.7%。

2 供体材料对非洲菊不定芽诱导的影响

以不同基因型的非洲菊胚珠为试材，在相同培养基和培养条件下，供体材料的基因型、取材季节、花序发育时期、小花类型4个因子对非洲菊胚珠不定芽诱导率及诱导时间的影响结果见表1。处理7的不定芽诱导效果最好，诱导率最高，达到20.0%，诱导不定芽时间最短，为39.3 d；其次是处理6。处理13、16的不定芽诱导率均为0，诱导不定芽的时间最长，都超过了90 d。处理14、15的不定芽诱导率分别为0.8%和1.7%。结果表明：除基因型外，取材季节、花序发育时期和小花类型

对胚珠诱导不定芽的影响是存在的。

各因素对不定芽诱导率和诱导时间的影响大小可通过对表1的数据进行直观分析(刘西周和郭成金2009)，结果见表2、3，通过分析，可以得出非洲菊胚珠诱导不定芽所需供体材料的最佳选择方案。

表2和表3中因素内水平极差(R)的大小，可分别反映出该因素对非洲菊不定芽诱导率和诱导时间的影响程度，极差越大说明该因素的变动越大，对试验结果影响越大。从表2、3可以看出：参试的4个因素内水平极差(R)的大小均为A>B>C>D，即对非洲菊不定芽诱导率和诱导时间影响的主次关系依次均是基因型>季节>发育时期>小花类型。

表1 正交设计 $L_{16}(4^4)$ 结果

Table 1 Result of orthogonal design $L_{16}(4^4)$

处理	基因型(A)	季节(B)	发育时期(C)	小花类型(D)	不定芽诱导率/%	不定芽诱导时间/d
1	‘红极星’	冬季	I	舌状花	1.7±1.44 ^{ij}	72.0±1.00 ^{fg}
2	‘红极星’	春季	II	管状花	5.8±1.44 ^{gh}	70.0±1.00 ^h
3	‘红极星’	夏季	III	舌状花	8.3±1.44 ^{fg}	60.3±1.53 ⁱ
4	‘红极星’	秋季	IV	管状花	4.2±1.44 ^{hi}	71.0±1.00 ^{gh}
5	‘白马王子’	冬季	II	舌状花	15.8±1.44 ^{bc}	51.0±1.00 ^j
6	‘白马王子’	春季	I	管状花	18.3±1.44 ^{ab}	45.3±0.58 ^l
7	‘白马王子’	夏季	IV	舌状花	20.0±2.50 ^a	39.3±1.53 ^m
8	‘白马王子’	秋季	III	管状花	17.5±2.50 ^{ab}	48.3±0.58 ^k
9	‘阳光露’	冬季	III	管状花	9.2±1.44 ^{ef}	82.3±1.53 ^c
10	‘阳光露’	春季	IV	舌状花	12.5±2.50 ^d	76.7±0.58 ^e
11	‘阳光露’	夏季	I	管状花	13.3±1.44 ^{cd}	73.3±1.53 ^f
12	‘阳光露’	秋季	II	舌状花	11.7±1.44 ^{de}	79.0±1.00 ^d
13	‘多利’	冬季	IV	管状花	0±0 ^j	90.0±0 ^a
14	‘多利’	春季	III	舌状花	0.8±1.44 ^j	89.0±1.00 ^a
15	‘多利’	夏季	II	管状花	1.7±1.44 ^{ij}	87.0±2.00 ^b
16	‘多利’	秋季	I	舌状花	0±0 ^j	90.0±0 ^a

发育时期中，I：舌状花未开放，花瓣已显色1 cm以上；II：舌状花处于半开放状态；III：舌状花已开放但管状花未开放；IV：管状花已开，见花药1轮以上，但未吐粉；表中数据为平均值±标准差，同列数值后不同小写字母表示在0.05水平上差异显著。

表2 不定芽诱导率的直观分析

Table 2 Visual analysis of adventitious buds induction rate

水平	不定芽的诱导率			
	基因型(A)	季节(B)	发育时期(C)	小花类型(D)
K1	5.0	6.7	8.3	8.9
K2	17.9	9.4	8.8	8.8
K3	11.7	10.8	9.0	8.9
K4	0.6	8.3	9.2	8.8
R	17.3	4.1	0.9	0.1

表3 不定芽诱导时间的直观分析

Table 3 Visual analysis of adventitious buds induction time

水平	不定芽的诱导时间			
	基因型(A)	季节(B)	发育时期(C)	小花类型(D)
K1	68.3	73.8	70.2	69.7
K2	56.0	70.3	71.8	70.9
K3	77.8	65.0	70.0	69.7
K4	89.0	72.1	69.3	70.9
R	33.0	8.8	2.5	1.2

表2和表3中各因素水平的均值(Ki)大小, 可分别得到通过非洲菊胚珠培养不定芽诱导率最高和诱导时间最短的最优水平组合。从表2、3可以看出, 非洲菊胚珠培养不定芽诱导率最高且诱导时间最短的最优水平组合均为A2B3C4D1, 供体材料的基因型在2水平, 取材季节在3水平, 花序发育时期在4水平, 小花类型在1水平时非洲菊不定芽诱导率最高且诱导时间最短。由此, 可得出通过非洲菊胚珠诱导不定芽, 供体材料的最佳选择方案为: 供体材料基因型选择非洲菊品种‘白马王子’; 季节选择夏季; 发育时期选择管状花已开, 见花药1轮以上, 但未吐粉的非洲菊花序; 小花类型选择舌状花。

3 单倍体的初步鉴定结果

将诱导出的不定芽切成单株, 在相同培养基中继续培养35 d后, 可长出大量丛生芽, 形成再生植株的株系。采用DNA流式细胞仪测定法(王丽花等2013), 结合不定芽丛生幼苗的形态特征差异, 对288个株系进行倍性的初步鉴定, 单倍体比例达55%以上。鉴定的单倍体丛生芽与二倍体丛生芽相比, 形态特征表现为株型纤弱、矮小、叶片较窄(图1-M)。

讨 论

Miyoshi和Asakura (1996)、王丽花等(2007)通过非洲菊胚珠诱导不定芽的培养基均采用MS中的大量元素和有机物+Heller中的微量元素+1/2铁盐为基本培养基, 然后加入植物生长调节剂IAA、NAA、BA和2,4-D的一种或两种组合, 并且认为植物生长调节剂对愈伤组织和不定芽的诱导有显著影响。而本研究所用的培养基为云南省农业科学院花卉所非洲菊组织培养常用的培养基配方, 旨在弄清在常规相同培养基和培养条件下, 供体材料的基因型、取材季节、发育时期和小花类型对胚珠培养的影响大小。

本研究表明: 在相同的培养条件下, 不同基因型在培养中的反应不同, 45个非洲菊基因型胚珠不定芽的诱导率在0~17.7%之间, 而‘白马王子’由于供体材料的优选(表1处理7: 选择了夏季发育较成熟的花序), 胚珠不定芽的诱导率由17.7%提高到了20.0%; 不能诱导出不定芽的基因型‘多利’, 改变

取材季节、花序发育时期、小花类型条件对诱导过程进行干扰, 结果仍然难诱导出不定芽。本研究应用正交设计方法, 只用了16个处理就比较了供体材料的基因型、取材季节、花序发育时期、小花类型4个因子对胚珠诱导成苗效果, 其诱导效果的主次关系是: 基因型>季节>发育时期>小花类型。

Tosca等(1999)的非洲菊胚珠愈伤组织诱导试验中, 4个基因型中基因型‘24-2’在春季表现最好, 诱导率超过30%; 在秋季表现更差; 基因型‘88274’则有不同的反应, 在春季和夏季诱导率最低, 而秋季时诱导率可达22%; 对芽的诱导来说, 秋季胚珠愈伤组织的出芽率最高。魏爱民等(2007)研究了供体植株栽培季节对黄瓜未受精子房离体培养的影响, 认为单倍体胚胎发生率和植株再生率在温度相对较高的6月下旬、7月上旬以及9月份明显高于其他季节。本试验的研究结果表明: 季节对非洲菊胚珠不定芽的诱导效果表现为: 为夏季>春季>秋季>冬季。

谢冰等(2006)研究了西葫芦5个基因型未受精胚珠的不同胚珠发育时期对再生植株诱导率的影响, 认为开花前1日及当日的胚珠诱导频率较高。潘莉和杨铁钊(2000)接种不同发育时期的烟草子房, 均可不同程度地诱导出单倍体植株, 但它们的胚状体诱导率有较大差异, 发育早期接种的子房胚状体诱导率明显低于中、晚期的子房, 发育中期的子房胚状体诱导率又略低于发育晚期的子房。而本试验却发现发育时期对非洲菊胚珠不定芽的诱导效果表现为: 非洲菊花药未吐粉前, 花序越成熟, 胚珠诱导不定芽的效果越好。目前还未见小花类型对胚珠培养影响的相关研究, 本试验的研究认为小花类型对非洲菊胚珠培养的效果表现为: 舌状花好于管状花(即雌性花好于两性花)。原因还有待进一步研究。

参考文献

- 白厚义(2005). 试验方法及统计分析. 北京: 中国林业出版社, 11~37
葛志东(2009). 西葫芦未授粉子房离体培养研究[硕士论文]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学
何启谦(2009). 遗传育种学. 北京: 中央广播电视大学出版社, 176~185
李绅崇, 李淑斌, 蒋亚莲, 杨春梅, 吴丽芳(2007). 非洲菊品种间杂交主要观赏性状在F₁代的遗传表现. 云南农业大学学报, 22 (2): 197~201

- 刘西周, 郭成金(2009). 采用 $L_9(3^4)$ 正交设计方法筛选血耳菌丝液体培养基. 中国食用菌, 28 (1): 36~38
- 潘莉, 杨铁钊(2000). 烟草未授粉子房胚状体诱导的研究. 西北植物学报, 20 (1): 59~63
- 荣廷昭(1993). 农业试验与统计分析. 成都: 四川科学技术出版社, 245~249
- 孙强(2007). 非洲菊杂交育种技术及优良品系选育初步研究[学位论文]. 南京: 南京林业大学
- 王丽花, 瞿素萍, 杨秀梅, 熊丽, 王继华(2007). 非洲菊未授粉胚珠的离体诱导和植株再生. 植物生理学通讯, 43 (6): 1089~1092
- 王丽花, 杨秀梅, 吴学尉, 王继华, 瞿素萍, 李绅崇, 张艺萍(2013). 非洲菊大孢子再生植株倍性的快速鉴定方法. 西南农业学报, 22 (1): 155~161
- 魏爱民, 韩毅科, 杜胜利, 张桂华, 刘楠(2007). 供体植株栽培季节和栽培方式对黄瓜未受精子房离体培养的影响. 西北农业学报, 16 (5): 141~144
- 谢冰, 王秀峰, 樊治成(2006). 西葫芦未受精胚珠离体培养条件的优化及胚囊植株的产生. 中国农业科学, 39 (1): 132~138
- 杨江义, 李旭锋(2002). 植物雌性单倍体的离体诱导. 植物学通报, 19 (5): 552~555
- 张树根, 蒋钟仁, 邢永萍, 李春玲(2008). 一个辣椒杂交种的加倍单倍体(DH)群体果实性状的遗传分析. 园艺学报, 35 (4): 515~520
- 张献龙, 唐克轩(2004). 植物生物技术. 北京: 科学出版社, 174~177
- Miyoshi 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
- Tosca A, Arcara L, Frangi P (1999). Effect of genotype and season on gynogenesis efficiency in *Gerbera*. Plant Cell Tiss Organ Cult, 59: 77~80