

百合的花药培养研究

褚云霞^{1,*} 陈龙清^{2,**} 黄燕文¹ 张永春³

(¹ 华中农业大学理学系, 武汉 430070; ² 华中农业大学林学系, 武汉 430070; ³ 上海市农业科学院园艺研究所, 上海 201106)

摘 要: 对百合花药培养的影响因素研究显示, 小孢子最适培养时期为单核期; 愈伤组织诱导率最高可达 42.16%, 最佳激素组合为 2,4-D 3.0 mg L⁻¹ + KT 3.0 mg L⁻¹; 低温预处理作用不大; 早分化出的花蕾中的小孢子更易诱导产生愈伤组织; 分化培养基以改良 MS + NAA (2.0、4.0 mg L⁻¹) 为宜; 花粉植株中单倍体 (n=12) 约 25%, 二倍体 (2n=24) 约 75%。

关键词: 百合; 花药; 组织培养

中图分类号: S 682; Q 813 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2001) 05-0472-03

1 目的、材料与方法

我国百合育种工作始于 20 世纪 80 年代, 黄济明等利用远缘杂交通过胚挽救技术获得了百合种间杂种^[1], 而百合花药培养的研究相对较少, 且诱导率较低。本研究旨在摸索适合百合花药愈伤组织诱导和植株再生的条件, 使通过花药培养获得大量的单倍体或纯合二倍体成为可能。供试材料为 ‘Pollyanna’, 采用卡宝品红染色法确定花蕾长度与小孢子发育的关系。花蕾用 0.1% 升汞消毒 5 min 后用无菌水冲洗 5 遍, 剥出花药, 去除花丝, 接种于培养基中。诱导培养以 MS 为基本培养基, 将维生素 B₁ 提高到 4.0 mg L⁻¹, 附加不同浓度 2,4-D、KT 及蔗糖 (见表 1), 按均匀设计表的 U₆*(6⁴) 安排试验^[2], 琼脂含量为 0.7%, pH 5.8。分化培养仍以改良 MS 为基本培养基, 加入不同浓度的 NAA (1.0、2.0、4.0、7.0 mg L⁻¹), 蔗糖 3.0%, 琼脂 0.7%, pH 5.8。培养室温度为 24~26℃, 诱导培养阶段连续黑暗, 分化培养阶段光照 16 h/d, 光强 2 000~3 000 lx。取花粉植株的根尖用常规制片技术压片, 在 Olympus BH2 显微镜下观察并摄影。

2 结果与分析

2.1 花药愈伤组织的诱导 激素对百合的花药培养影响很大, 6 种培养基中有 5 种获得了花药愈伤组织 (表 1)。运用 SAS 软件对本结果进行逐步回归分析, 得到回归方程, 推算出条件极值在 2,4-D 为 3.0 mg L⁻¹, KT 为 3.0 mg L⁻¹ 时取得。

取不同大小的花蕾进行愈伤组织诱导试验, 由表 2 看出, 百合花药成熟前对离体培养均有反应, 24~26 mm 长的花蕾中的花药最易诱导产生愈伤组织, 此时对应的小孢子大都处于单核期, 因此认为单核期的花药作外植体为宜。

试验中观察到经低温预处理 (4℃, 48 h 后接种) 的花药诱导出 7 个愈伤组织 (诱导率为 11.67%), 不经低温预处理直接接种的花药诱导出 9 个愈伤组织 (诱导率为 11.54%), 可见 48 h 低温预处理对 ‘Pollyanna’ 的花药培养影响不显著。

收稿日期: 2001-01-09; 修回日期: 2001-04-20

基金项目: 武汉市科技攻关项目 (992002050G)

*现在工作单位: 上海市农业科学院园艺研究所, 201106。 **通讯作者 (Author for correspondence)。

表 1 诱导培养基的影响

Table 1 Effect of the media on callus induction

代号 Number	蔗糖 Sucrose (%)	2,4-D (mg L ⁻¹)	KT (mg L ⁻¹)	接种花药数 No. of anthers cultured	愈伤组织数 No. of calli formed	诱导率 Induction frequency (%)
	3.0	1.0	2.0	79	30	39.97
	4.0	2.0	5.0	81	12	14.81
	5.0	3.0	1.0	71	9	12.68
	6.0	0.5	4.0	80	4	5.00
	7.0	1.5	0.0	40	0	0.00
	8.0	2.5	3.0	80	28	35.00
总数 Total				431	83	19.26

表 2 不同长度花蕾的花药愈伤组织诱导情况

Table 2 Effect of the length of flower bud on callus induction

花蕾长 Length of flower bud (mm)	小孢子发育时期 Microspores stage	接种花药数 No. of anthers cultured	愈伤组织数 No. of calli formed	出愈率 Induction frequency (%)
12~22	花粉母细胞-二分体 Pollen mother cell-Dyad	334	28	8.38
24~26	单核期 Uninucleate microspore	266	58	21.80
>26	二胞期 Bicellular pollen	120	0	0

从表 3 可以看出，4 批花蕾（24 ~ 26 mm 长）愈伤组织诱导率随采样时期的推迟而呈下降趋势，即早分化出的单核期小孢子更易诱导产生愈伤组织，在应用上宜采用早期分化出的花药进行培养。

2.2 愈伤组织的分化培养 当愈伤组织长至 3~4 mm 时转入不同分化培养基，发现其分化表现不同。NAA 为 2.0（图版，

1）、4.0 mg L⁻¹ 时，根、叶比例比较恰当，且鳞茎较大（围径约 0.8 cm），NAA 过高（7.0 mg L⁻¹），则导致根多叶少，鳞茎小（围径约 0.4 cm），影响了营养生长，反之，NAA 过低（1.0 mg L⁻¹），则鳞茎也小（围径约 0.3 cm），不利于植株的移植成活。

愈伤组织分化能力也受诱导培养基的影响，在培养基上共诱导出 123 个愈伤组织，有 6 个分化出鳞茎，分化率仅为 4.88%，而培养基上产生的 30 个愈伤组织有 9 个分化出鳞茎，分化率为 30.00%，可见 2,4-D 浓度的升高将降低愈伤组织的分化能力，因此不能为了追求较高的愈伤组织诱导率而在初代培养基中加入过多的 2,4-D。

2.3 花粉植株的倍性鉴定 经根尖压片观察：所得花粉植株中有单倍体存在（约占 25%），其染色体数目为 12 条（图版，2），也有二倍体存在（约占 75%），染色体数为 24（图版，3），尚未发现非整倍体。

参考文献：

1 黄济明，赵晓艺，张国民，等. 玫红百合为亲本育成百合杂种. 园艺学报，1990，17（2）：153~157
2 方开泰编. 均匀设计与均匀设计表. 北京：科学出版社，1994. 69

表 3 不同采样时期的花药培养差异情况表

Table 3 Effect of time of sample collecting on anther culture

日期 Date (M-D)	接种花药数 No. of anthers cultured	愈伤组织数 No. of calli formed	诱导率 Induction frequency (%)
05-31	102	43	42.16
06-02	84	27	32.14
06-07	60	7	11.67
06-28	42	3	7.14

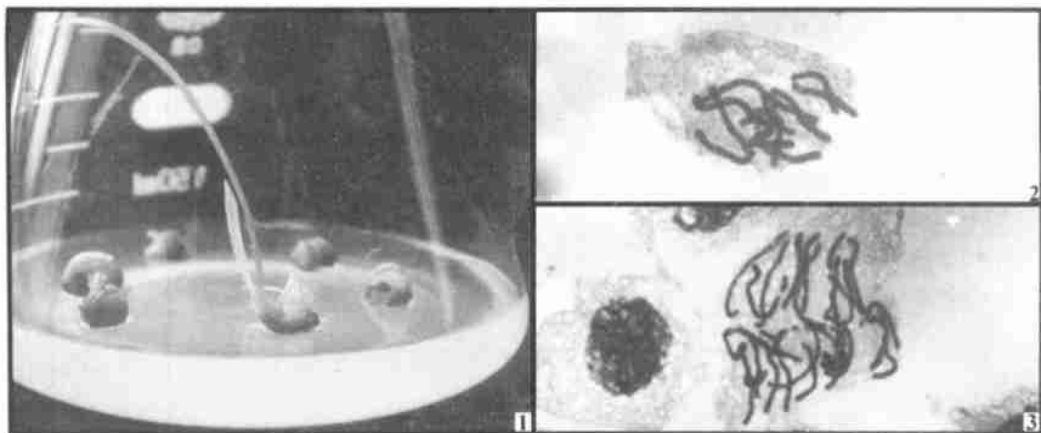
Studies on Anther Culture of Lily

Chu Yunxia¹, Chen Longqing², Huang Yanwen¹, and Zhang Yongchun³

(¹ Science department of Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070; ² Forestry department of Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070; ³ Horticultural Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Science, Shanghai 201106)

Abstract: The following experimental results have been obtained: Compared with other stage, microspores at uninucleate stage were more suitable for culture. Calli were induced from anthers of lily placed on modified MS media supplemented with different concentrations of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and Kinetin (KT) according to homogeneous design. The cold pretreatment (4 °C, 2 days) couldn't obviously raise the callus induction frequency in anther culture; The pollen calli were transferred to modified MS media with different concentrations of naphthaleneacetic acid (NAA). The results indicated that modified MS media with 2.0 - 4.0 mg · L⁻¹ NAA were optimal for the differentiation of pollen callus. Cytological examination of mitotic root tip cells from green plants showed that about 25 % of them were haploid and others were diploid.

Key words: Lily; Anther; Tissue culture



图版说明 1. 在改良 MS + NAA 2.0 mg/L 小鳞茎抽出叶; 2. 花粉植株根尖细胞染色体数为 $n = 12$, $\times 450$; 3. 花粉植株根尖细胞染色体数为 $2n = 24$, $\times 450$

Explanation of plates 1. Leaf regenerated on MS + NAA 2.0 mg/L; 2. Chromosomes of a root-tip cell of an anther culture-derived plantlet ($n = 12$), $\times 450$; 3. Chromosomes of a root-tip cell of an anther culture-derived plantlet ($2n = 24$), $\times 450$

欢迎订阅 2002 年下列期刊

《广西科学院学报》是广西科学院主办的自然科学综述性期刊。季刊, 16 开本, 48 页, 国内定价每期 2.5 元, 全年 10 元; 国外定价每期 2.5 美元, 全年 10 美元。订阅者请将书款汇到: 广西南宁市星湖路 32 号, 《广西科学院学报》编辑部。收款人: 邓大玉; 邮编: 530022; 电话: (0771) 5311061 (转帐开户名: 广西科学编辑部; 开户行: 工行南宁市星湖路分理处; 帐号: 0542490070251)。

《西北农林科技大学学报》(自然科学版) 由西北农林科技大学主办, 双月刊, 16 开, 128 页。每期定价 10 元, 全年 60 元。全国各地邮局均可订阅。邮发代号 52-82; 国外总发行为中国出版对外贸易总公司。编辑部地址: 陕西杨凌西北农林科技大学西农校区 40 号信箱, 邮政编码: 712100, 电话: 029-7092511。