

石刁柏花药培养研究简报

A Brief Report on the Anther Culture of Asparagus

张 斌* 胡霓云 王 鸣

(园艺系)

Zhang Bin Hu Niyun Wang Ming

(Department of Horticulture)

关键词 石刁柏, 花药培养, 单倍体育种

key words Asparagus, anther culture, haploid breeding

中图分类号 S644.603.5

石刁柏 (*Asparagus officinalis* L.) 是具有较高经济价值、食用价值和药用价值的名贵蔬菜。至 70 年代, 我国大陆才开始有较大面积的栽培, 近几年栽培面积和加工出口正在日益增加。石刁柏花药培养产生超雄二倍体 (YY) 可以与雌株 (XX) 杂交, 生产纯雄株杂种一代 (XY)。最早进行这一研究的是 Pellevier 等⁽¹⁾, 法国学者 Falavigna^(2,3) 也用此法成功地培育出纯雄株一代杂种。我国大陆迄今尚未见关于石刁柏花药培养及其在育种上应用的研究报道。

1 材料与方法

供试品种为石刁柏 "Mary Washington 500", 采用其在花粉发育处于单核靠边期的幼小花蕾, 用乙醇和升汞进行表面消毒灭菌后, 于无菌条件下剥离花药, 做为初次培养的外植体。每培养接种 6 个花药, 每个试验处理调查数日不少于 40 个外植体。继代培养及分化培养时将愈伤组织切成 0.5cm³ 的小块做为外植体, 每培养瓶接种 5 个, 每试验处理调查数目不少于 40 个外植体。试验以 Ms 培养基作为基本培养基, 附加 3% 蔗糖, 0.6%~0.7% 琼脂, pH5.8, 培养温度 26~28℃, 以 1500~2000 lx 光强的日光灯照明 12h, 染色体观察采用卡诺固定液 (乙醇 3:冰醋酸 1) 固定, 醋酸洋红染色, 压片观察。

2 结果与分析

2.1 诱导愈伤组织培养基的筛选

对预试验中能诱导出愈伤组织的 7 种培养基进一步进行筛选, 随机区组设计, 设 3 次重复。接种后 60d 调查结果见表 1。在含有 1.0mg/L 的 KT (1 号培养基) 或 1.0mg/L BA (8 号培养基) 中分别再加入 5.0mg/L NAA 都可良好地诱导愈伤组织产生。经多重比较 (新复极差法), BA 和 KT 在成愈率上无显著性差异, 并且形成的

文稿收到日期: 1990-04-16。

* 现在天津市蔬菜研究所工作。

愈伤组织的生长量也较大,尤以1号培养基更为明显,直径不小于0.5cm的愈伤组织占接种花药总数的20%,8号培养基为13.3%。试验中还观察到由KT(1号培养基)诱导的愈伤组织生长形状极不规则,呈珊瑚状,生长速度特别快;由BA(8号培养基)诱导的愈伤组织为表面比较平坦的圆形愈伤组织,生长速度较快;而由2.4-D(9号培养基)诱导的愈伤组织则是疏松的。

表1 诱导愈伤组织培养基的筛选

培养基代号	激素(mg/L)	成愈率(%)
1	KT 1.0+NAA 5.0	74.5 a
8	BA 1.0+NAA 5.0	61.2 ab
9	BA 1.0+2.4-D 5.0	53.4 bc
5	BA 1.0+NAA 3.0	51.4 bc
4	Z(玉米素)1.0+NAA 5.0	44.7 cd
6	BA 1.0+NAA 5.0+GA ₃ 0.1	41.5 cd
3	BA 1.0+IBA 5.0	34.7 d

2.2 继代培养试验

将1号和8号培养基诱导的愈伤组织分别在各自培养基上继代10代(每代30d左右)以上,愈伤组织一直处于旺盛生长状态,每30d1号培养基上的愈伤组织可增殖8~10倍,8号培养基上的愈伤组织可增殖6~8倍。继代过程中部分愈伤组织块可再分化产生幼茎。

2.3 愈伤组织分化成苗培养基的筛选

用在8号培养基上继代5次的愈伤组织对不同激素组成的近18种配方进行分化试验,从分化指数看,单独使用BA以1.0mg/L为最适宜,与0.1mg/L NAA配合使用时以0.2mg/L最佳,与0.05~0.1mg/L IBA配合也可较好地诱导分化成苗(表略)。对4种较好的分化培养基进一步筛选,试验按随机区组设计,设3次重复,结果见表2。对分化指数进行多重比较(新复极差法),表明a培养基与b培养基无显著性差异,而与c及d培养基则存在极显著差异,说明a和b分化培养基是诱导愈伤组织分化产生幼茎的适宜培养基。

表2 愈伤组织分化培养基筛选

培养基代号	激素(mg/L)	分化指数 ¹⁾	分化率(%) ²⁾
a	NAA 0.1+BA 0.2	0.94 A	21.3
b	BA 0.1	0.80 AB	22.3
c	IBA 0.1+BA 0.2	0.65 BC	24.3
d	IBA 0.05+BA 0.2	0.50 C	18.5

注:1) 分化的总芽数与接种外植体数的比值;2) 发生幼茎分化的外植体占接种外植体数的百分率。

2.4 不同培养基诱导的愈伤组织分化能力的差异

KT组成的培养基(1号培养基)和BA组成的培养基(8号培养基)诱导产生的愈伤组织在各自培养基上继代培养后进行分化试验,所表现出的分化能力存在着相当大的差异(表3)。KT的培养基诱导的愈伤组织在4种分化培养基上的分化指数及分化率

远远高于 BA 组成的培养基诱导的愈伤组织。

表 3 不同培养基诱导的愈伤组织的再分化情况

愈伤组织来源(培养基)	分化培养基	分化指数	分化率(%)
KT 组成的培养基	a	1.35	40.9
	b	0.74	33.3
	c	0.83	47.2
	d	0.86	31.8
BA 组成的培养基	a	0.04	4.2
	b	0.31	12.5
	c	0.11	11.1
	d	0.09	4.3

注:表中数据为接种后 50d 调查的结果。

KT 组成的培养基和 BA 组成的培养基诱导的愈伤组织在各自的培养基上继代培养时表现的分化能力也存在较大差异(表 4)。KT 组成的培养基诱导的愈伤组织在继代培养第 1 代就表现较高的分化能力,具有较高的分化指数及分化率。而 BA 组成的培养基诱导的愈伤组织在继代培养的第 1 代只有极少数愈伤组织发生分化,至第 2 代分化指数及分化率仍然很低。

表 4 愈伤组织继代培养过程中的分化情况

培养基	培养代数	培养时间 (d)	分化指数		分化率%	
			I	II	I	II
KT 组成的培养基	初代培养	60	0.00	0.0	0.0	0.0
	第一次继代	30	0.20	1.21	15.5	20.6
	第二次继代	30	0.52	2.31	21.1	74.2
BA 组成的培养基	初代培养	60	0.00	0.00	0.0	0.0
	第一次继代	30	0.03	0.00	2.8	0.0
	第二次继代	30	0.03	0.11	2.8	11.1

综合分析上述试验结果,我们认为愈伤组织内部 KT 的积累对其分化成苗有明显的促进作用。KT 组成的培养基诱导出的愈伤组织由于积累了较多的 KT,所以在分化培养时就表现出较高的分化成苗能力(表 3)。愈伤组织在 KT 组成的培养基上继代培养,会使 KT 的积累逐渐增加,其分化成苗的能力也逐渐增强(表 4)。本试验也不否定 BA 积累的增多对愈伤组织分化成苗的促进作用,但可以肯定其促进作用远不如 KT 明显。

2.5 愈伤组织的细胞学观察

继代培养的愈伤组织中存在着极其广泛的染色体数目变异(表 5),观察的 58 个分裂相中,单倍体($n=10$)和二倍体($2n=20$)细胞各占 3.4%和 41.4%,并存在大量非整倍体细胞,这一结果与 Tsay 等^[4]和 Faivigna 等^[3]在花药培养株中观察到的结果一致。

多数报道认为在石刁柏花药培养中,愈伤组织细胞的染色体数目及倍性变异十分普

遍, Inagaki 等在培养 7~10d 的愈伤组织细胞中观察到单倍体细胞, 但培养 20d 以后就观察不到了, 认为可能是单倍体细胞已加倍^[5]。八锹等也认为对花药培养得到的 $4n$, $2n$ 植株不能断然否定其花粉起源, 而应在成株期用杂交法鉴定^[6]。据此我们认为本试验所得到的非单倍体细胞乃至进一步试验所分化出的非单倍体植株中, 有些也有起源于花粉的可能, 此种单倍体是在以后的培养过程中通过染色体的自然加倍而产生二倍体或多倍体植株。

表 5 愈伤组织细胞中的染色体数目变异

染色体数目(条)	10 以下	10	10~20	20	20~40	40	40 以上
细胞数	1	2	10	24	13	5	3
占观察总数的百分率(%)	1.7	3.4	17.4	41.4	22.4	8.6	5.2

2.6 生根试验

将愈伤组织再分化产生的幼茎从基部切下, 接种于附加 0.1mg/L 和 0.3mg/L 的 MS 培养基上培养 30d, 可达到 52.2% 的生根率, 平均生根条数为 6.50, 提高生根率及移栽成活率目前仍是石刁柏组织培养中普遍存在的难题, 正在进一步研究解决。

参 考 文 献

- 1 Pellevier 等著; 中国科学院植物所译. 石刁柏花药培养的高体培养. 单倍体育种资料集 (第二集). 1973, 18~21
- 2 Falavigna A, et al. The first all-male F_1 hybrids of asparagus from doubled haploid androgenetic clones, *Genetica Agraria*, 1984, 38(3):330
- 3 Falavigna A, et al. Asparagus breeding through anther *in vitro* culture eight years of activity in Italy. In: *Proceedings of the Sixth International Asparagus Symposium*, Guelph: University of Guelph, 1985. 31~34
- 4 Inagaki N, et al. Studies on the anther culture of horticultural crops. In: *VII Investigation of optimal conditions for obtaining pollen-originating callus and its characteristics in Asparagus officinalis L.* 1983, 61(3):279~284
- 5 Tsay H S, et al. The breeding of all male asparagus plants by means of anther culture, In: *Proceeding of the Sixth International Asparagus Symposium*. Guelph: University of Guelph, 1985. 22~30
- 6 八锹利郎片ろ. 园学杂志, 1972, 49 (1): 71~78