

金鱼草高效植株再生体系的建立

黄俊轩, 李双跃, 李建科, 刘艳军, 杨静慧 (天津农学院园艺系, 天津 300384)

摘要 [目的]探索利用组织培养技术对优良品种的金鱼草进行快速繁殖的研究。[方法]以金鱼草无菌苗不同部位为外植体,在 MS+2.0 mg/L BA+0.2 mg/L NAA 的培养基上进行再生频率比较。[结果]结果表明,下胚轴的再生率最高;把下胚轴再生的芽接种到增粗培养基上进行再生芽的诱导,可以得到 100% 的再生率。[结论]该研究为金鱼草的高效转化提供了试验依据。

关键词 金鱼草;外植体;组织培养;再生

中图分类号 Q943.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2007)20-06039-02

Establishment of High Efficient Regeneration System of *Antirrhinura majus* L.

HUANG Jun-xuan et al (Department of Horticulture, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384)

Abstract [Objective] Rapid regeneration of good variety *Antirrhinura majus* L was studied by tissue culture technology. [Method] Different explants of *Antirrhinura majus* L was cultured on MS+2.0 mg/L BA+0.2 mg/L NAA and their regeneration frequencies were compared. [Result] Result showed that hypocotyls had the highest regeneration frequency. The bud of hypocotyls was transformed into regeneration medium and its regeneration frequency could reach 100%. [Conclusion] This paper provided references for the high efficient regeneration study of *Antirrhinura majus* L.

Key words *Antirrhinura majus* L; Explants; Tissue culture; Regeneration

金鱼草(*Antirrhinura majus* L.)又名龙头花,玄参科多年生草本花卉^[1]。由于金鱼草为异花授粉植株,种子繁殖后代会发生分离,严重影响观赏效果。如应用组织培养技术对优良品种的金鱼草进行快速繁殖,将有利于种质资源的保存和优良品种的应用与推广^[2-3]。笔者进行了金鱼草高效植株再生体系的研究。

1 材料与与方法

1.1 材料 供试金鱼草品种购自北京市花卉市场。

1.2 无菌苗培养 挑取饱满的金鱼草种子,自来水冲洗后,用浓度 95%乙醇浸泡 30 s,0.025% HgCl₂ 溶液表面灭菌 15 min,无菌水浸泡冲洗 3~5 次。然后接种在 MS 培养基上萌发,培养条件:温度 25℃,光照 12 h/d,光强为 1 600~2 000 lx。取 6 日龄无菌苗进行各种不同处理的组培试验。

1.3 不同组织部位诱导比较试验 取预培养 6 日龄金鱼草无菌苗的子叶、下胚轴、叶柄等组织部位,用剪刀剪成 1~3 cm 小段。分别接种到 MS+2.0 mg/L BA+0.2 mg/L NAA 的分化培养基上。附加 3%蔗糖、0.7%琼脂,调 pH 至 5.8。将接种后的培养基放入培养室,培养温度控制在(25±2)℃,光照时间 12 h/d,光照强度 2 000 lx。培养 15 d 调查再生率。

1.4 增粗培养基的筛选 取金鱼草下胚轴诱导的再生苗,分别接种到含有不同激素浓度的 MS 分化培养基上。附加 3%蔗糖、0.7%琼脂,调 pH 至 5.8。将接种后的培养基放入培养室,培养温度控制在(25±2)℃,光照时间 12 h/d,光照强度 2 000 lx。培养 15 d 调查再生苗的粗壮程度。再生苗的粗壮程度的计算方法为每块外植体上随机测得一个再生芽的茎粗和的平均数,计作平均茎粗;外植体的分化系数的计算公式:分化系数=分化总的芽数/总接种数。

基金项目 天津市自然科学基金项目(转基因抗黄化苹果选育 023614211,抗旱抗寒高产油树工程育种 05YFJMJC14400);天津市科技发展规划项目(天津市生物技术预见);天津市农业科技成果转化与推广项目(耐盐牧草选育 0504018);天津市高等学校科技发展基金项目(名贵花卉—巨型红掌的引种和组培快繁研究 20050908);天津农学院青年基金项目(转基因耐贮藏金鱼草的培育)。

作者简介 黄俊轩(1973-),男,广东河源人,讲师,从事园林植物研究。
收稿日期 2007-04-02

1.5 组培苗茎段诱导再生培养基的筛选 取经增粗培养基诱导的金鱼草再生苗,用剪刀剪成 1~3 cm 小块分别接种到含有不同激素浓度的 MS 分化培养基上。附加 3%蔗糖、0.7%琼脂,调 pH 至 5.8。将接种了的培养基放入培养室,培养温度控制在(25±2)℃,光照时间 12 h/d,光照强度 2 000 lx。培养 15 d 调查再生率及分化系数。

2 结果与分析

2.1 不同组织部位对金鱼草再生率的影响 表 1 表明,以下胚轴的再生芽诱导效果最好,叶柄次之,子叶最低。主要是由于在这些组织部位中分生组织的分布不同,其中生长迅速的子叶、叶柄、下胚轴中均含有较多的分生组织,因此有利于再生芽诱导。同时在对金鱼草再生芽诱导的过程中,还发现叶柄作为外植体,在剪取时不容易,经常被剪碎,离体组织太小,不易存活,因此大多数外植体在诱导过程中就已经死亡,从而影响了再生率;下胚轴分布大量分生组织,直接影响再生率,特别在其靠近生长点的一端分生组织最多,因此在其一端会先出现大量的再生芽。

表 1 不同组织部位对金鱼草再生率的影响

组织部位	接种再生苗数	再生芽的外植体数	再生率/%
子叶	40	11	27.5
叶柄	40	28	70.0
下胚轴	40	40	100.0

2.2 不同培养基对金鱼草再生苗茎增粗的影响 表 2 表明,采用 MS 培养基比 1/2 MS 培养基的分化系数高,说明高盐有利于组织分化;从 BA 的浓度变化来看,较高的浓度有利于芽的组织分化;在平均茎粗的情况来看,使用 1/2 MS 培养基的再生苗的茎粗明显高于采用 MS 培养基,主要由于低盐有利于植物细胞生长,从而有利于植株的增粗和长高;另外从生长速度上看,采用 1/2 MS 培养基的再生苗的生长速度明显快于使用 MS 培养基,一般在接种后 7 d 就直接用于转化试验。综合以上因素,比较理想的增粗培养基的配方为 1/2 MS+1.0 mg/L BA+0.2 mg/L IAA。

2.3 组培苗茎段诱导再生培养基的筛选 表 3 表明,所有 4 种培养基配方都能够使金鱼草组培苗茎段诱导再生率为 100%,说明金鱼草组培苗茎段作为转化外植体是理想的材

表2 不同培养基对金鱼草茎增粗的影响

培养基配方	接种再生芽数	分化系数	平均茎粗//mm
1/2 MS+1.0 mg/L BA+0.2 mg/L IAA	40	8.3	0.83
1/2 MS+ 0.5 mg/L BA+0.2 mg/L IAA	40	5.8	0.78
MS+1.0 mg/L BA+0.2 mg/L IAA	40	9.6	0.51
MS+0.5 mg/L BA+0.2 mg/L IAA	40	8.9	0.62

料;从分化系数上看随着 BA 浓度的增加,金鱼草组培苗茎段诱导再生苗的分化系数也增加,说明较高的浓度 BA 利于芽组织分化;从 NAA 对分化系数影响来看,随着 NAA 浓度的增加,金鱼草组培苗茎段诱导再生苗的分化系数减小,说明较高的浓度 NAA 不利于芽的组织分化,但从再生苗的粗壮程度及生长速度来看,较高浓度的 NAA 明显好于低浓度的处理,在试验中一般在接种后 14 d 就可直接用于生根试验。综合以上因素,比较理想的组培苗茎段诱导再生培养基的配方为 MS+2.0 mg/L BA+0.2 mg/L NAA。

表3 不同培养基对金鱼草组培苗茎段诱导再生的影响

培养基配方	接种再生芽数	分化系数	再生率//%
MS+2.0 mg/L BA+0.2 mg/L NAA	40	9.8	100
MS+1.0 mg/L BA+0.2 mg/L NAA	40	7.9	100
MS+2.0 mg/L BA+0.1 mg/L NAA	10	11.1	100
MS+1.0 mg/L BA+0.1 mg/L NAA	40	8.2	100

3 讨论和结论

以金鱼草无菌苗不同部位为外植体,在 MS+2.0 mg/L BA+0.2 mg/L NAA 的分化培养基上进行再生频率的比较,结果表明,下胚轴的再生率最高。把下胚轴再生的芽接种到增粗培养基 1/2 MS+1.0 mg/L BA+0.2 mg/L IAA 上,可以得到长势粗壮的金鱼草无菌苗;再以此无菌苗的茎段为外植体,在组培苗茎段诱导再生培养基上进行再生芽的诱导,所有

(上接第 6038 页)
料的 38.5%;只有 Y2272 材料抗病等级为 4 级,为高感,占供试材料的 7.7%(表 2)。

抗病材料 Y192 和感病材料 Y2272 杂交,后代进行了抗病性鉴定。F₁ 代表现抗病, F₂ 代出现明显的抗感分离现象。获得的 115 株单株中,有 86 株抗病, 29 株感病, 遵循 3:1 的比例分离,表明抗病基因是显性单基因控制的。

3 讨论

粗山羊草间的杂交,是验证材料之间的亲缘关系和检验抗病基因个数的一种有效方法。从试验结果可以看出,粗山羊草间的杂交并不是全部可育的。董玉琛等将山羊草分为 6 个组 24 种,粗山羊草是其中的一个种,粗山羊草又分为 *Eusquarrosa* 和 *Strangulata* 两个亚种,查找该试验使用的材料来源,发现 Y2272、Y192 和 Ae34 属于 *Strangulata*,其余材料都是 *Eusquarrosa* 亚种^[8-9]。从杂交的结果来看,亚种内杂交率较高,为 14.15%~83.33%,而亚种间杂交率较低,为 0~8.33%。因此可以判断粗山羊草亚种之间存在着生殖隔离,与前人的分类结果相吻合。

粗山羊草的抗病材料与感病材料杂交,可以确定抗病基因存在的个数,还可以对抗病基因进行基因定位, Sun XL 等及张海泉等分别利用抗病粗山羊草与感病粗山羊草杂交,定位 3 个抗小麦白粉病新基因^[5-6]。该研究的抗病材料 Y192

配方都可以得到 100% 的再生率,比较理想的组培苗茎段诱导再生培养基的配方为 MS+2.0 mg/L BA+0.2 mg/L NAA。

有人曾采用金鱼草下胚轴为外植体,建立不定芽发生系统,并在此基础上进一步以下胚轴为转化受体进行农杆菌 Ti 质粒介导法将外源基因导入金鱼草细胞,成功地获得开花的转基因植株^[2-4]。由于金鱼草的无菌苗生长势极弱,从而导致以下胚轴为外植体进行农杆菌 Ti 质粒介导法进行基因转化时,因下胚轴太小太细,在操作时往往将其伤害严重,再加上农杆菌的侵染作用,外植体的共培养阶段几乎全部死亡,从而使再生率和转化率大大下降,为金鱼草的基因转化工作增加了难度。该试验结果得出的金鱼草高效转化途径为:①挑取饱满的金鱼草种子,经消毒处理后得到无菌苗;②切取无菌苗下胚轴接种到 MS+2.0 mg/L BA+0.2 mg/L NAA 的分化培养基上诱导出再生的芽;③将下胚轴再生的芽接种到增粗培养基 1/2 MS+1.0 mg/L BA+0.2 mg/L IAA 上,可以得到长势粗壮的金鱼草无菌苗;④以组培苗茎段为金鱼草基因转化的外植体进行遗传转化,转化所用的诱导再生培养基为 MS+2.0 mg/L BA+0.2 mg/L NAA。

参考文献

- [1] 张效芳,辛雅芬,刘宏伟.金鱼草茎尖培养与植株再生[J].东北林业大学学报,1997,7(4):42-47.
- [2] 余迪求,邓庆丽,沈亚楠,等.金鱼草下胚轴组织培养的研究[J].园艺学报,1996(23):99-100.
- [3] 余迪求,邓庆丽,沈亚楠,等.金鱼草基因转化和转基因植株再生[J].热带亚热带植物学报,1996,4(4):86-90.
- [4] 姜维梅,梁海曼,种华鑫.金鱼草下胚轴不同部位切段形态发生能力的研究[J].云南植物研究,1999,21(1):109-111.

和感病的 Y2272 杂交,已经确定抗病基因是由显性单基因控制的,基因所在的染色体位置及其是否是新的抗病基因,有待研究。

参考文献

- [1] 杨凯,朱志华,吕小平.粗山羊草的细胞质对小麦抗旱性的影响[J].作物学报,1997,23(1):50-55.
- [2] BAI D, KNOT D R. Suppression of rust resistance in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) by 2D genome chromosomes [J]. Genome, 1992, 35: 276-282.
- [3] COX T S, HARRELL L, GAND C P. Reproductive behavior of hexaploid/diploid wheat hybrids [J]. Plant Breeding, 1991, 107: 105-450.
- [4] GILL B S, RAUPP W J. Direct genetic transfer from *Aegilops squarrosa* L. to hexaploid wheat [J]. Crop Science, 1987, 27: 445-450.
- [5] SUN X L, LIU D, ZHANG H Q, et al. Identification and mapping of two new genes conferring resistance to powdery mildew from *Aegilops tauschii* (Coss.) Schmal [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2006, 48(10): 1204-1209.
- [6] MIRANDA L M, MURPHY J P, MARSHALL D, et al. Pm34: a new powdery mildew resistance gene transferred from *Aegilops tauschii* Coss. to common wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Theor Appl Genet, 2006, 113(8): 1497-504.
- [7] 张海泉,张宝石,周荣华,等.染色体定位粗山羊草抗小麦白粉病基因 *PmAeY1* [J]. 中国农业科技导报, 2006, 8(4): 19-22.
- [8] 董玉琛,郑殿升.中国小麦遗传资源[M].北京:中国农业出版社, 2000.
- [9] 董玉琛.小麦野生近缘植物的研究利用——植物优异种质资源及其开拓利用[M].北京:中国科技出版社, 1992.