

## 矮牵牛花药培养胚状体诱导和植株再生

鲁娇娇<sup>1</sup>, 张青<sup>1</sup>, 王平<sup>1</sup>, 侯超<sup>2</sup> (1. 辽宁省农业科学院, 辽宁沈阳 110161; 2. 瑞克斯旺中国种子有限公司, 江苏宿迁 223800)

**摘要** [目的]利用矮牵牛的花药培养诱导胚状体和再生植株。[方法]以7个品种矮牵牛的花药为材料,研究其胚状体及其再生植株的诱导方法。[结果]基因型和培养基成分对胚状体的诱导有重要影响;椰乳和活性炭对胚状体的发生及发育有促进作用;向改良MS培养基中添加0.01%活性炭可促进植株再生;最佳生根培养基为1/2MS+IBA 0.2 mg/L。[结论]该研究为矮牵牛的大规模工业化生产奠定了基础。

**关键词** 矮牵牛;花药;胚状体;植株再生

**中图分类号** S681.6 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)05-01907-01

Embryoid Induction and Plant Regeneration of *Petunia hybrida* vilm by Its Anther Culture

LU Jiao-jiao et al (Liaoning Academy of Agricultural Sciences, Shenyang, Liaoning 110161)

**Abstract** [Objective] The paper was to induce the embryoid and regenerated plants of *Petunia hybrida* vilm by its anther culture. [Method] The induction methods of embryoid and regenerated plants were studied by using anther of 7 species of *P. hybrida* as materials. [Result] Genotype and medium composition had important effects on the induction of embryoid; coconut milk and activated carbon could promote the induction and development of embryoid; the modified MS medium supplemented with 0.01% activated charcoal could promote the regeneration of plants; the best rooting medium was 1/2MS + IBA 0.2 mg/L. [Conclusion] The study laid the foundation for the large-scale industrialization production of *P. hybrida*.

**Key words** *Petunia hybrida* vilm; Anther; Embryoid; Plant regeneration

矮牵牛(*Petunia hybrida* vilm)又名碧冬茄、灵芝牡丹,是属茄科矮牵牛属的多年生草本花卉。随着城市绿化中使用花卉的比重越来越大,矮牵牛因具有装饰效果良好及栽培管理较为粗放等特点而备受人们青睐,市场需求量持续上升<sup>[1-4]</sup>。

矮牵牛的传统育种方法周期长,需耗费大量的人力物力。而通过花药离体培养诱导胚状体能够快速得到单倍体植株,再经加倍即可获得纯合二倍体,可加速育种材料的稳定,从而加快育种进程,缩短育种周期<sup>[5]</sup>。此项技术在矮牵牛上的应用还不成熟<sup>[6-11]</sup>,因此笔者以7个矮牵牛为试材进行花药培养,诱导胚状体并分化再生植株,旨在为矮牵牛的大规模工业化生产奠定基础。

## 1 材料与方

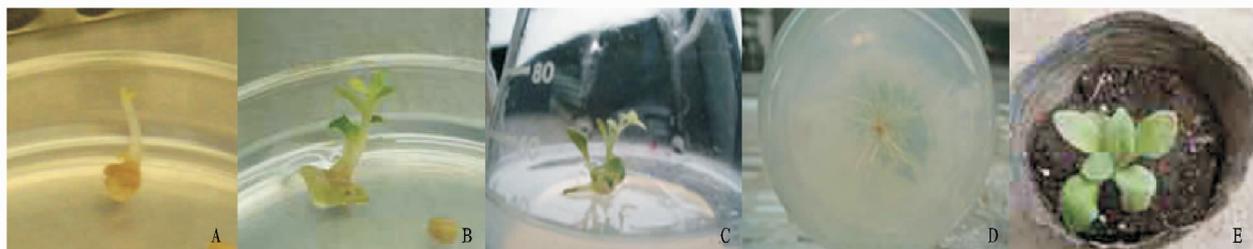
**1.1 材料** 供试材料选用辽宁省农科院花卉所研制的F<sub>1</sub>杂交组合:N<sub>1</sub>、N<sub>2</sub>、N<sub>3</sub>、樱桃、梦境、王子、粉爱,于2007年3月定植于辽宁省农科院花卉所辽农型日光温室内,常规田间管理。矮牵牛现蕾后,于上午8:00~10:00取健壮植株上的花蕾,采用醋酸洋红压片后在生物显微镜下观察,选取小孢子发育时期处于单核靠边期至双核早期所占比例较大的花蕾

(花蕾长度1.8~3.1 cm)进行试验。

**1.2 方法** 剥去花蕾的花萼,用1 mol/L HCl处理1 min,水洗数遍后,洗衣粉溶液浸泡3 min,流水冲洗30 min,再用70%酒精处理1 min,0.1%升汞处理8 min,无菌水冲洗3遍,每次5 min。用灭过菌的镊子剥开花蕾,取出花药,去除花丝,接种到已配好的固体培养基上,每皿放8~12个花药,用Parafilm封口。先在33℃高温、黑暗条件下预培养24 h(恒温培养箱中),再置于25℃下暗培养。当花药诱导得到的胚状体长到子叶形时,将胚状体转入含3.0%蔗糖和1.0%琼脂的固体培养基上,置于25℃、16 h/d光照下诱导胚状体分化,形成再生植株。

## 2 结果与分析

**2.1 基因型对胚状体发生的影响** 在Nitsch培养基上,花药热激培养1 d后,大部分花药明显膨大。在相同培养条件下,不同基因型的矮牵牛出胚率差异很大。培养约3周后,7个不同基因型的矮牵牛中只有1个品种(粉爱)获得了胚状体(图1A)并进一步成苗,但出胚率较低,只有2.5%左右,而其他6个品种无任何反应。不同基因型间诱导率存在差异说明基因型是影响胚诱导的关键因素之一。



注:A.花药培养获得的胚状体;B.胚状体直接萌发成苗;C.继代苗;D.花培植株的生根;E.成活植株。

图1 矮牵牛花药再生植株的形成过程

**作者简介** 鲁娇娇(1983-),女,辽宁阜新,助理研究员,硕士,从事园艺植物生物技术研究,E-mail:bestlj@163.com。

**收稿日期** 2013-01-09

**2.2 培养基对胚状体发生的影响** 在添加2,4-D(0.01~

(下转第1960页)

[10] LIU X, WANG J, LI R, et al. Maternal dietary protein affects transcriptional regulation of myostatin gene distinctively at weaning and finishing stages in skeletal muscle of Meishan pigs[J]. Epigenetics, 2011, 6(7): 899 - 907.

[11] 矫继峰. 猪肌生成抑制素及其相关因子的表达分析[D]. 长春: 吉林大学, 2011.

[12] KAMBADUR R, SHARMA M, SMITH T P L, et al. Mutations in myostatin (GDF8) in Double - Muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle[J]. Genome Res, 1997, 7: 910 - 915.

[13] 史明艳, 咎林森, 李保兰, 等. 牛 Myostatin 基因单核苷酸多态性分析[J]. 中国农学通报, 2005(6): 24 - 25.

[14] MARCQ F. Investigating the role of myostatin in the determinism of double muscling characterizing Belgian Texel sheep[J]. Anim Genet, 1998, 29(S1): 52.

[15] WALLING G A, VISSCHER P M, SIMM G, et al. Confirmed linkage for QTLs affecting muscling in Texel sheep on chromosomes 2 and 18[C]// proceedings of the 52th Annual Meeting of the European Association for Animal Production. Budapest (Hungary), 2000.

[16] CLOP A, MARCQ F, TAKEDA H, et al. A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep[J]. Nature Genetics, 2006, 38: 813 - 818.

[17] 孟详人, 郭军, 赵倩君, 等. 11 个绵羊品种 MSTN 基因非翻译区的变异

[J]. 遗传, 2008(12): 1585 - 1590.

[18] GAN S Q, DU Z, LIU S R, et al. Association of SNP Haplotypes at the Myostatin Gene with Muscular Hypertrophy in Sheep[J]. Asian-Aust J Anim Sci, 2008, 21(7): 928 - 935.

[19] HICKFORD J G. Polymorphisms in the ovine myostatin gene(MSTN) and their association with growth and carcass traits in New Zealand Romney sheep[J]. Anim Genet, 2010, 41(1): 64 - 72.

[20] LI X L, WU Z L, GONG Y F, et al. Single nucleotide polymorphism identification in the caprine myostatin gene[J]. J Anim Breed Genet, 2006, 123: 141 - 144.

[21] 金鑫燕. 山羊肌生成抑制素(MSTN)基因的克隆及生物信息学分析[J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(9): 111 - 114.

[22] MOSHER D S, QUIGNON P, BUSTAMANTE C D, et al. A Mutation in the Myostatin Gene Increases Muscle Mass and Enhances Racing Performance in Heterozygote Dogs[J]. PLoS Genet, 2007, 3(5): 79.

[23] LI S H, HE Z Q, CHEN Q L, et al. Construction of Myostatin Gene Targeting Vector of Mouse[J]. Agricultural Science & Technology, 2012, 13(6): 1164 - 1166.

[24] 王兰萍, 耿荣庆, 冀德君, 等. 牛肌肉生长抑制素基因变异位点遗传共适应性分析[J]. 华北农学报, 2011(1): 51 - 53.

(上接第 1907 页)

1.00 mg/L)、BA(0.05 ~ 0.50 mg/L)和 NAA(0.05 ~ 0.50 mg/L)的 Nitsch 培养基上,不同激素配比对花药的诱导效果差异很大,且不同基因型要求的激素组合和浓度不尽相同。在 7 个品种中,有 3 个品种(N<sub>1</sub>、N<sub>2</sub>、N<sub>3</sub>)发生了愈伤组织;有 2 个品种(粉爱、樱桃)获得了胚状体;其他 2 个品种无任何反应。这表明除基因型外,培养基成分也是影响小孢子胚胎发生能力的关键因子,且培养基成分对成功诱导小孢子胚胎发生的作用优于基因型的影响(表 1)。

表 1 基因型及培养基对矮牵牛小孢子胚胎发生的影响

| 培养基                       | 出胚率//个/蕾 |    |      |    |                |                |                |
|---------------------------|----------|----|------|----|----------------|----------------|----------------|
|                           | 粉爱       | 王子 | 樱桃   | 梦境 | N <sub>1</sub> | N <sub>2</sub> | N <sub>3</sub> |
| Nitsch                    | 0.02     | 0  | 0    | 0  | 0              | 0              | 0              |
| Nitsch + 2,4-D + BA       | 0.08     | 0  | 0.04 | 0  | 0              | 0              | 0              |
| Nitsch + 2,4-D + NAA + BA | 0.13     | 0  | 0.10 | 0  | 0              | 0              | 0              |

**2.3 椰乳和活性炭对胚状体发生及发育的影响** 在 Nitsch + 2,4-D + NAA + BA 培养基中,分别添加 3%、5%、7%、9% 椰乳和 2 g/L 活性炭,对未获得胚状体的 5 个基因型矮牵牛进行花药培养,20 d 后, N<sub>3</sub> 品种成功诱导出胚状体(表 2),再将试验中获得的发育不一致的胚状体,挑出子叶期的胚,将剩下的胚分别添加在 100 μl 活性炭和未添加活性炭的相同培养基上培养,15 d 后,添加了活性炭的培养基上幼胚发育迅速,胚体粗壮,且最终大部分幼胚都能发育成子叶期的胚;而后的幼胚发育迟缓,较幼小,只有少部分能发育至子叶期胚。

表 2 椰乳和活性炭对胚状体发生及发育的影响

| 培养基               | 出胚率//个/蕾 |    |                |                |                |
|-------------------|----------|----|----------------|----------------|----------------|
|                   | 王子       | 梦境 | N <sub>1</sub> | N <sub>2</sub> | N <sub>3</sub> |
| 3% 椰乳 + 2 g/L 活性炭 | 0        | 0  | 0              | 0              | 0              |
| 5% 椰乳 + 2 g/L 活性炭 | 0        | 0  | 0              | 0              | 0.05           |
| 7% 椰乳 + 2 g/L 活性炭 | 0        | 0  | 0              | 0              | 0.11           |
| 9% 椰乳 + 2 g/L 活性炭 | 0        | 0  | 0              | 0              | 0.09           |

**2.4 胚培养和再生植株获得** 将挑出子叶期的胚接种到改

良 MS + 0.01% 活性炭 + 6.0 g/L 琼脂的培养基上,置于 25 °C、12 h/d 光照的培养室中继续培养,10 d 后,胚状体开始变绿,胚根伸长并长出根毛。经过 15 d 的培养,整个胚状体变成绿色,同时分化出小芽(图 1B)。在添加和不添加活性炭的培养基上都能诱导成苗(图 1C),但前者芽苗长得健壮,不经过壮苗培养就可直接转到 1/2MS + IBA 0.2 mg/L 生根培养基上诱导生根(图 1D)。将生根苗移栽至温室苗床基质中,成活后获得小孢子植株(图 1E),成活率达 71.6%。

**3 讨论**

该试验初步探讨了矮牵牛花药培养胚状体诱导的影响因素,成功获得了胚状体及再生植株。但不同基因型培养的成功率和胚状体诱导率还较低,不同基因型适宜的培养条件也有很大差别,说明影响矮牵牛花药培养胚状体发生的因素还很多,有待于进一步的研究。

**参考文献**

[1] 北京林业大学园林系花卉教研组. 花卉学[M]. 北京: 中国林业大学出版社, 1994: 209.

[2] 河南省花粉单倍体育种编写组. 植物单倍体育种[M]. 郑州: 河南人民出版社, 1978: 12 - 15.

[3] 施雪波. 矮牵牛育种[M]//程金水. 园林植物遗传育种学. 北京: 中国林业出版社, 2000: 234 - 239.

[4] ZHAO Y, XU N, MA Z Y, et al. Effect of Different Plant Growth Regulators on Callus Induction and in vitro Rapid Propagation of Wild *Petunia* Juss. [J]. Agricultural Science & Technology, 2012, 13(5): 931 - 934.

[5] 胡道芬. 植物花培育种进展[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996.

[6] BINDING H. Nuclear and cell divisions in isolated pollen of *Petunia hybrida* in agar suspension cultures[J]. Nature (New Biol), 1972, 237: 283 - 285.

[7] ENGVID K C. Triploid petunias from anther cultures[J]. Hereditas, 1973, 74: 144 - 147.

[8] MITCHELL A Z, HANSON M R, SKVIRSKY R C, et al. Anther culture of *Petunia*: genotypes with high frequency of callus, root of plantlet formation[J]. Z Pflanz Bodenkunde, 1980, 100: 131 - 146.

[9] RAQUIN C. Genetic control of embryo production and embryo quality in anther culture of *Petunia*[J]. Theor Appl Genet, 1982, 63: 151 - 154.

[10] 代色平, 包满珠. 矮牵牛花药培养及植株再生研究[J]. 亚热带植物科学, 2003, 32(2): 55 - 57.

[11] 庞海峰, 王平, 姜策. 矮牵牛花药培养的研究[J]. 北方园艺, 2007(5): 196 - 197.