

## 红花檵木花粉单倍体愈伤组织的诱导与培养

李炎林<sup>1,3</sup>, 于晓英<sup>1</sup>, 熊兴耀<sup>2,3\*</sup>, 陈己任<sup>1</sup>, 朱杰辉<sup>1</sup>

(1.湖南农业大学 园艺园林学院, 湖南 长沙 410128; 2.湖南省作物种质创新与资源利用重点实验室, 湖南 长沙 410128; 3.湖南省马铃薯工程技术研究中心, 湖南 长沙 410128)

**摘 要:**为通过红花檵木单倍体愈伤组织获得红花檵木全基因组序列,在红花檵木‘细叶玫红’减数分裂和小孢子发育进程研究的基础上,初步明确了与小孢子不同发育时期相对应的花蕾外部特征,筛选出‘细叶玫红’单核靠边期花粉进行花药愈伤组织培养。诱导培养基以 SNGM 为基本培养基,添加 2.5 mg/L NAA+0.5 mg/L 6-BA+30 g/L 蔗糖;花粉愈伤组织培养的最优培养基为 B<sub>5</sub> 培养基,添加物同诱导培养基;花药愈伤组织悬浮培养体系为 B<sub>5</sub> 液体培养基,添加物同诱导培养基,转速为 110 r/min,培养温度为 25 ℃。经流式细胞仪检测,红花檵木花粉愈伤组织最大吸收峰值约为叶片愈伤组织的 50%;用染色体压片计数法观察到叶片愈伤组织细胞染色体数为 24 条,花粉愈伤组织为 12 条,单倍体细胞占 63.1%,表明红花檵木‘细叶玫红’花粉经诱导培养出的愈伤组织为单倍体愈伤组织。

**关 键 词:**红花檵木;花药;愈伤组织;单倍体

中图分类号: S722.3 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2011)06-0632-05

## Induction and cultivation of haploid callus of *Loropetalum chinense* var. *rubrum*

LI Yan-lin<sup>1</sup>, YU Xiao-ying<sup>1</sup>, XIONG Xing-yao<sup>2,3\*</sup>, CHEN Ji-ren<sup>1</sup>, ZHU Jie-hui<sup>1</sup>

(1. College of Horticulture and Landscape, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. Key Laboratory Germplasm Innovation and Utilization of Crop, Hunan Province, Changsha 410128, China; 3. Hunan Provincial Engineering Research Center for Potatoes, Changsha 410128, China)

**Abstract:** For obtaining the complete genome sequence of *Loropetalum chinense* var. *rubrum*, haploid callus was induced and cultivated based on previous data of meiosis and microspore development of *Loropetalum chinense* var. *rubrum* ‘xiyemeihong’. The outer characteristics of the flower bud corresponding to specific development stages were primarily determined and monocaryotic phase of ‘xiyemeihong’ was selected for induction of haploid callus. SNGM medium supplemented with 2.5 mg/L NAA, 0.5 mg/L 6-Benzyladenine and sucrose concentration 30 g/L turned out to be the optimum callus-induction medium. And B<sub>5</sub> medium with supplements the same to the induction medium was the optimum medium for semi-solid-state cultivation of pollen callus and for liquid cultivation of anther callus under the rotation speed of 110 r/min and the temperature of 25 ℃. Flow cytometry showed that the absorption peak of the pollen callus was about half of that of the leave callus (the control). Chromosome counting indicated haploids of pollen callus possessed 12 chromosomes while diploids 24 and haploids were detected in 63.1% of pollen callus cells.

**Key words:** *Loropetalum chinense* var. *rubrum*; pollen; callus; haploid

收稿日期: 2011-10-14

基金项目: 国家自然科学基金(31071826); 湖南省自然科学基金面上项目(04JJ3024); 湖南省高等学校产业化培育项目(07CY001)

作者简介: 李炎林(1984—), 男, 湖南常德人, 研究实习员, 主要从事生物技术与作物遗传改良研究, ly1843@163.com; \*通信作者, xiongxingyao@126.com

红花檵木(*Loropetalum chinense* var. *rubrum*)系金缕梅科(Hamamelidaceae)檵木属常绿灌木或小乔木<sup>[1-2]</sup>,是檵木的芽变<sup>[3]</sup>。目前,红花檵木新品种主要是从扦插苗自然变异后代中定向选择而获得<sup>[4-5]</sup>。这种通过自发突变或者人工诱导突变选育新品种的方式具有偶然性,需要花费大量的人力和物力,而通过花粉培养获取单倍体材料可在较短时间内获得新的育种材料,大大加速育种进程。

单倍体材料具有较高的利用价值,如控制杂种后代分离、提高选择效率、简化遗传分析和作为转基因材料等,已有不少关于单倍体材料的研究<sup>[6-15]</sup>的报道,但尚未见有关红花檵木花药培养的报道。供体材料的基因型、生长条件、花期和小孢子发育时期、逆境处理及培养基组成等是影响花药培养的重要因素<sup>[16]</sup>。笔者对红花檵木花粉单倍体愈伤组织的诱导与培养进行研究,旨在为红花檵木的育种、遗传转化等提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

红花檵木‘细叶玫红’为湖南农业大学园艺园林观赏植物教学基地红花檵木资源圃的3年生植株。

基本培养基为添加 6 g/L 琼脂糖和 30 g/L 蔗糖的 MS、SNGM 和 B5 培养基, pH 为 5.8。

主要仪器为 Motic Images Advanced 3.2 数码成像显微镜 BA400(自带 moticam2306 相机)和流式细胞仪(Partec PA)。

### 1.2 小孢子发育的观察

于 2009 年 9 月至 2010 年 3 月进行花药愈伤组织诱导试验。取 3 个不同生长发育时期的红花檵木花蕾,压片观察不同发育时期小孢子的发育情况。

压片时用蒸馏水清洗花蕾,用 1.5%的醋酸洋红染色直接压片法,在显微镜下观察,并拍照记录。

### 1.3 花药愈伤组织的诱导

1) 花蕾材料预处理。用黑色塑料袋包好花蕾,置于 4 ℃冰箱中冷藏 3 d。

2) 花蕾消毒和剥取花药。在蒸馏水中加几滴清洁剂清洗花蕾,再用蒸馏水清洗花蕾 4 遍;在超净工作台上用体积分数 70 % 的乙醇表面消毒 30 s,再用质量分数 0.1 % 的 HgCl 消毒 10 min,并添加 5 滴

T-80,然后用无菌水冲洗材料 4 遍,每遍冲 1、3、6、9 min。在垫有无菌纸的 Motic SMZ-168 体式显微镜下将花药剥出,注意避免损伤、损坏花药,并把花丝去除干净。

3) 花药接种和花药培养。把剥出的花药接种于盛有 25 mL 固体培养基的塑料无菌一次性培养皿中,每皿接种 20 粒花药。以 MS、SNGM 为基本培养基,分别附加不同浓度(0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mg/L)的 NAA 和 0.5 mg/L 6-BA,在 33 ℃条件下热激处理 3 d。继代培养的所有处理均以 MS 为基本培养基,植物生长调节剂组合不变,继代培养材料在温度 25 ℃,光照度 3 000 lx 的条件下,每天 12 h 光照和 12 h 黑暗培养 10 d,再将材料转移到温度 25 ℃的黑暗条件下培养。

### 1.4 花药愈伤组织培养

花药愈伤组织培养分为半固体培养和悬浮培养。

1) 半固体培养。在上述试验基础上,以 MS 和 B<sub>5</sub> 培养基为基本培养基,添加 0.5 mg/L 6-BA+2.5 mg/L NAA,在温度 25 ℃条件下黑暗培养。

2) 悬浮培养。以 B<sub>5</sub> 培养基为基本培养基,添加 0.5 mg/L 6-BA+2.5 mg/L NAA,在 25 ℃黑暗条件下培养,转速为 110 r/min。

### 1.5 花药愈伤组织倍性检测

1) 流式细胞仪检测。红花檵木花粉愈伤组织的染色体组倍性检测参照文献[17-18]的方法。

2) 染色体压片检测。取悬浮培养 3 d 的花药愈伤组织和半固体培养 7 d 的叶片愈伤组织,参照改良苯酚品红染色压片法,在显微镜下观察二者的染色体,拍照,计数。

### 1.6 数据统计与分析

用 Excel 2003 进行数据统计。

## 2 结果与分析

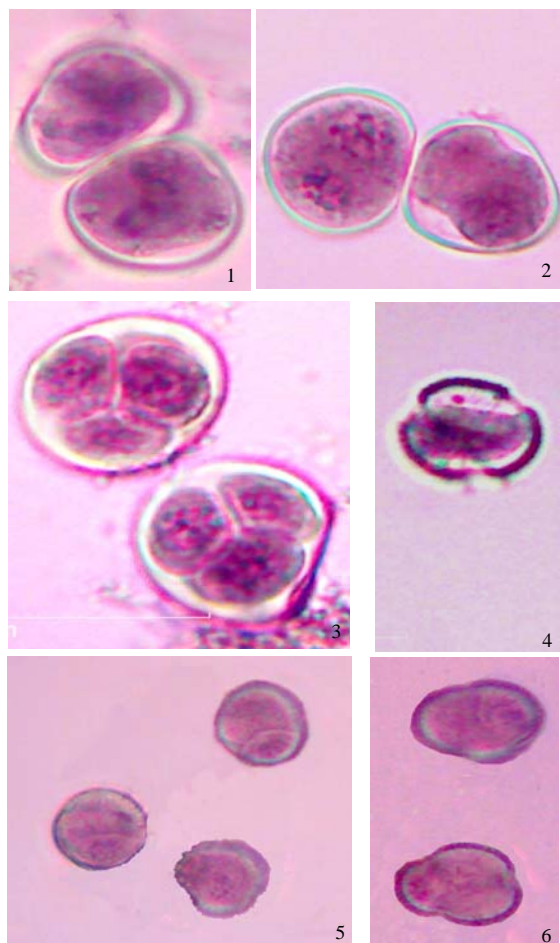
### 2.1 红花檵木花蕾和小孢子发育的外部特征

因红花檵木花药、花瓣和萼片全部为红色,故无法确定花药的颜色及其细微的变化。经观察,红花檵木花蕾和小孢子发育的外部特征表现为:当红花檵木花蕾的小花肉眼可区分时,其小孢子处于小孢子母细胞时期;当花蕾上的小花膨大、花萼开始生长,花冠头部开始变白时,其花粉处于二分体至

四分体时期；当花萼有裂开的迹象，花冠头部变白区域增大时，其花粉处于单核靠边期；当花萼张开、花瓣开始展开时，其花粉发育至二核期或形成成熟的花粉粒。

## 2.2 不同发育时期红花檵木花蕾小孢子的发育

红花檵木小孢子发育进程如图 1 所示。红花檵木每朵花由 5~10 朵小花聚生在同一个花柄上，每朵小花中有 4~6 个花药贴生在小花柄上。在红花檵木小孢子发生和花粉的发育过程中，同一花粉中不同的花药基本处于同一发育时期(图 1-1、2、3、5、6)；红花檵木减数分裂过程中胞质分裂为连续型，即减数分裂后形成细胞壁，接着进入第 2 次分裂(图 1-1、2、4)；其连续分裂后形成的四分体不在同一平面上，呈三角锥型(图 1-3)。



1 末期 I；2 后期 II；3 四分体形成期；4 单核中期(单核靠边期)；5 二核期；6 成熟花粉粒。

图 1 红花檵木花粉减数分裂的细胞学观察(10×40)

Fig.1 Cytological observation of anther meiosis of *Loropetalum chinense* var. *rubrum* (10×40)

## 2.3 花粉愈伤组织的诱导率

表 1 结果显示，起始培养基为 SNGM 的诱导效果要好于 MS 培养基。红花檵木花粉愈伤组织的诱导率与 NAA 浓度有关，其中，以 SNGM 为基本培养基，添加 2.5 mg/L NAA+0.5 mg/L 6-BA 的诱导率最高，为 31.75%。

表 1 培养基类型和生长调节剂浓度对单倍体愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effects of concentration of growth regulators and basic media on haploid callus induction

基本培养基	质量浓度/(mg·L <sup>-1</sup> )		接种花药数/粒	愈伤数/个	诱导率/%
	6-BA	NAA			
MS	0.5	0.0	80	0	0.00
	0.5	0.5	80	1	1.25
	0.5	1.0	80	1	1.25
	0.5	1.5	80	7	8.75
	0.5	2.0	80	10	12.50
	0.5	2.5	80	15	18.75
	0.5	3.0	80	9	11.25
SNGM	0.5	0.0	80	1	1.25
	0.5	0.5	80	7	8.75
	0.5	1.0	80	10	12.5
	0.5	1.5	80	15	18.75
	0.5	2.0	80	21	26.25
	0.5	2.5	80	25	31.75
	0.5	3.0	80	14	17.50

## 2.4 花药愈伤组织的培养

诱导出的红花檵木花粉愈伤组织分别在 MS 和 B<sub>5</sub> 培养基上培养的结果(图 2-1~6，封三)显示：在 MS 培养基上培养 20 d 后，愈伤组织松散，呈水渍状(图 2-1，封三)，培养时间越长，衰老、褐化现象越明显(图 2-3，封三)；在 B<sub>5</sub> 培养基上培养的花粉愈伤组织呈白色的球状颗粒(图 2-2，封三)，在 B<sub>5</sub> 培养基上继代 5 次后的花粉愈伤组织呈白色的颗粒状(图 2-4、5，封三)；随继代培养时间的增加，其花色苷的含量增加，愈伤组织颜色加深(图 2-6，封三)。

红花檵木花粉愈伤组织的悬浮培养结果(图 2-7、8、9，封三)显示：经初始培养和第 1 次悬浮培养，可得到大量的悬浮培养细胞；得到的花粉愈伤组织细胞悬浮系可以进行大量增殖，其培养基为 B<sub>5</sub>+0.5 mg/L 6-BA+2.5 mg/L NAA+30 g/L 蔗糖。

## 2.5 花药愈伤组织的倍性

由图 3 可知,红花檵木叶片愈伤组织在 422.5 V 电压条件下的最大吸收峰值约为 98,而花粉愈伤组织的最大吸收峰值约为 57,这表明由花粉诱导愈伤组织的染色体数目约为由叶片诱导愈伤组织染色体数目的 50%,故初步判断红花檵木花粉愈伤组织

为单倍体愈伤组织。经染色体压片观察,红花檵木花粉愈伤组织细胞的染色体数目为 12 条,单倍体细胞占 63.1%,而其叶片愈伤组织细胞染色体数目为 24 条。结合细胞流式仪检测结果,可断定红花檵木‘细叶玫红’花粉经诱导培养出的愈伤组织为单倍体愈伤组织。

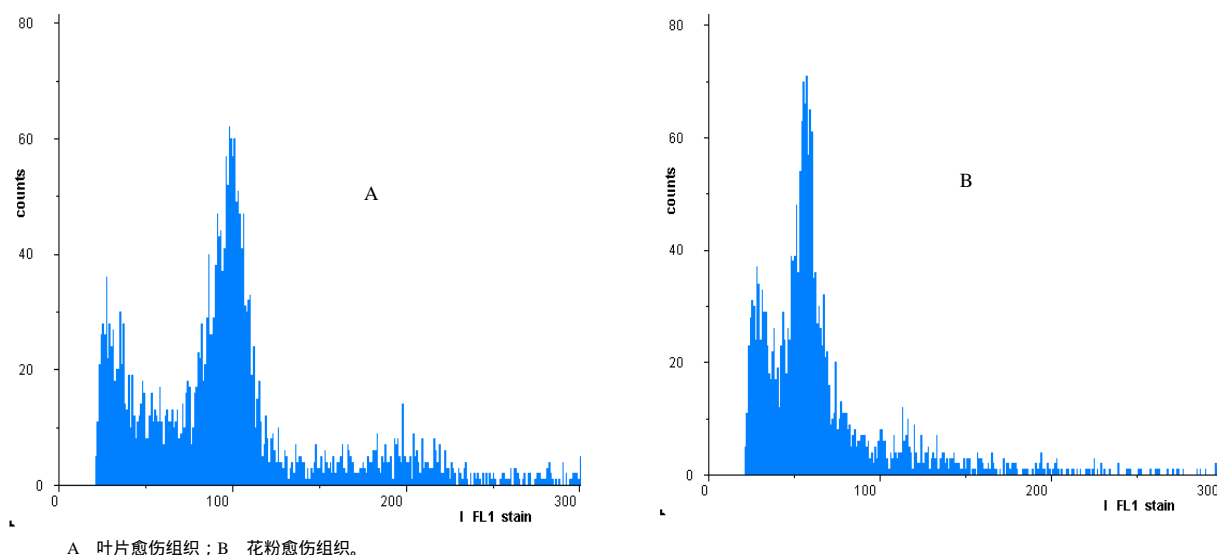


图 3 红花檵木叶片愈伤组织和花粉愈伤组织的倍性检测结果

Fig.3 Determination of chromosome ploidy in leaf and anther calluses of *Loropetalum chinense* var. *rubrum*

## 3 结论与讨论

本试验以红花檵木的花药为外植体,成功得到了由花药形成的愈伤组织,并由此建立了红花檵木花粉愈伤组织的悬浮系,这既为红花檵木新品种的选育提供了新的途径,也为开展红花檵木基因组学研究提供了丰富的材料。同时,在试验中观察到,经多代培养的红花檵木花粉愈伤组织的花色素苷含量显著增加,这可为红花檵木次生代谢产物的研究提供材料。本试验中没有得到由红花檵木愈伤组织分化的组培苗,这是否与需要较高的激素水平有关还有待研究。

在花药培养过程中,不同基因型之间的差异较大。在本试验的预备试验中对 4 个品种红花檵木花粉进行了培养,其中只有红花檵木‘细叶玫红’得到了花粉愈伤组织。这与辣椒花药培养的结果<sup>[17]</sup>一致。

小孢子发育时期是决定花药培养成功与否的重要因素。在本试验预备试验中,笔者对处于小孢

子时期、单核靠边期以及发育成熟期的红花檵木花粉粒分别进行了培养,发现只有单核靠边期的花粉粒出现了愈伤组织,这与文献[14]和文献[18]的结果一致。处于单核靠边期红花檵木花粉的外部特征表现为花萼有裂开的迹象,花冠顶部变白区域较二分裂至四分体时期增大。无法通过花粉粒的外部特征来判断小孢子发育的时期。

在花药培养时,不同培养基培养的花药存在一定的差异<sup>[19]</sup>。在培养基中添加一定浓度的植物生长调节剂对成功诱导部分高等植物花粉愈伤组织起关键作用<sup>[20]</sup>。本试验中,在其他条件相同的情况下,以 SNGM 为基本培养基的培养效果比以 MS 为基本培养基的效果好;在 SNGM 基本培养基中添加 2.5 mg/L NAA+0.5 mg/L 6-BA 可得到较高的愈伤组织诱导率。

除了选择合适的培养材料和培养基外,适当的逆境胁迫处理对花粉培养的成功起着重要的作用<sup>[6]</sup>。本试验结果表明,将红花檵木的花蕾在冰箱中 4℃

暗处理 3 d 后,再将剥离花蕾接种在培养基上 33 ℃ 热激处理 3 d,可以有效打破花粉的配子体发育模式,使其朝向体细胞增殖方向发育,产生愈伤组织。

#### 参考文献:

- [1] 祁承经,喻勋林.湖南种子植物总览[M].长沙:湖南科学技术出版社,2002:215.
- [2] 连芳青,肖德兴.红花檵木、长红檵木染色体核型的研究[J].江西农业大学学报,2001,23(2):228-230.
- [3] 唐前瑞.红檵木遗传多样性及其叶色变化的生理生化研究[D].长沙:湖南农业大学园艺园林学院,2001.
- [4] 侯伯鑫,童新旺,林峰,等.檵木品种资源的研究[J].中国野生植物资源,2002(6):15-17.
- [5] 李炎林.红花檵木花叶芽变的遗传和生物学特性研究[D].长沙:湖南农业大学园艺园林学院,2009.
- [6] 张菊平.辣椒花药小孢子培养及其胚状体发生机理研究[D].杨凌:西北农林科技大学园艺园林学院,2007.
- [7] Nitsch J P. Experimental androgenesis in *Nicotiana*[J]. *Phytomorphol*, 1969, 19: 389-404.
- [8] Nitsch J P. The production of haploid embryos from pollen grains [C]//Heslop-Harrison J. In *Pollen Development and Physiology Education*. London: Butterworth, 1971: 441-452.
- [9] Nitsch J P. Haploid plants from pollen[J]. *Z Pflanzenzuecht*, 1972, 67: 3-18.
- [10] Sunderland N. Anther culture: A progress report[J]. *Sci Progr*, 1971, 59: 527-549.
- [11] Hoffmann F, Thomas E, Wenzel G. Anther culture as a breeding tool in rape[J]. *Theor Appl Genet*, 1982, 61: 225-232.
- [12] Assani A, Bakry F, Kerbellec F, et al. Production of haploids anther culture of banana (*Musa balbisiana* (BB)) [J]. *Plant Cell Rep*, 2003, 21: 511-516.
- [13] Hofer M. *In vitro* androgenesis in apple-improvement of the induction phase[J]. *Plant Cell Rep*, 2004, 22: 365-370.
- [14] Chen Lin-jiao, Zhu Xue-yi, Li Gu, et al. Efficient callus induction and plant regeneration from anther of Chinese narcissus(*Narcissus tazetta* L. var. *chinesis* Roem)[J]. *Plant Cell Rep*, 2005, 24, 401-407.
- [15] 韩秀丽,田晓明,贾桂霞.新铁炮百合单倍体植株的诱导[J].园艺学报,2010,37(2):263-268.
- [16] Krystyna G, Dorota K, Ryszard G. The influence of several factors on the efficiency of androgenesis in carrot [J]. *J Appl Genet*, 2005, 46(3): 265-269.
- [17] 杨博智,周书栋,张竹青,等.不同培养基和激素对辣椒花药培养的影响[J].湖南农业大学学报:自然科学版,2009,35(1):61-64.
- [18] Dunwell J M, Sunderland N. Anther culture of *Solanum tuberosum*[J]. *Euphytica*, 1973, 22: 317-323.
- [19] 赵激,邹学校,张竹青,等.不同培养基对辣椒花药培养的影响[J].湖南农业大学学报:自然科学版,2010,36(2):181-185.
- [20] 刘选明,官春云,李桐,等.油菜花药离体培养[J].湖南农业大学学报:自然科学版,2000,26(3):185-189.

责任编辑:王赛群