

姜花属种间杂交胚拯救研究

熊友华^{1,2}, 庄雪影², 刘念^{1*}

(1. 仲恺农业工程学院 园艺园林学院, 广州 510225; 2. 华南农业大学 林学院, 广州 510642)

摘要: 为提高姜花属种间杂交胚挽救中幼胚萌发率, 以白姜花×金姜花的胚珠为试材, 研究不同胚珠发育时期、不同培养基及低温处理果实对幼胚萌发率的影响。结果表明, 白姜花×金姜花胚挽救的适宜培养基是 MS+0.1 mg/L BA+0.1 mg/L NAA; 接种时期以 60 d 的幼胚培养效果最佳; 低温处理果实 3~6 d 能有效提高幼胚的萌发率。

关键词: 姜花属; 种间杂交; 胚拯救

中图分类号: Q943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2011)04-0541-04

Study on embryo rescue of interspecific hybrids between *Hedychium*XIONG You-Hua^{1,2}, ZHUANG Xue-Ying², LIU Nian^{1*}

(1. College of Horticulture and Landscape Architecture, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China; 2. College of Forestry, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The object of this study was to improve the germination capacity of embryos of *Hedychium* hybrids through embryo rescue *in vitro*. Hybrid ovules of *H. coronarium* × *H. gardnerianum* were used to investigate the effect of different growth stage of embryo, different culture medium and low-temperature treatment on the germination capacity of embryos. The results indicated that MS medium supplemented with 0.1 mg/L BA and 0.1 mg/L NAA showed suitable for embryo rescue *in vitro* culture. It was showed that the optimum germination capacity of embryos reached 40.6%, which was obtained by taking 60 day old immature embryo as explant. Low-temperature treatment of fruits for 3-6 d, had a positive effect on improvement of the germination capacity of embryos.

Key words: *Hedychium*; interspecific hybridization; embryo rescue

姜花属(*Hedychium*)隶属于姜科(Zingiberaceae), 全世界分布约 50 种, 主产亚洲热带和亚热带地区, 我国有 29 种 2 个变种, 特有种 18 个(Wu & Larsen, 2000)。该属植物大多香气袭人、花形奇特, 在国外是广受欢迎的香花植物(吴德邻等, 1988; 曾宋君等, 2003); 在我国广东、香港等地, 白姜花是市场流行的香型鲜切花, 黄姜花在西双版纳地区是极受傣族少女喜爱的头饰花卉。欧美等发达国家早在 18 世纪便开始了本属植物的引种及育种工作, 全世界已培育出近百个姜花属花卉新品种, 在我国, 姜花

属植物一般都采用无性繁殖栽培, 很难培育出新品种, 而人工有性杂交是定向培育姜花属观赏新品种的有效途径和方法, 可获得比系统选育得到更为理想的新型栽培品种。我国蕴藏有丰富的优良基因资源, 其中具有许多优良性状, 如花形奇特、花色艳丽、芳香、抗寒、高产及瓶插期长等, 将其导入栽培种进行姜花属种质创新和品种改良在姜花育种中极其重要。在远缘杂交过程中, 由于杂种胚与胚乳的发育不协调, 往往导致杂交后代种胚部分或全部坏死或中途停止发育, 阻碍育种进程。为提高远缘杂成交

收稿日期: 2010-12-29 修回日期: 2010-04-19

基金项目: 广东省科技计划项目(2010B020305013)[Supported by Science and Technology Plan Project of Guangdong Province(2010B020305013)]

作者简介: 熊友华(1979-), 男, 江西南昌人, 博士, 讲师, 从事园林植物组培与育种方面研究, (E-mail)youhuachina@126.com。

* 通讯作者: 刘念, 教授, 博导, (E-mail)liunian678@126.com。

功率,在受精后杂种胚停止发育前通过未成熟胚离体培养获得杂种植株的胚拯救技术已广泛应用于植物远缘杂交。

近年来,国内外学者对姜花属野生花卉资源的调查、引种、分子标记和切花保鲜等方面研究较多(高丽霞,2008),但尚无姜花属杂交胚拯救的研究报道。本研究在姜花属种间杂交的基础上,选用亲和性较强的组合进行离体幼胚培养,通过对胚发育时期、培养基及低温处理对白姜花×金姜花杂种胚拯救培养的影响进行研究,旨在建立有效的杂种胚拯救体系,为提高姜花属种间远缘杂交成功率提供有效技术,同时为姜花属种间杂交育种提供新的种质资源。

1 材料与方 法

1.1 材料

于姜花属植物进入盛花期时,挑选生长健壮、无病虫害、花器官发育正常并具有本物种典型特征的白姜花和金姜花植株作为杂交亲本材料。

1.2 试验方法

1.2.1 有性杂交试验 选择花蕾已长大、次日可开

放的花朵进行去雄,并在父本区采摘当天开放的花朵,取出花药,用医用棉签沾父本的花粉轻轻涂抹在母本柱头上,然后套袋并挂牌标记。

1.2.2 胚发育时期对胚拯救的影响 在授粉后 30、40、50 d 和 60 d,分别采 *H. coronarium*×*H. gardnerianum* 的未成熟蒴果,消毒后取出种子胚接种到 MS+0.2 mg/L BA+0.2 mg/L NAA 培养基,先进行暗培养,温度(25±1)℃;待萌发后转移至光照(光强 36 μmol·m⁻²·s⁻¹,光照时间 12 h/d)培养。观察胚萌发的情况,并统计萌发率。

1.2.3 培养基的筛选试验 根据发育时期试验结果,取授粉后 60 d 的 *H. coronarium*×*H. gardnerianum* 的种子胚进行胚拯救。培养基配方筛选:以 MS、B5 为基本培养基,附加不同浓度的 BA 和 NAA 等,并加入蔗糖 3%、琼脂 0.7%,pH 值调节至 5.8。

1.2.4 低温处理后幼胚离体培养试验 根据发育时期试验和培养基配方筛选结果,取授粉后 60 d *H. coronarium*×*H. gardnerianum* 的蒴果,于 4℃ 冰箱进行低温处理 0、3、6 和 9 d。处理结束后,进行种子表面消毒,再将种子胚接种到 MS+0.1 mg/L BA+0.1 mg/L NAA 培养基中。

表 1 不同发育时期的杂种幼胚萌发率比较

Table 1 Germination capacity of immature embryos for different growth durations *in vitro*

取样时期(授粉后天数) Collecting time (d)	胚珠数 No. of ovules	胚萌发数 No. of embryos germinated	胚萌发率(%) Germination capacity of embryos	胚萌发情况 Germination situation of embryos
30	48	0	0	未见萌发,培养物慢慢死亡
40	62	4	6.4	很少萌发,形成愈伤组织
50	57	13	22.8	萌发较低,褐化较严重
60	64	26	40.6	萌发好,局部稍褐化

1.2.5 试验数据分析 试验数据按单因素试验设计相同重复数进行方差分析,采用 DPS(Data Process System)软件进行 Duncan 新复极差法检验。

2 结果与分析

2.1 胚发育时期对幼胚萌发的影响

取 *H. coronarium*×*H. gardnerianum* 不同发育时期的未成熟种子进行胚拯救。结果(表 1)表明,杂交幼胚在授粉后 30 d 时离体培养未见萌发,培养物慢慢死亡,此后随着胚龄增长萌发率逐步增加,至授粉后 60 d 达最高值,萌发率为 40.6%,可见 *H. coronarium*×*H. gardnerianum* 的幼胚离体培

养时间以授粉后 60 d 为宜。授粉后 40 d 以内胚龄较短的幼胚,胚较小且幼嫩,取胚操作困难,容易造成伤口,形成愈伤组织,而且萌发率低,仅为 6.4%;授粉后 50~60 d 的幼胚较大,取胚操作方便,萌发率较高且培养时生长状态较好。

2.2 不同培养基对幼胚萌发的影响

取授粉后 60 d 的杂种幼胚在不同培养基中进行离体培养,结果(表 2)可以看出,不同培养基对幼胚离体培养成苗影响较大。接种于 MS 培养基上比 B5 培养基上的幼胚萌发率高,在 MS+0.1 mg/L BA+0.1 mg/L NAA 培养基上萌发率最高,达 57.6%,在 B5+0.1 mg/L BA+0.1 mg/L NAA 培养基上萌发率最低,仅 38.2%,可以认为 MS+0.1

表 2 不同培养基中杂种幼胚离体培养的萌发率

Table 2 Germination capacity of immature embryos cultured in different culture media *in vitro*

培养基 Medium	胚珠数 No. of ovules	胚萌发数 No. of germinated embryos	胚萌发率(%) Germination capacity of embryos
MS+0.2 mg/L BA+0.2 mg/L NAA	64	26	40.6B
B5+0.2 mg/L BA+0.2 mg/L NAA	53	21	39.6B
MS+0.1 mg/L BA+0.1 mg/L NAA	59	34	57.6A
B5+0.1 mg/L BA+0.1 mg/L NAA	47	18	38.2B

mg/L BA+0.1 mg/L NAA 是杂种幼胚培养较为理想的培养基。

2.3 低温处理果实对胚挽救的影响

低温处理果实的试验(表 3)表明,低温处理果实对胚的发育有一定促进作用,并呈现一定的规律性。在低温处理 *H. coronarium* × *H. gardnerianum* 果实 3 d 时,胚萌发率最高,达 62.8%,胚萌发率随处理时间的增长,先增加后降低,低温处理 9 d 时,胚萌发率降为 52.1%。可见,低温处理果实 3~6 d 可以打破 *H. coronarium* × *H. gardnerianum* 幼胚休眠,促进胚的萌发。

表 3 低温处理果实对杂种胚挽救的影响

Table 3 Effect of the fruits treated at low temperature on the embryo rescue

低温处理时间(d) Low temperature treatment time	胚珠数 No. of ovules	胚萌发数 No. of embryos germinated	胚萌发率(%) Germination capacity of embryoes
0	59	34	57.6B
3	43	27	62.8A
6	34	21	61.7A
9	23	12	52.1B

3 讨论

人工有性杂交是定向培育新品种的有效途径和方法,可获得比系统选育得到更为理想的新型栽培品种。但由于远缘杂交亲本之间的不亲和性等诸多因素,导致杂种胚过早败育。胚拯救技术是在胚败育前将未成熟胚在离体条件下进行培养,以维护幼胚的“胚性生长”,获得远缘杂种。Burger 等(1990)先后利用胚挽救方法在月季、梨(曾艳玲等,2005)、柑桔(洪柳等,2005)、葡萄(潘俨等,2006)、梅(沈庆斌等,2005)、樱桃(李文生等,2005)等园艺植物育种上成功应用,获得杂交后代。本试验通过胚拯救技术克服了姜花属种间杂交不亲和,获得较高的幼胚萌发率,缩短了育种周期。

胚龄对胚离体培养效果有较大影响,种胚的适时剥离是成功获得杂种胚胎苗的关键因素之一。雷家军等(2009)报道,卷丹百合种间杂种胚以授粉后 40~50 d 的杂种胚最适于胚培养,卫尊征等(2008)通过对白杨派的毛新杨和青杨派的不同种源小叶杨的杂交子代的幼胚培养研究,发现随着授粉天数的增加,幼胚培养成功率逐渐增加;苹果和梨属间杂交幼胚挽救培养时期为授粉后 60 d 左右(孙亮等,2008)。本研究以 *H. coronarium* × *H. gardnerianum* 的幼胚为试验材料,分别采收了授粉后 30、40、50、60 d 四种胚龄的幼胚进行培养。结果表明,*H. coronarium* × *H. gardnerianum* 幼胚的萌发率受发育时期的影响,幼胚成熟度越高,操作越容易,萌发率也越高。可将授粉后 60 d 作为 *H. coronarium* × *H. gardnerianum* 胚拯救的最适宜时期。

Raghavan(1980)报道,早期胚处于异养阶段。早期胚的内部分化还未达到具备萌发能力的水平,胚的大小在异养时期要比在自养时期小,并且需要生长调节因子以保证其正常发育(Raghavan & Srivastava,1982)。不同培养基作为胚挽救成功的重要外界条件,创造幼胚发育的良好外在条件可以提高胚的发育率,不同植物种类幼胚培养所需的培养基有所不同,柑桔、猕猴桃的胚拯救以 MS、MT 较为理想(伊华林,1998),Tukey 培养基适于杏的未成熟胚培养(庄恩及等,1991),WPM 培养基为李属种间杂种胚培养的适宜培养基(尚霄丽等,2009)。在本试验中,发现对 *H. coronarium* × *H. gardnerianum* 杂交后的胚培养以 MS 培养基效果较好,且激素低浓度较好。

Serge(1994)认为低温处理可促进幼胚的萌发,提高幼胚的生长速度、萌发时间和萌发率;宋维秀等(2008)研究发现,低温(5℃)沙藏 3 周的柴松种胚更适宜诱导萌芽。本试验对幼胚经 4℃低温处理 3~9 d 与不经处理直接接种的培养效果进行了比较,结果表明,低温处理 3~6 d 可提高幼胚萌发率。

参考文献:

- 吴德邻,陈忠毅. 1988. 极有开发前途的野生姜科花卉资源[J]. 植物杂志, 2(24)
- 曾宋君,段俊,刘念. 2003. 姜目花卉[M]. 北京:中国林业出版社
- Burger DW, Liu LL, et al. 1990. Organogenesis and plant regeneration from immature embryos of *Rosa hybrida* [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 21(2):147-152
- Gao LX(高丽霞), Liu N(刘念), Huang BH(黄邦海), et al. 2008. Optimization and formation SRAP system in *Hedychium* (姜花属 SRAP-PCR 体系的优化与建立)[J]. *Guihaia*(广西植物), 28(5):604-607
- Hong L(洪柳), ; Liu YZ(刘永忠), Deng XX(邓秀新). 2005. Obtaining of ponkan (*Citrus reticulata*) tetraploid by culturing embryos of mature seeds(柑成熟种子胚培养获得四倍体植株)[J]. *Acta Hort Sin*(园艺学报), 32(4):688-690
- Lei JJ(雷家军), Pang L(庞兰), Lin YF(林翼飞), et al. 2009. Embryo culture of interspecific hybrids from *Lilium lancifolium* (卷丹百合种间杂种胚培养研究)[J]. *J Shenyang Agric Univ* (沈阳农业大学学报), 40(1):84-87
- Li WS(李文生), Niu AG(牛爱国), Yan GH(闫国华), et al. 2005. Immature embryo culture for interspecific hybrids of cherry(樱桃种间杂交种的幼胚培养)[J]. *Plant Physiol Comm*(植物生理学通讯), 41(2):196
- Pan Y(潘俨), Liao K(廖康). 2006. Effect of different embryo-collecting time on hybrid grape embryos culture(不同取胚时期对葡萄杂交胚培养的影响)[J]. *Xinjiang Agric Sci*(新疆农业科学), 43(6):459-462
- Raghavan V, Srivastava PS. 1982. Embryo culture[C]//Johri BM (ed). *Experimental Embryology of Vascular plants*. Springer Verlag, Berlin:195-230
- Raghavan V. 1980. Embryo Culture[M]. *Internet Rev Cytol L B*:209-240
- Serge G. 1994. Embryo rescue in *Rosa hybrida* [J]. *Euphytica*, 72:205-212
- Shang XL(尚霄丽), Zhu GR(朱更瑞), Li J(李靖), et al. 2009. Study on the interspecific hybridization compatibility between *Prunus* crops and embryo culture of their hybrids(李属种间杂交亲和性及胚培养研究)[J]. *J Fruit Sci*(果树学报), 26(6):826-829
- Shen QB(沈庆斌), Lai ZX(赖钟雄), Cai HQ(蔡汉权), et al. 2005. *In vitro* culture of immature embryos and plant regeneration via somatic embryogenesis in loquat(枇杷幼胚培养与体胚诱导植株再生)[J]. *Acta Agric Univ Jiangxi*(江西农业大学学报), 27(3):379-384
- Song WX(宋维秀), Song XD(宋西德), Zhou FL(周锋利), et al. 2008. A preliminary study on inducing buds of *Pinus tabulaeformis* f. *shekannesis*(柴松胚培养诱导芽形成的初步研究)[J]. *J Northwest Fore Univ*(西北林学院学报), 23(3):114-116
- Sun L(孙亮), Leng P(冷平). 2008. Apple-pear hybrid and *in vitro* rescue culture of zygotic embryo(苹果和梨属间杂交及其幼胚挽救研究)[J]. *J China Agric Univ*(中国农业大学学报), 13(2):25-29
- Wei ZZ(卫尊征), Zhang JF(张金凤), Zhang DQ(张德强), et al. 2008. Immature ovule culture of inter sectional hybrids between (*Populus tomentosa* P. *bolleana*) and *P. simonii* and molecular identification of the hybrid filial generation(白、青杨派间杂交幼胚培养及杂种子代的分子鉴定)[J]. *J Beijing Fore Univ*(北京林业大学学报), 30(5):73-77
- Wu TL, Larsen K. 2000. Zingiberaceae[M]//Wu ZY, Raven PH (eds). *Flora of China*. Beijing: Science Press; St. Louis, Missouri Botanical Garden Press, 24:370-377
- Yi HL(伊华林), Deng XX(邓秀新). 1998. A study of culture of citrus triploid plantlets(培养三倍体柑桔植株的研究)[J]. *J Frit Sci*(果树科学), 15(3):212-216
- Zeng YL(曾艳玲), Tan XF(谭晓凤), Wu YTN(乌云塔娜), et al. 2005. Reseach on shoot regeneration from the immature embryos of different crossbred and selfed pear combinations(梨不同杂交和自交组合幼胚组织培养的研究)[J]. *J Central South Fore Univ*(中南林学院学报), 25(1):29-32
- Zhuang EJ(庄恩及), Yao Q(姚强), Wu YL(吴钰良), et al. 1991. Studies on in-ovulo embryo culture techniques of early-maturing and very early-maturing peaches(早熟和特早熟桃胚珠培养研究)[J]. *Acta Hort Sin*(园艺学报), 18(4):303-308

(上接第 478 页 Continue from page 478)

- 生态效应研究进展)[J]. *Guangxi Fore Sci*(广西林业科学), 35(4):179-201
- Zhang JE(章家恩), Huang ZX(黄兆祥), Tang GL(唐国玲). 2005. Investigation of the composition of soil animal communities under forest vegetations in Guangzhou(广州市几种林型土壤动物群落调查研究)[J]. *J South China Agric Univ*(华南农业大学学报), 26(3):47-51
- Zhang XQ(张小全), Xu DY(徐德应), Zhao MS(赵茂盛). 1999.

- Review on forest canopy structure, radiation transfer and canopy photosynthesis(林冠结构、辐射传输与冠层光合作用研究综述)[J]. *Fore Res*(林业科学研究), 12(4):411-421
- Zhao P(赵平), Zeng XP(曾小平), Cai XA(蔡锡安), et al. 2002. Report on measurement of leaf area index of low subtropical forests by using digital plant canopy imager(利用数字植物冠层图像分析仪测定南亚热带森林叶面积指数的初步报道)[J]. *Guihaia*(广西植物), 22(6):485-489