

# 怀地黄花药愈伤组织诱导研究

周春娥<sup>1</sup>, 朱凤荣<sup>2</sup>, 蔡兆奎<sup>1</sup>, 王灵灵<sup>1</sup>, 谷燕燕<sup>1</sup>

(1. 河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453007; 2. 新乡学院, 河南 新乡 453001)

**摘要:** 以怀地黄花药为材料, 研究了激素、温度、品种及光照对怀地黄愈伤组织诱导的影响。结果表明: 2, 4-D、6-BA、KT 和品种对怀地黄愈伤组织诱导均有一定影响, 各因素的组合以 2, 4-D 2.0mg/L+ 6-BA 0.5mg/L+ KT 2.0mg/L+ 串地龙为最佳, 诱导率达到 47%; 4℃低温预处理 3 d, 诱导效果最佳, 诱导率达到 43%; 黑暗条件下更有利于愈伤组织的诱导, 并可以减少后期生长中的褐化现象。

**关键词:** 怀地黄; 花药; 愈伤组织; 诱导因素

中图分类号: S567.9      文献标识码: A      文章编号: 1004-3268(2011)08-0169-03

## Study of Influential Factors on Anther Callus Induction of *Rehmannia glutinosa* Libosch

ZHOU Chun-e<sup>1</sup>, ZHU Feng-rong<sup>2</sup>, CAI Zhao-kui<sup>1</sup>, WANG Ling-ling<sup>1</sup>, GU Yan-yan<sup>1</sup>

(1. College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxian 453007, China;

2. Xinxian University, Xinxian 453001, China)

**Abstract:** Using the anther of *Rehmannia glutinosa* Libosch as materials, several factors, including different hormone treatments, temperature, cultivars, and light on anther callus induction of *Rehmannia glutinosa* Libosch were studied. The result showed that 2, 4-D, 6-BA, KT, and cultivars had important effects on anther induction. 2, 4-D 2.0mg/L+ 6-BA 0.5mg/L+ KT 2.0mg/L+ Chuandilong was the best combination for callus induction. The pre-treatment at 4℃ for 3 days were the most conducive to callus induction with induction rate of 43%; It was more favorable to callus induction in darkness than in light, which reduced callus browning during the later growth.

**Key words:** *Rehmannia glutinosa* Libosch; Anther culture; Callus; Induction factors

怀地黄(*Rehmannia glutinosa* Libosch)为玄参科地黄属多年生草本药用植物, 为著名的四大怀药之一。其块根入药, 具有滋阴养血, 清热凉血, 补肾生津止渴等功效<sup>[1-3]</sup>, 具有重要的药用价值和经济价值。因此, 获得优质怀地黄品种是非常重要的。

怀地黄在常规育种中费时费力, 再加上病虫害非常严重, 往往是育出一个新品种还未来得及推广就因为病虫害危害而发生退化。因此, 开展怀地黄花药培养和单倍体育种技术的研究, 是获得怀地黄

优良种质资源和新品种培育的一条新的有效途径。单倍体诱导技术作为现代高效育种技术的重要组成部分, 单倍体加倍后可以直接得到纯合体, 从而使育种年限较常规方法缩短 3~4 a, 此外, 由花药培养所获得的二倍体植株可以大大降低怀地黄病毒量。作为单倍体本身并没有或很少有育种价值, 但一旦将单倍体育种技术与常规育种相结合, 就会显示出巨大的优势, 使药物育种发生革命性的变化<sup>[4]</sup>。1964 年, 印度的 Guba 等<sup>[5]</sup>首次从毛曼陀罗(*Datura in-*

收稿日期: 2011-02-10

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863)项目子课题(2006AA100109)资助; 河南省教育厅自然科学研究计划项目(2009B180016)资助; 河南省教育厅自然科学研究计划项目(2011B180035)资助; 河南省高校道地中药材保育及利用工程技术研究中心资助; 河南师范大学校青年科学基金资助

作者简介: 周春娥(1977-), 女, 山西寿阳人, 讲师, 硕士, 主要从事植物分子与细胞育种研究。E-mail: 041106@htu.cn

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

oxia Mill) 花药培养中得到单倍体植株以来,花药培养技术一直受到遗传工作者的广泛关注。据不完全统计,已有 23 科 52 属约 300 种植物的花药培养获得了成功。其中有大麦、玉米、大豆、梨、橡胶、桃、苹果、荔枝等<sup>[6-17]</sup>。但在实际应用中存在诱导率低,产胚率低等问题,因此,寻求花药培养的最佳培养条件,进一步提高花药培养的效率是目前花培药养的一个主要研究内容。

本研究以怀地黄为材料,研究激素、温度、光照及品种对怀地黄花药培养的影响,以期得到怀地黄培养的最佳诱导条件,提高花药培养的诱导率,为怀地黄单倍体育种技术奠定基础,并能与常规育种相结合,提高育种效率。

1 材料和方法

1.1 材料

怀地黄材料由河南师范大学生命科学学院作物与微生物遗传实验室提供,现种植于河南师范大学生命科学学院试验田内。在 4 月份怀地黄的盛花期采集不同发育时期的花蕾。

1.2 方法

在怀地黄盛花期采集不同大小的花蕾,分别放入 4℃冰箱预处理不同时间,把不同发育时期的花蕾用 75% 的酒精浸泡 30 s,再用 0.1% 升汞消毒 4 min,用无菌蒸馏水冲洗 5 次,然后在无菌条件下剥出花药,除尽花丝,平放接在不同处理的培养基上,每瓶接种 20 个花药,每个处理接种 4 瓶,然后放入人工气候箱培养。

1.2.1 激素组合及品种对怀地黄花药愈伤组织诱导率的影响 设计四因素三水平正交试验研究不同激素配比及其质量浓度和品种对愈伤组织诱导率的影响(表 1)。将花蕾消毒后放入设计好的不同的培养基中,放入 26℃条件下培养,20 d 后观察结果。试验结果采用正交试验结果直观分析方法进行分析。

表 1 怀地黄花药愈伤组织诱导正交试验的因素与水平

因素	水平 1	水平 2	水平 3
2, 4-D	0.5 mg/L	1.0 mg/L	2.0 mg/L
6-BA	0.5 mg/L	1.0 mg/L	2.0 mg/L
KT	0.5 mg/L	1.0 mg/L	2.0 mg/L
品种	小黑英	串地龙	金皇后

1.2.2 不同低温预处理时间对怀地黄花药愈伤组织诱导的影响 将新采摘的花蕾放入 4℃冰箱预处理 0 d、1 d、3 d、5 d、7 d 后,分别接种于 MS+ 2, 4-D 2.0 mg/L+ 6-BA 0.5 mg/L+ KT 2.0 mg/L 培养基

中,每个处理重复 4 次,20 d 后观察记录出愈率。数据用最小显著差数法进行多重比较。

1.2.3 不同光照条件对怀地黄花药愈伤组织诱导率的影响 将接种在 MS+ 2, 4-D 2.0 mg/L+ 6-BA 0.5 mg/L+ KT 2.0 mg/L 的花药分别放置于黑暗条件和光照条件下培养,每个处理重复 4 次,20 d 后观察结果。数据用最小显著差数法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 不同激素配比和品种对怀地黄花药愈伤组织诱导率的影响

从表 2 可以看出,2, 4-D、6-BA、KT、品种对怀地黄花药愈伤组织的诱导都有一定的影响。处理组合 7 为最佳,即 2, 4-D 2.0 mg/L+ 6-BA 0.5 mg/L+ KT 2.0 mg/L+ 串地龙。愈伤组织诱导率为 47%。

表 2 怀地黄花药愈伤组织诱导率正交试验结果

处理组合数	2, 4-D/ (mg/L)	6-BA/ (mg/L)	KT/ (mg/L)	品种	愈伤组织 诱导率/%
1	0.5	0.5	0.5	小黑英	15
2	0.5	1.0	1.0	串地龙	16
3	0.5	2.0	2.0	金皇后	16
4	1.0	0.5	1.0	金皇后	17
5	1.0	1.0	2.0	小黑英	15
6	1.0	2.0	0.5	串地龙	18
7	2.0	0.5	2.0	串地龙	47
8	2.0	1.0	0.5	金皇后	44
9	2.0	2.0	1.0	小黑英	10
T1	47	79	77	40	
T2	50	75	43	81	
T3	101	44	78	77	
$\bar{x}_1$	15.67	26.33	25.67	13.33	
$\bar{x}_2$	16.67	24.75	14.33	27	
$\bar{x}_3$	33.67	14.67	26	25.67	
R	18	11.66	11.34	14.97	

2.2 不同低温预处理时间对怀地黄花药愈伤组织诱导率的影响

4℃低温预处理对花药愈伤组织诱导率有一定的影响。对数据进行方差分析,不同低温预处理条件下愈伤组织诱导率存在极显著差异。从表 3 可以看出,处理 3 d 的愈伤组织诱导率最高,为 43.00%,和其他处理间差异均达到极显著水平。

表 3 不同低温预处理时间下怀地黄花药愈伤组织诱导率

处理时间/d	愈伤组织诱导率/%
0	29.25bB
1	29.75bB
3	43.00aA
5	20.25cC
7	8.00dD

注:不同大、小写字母表示差异达到 1%、5% 显著水平。下同。

### 2.3 不同光照条件对怀地黄花药愈伤组织诱导率的影响

从表 4 可以看出,在光照和黑暗条件下,花药愈伤组织诱导率差异未达到显著水平,但是在后期培养过程中,在光照条件下的愈伤组织会有部分发生褐化现象,因此,在花药愈伤组织诱导的初期,黑暗条件更有利于花药愈伤组织的诱导。

表 4 不同光照条件下怀地黄花药愈伤组织诱导率	
光照条件	愈伤组织诱导率/ %
黑暗	39.75a
光照	39.25a

## 3 讨论

### 3.1 激素对怀地黄花药愈伤组织诱导率的影响

外源激素对花药愈伤组织的诱导作用极其重要,不同植物、基因型和外植体对激素种类和配比有不同的要求。丹参添加 2.0mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA 诱导效果最好<sup>[18]</sup>。甜查理草莓花药培养最佳的激素配比为 6-BA 1.0mg/L + 2,4-D 2.0mg/L<sup>[19]</sup>。在菠萝花药愈伤组织诱导中的最佳激素配比为 2mg/L 2,4-D + 0.08mg/L TDZ<sup>[20]</sup>。而本研究表明,2,4-D 2.0mg/L + 6-BA 0.5mg/L + KT 2.0mg/L 组合在怀地黄花药愈伤组织诱导中的效果最佳。

### 3.2 不同低温预处理时间对怀地黄花药愈伤组织诱导率的影响

花药接种之前,对花蕾进行一定时间的低温预处理,对大多数植物花药愈伤组织诱导具有良好的促进作用。丹参在 4℃ 低温预处理 2d 效果最佳。三七在 4℃ 处理 4~6d 可提高花药愈伤组织的诱导率<sup>[21]</sup>。本研究表明,4℃ 低温预处理 3d 可以极显著提高怀地黄花药的诱导率。

### 3.3 不同光照条件对怀地黄花药愈伤组织诱导率的影响

花药愈伤组织中是否需要光照以及光照强度的影响因植物种类不同而异。越橘花药在有光照和黑暗条件下,都能诱导出大量的愈伤组织,说明黑暗条件不是越橘花药愈伤组织诱导的必要条件,但黑暗条件更有利于愈伤组织的诱导<sup>[22]</sup>。本研究表明,黑暗和光照对怀地黄诱导率影响不大,但愈伤组织诱导出来后在后期生长过程中对褐化程度有一定影响。光照下诱导出的愈伤组织要比黑暗条件下诱导出的愈伤组织褐化严重一些。因此,黑暗条件更有利于怀地黄愈伤组织诱导。

### 参考文献:

[1] 刘红彦,陈玉红,杨贵军. 85-5 怀地黄优质栽培管理技术[J]. 河南农业,2004(3): 25-26.

[2] 王天亮,郑和平,白自伟,等. 怀地黄优质高产栽培技术[J]. 河南农业科学,2003(6): 41-42.

[3] 李明军,张晓丽,陈明霞,等. 怀地黄叶片愈伤组织的诱导形式及其可溶性糖含量变化的研究[J]. 河南农业科学,2005(8): 72-75.

[4] 张正. 农作物单倍体育种研究概括与思考[J]. 山东农业科学,2007(5): 122-125.

[5] Guba S, Maheshwari S C. In vitro production of embryos from anthers of *Datura*[J]. Nature, 1964, 204: 497.

[6] 胡道芬. 植物花药培育进展[M]. 北京: 中国农业科技出版社,1996: 22-42.

[7] 魏凌基. 大麦花药离体培养及植株再生研究初报[J]. 石河子农学院学报,1995,32(4): 60.

[8] 付迎军. 玉米离体花药培养再生体系的建立[J]. 延边大学农学学报,2004,26(1): 1-5.

[9] 赵桂兰. 大豆花药培养中胚状体萌发的研究[J]. 科学通报,1998,43(14): 1512-1516.

[10] 薛光荣. 锦丰梨花粉植株的诱导[J]. 园艺学报,1996,23(2): 123-127.

[11] 梁国平. 橡胶树花药离体培养再生植株[J]. 热带农业科技,2004,27(1): 8-10.

[12] 渡边庆一. 猕猴桃花药培养再生植株[J]. 国外特种经济动植物,1989(2): 50-51.

[13] 费开韦. 元帅苹果花药培养单倍体植株[J]. 中国农业科学,1981(4): 41-44.

[14] 吴绎云. 苹果花药培养获得单倍体植株[J]. 园艺学报,1981,81(4): 36.

[15] 薛光荣. 苹果花药培养又获进展[J]. 中国果树,1983(1): 46.

[16] 薛光荣. 诱导苹果花粉植株的研究[J]. 园艺学报,1984,11(30): 161-164.

[17] 傅连芳. 荔枝花粉植株诱导的研究[J]. 遗传学报,1984,10(5): 369-374.

[18] 解玉丽,王建华,宋振巧. 丹参花药愈伤组织诱导因素的研究[J]. 山东农业科学,2010(8): 5-7,10.

[19] 晁慧娟,刘敏,姬嫌龙,等. 甜查理草莓花药培养脱毒技术[J]. 北京农学院学报,2010,25(2): 18-21.

[20] 蒋晶,窦美安,孙伟生. 菠萝花药愈伤组织诱导及褐变影响因素[J]. 中国农学通报,2010,26(11): 366-369.

[21] 王定康,孙桂芳,郭志明,等. 影响三七花药愈伤组织诱导的几个因素[J]. 江苏农业科学,2010(6): 236-238.

[22] 游来秋,李晓艳,张志东,等. 越橘花药愈伤组织诱导的影响因子[J]. 吉林农业大学学报,2009,31(9): 528-531,537.