

6个烟草杂交组合花药再生苗的培养和DH群体的构建

陈学军¹, 彭双玉^{1,2}, 罗建蓉^{1,2}, 杨彦明¹, 肖炳光^{1,①}

(1. 云南省烟草农业科学研究院, 云南 玉溪 653100; 2. 云南农业大学, 云南 昆明 650201)

摘要: 以6个烟草(*Nicotiana tabacum* L.)杂交组合的花药为实验材料,对各杂交组合花药再生苗出苗状况及培养过程中添加H液体基本培养基对花药出苗状况的影响进行了比较分析;在此基础上,采用质量体积分数0.4%秋水仙素浸苗法构建加倍单倍体(DH)群体,对加倍处理后不同杂交组合再生苗的成苗率、大田移栽成活率及染色体加倍率等进行分析,并对杂交组合DH1单倍体和加倍单倍体植株叶片气孔保卫细胞叶绿体数的差异进行了研究。结果表明:不同杂交组合每枚花药的出苗数、加倍处理后再生苗的成苗率、大田移栽成活率及染色体加倍率有较大差异。其中,每枚花药出苗数为1.57~3.30,杂交组合DH5每枚花药的出苗数最多,达到3.30株,显著高于其他5个杂交组合($P<0.05$);加倍处理后再生苗的成苗率为21.12%~33.42%,大田移栽成活率为91.87%~98.86%,杂交组合DH6的成苗率和大田移栽成活率最高;染色体加倍率为6.64%~10.78%,杂交组合DH4的染色体加倍率最高。花药培养约15d后,添加H液体基本培养基能够显著促进杂交组合DH1和DH2花药出苗。杂交组合DH1单倍体苗和加倍单倍体苗叶片气孔保卫细胞的平均叶绿体数分别为9.27和17.46,二者比值接近1:2,差异显著。通过花药培养和染色体加倍处理,分别获得了6个烟草杂交组合的DH群体。

关键词: 烟草; 杂交组合; DH群体; 花药培养; 染色体加倍; 秋水仙素

中图分类号: Q943; S335.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2011)01-0065-04

Culture of regenerated seedlings from anthers and construction of DH populations of six cross combinations of *Nicotiana tabacum* CHEN Xue-jun¹, PENG Shuang-yu^{1,2}, LUO Jian-rong^{1,2}, YANG Yan-ming¹, XIAO Bing-guang^{1,①} (1. Yunnan Academy of Tobacco Agricultural Sciences, Yuxi 653100, China; 2. Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2011, 20(1): 65-68

Abstract: Taking anthers of six cross combinations of *Nicotiana tabacum* L. as experimental materials, the emergence status of regenerated seedlings from anthers of different cross combinations and the effect of adding H liquid basic medium in culture process on emergence status were comparatively analyzed. On this basis, doubled haploid (DH) populations were constructed by soaking seedling method with 0.4% colchicine, and the survival rates of regenerated seedlings and transplanted seedlings in field and the chromosome doubling rate of different cross combinations after doubling treatment were analyzed. Also, the difference of chloroplast number in stomata guard cells of seedling leaves of haploid and doubled haploid of cross combination DH1 was studied. The results show that there are significant differences in the emergence seedling number per anther, the survival rate of regenerated seedlings after doubling treatment, the survival rate of transplanted seedlings in field and the chromosome doubling rate among different cross combinations. In which, the emergence seedling number per anther of six cross combinations is 1.57-3.30, that of cross combination DH5 is the highest with a value of 3.30 and that is significantly higher than other five cross combinations ($P<0.05$). After doubling treatment, the survival rate of regenerated seedlings is 21.12%-33.42%, that of transplanted seedlings in field is 91.87%-98.86%, those two indexes are the highest in cross combination DH6. And the chromosome doubling

收稿日期: 2010-07-27

基金项目: 中国烟草总公司云南省公司科技项目(06A03;07A04;08A05;2010YN02;2010YN15); 国家烟草专卖局科技项目(110200701023)

作者简介: 陈学军(1970—),男,山西洪洞人,博士,助理研究员,主要从事烟草种质资源研究。

①通信作者 E-mail: xiaobg@263.net

rate of six cross combinations is 6.64%–10.78%, that is the highest in cross combination DH4. After anther cultured for about 15 d, adding H liquid basic medium can obviously promote anther emergence of cross combination DH1 and DH2. The average of chloroplast number in stomata guard cells of seedling leaves of haploid and doubled haploid of cross combination DH1 is 9.27 and 17.46, respectively, the ratio is close to 1:2 with significant difference. Using anther culture and chromosome doubling treatment, DH populations of six cross combinations could be constructed.

Key words: *Nicotiana tabacum* L.; cross combination; DH population; anther culture; chromosome doubling; colchicine

烟草(*Nicotiana tabacum* L.)育种过程中,加倍单倍体(doubled haploid, DH)在缩短育种进程、提高目标性状筛选效率及构建数量性状基因定位群体等方面发挥着越来越重要的作用^[1-3]。目前,利用花药培养构建烟草 DH 群体的研究已有报道;朱惠琴等^[4]构建了‘G28’×‘NC2326’和‘K326’×‘Coker176’2个烤烟杂交组合 DH 群体;柴利广等^[5]构建了‘B37’(高烟碱)×‘LAB21’(低烟碱)和‘B37’(中抗黑胥病)×‘B67’(感黑胥病)2个 DH 群体。但是,尚未见以不同类型栽培烟草杂交组合后代为材料进行烟草 DH 群体构建的相关研究报道。

烟草 DH 群体构建的方式通常是先将花药培养成再生植株,然后再利用秋水仙素进行人工处理使染色体加倍。虽然目前有关烟草花药培养的技术已经比较成熟,但要想获得大量加倍单倍体苗、建立烟草 DH 群体尚有一定的难度。

鉴于此,作者在前人实验的基础上对花药培养步骤进行简化,并改进了 DH 群体构建方法,选择在品质方面表现突出的不同类型烟草品种作为杂交亲本开展 6 个杂交组合 DH 群体的构建,为下一步开展特色烟叶品质育种、遗传连锁图谱构建及在烟草常规育种工作中开展单倍体育种奠定研究基础。

1 材料和方法

1.1 材料

供试的烟草杂交组合为‘红大’×‘Hicks’、‘红大’×‘K326’、‘红大’×‘白肋 21’、‘红大’×‘巴斯玛’、‘白肋 21’×‘TN86’和‘巴斯玛’×‘沙姆逊’,分别以 DH1~DH6 表示。所有杂交组合于 2008 年 12 月 10 日移栽至云南省烟草农业科学研究院试验基地温室内,2009 年 3 月 20 日植株开始陆续现蕾时,选取处于花粉单核中、后期的花蕾(花冠刚露出花萼或两者平齐),将花蕾置于 4℃ 冰箱中冷藏,备用。

1.2 方法

1.2.1 花药培养 在超净台上小心剥去花萼及花冠,将花药直接接种到装有 H 基本培养基^[6](不含生长激素)的兰花培养瓶中,每瓶 50 枚花药,于温度 25℃、光照时间 14 h·d⁻¹、光照度 4 000 lx 的条件下培养。接种 35 d 后统计出苗的花药数。然后将具有 2~4 片真叶的再生苗分别转接到 MS 基本培养基中,每瓶转接约 30 株苗。

1.2.2 添加 H 液体基本培养基对花药出苗状况的影响 选取开花较早的杂交组合 DH1 和 DH2 的花药,按上述方法前处理并接种培养,约 15 d 后添加 20 mL H 液体基本培养基,对照则不添加 H 液体基本培养基,在上述条件下培养 20 d 后统计每枚花药的出苗数。每处理 100 枚花药,各重复 3 次。

1.2.3 染色体加倍处理及再生苗大田移栽 待再生苗长至高 3~4 cm(4~6 片叶)时,采用秋水仙素浸苗法(秋水仙素质量体积分数为 0.4%)^[4]进行染色体加倍处理,浸苗时间为 48 h。取出小苗,用清水洗去根部残余的培养基后移植于漂浮育苗盘(长 66 cm、宽 34 cm,每盘有 162 个直径 3 cm 的育苗孔)上;将育苗盘置于育苗池(长 7.4 m、宽 1.3 m)中,覆盖塑料薄膜保湿炼苗 7 d 后将幼苗移到大棚温室中培养;30 d 后移栽至大田中,株距 30 cm、行距 50 cm,采用常规栽培措施。统计各杂交组合的处理苗数、成苗数(温室培养 30 d)、大田移栽苗成活数(移栽后 7 d)及染色体加倍苗数,并计算成苗率、大田移栽成活率及染色体加倍率。染色体加倍苗数以开花期观察的不同倍性苗的叶片、花器官形态及结实情况为准。

1.2.4 单倍体苗和加倍单倍体苗叶片气孔保卫细胞叶绿体数测定 选取 DH1 单倍体苗及其加倍单倍体苗,于移栽后 8~13 片真叶时取植株顶端向下第 5 片叶,撕取叶下表皮置于载玻片上并滴加质量浓度 5.00 g·L⁻¹的碘-碘化钾(质量比 1:4)溶液染色,加

盖玻片后在40倍显微镜下统计气孔保卫细胞内的叶绿体数;每一叶片随机选取5个气孔保卫细胞观察统计叶绿体数并计算平均值。

1.3 数据统计分析

烟草杂交组合花药再生苗的成苗率、大田移栽成活率及染色体加倍率的计算公式分别为:成苗率=(加倍处理后成活的再生苗数/用于加倍处理的再生苗数) $\times 100\%$;大田移栽成活率=(大田移栽后成活的再生苗数/加倍处理后成活的再生苗数) $\times 100\%$;染色体加倍率=(染色体加倍的植株数/大田移栽后成活的再生苗数) $\times 100\%$ 。

采用SAS 8.0分析软件对实验数据进行统计和方差分析。

2 结果和分析

2.1 烟草杂交组合花药出苗数的比较

6个烟草杂交组合的花药在接种1个月左右开始出苗,各杂交组合的出苗数见表1。6个杂交组合接种的花药数为4 766~6 949枚,出苗数为9 061~15 925株。其中,DH6花药的出苗数最少,为9 061株;DH5接种的花药数并不是最多,但出苗数最多,达到15 925株。6个杂交组合每枚花药的出苗数差异较大,其中,DH5的每枚花药出苗数最多,达到3.30株,显著高于其他杂交组合($P < 0.05$);另外5个杂交组合每枚花药的出苗数为1.57~2.01株,各杂交组合间无明显差异($P > 0.05$)。

2.2 添加H液体基本培养基对烟草杂交组合花药出苗的影响

在花药培养约15 d后添加H液体基本培养基,DH1和DH2每枚花药的出苗数分别达到3.45

表1 6个烟草杂交组合花药出苗数的比较¹⁾

Table 1 Comparison of emergence seedling number of anthers of six cross combinations of *Nicotiana tabacum* L.¹⁾

杂交组合编号 No. of cross combination	花药数 Anther number	出苗数 Emergence seedling number	每枚花药出苗数 Emergence seedling number per anther
DH1	5 714	9 518	1.67b
DH2	4 766	9 562	2.01b
DH3	6 710	12 089	1.80b
DH4	6 949	12 148	1.75b
DH5	4 820	15 925	3.30a
DH6	5 766	9 061	1.57b

¹⁾同列中不同的小写字母表示差异显著($P < 0.05$) Different small letters in the same column indicate the significant difference ($P < 0.05$).

和3.52,均高于各自未添加H液体基本培养基的对照组(2.21和2.03),差异达显著水平($P < 0.05$)。

2.3 烟草杂交组合花药再生苗的染色体加倍率及成苗率的比较

6个烟草杂交组合的47 763株花药再生苗经加倍处理后移栽至大田,不同杂交组合的成苗率、大田移栽成活率及染色体加倍率见表2。经加倍处理后各杂交组合再生苗的成苗率为21.12%~33.42%,其中,DH3的成苗率最低,为21.12%;DH6的成苗率最高,为33.42%。各杂交组合植株的大田移栽成活率都在90%以上,其中,DH6的大田移栽成活率最高,为98.86%;DH3的大田移栽成活率最低,为91.87%。DH1~DH6再生苗的染色体加倍率为6.64%~10.78%,其中,DH5的染色体加倍率最低,为6.64%;DH4的染色体加倍率最高,为10.78%。

通过上述的花药培养、染色体加倍处理及大田移栽等一系列步骤,获得了6个烟草杂交组合的DH群体,包含的加倍单倍体株数为126~203株。

表2 经加倍处理后6个烟草杂交组合花药再生苗成苗、大田移栽成活及染色体加倍状况的比较

Table 2 Comparison of seedling, surviving of transplanted in field and chromosome doubling status of regenerated seedlings from anthers of six cross combinations of *Nicotiana tabacum* L. after doubling treatment

杂交组合编号 No. of cross combination	处理苗数 Number of treated seedling	成苗状况 State of seedling		大田移栽苗成活状况 Survival state of transplanted seedling in field		染色体加倍苗状况 State of chromosome doubling seedling	
		数量 Number	百分率/% Percentage	数量 Number	百分率/% Percentage	数量 Number	百分率/% Percentage
DH1	7 347	2 130	28.99	2 082	97.75	203	9.75
DH2	6 555	2 044	31.18	1 992	97.46	146	7.33
DH3	8 269	1 746	21.12	1 604	91.87	126	7.86
DH4	7 865	1 729	21.98	1 624	93.93	175	10.78
DH5	10 390	2 835	27.29	2 651	93.51	176	6.64
DH6	7 337	2 452	33.42	2 424	98.86	192	7.92

2.4 烟草杂交组合 DH1 单倍体苗及其加倍单倍体苗叶片气孔保卫细胞叶绿体数的比较

DH1 单倍体苗及其加倍单倍体苗叶片气孔保卫细胞中的叶绿体数分别为 5~13 和 16~19, 平均数分别为 9.27 和 17.46; 二者的比值接近 1:2, 且差异显著 ($P < 0.05$)。朱惠琴等^[7]认为, 烟草气孔保卫细胞叶绿体数随染色体倍性的提高而增加, 气孔保卫细胞中的叶绿体数可作为烟草染色体倍性的鉴定依据。根据本研究结果也可对烟草杂交组合染色体加倍单倍体苗的倍性进行鉴定。

3 讨 论

3.1 花药培养及染色体加倍方法的改进

与常规花药培养方法相比, 作者在无菌环境下用无菌镊子剥去花萼及花冠后直接将花药接种到 H 基本培养基上进行培养, 无需对花药进行消毒处理, 减少了操作过程中对花药的损伤, 提高了花药的出苗数并极大降低了污染率, 简化了操作步骤。同时, 在培养过程中向已培养约 15 d 的烟草花药培养瓶中滴加 20 mL H 液体基本培养基, 既使花药出苗数得到显著提高又无需转瓶, 提高了培养效率, 也减轻了劳动强度, 对大规模开展花药培养具有一定的意义。

本研究中, 作者对花药再生苗的染色体加倍步骤也进行了一定的简化, 直接用质量体积分数 0.4% 秋水仙素对单倍体苗进行浸苗, 48 h 后将处理苗取出并清洗后直接转移到漂浮育苗盘上, 再经室内保湿锻炼 1 周后移至温室中培养 30 d, 然后将植株移栽到大田中, 这样的操作步骤既提高了工作效率又降低了污染率。另外, 用于加倍处理的秋水仙素比较昂贵, 在用秋水仙素处理时将培养基倒扣(生长点向瓶底, 培养基向瓶盖), 可节省试剂的用量。同时, 将已经使用过 1 次的秋水仙素灭菌后重复使用 1 次, 可以节省试剂损耗, 但此方法对 DH 群体成活率及染色体加倍率的影响有待进一步实验研究。

3.2 花药培养及 DH 群体构建中存在的问题

在本研究中, 接种 1 个月左右花药开始出苗, 不同批次、不同培养瓶及不同群体间的出苗状况差别极大。例如, 个别批次几乎所有杂交组合的花药均未出苗; 同一培养瓶中有些花药出苗几十株, 有些只有

1 至几株, 有些花药甚至不出苗。这一现象可能与培养基配制、消毒步骤、花药选取时间、花药部位及花药的生理状况有关。在整个培养过程中共诱导出 68 303 株再生苗, 其中的 2 200 株出现白化现象, 由于这些白化苗不能正常进行光合作用, 在育种上没有利用价值, 造成一定的浪费。虽然白化苗的产生可能是基因型决定的, 但也不排除温度过高的影响。

如今, 花药培养技术已作为一种常规手段应用于育种工作中, 但由于研究的对象和内容尚不够广泛深入, 这项技术还没有达到完全成熟的地步。目前, 花药培养技术存在的主要问题是: 1) 白化苗的产生会影响花药培养效果, 虽然有研究者对此进行了一些研究, 但是尚未找到能从根本上克服白化苗形成的方法; 2) 染色体加倍技术有待进一步改进。

本研究中, 在进行大批量花药再生苗染色体加倍时, 采用的是秋水仙素浸苗法, 经加倍处理后再生苗的成活率仅约 30%, 不可避免地造成加倍单倍体优异材料的丢失, 而且存活再生苗的染色体加倍率均不到 11%, 有些甚至更低。因而, 在烟草单倍体育种实践中, 建议采用离体快繁方法开展单倍体加倍研究^[8], 这将对加速烟草品种选育具有重要意义。

参考文献:

- [1] Kumashiro T, Oinuma T. Comparison of genetic variability among anther-derived and ovule-derived doubled haploid lines of tobacco [J]. Japanese Journal of Breeding, 1985, 35: 301-310.
- [2] Wernsman E A, Matzinger D F, Rufty R C. Androgenetic vs. gynogenetic double haploids of tobacco [J]. Crop Science, 1989, 29: 1151-1155.
- [3] 肖炳光, 徐照丽, 陈学军, 等. 利用 DH 群体构建烤烟分子标记遗传连锁图 [J]. 中国烟草学报, 2006, 12(4): 35-40.
- [4] 朱惠琴, 张宪银, 薛庆中. 开发实用的染色体加倍体系构建烟草 DH 群体 [J]. 分子植物育种, 2004, 2(5): 643-648.
- [5] 柴利广, 张俊杰, 林国平, 等. 白肋烟两个 DH 群体的构建与染色体倍性的鉴定 [J]. 中国烟草学报, 2007, 13(2): 33-37.
- [6] Bourgin J P, Nitsch J P. Production of haploid *Nicotiana* from excised stamens [J]. Annales de Physiologie Vegetale, 1967, 9: 377-382.
- [7] 朱惠琴, 张宪银, 薛庆中. 烟草染色体倍性快速鉴定方法 [J]. 农业生物技术学报, 2006, 14(2): 255-258.
- [8] Kasperbauer M J, Collins G B. Reconstitution of diploids from leaf tissue of anther-derived haploid in tobacco [J]. Crop Science, 1972, 12: 98-101.

(责任编辑: 佟金凤)