

珙桐离体根培养的研究

董社琴¹, 李冰雯²

(1. 长江大学 生命科学院, 湖北 荆州 404325; 2. 西北工业大学, 陕西 西安 710068)

摘要: 在水解酪蛋白(CH)和萘乙酸(NAA)对珙桐离体根诱导愈伤组织生长的试验中, CH对离体根愈伤组织生长有促进作用。30 mg/L CH 与 0.5 mg/L NAA 组合, 愈伤组织生长率可高达98%, 30 mg/L CH 与 0.75 mg/L NAA 组合, 有芽点发生, 30 mg/L CH 与 1 mg/L NAA 组合, 有不定根发生。

关键词: 珙桐; 根尖; 离体培养; 水解酪蛋白

中图分类号: S 792.99 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001—0009(2007)12—0206—02

珙桐是一种残遗种, 为我国所特有。在自然状态下繁殖困难, 制约了它的开发和利用, 所以在我国还处于保护阶段, 现试图建立珙桐再生体系, 为珙桐的保护、开发、利用寻找一条行之有效的途径。

1 材料与方法

珙桐属浅根性树种, 10 a 生以前无明显主根, 侧根发达, 密集在 10~20 cm 土层中, 试验采集 1 a 生、2 a 生珙桐的根尖为外植体, 严格消毒后切取 1.0 cm 长的根尖, 在解剖镜下剔除表皮, 接种于 WPM 培养基+活性炭(0.5%)上, 萘乙酸(NAA)浓度设置为 0、0.5、1、1.5、2 mg/L, 水解酪蛋白(CH)浓度设置为 0、10、20、30、40 mg/L 共 25 个处理(表 1), 3 次重复, 每个处理 15 瓶, 每瓶接种 4 个外植体。培养条件: 相对湿度 75%, 温度 25~27℃, 暗培养 5 d 后转在弱光下继续培养。一直观察记录, 40 d 后计算愈伤组织生成率并进行愈伤组织质量的细胞学鉴定(取出 10 瓶生长良好的, 5 瓶强光下培养, 5 瓶继续暗培养)。

表 1 L ₂₅ (5 ⁶)正交试验因素水平表		
水平	因素/ mg · L ⁻¹	
	CH	NAA
1	0	0
2	10	0.25
3	20	0.50
4	30	0.75
5	40	1.00

2 结果与分析

珙桐根尖诱导愈伤组织见表 2 表 3 为诱导结果直观分析, CH 对诱导愈伤组织影响大, 从表 3 均值中能选

取出对于珙桐根诱导愈伤组织的最佳培养基, 为: WPM+30 mg/L CH+0.5 mg/L NAA。从试验结果表 2 也可以看出第 17、18、19、20、22、23 处理的出愈率高, 第 18 处理出愈率高达 98.83%, 而且愈伤组织生长质量好, 结构松脆、质地致密、生长快、色泽鲜艳, 有大量小硬颗粒出现。通过细胞学鉴定为近似等茎, 壁较薄、质较浓、核明显。

表 2 根尖诱导愈伤组织 L₂₅(5⁶)试验结果

处理	外植体个数/ 个	出愈率/ %	愈伤组织质量
1	60	50.50	小, 色泽暗淡, 生长慢
2	60	52.78	小, 色泽暗淡, 生长慢
3	60	55.00	小, 色泽暗淡, 生长慢
4	60	56.67	稍大, 色泽暗淡, 生长慢
5	60	60.55	大点, 色泽暗淡, 生长慢
6	60	48.33	大点, 色泽暗淡, 生长慢
7	60	61.67	外部松软, 内部实硬, 生长慢
8	60	62.22	外部松软, 内部实硬, 生长慢
9	60	62.78	外部松软, 内部实硬, 生长慢
10	60	64.62	外部松软, 内部实硬, 有芽点
11	60	50.50	外部松软, 内部实硬, 有芽点
12	60	60.55	外部松软, 内部实硬, 芽点多
13	60	62.22	外部松软, 内部实硬, 芽点多
14	60	62.78	外部松软, 内部实硬, 芽点多
15	60	67.22	外部松软, 内部实硬, 芽点更多
16	60	61.67	外部松软, 内部实硬, 芽点更多
17	60	84.45	结果松脆, 质地致密, 生长快
18	60	98.83	结果松脆, 质地致密, 生长快, 出现小硬颗粒
19	60	97.17	结果松脆, 质地致密, 生长快
20	60	97.12	结果松脆, 质地致密, 生长快, 表面有许多突起
21	60	51.67	外部松软, 内部实硬
22	60	87.22	外部松脆, 生长过旺
23	60	88.33	外部松脆, 生长过旺
24	60	61.11	外部松散, 质地细软, 有点褐化
25	60	53.89	外部松散, 质地细软, 属穴进型

从表 4 方差分析结果可知: 在 α=0.01 水平上, CH 对诱导愈伤组织影响是极显著的, 在 α=0.05 水平上, NAA 对诱导愈伤组织影响表现为显著, 进一步多重比较(表 3)发现: CH 各个浓度之间除 30mg/L 与各个浓度之间差异达显著外其余各个浓度之间均不显著, 这说明

第一作者简介: 董社琴(1958-), 女, 教授, 从事植物细胞工程、基因工程教学及研究工作。E-mail: sheqindong@163.com。

基金项目: 湖北省教育厅资助项目(2002ZD2006)。

收稿日期: 2007-09-13

细胞在初始分裂时需要大量营养, CH 含有丰富的氨基酸, 在高水平情况才能满足需要, NAA 对根尖诱导愈伤组织发生起着重要作用, 在不添加 NAA 的培养基上愈伤组织基本不生长, 而 NAA 的各浓度之间差异不显著, 在 0.5 ~ 1 mg/L 范围内出愈率均有所改善, 当超过 1 mg/L 时就会出现相反情况。

表 3 诱导结果的直观分析		
均值	CH	NAA
\bar{X}_1	55.10 b	50.53 b
\bar{X}_2	59.92 b	69.33 a
\bar{X}_3	60.65 b	71.78 a
\bar{X}_4	84.65 a	68.10 a
\bar{X}_5	68.44 b	69.02 a
R	29.55	21.25

注 R 表示极差。

表 4 诱导结果的方差分析					
变异来源	自由度	平方和	均方	F 值	F 临界值
CH	4	2 688.63	672.26	6.39 **	$F_{0.05}=3.01$
NAA	4	1 484.73	371.18	3.53 *	$F_{0.01}=4.77$
误差	16	1 682.51	105.16		
总变异	24	5 855.87			

注 **表示达到 1%显著水平, *表示达到 5%显著水平。

3 结论与讨论

3.1 萘乙酸(NAA)与水解酪蛋白配(CH)配比

低水平生长素和高水平酪蛋白组合诱导出愈率高而且愈伤组织生长质量好, 中等水平的生长素和高水平的水解酪蛋白对愈伤组织出芽有利, 高水平的生长素和中等水平的水解酪蛋白对不定根的生长有显著影响, 只要调控好它们之间的比例关系和水平, 就会达到预期目的。从细胞生物学角度看, 植物细胞感受细胞生长素的信号是通过生长素受体和生长素分子相结合, 是生长素受体被活化来完成的, 激活的受体可能会引起特定的反应^[1], CH 的加入可能引起了一系列连锁的传导反应, 导致生长素诱导的基因表达, 过量表达受体蛋白基因就能显著提高愈伤组织生长率。

3.2 改进 WPM 培养基

用 WPM 培养基第 6 天就得更换新鲜培养基, 这是因为这种培养基离子平衡不是很好, 缓冲调节能力差,

培养过程中变化大对愈伤组织影响, 试验结果也证实了这一点(试验取出 5 瓶生长好的愈伤组织不转移, 4 周后相继枯萎死亡)。因此珙桐离体根的培养要对 WPM 培养基进行改进, 使用多种含氮无机盐做为氮源才能避免在培养过程中 pH 变化过大而产生的危害。

3.3 光照对不定根、芽的影响

离体培养的光照条件调控包括 3 个方面, 光照强度、光周期、光质, 试验只做了光照强度的控制, 分为黑暗、弱光、强光, 在观察过程中发现在黑暗条件下形成愈伤组织要比在弱光条件下提早 3 ~ 5 d, 但弱光下一旦形成愈伤组织后在愈伤组织生长过程中反而比在暗培养下生长得快, 在形成芽和不定根时总体来说弱光比强光好些, 弱光条件下先出现芽点后才出现根而且后期根形成得较多, 强光条件下先出现根也有个别出现芽点但连续照 3 d 时根就会萎缩, 继续下去就会枯死, 这种现象可能和一个植物细胞向分生状态回复过程所能进行的程度, 取决于在自然部位上所处的位置和生理状态^[2]。这与珙桐的生长环境以及外植体的生理状态有关。

3.4 脱分化与愈伤组织

细胞脱分化过程生理活动与细胞结构变化该试验没有用细胞检测分析, 在加入 NAA 和 CH 时细胞分裂发生了哪些变化, 它们在脱分化的过程中不同层次级联的调控顺序及其协同作用远没有清楚。

总之, 一个培养体系成功建立的关键是如何启动细胞从分化状态回复到分生状态, 研究对此做了一些探讨, 认为在改良的 WPM 培养基上控制好光照条件, 加入低水平的生长素和高水平的水解酪蛋白, 就会形成大量的愈伤组织, 再进行生长素和水解酪蛋白的调控就会形成大量的不定根和芽, 为珙桐的再生体系建立提供一些技术参考。

参考文献

[1] 薛庆善. 体外培养的原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
[2] 李俊明编译. 植物组织培养教程[M]. 北京: 中国农业大学出版社 2002.

Research on Culturing in Vitro Root of *Davidia involuercata*

DONG She-qin¹, LI Bing-wen²

(1. Yangtze University, Jingzhou, Hubei 434025, China; 2. Northwest Industrial University, Xi'an, Shaanxi 710068, China)

Abstract: Experiment showed that casein hydrolysate(CH) and α -naphthaleneacetic acid(NAA) had effects on the growth of callus and differentiation of rooting and budding. CH had a stimulative effect on the growth of the callus of in vitro root, 30 mg/L CH+0.5 mg/L NAA could make the growth rate of calle reach at 98%, 30 mg/L CH+0.75 mg/LNAA could make the growth of budding, 30 mg/L CH+1 mg/L NAA could make the growth of rooting.

Key words: *Davidia involuercata*; Root tip; Vitro culture; Casein hydrolysate