

有机附加物对栓皮栎胚性组织增殖的影响

陈春伶¹, 张存旭¹, 高小俊²

(1. 西北农林科技大学 林学院 陕西 杨陵 712100 2 云南农业大学 园林园艺学院 云南 昆明 650201)

摘 要: 研究有机附加物水解酪蛋白、谷氨酰胺在离体培养条件下对栓皮栎胚性组织增殖的影响。结果表明:在栓皮栎的胚性组织增殖培养基中,添加一定浓度的水解酪蛋白及谷氨酰胺能促进栓皮栎胚性组织的增殖;单独添加当水解酪蛋白的浓度为 200 mg/L,谷氨酰胺的浓度为 400 mg/L 时胚性组织的增殖量显著增加;当水解酪蛋白与谷氨酰胺同时添加时,200 mg/L 及 500 mg/L 的水解酪蛋白与 400 mg/L 的谷氨酰胺组合均能得到更大的胚性组织增殖量。

关键词: 栓皮栎;有机附加物;胚性组织

中图分类号: S 792.189 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001—0009(2010)13—0171—03

植物体细胞胚胎发生技术具有体细胞胚产生数量多,繁殖速度快,在短期内可以得到大量遗传上和形态上均一的苗木等的优点^[1]。自 Steward 和 Reinert 在胡萝卜组织培养中发现一种与胚相似的结构以来,目前对一些草本植物如小麦、苜蓿、天仙子等和木本植物白云杉、挪威云杉、宁夏枸杞、龙眼等的体胚发生研究已有了较为深入的报道,已有多达 200 多种植物成功诱导体胚^[2-4]。近年来,有关栎属植物体胚发生和植株再生的研究也逐年增加^[5],已能从栎属植物成年组织诱导出体胚。

体胚一旦被诱导产生,即开始重复增殖次生体胚。近年来,这种重复性体胚发生系统已被视为一种可资利用的繁殖途径^[6]。研究发现,体细胞胚胎发生以来外界条件很多,但是在增殖和成熟的过程中渗透压、氮源、激素等尤其重要,因为体细胞胚的一个重要特征是能够反复进行次生胚发生^[7]。栓皮栎是我国重要的造林树种,并且极具经济价值。研究表明,体胚发生途径可能是栎属植物优良单株组培快繁的最好途径^[8]。张存旭等^[9]以栓皮栎实生苗叶片为外植体诱导体胚并对栓皮栎体胚的增殖、成熟及萌发进行了研究,建立了初步的栓皮栎体胚再生植株体系,虽然体胚的萌发率达到 65.9%,但植株再生率却只有 9.4%,究其原因,可能是因为体胚在增殖或成熟过程中没有积累足够的营养物质或是适

当浓度的生长调节物质,从而影响到后期的萌发及再生。该研究以栓皮栎未成熟的合子胚为外植体诱导体胚,选取同一个细胞系的胚性组织为材料,研究有机附加物水解酪蛋白和谷氨酰胺对栓皮栎胚性组织增殖及生长状况的影响,以期在更大程度上提高栓皮栎的体胚增殖率,得到更加优质的体胚,进而优化栓皮栎的体胚快速繁殖体系,为建立更加系统高效的栓皮栎体胚再生植株体系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

采集栓皮栎的未成熟合子胚,接种到附加了 6-BA 0.5 mg/L、2,4-D 0.5 mg/L、PVP 0.5 mg/L 的 MS 培养基上诱导出胚性组织作为材料。

1.2 试验方法

1.2.1 胚性组织的增殖 选取诱导出的胚性组织中生长较好的细胞系 I、细胞系 II 的胚性组织分别接种到培养基 1:基本的增殖培养基 MS+6-BA 1 mg/L+NAA 0.25 mg/L,分别添加 0、100、200、500 mg/L 的水解酪蛋白;培养基 2:基本的增殖培养基 MS+6-BA 1 mg/L+NAA 0.25 mg/L,分别添加 0、200、400 mg/L 的谷氨酰胺;培养基 3:基本的增殖培养基 MS+6-BA 1 mg/L+NAA 0.25 mg/L,同时添加 200 mg/L 的谷氨酰胺与 100、200、500 mg/L 的水解酪蛋白,400 mg/L 的谷氨酰胺与 100、200、500 mg/L 的水解酪蛋白。培养温度为 25~28℃,光照时间 14 h。

1.2.2 统计分析 每个处理接种 5 瓶,每瓶接种 5~8 块 0.25 cm² 大小的胚性愈伤组织,接种前对材料进行称重,培养 28 d 后再次进行称重,计算增殖量的平均值,并用 SPSS、DPS 软件对数据进行统计分析。

第一作者简介:陈春伶(1983-),女,在读硕士,现主要从事林业生物技术研究工作。
通讯作者:张存旭(1961-),男,副教授,现主要从事林木遗传育种和林业生物技术研究工作。E-mail: cxzhang@nwsuaf.edu.cn
基金项目:国家林业局“948”资助项目(2006-4-54);西北农林科技大学唐仲英育种专项资助项目(2009)。
收稿日期:2010-03-31

2 结果与分析

2.1 水解酪蛋白对栓皮栎胚性组织增殖的影响

从表 1 可以看出,水解酪蛋白对栓皮栎胚性组织的增殖具有显著促进作用。分别选取 2 个细胞系的胚性组织在添加了不同浓度的水解酪蛋白的培养基中培养 28 d 后,与对照相比,在细胞系I 和细胞系II 中,200 mg/L 的水解酪蛋白均能显著促进胚性组织的增殖量的提高。同时对胚性组织的生长情况进行观察,从表 1 可知,随着水解酪蛋白的添加,胚性组织的生长状况越来越好,当水解酪蛋白的浓度为 200 mg/L 时,在胚性组织生长量显著增加的同时,生长状况也达到最好。添加水解酪蛋白后,愈伤组织仍然是白色或浅黄色颗粒状,结构较坚硬或疏松,属于正常的胚性愈伤组织,并且胚性组织生长旺盛,单独的体胚数量明显增加,出现大量的早子叶形的体胚,但是水解酪蛋白的浓度不宜太高,否则生长状况反而变得不好。

表 1 水解酪蛋白对栓皮栎胚性组织增殖的影响

处理	水解酪蛋白 /mg·L ⁻¹	细胞系I		细胞系II	
		生长量/g	胚性组织生长势	生长量/g	胚性组织生长势
CK	0	0.93±0.05 a	++	0.91±0.16a	++
C ₁	100	0.95±0.06 a	+++	0.97±0.14a	+++
C ₂	200	1.08±0.14b	++++	1.20±0.05b	++++
C ₃	500	0.95±0.08 a	++	1.01±0.13a	++

注:最小显著差异测验(LSD)测验,不同字母表示差异显著 P=0.05,下同;++ 生长较慢但不停滞,+++ 生长较快,++++ 生长旺盛,下同。

2.2 谷氨酰胺对栓皮栎胚性组织增殖的影响

从表 2 可以看出,谷氨酰胺对栓皮栎胚性组织的增殖具有显著的促进作用。细胞系I、细胞系II 在添加了不同浓度谷氨酰胺的培养基中培养 28 d 后,与对照相比,生长量均有所提高,当谷氨酰胺的浓度为 400 mg/L 时,胚性组织的生长量显著提高。同时对胚性组织的生长

状况进行观察后发现,随着谷氨酰胺的添加,胚性组织的生长状况越来越好,胚性组织生长旺盛,单独的体胚数量明显增加,愈伤组织也仍然为白色或浅黄色颗粒状,结构较坚硬或疏松,属于正常的胚性愈伤组织,并且有大量的早子叶形的体胚出现。

表 2 谷氨酰胺对栓皮栎胚性组织增殖的影响

处理	谷氨酰胺 /mg·L ⁻¹	细胞系I		细胞系II	
		生长量/g	胚性组织生长势	生长量/g	胚性组织生长势
CK	0	0.93±0.05a	++	0.91±0.16a	++
G ₁	200	0.94±0.08a	+++	0.90±0.18a	+++
G ₂	400	1.08±0.17b	++++	1.13±0.11b	++++

2.3 水解酪蛋白与谷氨酰胺组合对栓皮栎胚性组织增殖的影响

从表 3 中可以看出,不同浓度的水解酪蛋白与谷氨酰胺组合能促进栓皮栎胚性组织的增殖,通过不同浓度组合的水解酪蛋白与谷氨酰胺对细胞系I、细胞系II 的胚性组织进行处理后,当谷氨酰胺的浓度为 200 mg/L 时,随着水解酪蛋白浓度的增加,2 个细胞系胚性组织的增殖变化都不明显,从生长情况上看,虽然与对照相比,生长势有所增强,胚性组织生长较快,但均未出现明显的变化;当谷氨酰胺的浓度为 400 mg/L 时,随着水解酪蛋白浓度的增加,2 个细胞系中体胚的增殖量均出现显著的变化,生长势增强,当水解酪蛋白浓度为 200 mg/L 和 400 mg/L 时,在 2 个细胞系中胚性组织的增殖量都显著提高,胚性组织生长旺盛,体胚数明显增加。在水解酪蛋白浓度为 200 mg/L 时,得到胚性组织增殖的最大值。在经过水解酪蛋白与谷氨酰胺组合处理后,愈伤组织也仍然为白色或浅黄色颗粒状,结构较坚硬或疏松,属于正常的胚性愈伤组织,同时在胚性组织中也出现大量单独的体胚,并且有很多已经进入早子叶期。

表 3 水解酪蛋白与谷氨酰胺组合对栓皮栎胚性组织增殖的影响

处理	水解酪蛋白		谷氨酰胺		细胞系I		细胞系II	
	/mg·L ⁻¹		/mg·L ⁻¹		生长量/g	胚性组织生长势	生长量/g	胚性组织生长势
CK	0		0		0.92±0.05a	++	0.91±0.16a	++
(C+G) ₁	100		200		0.97±0.08a	+++	0.96±0.12a	+++
(C+G) ₂	200		200		0.95±0.05a	+++	1.03±0.09a	+++
(C+G) ₃	500		200		0.95±0.10a	+++	1.04±0.08a	+++
(C+G) ₄	100		400		0.95±0.09a	+++	1.02±0.08a	+++
(C+G) ₅	200		400		1.23±0.11b	++++	1.29±0.13b	++++
(C+G) ₆	500		400		1.17±0.13b	++++	1.20±0.08b	++++

3 结论与讨论

水解酪蛋白和谷氨酰胺作为有机氮源对栓皮栎胚性组织的增殖有很大的影响作用,这与张东向^[10]在对齿瓣延胡索愈伤组织生长的研究中发现水解酪蛋白和水解乳蛋白均有利于愈伤组织生长,张建瑛^[7]在胡桃楸的研究中发现 700 mg/L 水解酪蛋白有利于胚性愈伤组织的诱导,王玉珍等^[11]在对水稻的研究中发现 500 mg/L 谷氨酰胺或精氨酸有利于愈伤组织的形成等的研究结果相

一致。

有机附加物在促进栓皮栎胚性组织增殖的同时,对胚性组织的生长状况也有很大的影响作用,在添加了有机附加物的培养基中生长的胚性组织到后期便开始出现大量已进入早子叶期阶段的体胚,因此,有机附加物的添加很可能改善了体胚的营养环境,有利于体胚的成熟及萌发。

参考文献

[1] 赵晓敏, 沈海龙, 杨玲, 等. 兴安落叶松胚性愈伤组织诱导影响因子的研究[J]. 植物研究, 2007, 27(5): 538-543.
[2] 陈金慧, 施季森, 诸葛强, 等. 植物体细胞胚胎发生机理的研究进展[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2003, 27(1): 75-80.
[3] 赖钟雄, 陈春玲. 龙眼体细胞胚胎高质量浓度蔗糖成熟培养后的超微结构[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2002, 31(2): 188-191.
[4] 周俊彦. 植物体细胞在组织培养中产生的胚状体对植物胚状体发生和发育的因素[J]. 植物生理学报, 1982(8): 90-99.
[5] Sribastava P S, Steinhauer A. In vitro culture of embryo segment of Quercus lebanis; organogenesis and callus growth as a differential response to experimental conditions[J]. Z. Pflanzenphysiol, 1982, 106: 93-96.
[6] Puigdemarrjols P, Fernandez-Guijardo B, Tonibio M. Origin and early de-

velopment of secondary embryos in Quercus suberL. [J]. Int. J. Plant Sci 1996, 157: 674-684.
[7] 张建琪, 姜思佳, 邢亚娟, 等. 胡桃楸胚性愈伤组织诱导与体细胞胚胎发生[J]. 植物研究, 2010, 30(1): 22-26.
[8] Bueno M A, Astorga R, Manzanera J A. Plant regeneration through somatic embryogenesis in Quercus suber [J]. Physiologia Plantarum, 1992, 85: 30-34.
[9] 张存旭, 张焕玲, 贾小明, 等. 栓皮栎体胚的增殖、成熟和萌发[J]. 林业科学, 2008, 44(6): 39-44.
[10] 张东向. 培养条件对齿瓣延胡索愈伤组织生长及延胡索乙素含量的影响[J]. 植物研究, 2003, 23(1): 86-90.
[11] 王玉珍, 罗景兰, 徐进, 等. 农杆菌介导的水稻遗传转化与植株再生[J]. 华中农学报, 2005, 20(1): 8-11.

Effect of Organic Additives on Proliferation of Embryogenic Tissue in *Q. variabilis*

CHEN Chun-ling¹, ZHANG Cun-xu¹, GAO Xiao-jun²

(1. College of Forestry, Northwest Agricultural and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100; 2. College of Landscape and Horticulture Yunnan Agricultural University, Kunming Yunnan 650201)

Abstract: The study focus on the effect of organic additives such as casein acids hydrolysate and glutamine on proliferation of embryogenic tissue in *Q. variabilis* in vitro. The results showed that add a certain concentration of casein acids hydrolysate and glutamine would increase the proliferation of embryogenic tissue in *Q. variabilis*. Adding 200 mg/L casein acids hydrolysate and 400 mg/L glutamine respectively, would increase the proliferation of embryogenic tissue significantly; when 200 mg/L casein acids hydrolysate and 400 mg/L glutamine were combined, 500 mg/L casein acids hydrolysate and 400 mg/L glutamine were combined, the proliferation of embryogenic tissue increased significantly.

Key words: *Quercus variabilis*; organic additives; embryogenic tissue

蔬菜分苗讲技巧

蔬菜分苗, 是防止苗挤苗, 扩大 幼苗营养、光照面积, 促使幼苗 加快生长的有效途径。但是, 分苗必然造成不同程度的断根, 使根系 功能下降, 抑制 幼苗正常生长。要保证幼苗尽可能快恢复根系 吸收功能、幼苗健康成长, 其技术要点如下。

1 适时分苗

一般冷床育苗如辣椒、茄子分苗 约需 40~60 d。分苗从 2 片真叶开始, 分苗宜控制在 3~4 片真叶以内。因为 幼苗相对小, 成苗率高, 苗龄过大, 影响花芽分化, 而且每分苗 一次, 延迟生长 5~6 d。分苗前 3~5 d, 苗床要降温, 加大 通风、控制水分、锻炼秧苗。分苗时做到边挖苗边扎小拱棚排苗盖膜, 以防中午高温秧苗萎焉。分苗时尽可能集中劳力、时间进行排苗, 以利 幼苗健壮生长和管理。分苗宜采取 一次分苗。

2 密度适宜

分苗密度与产量关系密切。在 一定范围内, 随苗距的加大, 前期产量相对提高, 效益也会大幅度增加。

一般辣椒分苗苗距 7~8 cm, 茄子 8~9 cm。若苗床不紧张, 其苗距可达 8~10 cm; 营养钵育苗 其直径达 8~10 cm, 钵间用土充实, 提高保湿、保温效果, 有利 培育壮苗, 提高产量效益。

3 分苗方法

分苗前半天应浇水于苗床, 有利 挖苗和苗带土。挖苗时用铁锹或铁铲。挖苗要离 幼苗根部 1~2 cm。挖苗后用手轻轻挖掉根部大部分土, 然后将其放在盆里或篮里, 以利排苗。取苗勿伤嫩茎, 对子叶应小心保护。幼苗挖起后立即排苗, 尤其要防根部被太阳晒或被风吹干, 分苗时最好将大小苗分开, 剔除病苗、虫伤苗、无头苗。

4 排苗

分苗宜浅排, 一般子叶出土 1~2 cm 为标准, 排苗要把根部土培紧, 并及时浇足定根水。当天挖的苗当天排完。若上午排不完的, 可集中在一起用土围住, 并用遮盖物遮盖, 以防失水萎焉, 下午及时排完。