

瑞特姆油葵再生体系的建立

武春霞, 杨静慧, 刘太林, 黄俊轩, 李建科, 张伟玉

(天津农学院 园艺系 天津 300384)

摘要:以瑞特姆油葵无菌苗的茎尖、下胚轴、子叶、真叶为外植体, 1/2MS 培养基为基本培养基, 研究不同激素水平对油葵愈伤组织形成和芽再生及生根的影响。结果表明: KT 激素诱导的愈伤组织多为蓬松的绿色, 芽再生率相对较高; 外植体中破坏生长点的茎尖再生率最高; 诱导芽的最佳配方为: MS+KT 0.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L, 芽分化率可达 75%; 理想的生根培养基的配方为: 1/2MS+IBA 0.5 mg/L, 生根率达到 80%。

关键词: 油葵; 瑞特姆; 再生; 破坏生长点的茎尖

中图分类号: S 565.503.53 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)07-0124-03

油葵即油用向日葵 (*Helianthus annuus* L.), 为世界第二大油料作物^[1], 是植物蛋白及油脂的重要来源。是近 30 a 来总产量增长最快的世界三大油料作物之一, 年增长率 7.1%, 世界上油葵的主产国是俄罗斯、阿根廷、法国, 其次是中国。我国的油葵主要集中在东北三省、内蒙古、新疆和正在迅速发展的陕西、山西和河北等省、自治区。在我国, 随着人民生活水平的提高, 对食用油的品质要求也逐渐提高, 因而, 具有保健用油之称的向日葵油越来越受到人们的重视。同时由于油葵的抗旱耐碱性也使其成为新开荒地及盐碱地的先锋作物^[2]。但因油葵易受多种病害尤其是菌核病等真菌性病害的危害, 使其产量降低, 品质下降^[3]; 迫切需要采用新的育种手段来提高油葵的抗病性; 另外若要在重盐碱地上栽培油葵, 仍然需要提高油葵的耐盐碱性。瑞特姆油葵是从较耐盐的 8 个油葵中筛选出的最有潜力的抗盐碱的品种^[4], 可以在中、轻度盐碱地上栽培。

利用现代生物技术—转基因的方法是提高油葵抗病性和抗盐性的有效途径。油葵属于难再生作物, 有关油葵再生的报道较少, 且不同品种和基因型之间差异较大^[5], 转基因育种成功的关键首先是建立高效、稳定的油葵再生体系, 这是进行转基因抗性育种的重要基础。因此, 该试验就不同激素水平对瑞特姆油葵芽再生及生

根能力的影响进行研究, 以期为后期的转基因育种做准备。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试油葵瑞特姆品种是由天津农学院园艺系园林植物实验室提供。

1.2 试验方法

1.2.1 灭菌方法及无菌苗培养条件 先挑取饱满的油葵瑞特姆种子去掉种皮, 经自来水冲洗后, 用 75% 乙醇浸泡 30 s 0.1% HgCl₂ 溶液表面灭菌 5 min, 无菌水冲洗浸泡 3~5 次; 接种在 1/2MS 培养基上, 培养条件是: 温度 25℃, 光照强度 1 600~2 000 lx, 光照时间 12 h/d。

1.2.2 不同激素水平对外植体愈伤组织诱导的影响 取 8 日龄油葵瑞特姆无菌苗的茎尖(破坏生长点)、子叶、下胚轴、叶柄、真叶, 用剪刀剪成 1~3 cm 小块。分别接种到不同激素水平的愈伤组织诱导培养基上, 以 MS 为基本培养基, 附加 3% 蔗糖、0.7% 琼脂, pH 5.8。培养温度 (25±2)℃, 光照强度 2 000 lx, 光照时间 12 h/d。培养 30 d 后调查植株的芽再生率。

表 1 愈伤组织诱导培养激素水平及编号

培养基 编号	基本 培养基	激素种类及浓度/ mg · L ⁻¹			
		6-BA	IAA	KT	NAA
1	MS	2.0	0.3	—	—
2	MS	3.0	0.3	—	—
3	MS	4.0	0.3	—	—
4	MS	—	—	2.0	0.2
5	MS	—	—	3.0	0.2
6	MS	—	—	4.0	0.2
7	MS	2.0	—	—	—
8	MS	3.0	—	—	—
9	MS	4.0	—	—	—

第一作者简介: 武春霞(1970-), 女, 天津人, 硕士, 副教授, 现主要从事园林植物研究工作。

通讯作者: 杨静慧(1961-), 女, 甘肃兰州市人, 博士, 教授, 现主要从事园艺和生物技术方面的教学与研究工作。E-mail: jinghuiyang2@yahoo.com.cn

基金项目: 天津市科委科技支撑计划资助项目(08ZCKFNC01200; 07ZCKFNC01100)。

收稿日期: 2009-12-15

1.2.3 芽分化培养基的筛选(见表 2)。

表 2 芽分化培养激素水平及编号

培养基编号	基本培养基	激素种类及浓度 mg · L ⁻¹		
		6-BA	K T	NAA
1	MS	0.5	—	0.2
2	MS	1.0	—	0.2
3	MS	2.0	—	0.2
4	MS	—	0.05	0.2
5	MS	—	0.1	0.2
6	MS	—	0.5	0.2
7	MS	—	1.0	0.2

1.2.4 生根培养基的筛选 取分化的芽, 分别接种到含有不同浓度的 IBA 生长素的 MS 培养基上。附加 3%蔗糖、0.7%琼脂, pH5.8。将接种的培养基放入培养

室, 培养温度 (25±2)℃, 光照强度 2 000 lx, 光照时间 12h/d。培养 15 d 后调查植株的生根率。

2 结果与分析

2.1 油葵种子的消毒

用 0.1%HgCl₂ 消毒种子 5 min 时, 污染率可控制在 5% 以下; 消毒 6 min 以上时虽然污染率降低, 但油葵的胚根及子叶随着升汞浓度的增加而呈现出明显的毒害症状。用 2% 的次氯酸钠消毒油葵种子 10 min 也都能达到较好的灭菌效果, 但不易清洗, 控制污染率不如 0.1% HgCl₂。从而确定用 0.1% HgCl₂ 消毒种子 5 min 为油葵种子适宜的灭菌方法。

表 3 不同外植体 and 不同激素组合对愈伤组织形成的影响

培养基编号	外植体类型, 培养时间、愈伤长势					
	20 d			40 d		
	子叶	下胚轴	真叶	子叶	下胚轴	真叶
1	稍膨大, 卷曲, 伤口处长出少量浅褐色愈伤	稍膨大, 伤口四周少量浅黄绿色愈伤	稍膨大, 卷曲, 伤口处出现浅褐色愈伤	浅黄色, 伤口处出现玻璃化	膨大, 四周出现玻璃化	膨大, 伤口处出现玻璃化
2	稍膨大, 卷曲, 伤口处长出少量浅褐色愈伤	稍膨大, 伤口四周少量浅黄绿色愈伤	稍膨大, 卷曲, 伤口处出现浅褐色愈伤	浅黄色, 伤口处出现玻璃化	膨大, 四周出现玻璃化	膨大, 伤口处出现玻璃化
3	稍膨大, 卷曲, 伤口处长出少量浅褐色愈伤	稍膨大, 伤口四周少量浅黄绿色愈伤	稍膨大, 卷曲, 伤口处出现浅褐色愈伤	浅黄色, 伤口处玻璃化	膨大, 四周出现玻璃化	膨大, 伤口处出现玻璃化
4	膨大, 卷曲, 伤口处长出绿色硬块	膨大数倍, 白绿相间愈伤	膨大, 卷曲, 伤口处长出绿色硬块	黄绿色, 膨大数倍, 伤口处黄绿色硬块	膨大, 愈伤浅灰色颗粒状	膨大, 伤口上出现绿色颗粒状硬块
5	膨大, 卷曲, 伤口处长出浅绿色硬块	膨大数倍, 白绿相间愈伤	膨大, 卷曲, 伤口处长出绿色硬块	黄绿色, 膨大数倍, 伤口处黄绿色硬块	膨大, 愈伤浅灰色颗粒状	膨大, 伤口上出现绿色颗粒状硬块
6	膨大, 卷曲, 伤口处长出浅绿色硬块	膨大数倍, 白绿相间愈伤	膨大, 卷曲, 伤口处长出绿色硬块	黄绿色, 膨大数倍, 伤口处黄绿色硬块	膨大, 愈伤浅灰色颗粒状	膨大, 伤口上出现绿色颗粒状硬块
7	稍膨大, 少量褐色愈伤	膨大, 接触培养基部分生成黄色愈伤	稍膨大, 少量褐色愈伤	伤口处出现少量褐色愈伤	膨大, 四周少量灰色愈伤	膨大, 伤口处出现黄褐色愈伤
8	稍膨大, 少量褐色愈伤	膨大, 接触培养基部分生成黄色愈伤	稍膨大, 少量褐色愈伤	伤口处出现玻璃化	膨大, 四周出现玻璃化	膨大, 伤口处出现玻璃化
9	稍膨大, 少量褐色愈伤	膨大, 接触培养基部分生成黄色愈伤	稍膨大, 少量褐色愈伤	伤口处出现玻璃化	膨大, 四周出现玻璃化	膨大, 伤口处出现玻璃化

2.2 不同外植体和不同激素组合对愈伤组织形成影响

从表 1 可知, 在 9 种培养基上虽然各外植体都能长出愈伤组织, 但愈伤组织的形态不同, 因而进一步分化的潜力也不同。加 6-BA 的培养基上的愈伤组织, 在培养后期几乎全部玻璃化。而加 KT 培养的愈伤组织多表现为蓬松、手摸略感坚硬, 呈灰绿色, 个别愈伤组织呈稀、软的水浸状。蓬松的绿色愈伤组织更容易分化芽。所以, 诱导油葵分化芽, 应用 KT。

2.3 不同激素处理对油葵芽分化的影响

用子叶、下胚轴、真叶再生芽的比率很低, 尽管用 KT 诱导的绿色愈伤组织能部分的再生芽, 但再生率均低于 5%。

用破坏生长点的茎尖诱导再生芽比例较高(见图 1), 其芽再生率随着 KT 激素浓度的增加而增加, 在 KT 为 0.5 mg/L 时, 再生率最高, 达 75%; 6-BA 激素处理的油葵茎尖芽再生率均低于 KT 的处理, 再生率均在 20% 以下。因此, 用破坏生长点茎尖再生芽的最佳培养基配方是: MS+KT 0.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L。

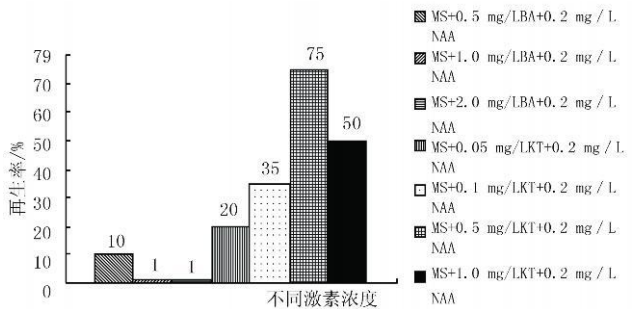


图 1 不同激素处理与油葵的芽再生

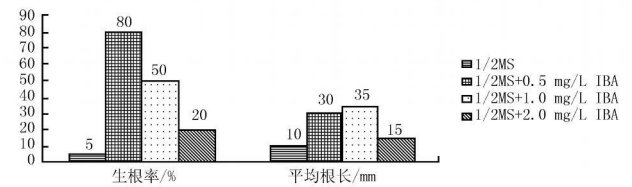


图 2 不同浓度的 IBA 对油葵生根的影响

海藻酸钠明胶联合固定化香菇纤维素酶的技术研究

裴 哲, 朱启忠, 李希红, 韩雷强, 张燕华

(山东大学威海分校 海洋学院 山东 威海 264209)

摘 要:以海藻酸钠、明胶为载体, 戊二醛为交联剂, 对香菇纤维素酶进行固定化。研究了海藻酸钠浓度、明胶浓度、氯化钙浓度、给酶量、戊二醛浓度及交联时间对固定化酶的影响, 并对固定化酶的最适反应温度、最适 pH、温度稳定性等酶学性质进行了测定。结果表明: 海藻酸钠和明胶的最佳浓度分别为 3.5% 和 3.0%, 戊二醛浓度为 1.0%。与游离酶相比, 固定化酶最适反应 pH 向酸性方向移动了 0.4, 最适反应温度提高了 5℃, 并且固定化酶具有良好的贮存稳定性。

关键词: 海藻酸钠; 明胶; 纤维素酶; 固定化; 稳定性

中图分类号: S 646.1⁺2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)07-0126-04

纤维素是地球上数量最大的可再生性碳源物质, 但目前有效利用纤维素生物量的主要障碍是纤维素酶的酶解效率低^[1], 进而导致纤维素酶解过程中纤维素酶的成本过高, 从而严重阻碍了纤维素酶在纤维素糖化中的广泛应用^[2]。

酶的固定化技术为提高纤维素酶的使用效率, 降低

成本, 提供了可能性。高分子复合物作为载体制备固定化酶是近年来引人瞩目的发展方向^[3]。海藻酸钠作为固定化载体, 具有传质性能好, 包埋条件温和, 成本低以及操作简单等优点^[4]。明胶是一种常用的蛋白质胶凝剂, 溶解性好而且价格低廉^[5], 可以很好的改善海藻酸钠的成型效果。利用海藻酸钠与明胶联合固定化制备的胶粒与单一的应用海藻酸钠相比可以提供更大的固定化空间, 有利于物质的扩散^[6]。目前, 海藻酸钠与明胶联合固定化的技术工艺鲜有报道, 现利用香菇产生纤维素酶特性, 以这 2 种载体为包埋材料, 戊二醛为交联剂, 对纤维素酶进行固定化, 并对其固定化条件与酶学性质进行了初步研究, 以期海藻酸钠明胶联合固定化纤维素酶提供技术参考。

第一作者简介: 裴哲(1988-), 男, 山西临汾人, 本科, 研究方向为生物化学。E-mail: 007peizhe@163.com.

通讯作者: 朱启忠(1957-), 男, 本科, 教授, 现主要从事生物化学的教学和科研工作。E-mail: hzzqz@sdu.edu.cn.

基金项目: 山东大学威海分校科研资助项目(A09017)。

收稿日期: 2009-12-15

2.4 不同浓度的 IBA 对油葵生根的影响

从图 2 可知, 0.5 mg/L IBA 激素浓度的处理生根率最高, 为 80%; 0.5~1.0 mg/L IBA 激素浓度的处理, 油葵平均根长最长, 为 30~35 mm。2.0 mg/L 高浓度的生长素 IBA 处理不仅生根率低, 而且玻璃化严重。所以, 最好的生根培养基配方为: 1/2MS+IBA 0.5 mg/L。

参考文献

[1] 张金环, 甄二英, 王涛, 等. 油葵在畜牧业中的应用研究[J]. 饲料研

究, 2005(12): 44-45.

[2] 何承刚. 油葵品种在盐碱地的生态适应性研究[J]. 种子, 2004, 23(5): 6-7.

[3] 陈卫民, 宋红梅, 焦子伟, 等. 五种药剂防治油葵白锈病试验初报[J]. 新疆农业科学, 2005(S1): 247-249.

[4] 穆俊丽, 李建科, 杨静慧, 等. 不同油葵品种种子萌发期的耐盐性研究[J]. 北方园艺, 2009(5): 33-37.

[5] 徐培洲, 吴先军, 胡保民, 等. 油葵子叶外植体不定芽再生体系的建立[J]. 中国油料作物学报, 2004, 26(4): 18-21.

A Regeneration System from Sunflower Ritmo(*Helianthus annuus* L.)

WU Chun-xia, YANG Jing-hui, LIU Tai-lin, HUANG Jun-xuan, LI Jian-ke, ZHANG Wei-yu

(Horticultural Department of Tianjin Agricultural College, Tianjin 300384)

Abstract: The apical shoot broken, hypocotyl, cotyledon, leaf from sterile seedling were cultured in MS medium with different hormones. The result showed that more fluey green callus were gotten and some buds were regenerated from the callus with treatment of KT. The apical shoot broken among explants regenerated best and its differentiation ratio was 75% in the medium of MS+KT 0.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L. The best rooting medium was 1/2MS+IBA 0.5 mg/L in which the rooting ratio was 80%.

Key words: oil sunflower; Ritmo; regeneration; apical shoot broken