

# 紫丁香离体再生体系研究

张先云, 袁秀云, 崔波, 马杰

(郑州师范高等专科学校 生物技术研究所, 河南 郑州 450044)

**摘要:**以紫丁香枝条为材料, 对紫丁香离体培养及再生体系进行研究, 探讨不同激素组合对紫丁香无菌芽诱导、愈伤组织的产生、分化、增殖以及生根的影响。结果表明: 适合紫丁香无菌芽和各种外植体形成愈伤组织、分化和增殖的培养基为: MS+BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L; 生根培养基为: MS+BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L。

**关键词:**紫丁香; 愈伤; 分化; 生根

**中图分类号:**S 685.26 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)08-0155-03

紫丁香(*Syringa oblata*)为木樨科丁香属落叶小乔木或灌木, 植株秀丽清雅, 枝叶茂密, 花序细密, 花冠紫色, 香气宜人, 具有较强的适应能力, 是优良的园林观赏绿化树种。其嫩叶可制茶, 花可提取芳香油, 种子药用<sup>[1]</sup>, 具有较高的经济价值, 极具深度开发利用前景。但是, 紫丁香属于木本植物, 相对于草本植物有一个较长的营养生长期, 这是运用传统杂交育种方法改良其性状的主要障碍, 植物遗传转化为克服木本植物传统育种局限性、加速树木遗传育种进程提供了一条有效途径。但是木本植物的遗传转化却远远落后于草本植物, 主要原因是木本植物的高频再生体系和高效遗传转化体系不够完善。全世界丁香属植物约 32 种, 我国原产的有 27 种, 占世界丁香属植物的 80%以上。然而目前只有 8 种丁香进行了组织培养研究, 其中仅白丁香、暴马丁香、小叶丁香和裂叶朝鲜丁香 4 种丁香建立了组培体系, 对丁香属其它植物的组培研究较少<sup>[2]</sup>, 到目前为止未见紫丁香再生体系的研究报道。现以紫丁香枝条为材料, 初步建立了紫丁香的再生体系, 旨在为紫丁香和其它木樨科木本植物转基因工作提供技术参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

外植体为紫丁香 1 a 生枝条, 于 2009 年 4 月取于郑州陇海路花坛。

### 1.2 试验地

郑州师专生物技术研究所植物技术实验室和郑州师专智能温室。

### 1.3 试验方法

第一作者简介: 张先云(1957-), 女, 本科, 副教授, 现主要从事植物资源及生物技术研究工作。E-mail: zszxianyun@126.com。

基金项目: 郑州市重点科技攻关资助项目(051SGDS17017)。

收稿日期: 2009-12-15

1.3.1 无菌芽的获得 取紫丁香顶芽下 2~5 节, 去掉叶片, 先将材料放于水与洗洁精的比例在 1:500 的溶液中冲洗 15 min, 同时用柔毛刷轻轻刷洗干净, 再用自来水冲洗 5 次。把清洗过的材料剪成带有 2~3 个芽的小段后, 用 70% 的酒精消毒 10 s, 无菌水冲洗 3 次, 再用 0.1% 的升汞浸泡 6~7 min, 无菌水冲洗 5 次。把两端消毒时受伤变色部分剪去, 上端平齐, 下端切成斜面, 插入 A<sub>1</sub>~A<sub>3</sub> 培养基中(见表 1), 接种 15 d 后进行观察统计。

1.3.2 不同浓度的激素组合对成愈率、分化率及丛生芽增值的影响 将获得的健壮无菌芽分割成 0.5 cm 左右的段, 叶片切成直径为 0.4 cm 左右大小的块, 接种到 B<sub>1</sub>~B<sub>7</sub> 培养基中(见表 2), 20~40 d 观察成愈率、分化率及丛生芽增值的情况。

1.3.3 生根与移栽 丛生芽长到 3~5 cm 左右时, 从基部切下, 移至生根培养基中, 当瓶苗培养 25~40 d, 小苗根长至 2~3 cm 时出瓶。移至自然光下练苗 2~5 d, 然后将其从玻璃瓶中取出, 洗净根部粘连的培养基后, 移入温棚蛭石和草炭为基质的营养钵中, 适当遮荫, 经常喷水, 保持温度 18~25℃, 空气湿度 70%~90%, 光照强度 3 000~6 000 lx, 30 d 后统计移栽成活率。

1.3.4 结果统计方法 诱导率=诱导丛生芽的外植体数/培养的外植体数×100%; 成愈率=产生愈伤数/接种总数×100%; 分化率=已分化的愈伤数/接种的总愈伤数×100%; 增殖倍数=丛生芽继代数/接种数; 生根率=生根苗数/培养苗数×100%。

### 1.4 培养条件

基本培养基为 MS, 所有培养基均附加蔗糖 30 g/L, 琼脂 8 g/L, pH(5.8~5.9), 120℃灭菌 25 min, 所有的培养温度均为(24±2)℃, 光照强度 2 500~3 000 lx, 光照时间 12 h/d。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同激素的浓度组合对腋芽诱导的影响

不同激素的浓度组合对紫丁香茎段的腋芽诱导与腋芽生长情况的调查结果见表 1。处理后的茎段接种 7 d 左右, 原来的叶柄脱落, 腋芽开始膨大、伸长, 长出新叶, 12 d 左右叶片展开。A<sub>1</sub> ~ A<sub>3</sub> 处理的茎段腋芽诱导率、长势差别不大, 以 A<sub>1</sub> 即 BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L 培养基相对较好。综合来看, 腋芽诱导对激素的种类和浓度配比要求不高。

表 1 不同激素的浓度组合对腋芽诱导的影响

处理号	激素组合/ mg · L <sup>-1</sup>	诱导率/ %	备注
A <sub>1</sub>	BA 1.0+NAA 0.1	92.6	芽绿色, 较壮, 高 2~5 cm
A <sub>2</sub>	BA 2.0+NAA 0.1+KT 0.5	91.4	芽绿色, 较壮, 高 2~4 cm
A <sub>3</sub>	BA 2.0+IAA 0.2	90.7	芽绿色, 较壮, 高 2~4 cm

## 2.2 不同激素的浓度组合对愈伤形成、分化和丛生芽增殖的影响

不同激素的浓度组合对愈伤组织诱导、分化和丛生

表 2 不同激素的浓度组对丛生芽增殖、成愈率及分化的影响

处理号	激素组合/ mg · L <sup>-1</sup>	增殖倍数	长势	成愈率/ %		分化率/ %
				叶片	茎段	
B <sub>1</sub>	BA 1.0+IBA 0.5	1.5	黄绿、弱、高 2~4 cm	84.3	75.6	0
B <sub>2</sub>	BA 1.0+NAA 0.05	2.2	鲜绿、较壮、高 2~5 cm	89.3	85.2	0
B <sub>3</sub>	BA 1.0+NAA 0.1	3.3	鲜绿、较壮、高 4~5 cm	100	100	20.9
B <sub>4</sub>	BA 2.0+NAA 0.1+KT 0.3	1.7	黄绿、弱、高 1~4 cm 30%死亡	85.6	82.7	0
B <sub>5</sub>	KT 0.5	0.6	黄绿、弱、高 1~6 cm 50%死亡	0	0	0
B <sub>6</sub>	BA 3.0+IAA 0.3	1.4	黄绿、弱、高 1~10 cm, 20%死亡	20.3	0	0
B <sub>7</sub>	BA 3.0+NAA 0.3	2.9	鲜绿、弱、高 3~5 cm	86.4	82.7	0



图 1 愈伤



图 2 分化



图 3 生根

## 2.3 不同培养基对再生芽生根的影响

不定芽伸长至 3~5 cm 时, 将其自基部切下, 移至 D<sub>1</sub> ~ D<sub>4</sub> 生根培养基中(见表 3)。20 d 后 D<sub>2</sub> 和 D<sub>4</sub> 培养基中均有不定根生成, D<sub>4</sub> 培养基的小苗不定根诱导率达 80.2% 以上, 平均生根数为 3~5 条, 根粗壮(见图 3), 移栽成活率高达 90.4%; D<sub>2</sub> 培养基中小苗生根率为 20.3%, 平均根数为 2~3 条, 移栽后成活率偏低, D<sub>1</sub> 和 D<sub>3</sub> 培养基中均无根的生成。试验结果表明, NAA 为紫丁香生根的必要条件, NAA 与 BA 以一定浓度的配比相互作用对紫丁香生根更有利, IBA 不利于紫丁香根的生成, NAA 浓度为 0.1 mg/L 时生根速度快且根生长粗壮, 移栽后成活率高。综合来看, 以 D<sub>4</sub> 培养基即 MS+BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L 为紫丁香最适宜生根培

芽增殖的影响见表 2。无论是茎还是叶均能在 B<sub>3</sub> 中产生愈伤(见图 1), 成愈率达 100%, 而且在 B<sub>3</sub> 培养基中的愈伤组织能够分化(见图 2), 丛生芽的增值倍数达 3.3, 且生长健壮。B<sub>5</sub> 培养基中叶、茎均无愈伤形成, 丛生芽的增值倍数最低, 并且接种到此培养基中的外植体有 50% 死亡。结果表明, BA 是紫丁香增殖、产生愈伤和分化的必要条件, 较高浓度的 BA 不利于分化和增殖; KT 不利于紫丁香的增殖、产生愈伤; 在选用的 3 种生长素中, NAA 对于增殖、产生愈伤效果明显好于 IAA 和 IBA, 且以 NAA 浓度为 0.1 mg/L 时为最好。综合来看, 诱导愈伤组织、愈伤分化及丛生芽增殖的最适植物生长调节剂配比为 B<sub>3</sub> 即 BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L。从外植体来看叶片成愈率在各种培养基中略高于茎段的成愈率。

培养基。

表 3 不同激素组合对不定芽生根的影响

处理号	激素组合 / mg · L <sup>-1</sup>	生根率/ %	根长势	成活率/ %
D <sub>1</sub>	1/2MS+IBA 0.5	0		
D <sub>2</sub>	1/2MS+NAA 0.5	20.3	较壮、每棵 2~3 条	70.7
D <sub>3</sub>	MS+NAA 0.3+IBA 0.05	0		
D <sub>4</sub>	MS+BA 0.5+NAA 0.1	80.2	粗壮、每棵 3~5 条	90.4

## 3 结论与讨论

各种激素浓度的配比对紫丁香枝条腋芽诱导的影响不大, 均能诱导出无菌芽并且长势均壮; 适合无菌芽各部位形成愈伤组织、分化和增殖的培养基 B<sub>3</sub> 即 MS+BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L 为最好; 叶片成愈率略高于茎段的成愈率。有利于生根的培养基为 D<sub>4</sub> 培养基

# 拟南芥热激转录因子 *HSFA2* 基因克隆与原核表达

王瑾瑜, 任亚萍

(河南城建学院 城市规划与建筑系, 河南 平顶 460440)

**摘要:** 为了进一步阐明 *HSFA2* 功能, 现采用 Trizol 法分离拟南芥叶片总 RNA, 用 RT-PCR 方法得到拟南芥 *HSFA2* 基因, 经过连接、转化和蛋白诱导对其进行了原核表达研究。结果表明: 从拟南芥叶片中分离到了高质量的总 RNA, 进而扩增到了目的基因, 将其连入表达载体 *PGEX-KG*, 且转入大肠杆菌 *BL21* 中。不同温度条件下的诱导结果表明, 16℃下蛋白诱导效果较好。采用这套系统, 可以使 AtHSFA2 得以较好的表达。

**关键词:** 热激转录因子; 基因克隆; 原核表达

**中图分类号:** S 637.903.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)08-0157-03

当受到热和一些化学因子胁迫的时候, 细胞会产生一系列的维持自身的正常功能。在这一系列反应中, 热激蛋白(Heat shock protein, HSP)的大量积累就

第一作者简介: 王瑾瑜(1982), 女, 河南平顶山人, 硕士, 助教, 现主要从事园林规划与设计的研究工作。E-mail: jinyu7615816@126.com。

通讯作者: 任亚萍(1983), 女, 河南平顶山人, 硕士, 助教, 现主要从事园林规划与设计的研究工作。

收稿日期: 2009-12-09

即 MS+BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L 为最适宜生根培养基。

已有研究表明, 丁香属 8 种植物均能诱导出愈伤组织<sup>[2]</sup>, 除白丁香愈伤组织的分化率较高外<sup>[4]</sup>, 大部分丁香属植物愈伤组织的分化率很低, 甚至没有分化<sup>[2]</sup>。该试验从近 20 种培养基中筛选出来的紫丁香最佳分化培养基配方与王兴安的白丁香试验分化培养基配方相同, 但该试验的分化率比较低, 说明同属植物的再生条件相似, 不同种再生条件有差异, 紫丁香分化培养基的最佳激素种类和浓度配比仍需要继续探索, 对紫丁香的再生

是细胞自我保护机制一个非常重要的方面。热激蛋白在抵抗胁迫造成的伤害、蛋白的胞间分布与降解, 甚至在信号转导中起着非常重要的作用, 使细胞能够在胁迫情况下继续生存<sup>[1-2]</sup>。

作为信号转导途径的末端组分, 热激转录因子(Heat shock transcription factor, HSF)可以识别存在于热激蛋白启动子中的一段非常保守的序列(5' - nGA AnnTTCnnGAAn - 3'), 从而调控热激蛋白的表达<sup>[3]</sup>。HSF 基因首先从酵母中克隆得到<sup>[4,5]</sup>, 之后在果

体系条件进行再优化, 以建立起紫丁香高效再生体系, 为紫丁香和其它木樨科木本植物转基因工作奠定基础。

## 参考文献

- [1] 崔波, 李服, 马杰. 郑州植物志(上册)[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2008: 739-740.
- [2] 郭辉. 丁香属植物组织培养的研究进展[J]. 青海大学学报(自然科学版), 2009(2): 44-47.
- [3] 刘建斌, 赵祥云, 王俊娟等. 紫丁香的组织培养[J]. 北京农学院学报, 2001(4): 40-43.
- [4] 王兴安. 白丁香的器官克隆和快速繁殖[J]. 国土与自然资源研究, 2006(3): 96.

## Isolated Culture and Establishment of Regeneration System of *Syringa oblata*

ZHANG Xian-yun, YUAN Xi-run, CUI Bo, MA Jie

(Institute of Biology Technology, Zhengzhou Teacher's College, Zhengzhou, Henan 450044)

**Abstract:** The paper studied the isolated culture and regeneration system of *Syringa oblata* using its stem, and discussed the effects of different hormone combination on induction of aseptis bud, callus, differentiation, generation and rooting. The results showed that MS+BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L was optimum medium for induction of aseptis bud, callus from explants, differentiation and generation; MS+BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L is optimum medium for rooting.

**Key words:** *Syringa oblata*; callus; differentiation; rooting