

文冠果组织培养和植株再生研究

宋群雁¹, 王丽艳¹, 矫洪双², 王丽娜¹, 殷奎德¹

(1. 黑龙江八一农垦大学, 黑龙江 大庆 163319; 2. 大庆油田昆仑集团农牧分公司, 黑龙江 大庆 163458)

摘 要:以文冠果实生苗幼嫩叶片为外植体,研究了植物生长调节剂种类及配比对文冠果组织培养及植株再生的影响,经愈伤诱导、增殖、分化、伸长和生根培养,获得了再生植株,建立了文冠果体细胞胚发生及再生植株体系。结果表明:最适合文冠果胚性愈伤诱导的培养基为 DKW+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L;最适分化及增殖的培养基为 DKW+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L+KT 1.0 mg/L;伸长培养基为 DKW+6-BA 0.2 mg/L+IBA 0.5 mg/L;生根培养基为 1/2MS+IBA 0.5 mg/L,生根率为 81%,移栽成活率可达到 90%以上。该再生体系的建立为文冠果快速繁殖和遗传转化的研究奠定了基础。

关键词:文冠果;愈伤组织;植株再生

中图分类号:S 668.903.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)07-0121-04

文冠果(*Xanthoceras sorbifolia* Bunge.)为无患子科(Sapindaceae)文冠果属植物,是我国特有的珍稀木本油料和药用植物。可治疗小儿遗尿症^[1]、风湿性关节炎、心脏病、脱发、血管病等,种子所含有的齐墩果烷型三萜皂苷具有抗癌、抗艾滋病的活性^[2]。文冠果的种子营养丰富、种仁含油率为 55%~67%,其食用油中的亚油酸是中药“益寿宁”的主要成分,具有极好的降血压作用。文冠果油可用作生产柴油、食用油和高级润滑油^[3],是“十五”期间国家重点研究的生物燃油树种。文冠果作为生物质能源树种具有很高的应用价值及发展潜力。

文冠果全身是宝,但自然状态下生长的文冠果靠根蘖繁殖,后代变异性大,呈现严重的退化现象;此外,文冠果素有“千花一果”之称,单株产量相差悬殊,因此长期以来文冠果种源严重不足。生产上文冠果的繁殖以播种繁殖为主,但其种子发芽率低,扦插繁育又很困难,因此利用组培技术建立文冠果胚性细胞的培养体系是快繁和进行药用成分生产的良好途径。目前,有关文冠果组织培养方面的研究有一些报道,大部分试验采用的外植体是文冠果茎段、茎尖、果实成熟期的种胚及种子

苗的嫩茎进行研究^[1,5-7,9],发现文冠果的组培具有一定的难度,表现在试管植株长势较弱,增殖率不高以及生根困难等几个方面,因而影响了文冠果良种化进程。

该试验在前人研究的基础上,采用文冠果实生苗的幼嫩叶片为外植体,以 DKW 作为基本培养基,研究了不同激素种类和激素配比对其愈伤诱导、增殖、分化、伸长和生根的影响,为文冠果快速繁殖和遗传转化的研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试材为成熟的文冠果(*Xanthoceras sorbifolia*)种子,由大庆油田昆仑集团农牧分公司提供。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的准备 取苗龄为 20 d 的幼苗幼嫩叶片为外植体,先用自来水冲洗表面覆土,然后放在饱和洗衣粉水溶液中刷洗,用流水冲洗 1 h 后置于超净工作台上进行消毒处理。在超净工作台上将叶片用 75%酒精消毒 30 s;无菌水冲去残留酒精;用 0.1% HgCl₂ (含 0.01% 吐温-20)溶液对叶片进行消毒,消毒时间分别为 5~10 min;无菌水冲洗 3~5 次;将消毒后的叶片切成 0.5 cm×0.5 cm 见方的小块备用。

1.2.2 诱导愈伤组织 2,4-D 浓度设为 1.0、1.5、2.0 mg/L,6-BA 浓度设为 0.25、0.5、1.0 mg/L,NAA 浓度设为 0.25、0.5、1.0 mg/L,按正交实验设计 10 组培养基(表 1)。将灭菌的外植体,接种到不同激素组合的 DKW 培养基上,每处理 10 瓶,每瓶 10 块外植体,重复 3 次,培养基均添加 30%蔗糖和 0.8%琼脂,pH 5.8,置于温度为(25±2)℃暗培养。接种 30 d 后,统计各处理愈

第一作者简介:宋群雁(1983-),女,在读硕士,研究方向为生物技术。

责任作者:殷奎德(1964-),男,黑龙江虎林人,博士,教授,博士生导师,现主要从事植物分子育种研究工作。E-mail: yinkuide@sohu.com.

基金项目:大庆市石油管理局资助项目(dqc-2009-kqfw-ky-001)。

收稿日期:2012-10-26

伤组织的诱导率。其中,愈伤诱导率=愈伤组织块数/接种总块数 $\times 100\%$ 。肉眼观察愈伤组织的外观,显微镜辅助观察,辨别收集胚性愈伤组织。

1.2.3 愈伤组织分化及增殖培养 将获得的愈伤接种于分化培养基上,每个处理接种3瓶,每瓶10块愈伤,每个处理重复3次,25 d后统计计数。分别以再分化率为指标进行最佳分化培养基的筛选,以增殖系数为指标进行最佳培养基的筛选。再分化率(%)=(已分化的愈伤组织/接种愈伤总数) $\times 100\%$ 。增殖系数=分化芽的总数/接种愈伤总数。以上培养基均添加琼脂0.8%,蔗糖30 g/L,pH值5.8。

1.2.4 不同种类和浓度的激素对文冠果伸长生长的影响 经过继代增殖的丛生芽进行伸长生长,试验设计DKW培养基中附加IBA浓度为0.5 mg/L,6-BA浓度0.1、0.2、0.5 mg/L作为变量。按完全随机试验设计进行激素配比的筛选。每个处理接种10瓶,每瓶3块带愈伤组织的苗,每个处理重复3次,20 d后统计苗的伸长情况。

1.2.5 生根培养 把增殖继代培养长至3.0~5.0 cm无根苗接种到生根培养基上诱导生根,15 d后观察生根情况。生根培养基:1/2MS培养基中分别附加NAA、IBA的浓度分别为0、0.1、0.3、0.5和1.0 mg/L,每个处理接种3瓶,每瓶接4株。15 d后统计生根条数及生根率。

1.2.6 移栽 当根系长至2~4 cm以上,取出小苗用流水将根部的培养基冲洗干净,并将根部在4%多菌灵溶液中浸泡10 min,然后移栽到已消过毒的基质(腐殖质:珍珠岩:蛭石=7:3:1)中,保持遮荫培养,用小烧杯扣住置于培养室中,逐步打开瓶口,使嫩苗逐渐与外界接触,提高适应能力,保持较高的空气湿度。20 d后统计成活率,观察苗生长情况。

2 结果与分析

2.1 不同激素组合对文冠果胚型愈伤诱导的影响

以文冠果实生苗嫩叶为外植体,将灭菌后的外植体

表2 不同激素组合对愈伤分化和增殖的影响

处理 编号	激素浓度/mg·L ⁻¹			接种苗数/株	分化苗数/株	再分化率/%	增殖系数	苗平均高度/cm
	KT	NAA	6-BA					
0	0	0	0	30	0	0	0	0
1	1.0	0.25	0.25	30	13	43	3.25	0.80
2	1.0	0.5	0.5	30	21	70	5.30	1.44
3	1.0	1.0	1.0	30	16	53	5.25	1.36
5	1.5	0.25	0.5	30	17	56	3.70	1.46
6	1.5	0.5	1.0	30	13	43	4.30	1.29
7	1.5	1.0	0.25	30	16	53	2.30	1.41
9	2.0	0.25	1.0	30	11	37	3.60	1.18
10	2.0	0.5	0.25	30	14	47	4.10	1.33
11	2.0	1.0	0.5	30	16	53	3.20	1.09

接种到不同激素组合的DKW培养基上,接种30 d后,统计各处理愈伤组织的诱导率。由表1可以看出,不同激素配比对文冠果愈伤诱导的影响不同,其中以6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L愈伤的诱导率最高,愈伤的质量较好(图1-A)。愈伤组织培养28 d左右分化出芽(图1-B)。

表1 不同激素组合对文冠果胚性愈伤诱导的影响

Table 1 Effects of different combinations of plant growth regulators on callus induction of *X. sorbifolia*

处理 编号	激素浓度/mg·L ⁻¹			愈伤组织外观	愈伤组织 生长量	愈伤诱导 率/%
	2,4-D	NAA	6-BA			
0	0	0	0	白色,颗粒状,透明	+	2
1	1.0	0.25	0.25	黄色,团状,紧密	++++	58
2	1.0	0.5	0.5	黄色,团状,紧密	+++++	93
3	1.0	1.0	1.0	黄色,颗粒状疏松	+++++	88
4	1.5	0.25	0.5	白色,雪花状	++++	39
5	1.5	0.5	1.0	浅黄色,颗粒状疏松	++++	60
6	1.5	1.0	0.25	黄色,颗粒状疏松	++++	78
7	2.0	0.25	1.0	浅黄色,颗粒状疏松	+++++	89
8	2.0	0.5	0.25	浅黄色,颗粒状,疏松	+++++	73
9	2.0	1.0	0.5	黄褐色,颗粒状,疏松	++++	79

注:+++++表示生长量极大;++++表示生长量大;+++表示生长量中等;++表示生长量小;+表示生长量极小。

2.2 不同激素组合对文冠果不定芽分化和增殖的影响

将获得的愈伤接种于增殖培养基上,每个处理接种3瓶,每瓶10个,每个处理重复3次,25 d后统计计数。由表2可知,从外部形态看,以DKW为基本培养基添加6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L+KT 1.0 mg/L的丛生芽长势最好,外植体形态也正常;统计结果表明,培养基中添加6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L+KT 1.0 mg/L其增殖系数最高为5.30,再分化率高达70%,而且丛生芽苗也较高,为1.44 cm,且生长情况最好(图1-C)。其它培养基的增殖系数分布在2.30~5.25,芽苗平均高度分布在0.80~1.46 cm,分化频率分布在43%~56%。因此,6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L+KT 1.0 mg/L的激素组合最适合愈伤组织的分化与增殖培养,愈伤的再分化率为70%,增殖系数最高为5.30。

2.3 不同激素比对文冠果伸长生长的影响

分化的组培苗在筛选出的最佳分化增殖培养基 6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L+KT 0.5 mg/L 中生长不高,因此必须进行伸长生长培养基的筛选。将分化增殖的组织块接种到表 3 的伸长生长培养基中进行培养,20 d 后观察统计组培苗的伸长生长情况。由表 3 可以看出,不同的激素比对组培苗的伸长生长有一定的影响,当 6-BA 浓度出现细微变化时,组培苗的平均高度会出现变化,苗的最高高度为 2.3 cm。单独使用浓度为 0.2 mg/L 的 6-BA 时,组培苗平均高度较高,6-BA 浓度降低或者再增大,组培苗的平均高度会下降,幼苗玻璃化现象加重。当 IBA 浓度为 0.5 mg/L 时,与不同浓度的 6-BA 进行组合,组培苗的平均高度出现显著差异。因此选择 DKW+6-BA 0.2 mg/L+IBA 0.5 mg/L 作为最佳的伸长生长培养基。在此培养基上,经过 20 d 左右的生长后,组培苗长高,并且长势良好(图 1-D)。

表 3 6-BA 浓度对不定芽伸长的影响

Table 3 Effects of 6-BA concentration on elongation growth of adventitious shoot

6-BA 浓度 /mg·L ⁻¹	IBA 浓度 /mg·L ⁻¹	不定芽数	平均植株 高度/cm	玻璃化率 /%
0.1	0	30	1.4c	0
0.2	0	30	1.8b	2
0.5	0	30	1.6bc	14
0.1	0.5	30	1.7b	12
0.2	0.5	30	2.3a	19
0.5	0.5	30	2.2a	37

2.4 不同激素浓度对文冠果生根的影响

由表 4 可以看出,IBA 有明显促进文冠果生根的作用,随着 IBA 浓度的提高,IBA 促进生根能力逐步上升,当达到 0.5 mg/L 时生根能力最好,生根率达到 81%。NAA 也具有促进生根的能力,随 NAA 浓度的提高,NAA 促进生根能力逐步上升,但所产生的根的质量较差,并且在根的周围存在一定量的愈伤组织,愈伤组织的存在对移栽成活不利。根据 IBA、NAA 不同浓度对生根的影响,筛选出最适生根培养基为 1/2MS 附加 IBA

表 4 IBA、NAA 不同浓度诱导对文冠果生根的影响

Table 4 Effects of concentration of IBA, NAA on root induction of *X. sorbifolia*

激素种类	激素浓度 /mg·L ⁻¹	平均生根数	根长度 /cm	平均生根率 /%
IBA	0	0	0	0
	0.1	1.3	1.8	24
	0.3	1.2	2.1	37
	0.5	2.4	2.5	81
	1.0	2.1	2.3	78
NAA	0	0	0	0
	0.1	1.2	1.4	13
	0.3	1.6	1.7	36
	0.5	1.5	1.9	49
	1.0	1.8	2.1	54

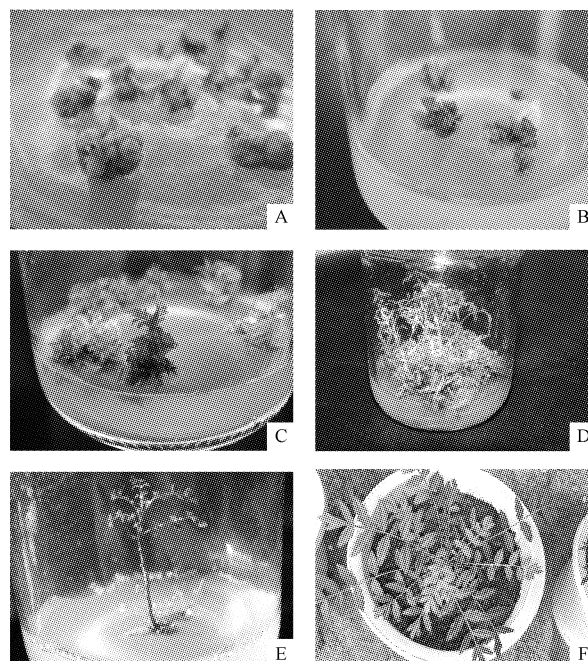


图 1 文冠果愈伤的高效诱导及植株再生

注:A. 文冠果叶片愈伤组织;B. 不定芽的形成;C. 丛生芽生长;D. 伸长的芽;E. 再生植株;F. 移栽成活。

Fig. 1 Efficient induction of callus and plant regeneration of

X. sorbifolia

Note: A. Leaf callus of *X. sorbifolia*; B. Multiple shoot formed; C. Multiple shoot grew; D. Elongated buds; E. Regenerated plants; F. Successful transplanting.

0.5 mg/L,由此诱导出的根系的质量较好(图 1-E),并且在此培养基上生长的组培苗根部没有愈伤组织形成,有利于下一步移栽的成活,移栽成活率可达到 90%以上(图 1-F)。

3 讨论

组织培养中外植体的选择很关键,我国曾有人开展以文冠果嫩茎和茎尖组织离体培养试验^[4]。试验发现,有的培养物能直接形成胚状体,发育成小植株,但是胚型细胞团诱导率很低,只有极少数的培养物形成胚性细胞团,而该试验愈伤诱导率可达 93%。柳金凤等^[5]采用文冠果茎段、叶片及种子苗的嫩茎作为外植体,用于愈伤组织的诱导,但得到的愈伤的数量有限,质量较差。该研究选用实生苗的嫩叶为外植体行了愈伤组织的诱导,得到了很好的结果,克服了上述不足。

培养基类型选择上,盛德策^[6]研究得出的最佳培养基为 B₅,张桂琴等^[4]研究得出的最佳培养基为 H,该研究以 DKW 作为最适基本培养基。H、B₅、DKW 均属于硝态氮含量低的培养基类型,均适合于木本植物的组织培养,这又与其它研究者在木本植物组织培养研究中得出的结论一致。

臧国忠等^[7]以文冠果成熟种子的子叶为外植体进行

培养建立植株再生体系的研究。为了测试文冠果愈伤组织产生的最适激素种类和浓度,以 2,4-D(0~4 mg/L)、NAA(0.5~2.0 mg/L)、6-BA(0.5~2.0 mg/L)不同处理进行试验。结果发现,2,4-D 对愈伤组织的形成有显著的促进作用。当激素浓度为 2,4-D 1.0 mg/L, NAA 1.0 mg/L 和 6-BA 1.0 mg/L 时,愈伤胚性维持良好,增殖率和生长量最优。柳金凤等^[5]以文冠果茎段进行了茎段组织培养试验。结果表明,MS+6-BA 0.3 mg/L+IAA 0.8 mg/L 最适于不定芽诱导。该研究结果得出,最适合文冠果胚性愈伤诱导的培养基为 DKW+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L。这与柳金凤等^[5]、臧国忠等^[7]的研究结果有所不同,但也得到了较好的结果。

IBA 作为一种生根诱导剂广泛应用于促进植物扦插生根的研究中,在组织培养中也常常用其作为生根诱导的激素。张桂琴等^[4]研究表明,IBA 1.5 mg/L 处理中能产生根。王永明等^[8]提出的诱导文冠果生根的培养基附加 IBA 1.0 mg/L 可得到较好的生根诱导效果。王玉珍等^[9]最佳生根添加 IBA 0.25~2.0 mg/L 的处理生根质量最好;黄永伟等^[10]试验发现含有 IBA 0.8 mg/L 的培养基生根效果最佳。该研究中得出 1/2MS+IBA 0.5 mg/L 为较好的生根诱导培养基,基部无愈伤组织

产生,生根质量好,根系生长良好。

该研究以实生苗的嫩叶为外植体,经诱导产生愈伤组织,分化出丛生芽,并得到增殖、伸长、生根诱导形成正常植株。该试验再生研究结果不仅可以用来快速繁殖和保存文冠果资源,而且可用于文冠果遗传转化研究,为文冠果的组培快繁体系建立提供了一条新途径。

参考文献

- [1] 高述民,马凯,杜希华,等. 文冠果(*Xanthoceras sorbifolia*)研究进展[J]. 植物学通报,2002,19(3):296-301.
- [2] 崔红. 文冠果育苗技术[J]. 山西林业,2004(4):26-27.
- [3] 王中山,王玉欣. 文冠果[J]. 特种经济动植物,2002(11):29.
- [4] 张桂琴,徐祥龄,赵志学. 文冠果嫩茎组织诱导植株移栽初获成功[J]. 林业科技通讯,1980(7):4-5.
- [5] 柳金凤,吴建华,闵丽霞. 文冠果组培快繁技术研究[J]. 江苏农业科学,2010(2):52-54.
- [6] 盛德策. 文冠果果实发育及体细胞胚培养的研究[D]. 北京:北京林业大学,2008.
- [7] 臧国忠,陈尚武,张文,等. 文冠果子叶同步胚的高效诱导及植株再生[J]. 西北林学院学报,2008,23(5):91-94.
- [8] 王永明,赵静茹,陈颖. 文冠果的组织培养[J]. 植物生理学通讯,1986(1):132-145.
- [9] 王玉珍,李霞,张弛. 文冠果组培快速繁殖方法[P]. 中国专利. 101032226,2007:9-12.
- [10] 黄永伟,贾明仁,王洪波,等. 影响文冠果组织培养苗离体生根的因素[J]. 北方果树,2010(4):7-9.

Study on Tissue Culture and Plant Regeneration in Castorplant Regeneration of *Xanthoceras sorbifolia* Bunge.

SONG Qun-yan¹, WANG Li-yan¹, JIAO Hong-shuang², WANG Li-na¹, YIN Kui-de¹

(1. Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing, Heilongjiang 163319; 2. Farming Branch of Kunlun Group, Daqing Oil Field Company, Daqing, Heilongjiang 163458)

Abstract: Taking the tender leaves of *Xanthoceras sorbifolia* as explants, the effect of species and concentrations of plant growth regulator on tissue culture and plant regeneration of *Xanthoceras sorbifolia* were studied, after the following four steps: adventitious shoot induction, induction and proliferation and differentiation, root induction, and root growth, an effective regeneration system was established for *Xanthoceras sorbifolia*. The results showed that the optimal medium for callus induction was DKW+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L; for callus differentiation and proliferation the optimal medium was DKW+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L+KT 1.0 mg/L; for elongating DKW+6-BA 0.2 mg/L+IBA 0.5 mg/L, and for rooting, 1/2MS+IBA 0.5 mg/L; the ratio of rooting was 81%, and that of survival was more than 90% when small intact plants were transplanted. The establishment of this regeneration system had laid a foundation for rapid propagation and genetic transformation of *Xanthoceras sorbifolia*.

Key words: *Xanthoceras sorbifolia*; callus; plant regeneration