

蓖麻胚轴外植体离体再生研究

刘 鹏^{1,2}, 董永义¹, 陈永胜^{2,3}

(1. 内蒙古民族大学 农学院, 内蒙古 通辽 028042; 2. 内蒙古自治区高校蓖麻产业工程技术研究中心, 内蒙古 通辽 028042; 3. 内蒙古民族大学 生命科学学院, 内蒙古 通辽 028042)

摘 要:以蓖麻胚轴为外植体,研究了不同种类和浓度的细胞分裂素对胚轴再生不定芽的影响以及不同浓度的生长素对外植体根分化的影响。结果表明:从成熟蓖麻种子中剥离的胚轴接种在 MS 基本培养基并添加 0.5 mg/L 6-BA 或 10.0 mg/L ZT 中诱导不定芽的再生频率最高,分别为 86.7%和 68.9%。健壮的不定芽在 MS+0.2 mg/L NAA 的培养基中根分化率达 26.7%。

关键词:蓖麻;胚轴;离体再生

中图分类号:S 565.635.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)03-0107-03

蓖麻(*Ricinus communis* L.)为大戟科蓖麻属油料作物,其经济价值主要体现在高含油量的蓖麻籽粒上。据 Anjani^[1]报道,从籽粒中提取的蓖麻油有 700 多种工业用途。蓖麻植株高大,茎秆粗壮,叶大如掌,根系发达,且耐旱性能较强,适合于沙化严重的土壤种植,不但可收获产品,还能起到防风固沙的作用。彩色蓖麻的茎、叶、果会呈现五彩缤纷的颜色,还为花卉市场增添了新成员。

目前对蓖麻的组织培养和遗传转化技术研究还不够深入。利用基因工程技术对蓖麻进行遗传改良需要建立一个有效的体外再生体系^[2]。已有通过农杆菌介导的方法获得转基因蓖麻的报道,但转化效率很低(分别为 0.08%和 0.46%)^[3-4]。对于检测转基因品系的目的基因表达水平,获得大量的独立转化体是非常必要的^[5],所以已有的蓖麻转化体系的转化效率需要提高。

该研究以成熟蓖麻种子的胚轴为外植体,研究了不同种类和浓度的细胞分裂素对胚轴再生不定芽的影响以及不同浓度的生长素对外植体根分化的影响,以期建立以蓖麻胚轴为外植体的高效遗传转化体系提供试验数据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

蓖麻品种“通蓖 5 号”种子购自通辽市农业科学研究院。

第一作者简介:刘鹏(1973-),男,内蒙古赤峰人,博士,副教授,现主要从事分子生物学研究工作。E-mail:mindaliupeng@126.com。

责任作者:陈永胜(1971-),男,内蒙古通辽人,博士,教授,现主要从事分子生物学研究工作。E-mail:chenys2000@163.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31060194);内蒙古自治区自然科学基金资助项目(2011MS0512);内蒙古自治区高等学校科学研究资助项目(NJZY11201)。

收稿日期:2012-10-18

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的制备 成熟蓖麻种子剥去种皮在 75%酒精中浸泡 1 min,然后放入 0.1%升汞溶液中 2 min 完成表面灭菌,最后用无菌水冲洗 5 次。用解剖刀将灭过菌的种子从中间纵向剖开,小心取出完整的胚接种在 MS 为基本培养基、添加 0.1 mg/L 6-BA 的固体培养基上。胚正常生长 1 周后,除掉子叶和胚根的胚轴即为接种用的外植体。

1.2.2 胚轴不定芽诱导培养基的筛选 将胚轴用解剖刀纵向划出若干伤口,然后竖直接种到以 MS 为基本培养基、分别添加浓度为 0、0.25、0.50、0.75、1.00 mg/L 的 6-BA 和浓度为 4.0、6.0、8.0、10.0 mg/L 的 ZT 不定芽诱导培养基上进行不定芽诱导培养。每个处理接种 5 个胚轴外植体,重复 9 次。30 d 后进行数据统计。

1.2.3 胚轴生根培养基的筛选 将长到 3~4 cm 的健壮不定芽从基部切下,转移到以 MS 为基本培养基,分别添加浓度为 0、0.1、0.2、0.3、0.4 mg/L NAA 固体根诱导培养基上进行生根诱导培养。每个处理接种 1 个不定芽,重复 15 次。40 d 后进行数据统计。

1.2.4 再生小植株的移栽 将生长健壮的小植株练苗 2~3 d,然后小心清洗干净根部培养基后移栽到花盆中,于人工气候室培养。培养室温度白天控制在 28℃,光照强度约 2 000 lx;夜晚 18℃,黑暗培养。

2 结果与分析

2.1 不同浓度 6-BA 和 ZT 对胚轴不定芽诱导的影响

由表 1 可知,当 6-BA 浓度在 0.5 mg/L 时,不定芽分化率最大,为 86.7%。每个外植体平均不定芽数为 5.8,虽然不是最大值(6.1),但与最大值没有明显差异,而且外植体玻璃化率较小,为 33.3%,与最小值

(29.4%)之间没有显著差异。因此,MS+0.5 mg/L 6-BA 是胚轴外植体最佳的不定芽诱导培养基。由表 2 可知,不同浓度的 ZT 对胚轴不定芽的影响不同,不定芽的分化率和平均不定芽数以浓度为 10.0 mg/L 时为最优,此时虽然不定芽玻璃化率有所升高,但与最低值(26.7%)之间并没有显著差异。因此,如果基本培养基中添加细胞分裂素 ZT,则以 10.0 mg/L 浓度为宜。通过 6-BA 和 ZT 对不定芽诱导的分化率还可以看出,以胚轴为外植体的不定芽再生适宜的细胞分裂素为 6-BA。

表 1 不同浓度 6-BA 对胚轴不定芽的影响

Table 1 Effect of different concentrations of 6-BA on shoot induction from hypocotyl explants

6-BA 浓度 Concentrations of 6-BA /mg · L ⁻¹	接种的外 植体数 Number of explants/个	不定芽分化率 Differentiation rate of adventitious bud/%	每个外植体平均 不定芽数 Number of buds per explants	玻璃化率 Vitrification rate/%
0	45	37.8c	2.2c	29.4c
0.25	45	71.1b	3.4b	31.5c
0.50	45	86.7a	5.8a	33.3c
0.75	45	82.2a	6.1a	48.6b
1.00	45	77.8b	3.5b	62.9a

表 2 不同浓度 ZT 对胚轴不定芽的影响

Table 2 Effect of different concentrations of ZT on shoot induction from hypocotyl explants

ZT 浓度 Concentrations of ZT /mg · L ⁻¹	接种的外 植体数 Number of explants/个	不定芽分化率 Differentiation rate of adventitious bud/%	每个外植体平均 不定芽数 Number of buds per explants	玻璃化率 Vitrification rate/%
4.0	45	46.7c	3.7c	28.6b
6.0	45	53.3b	4.8b	33.3a
8.0	45	66.7a	5.5a	26.7b
10.0	45	68.9a	5.9a	29.0b

2.2 不同浓度 NAA 对胚轴生根的影响

由表 3 可以看出,胚轴生根比较困难,对照(0 mg/L NAA)没有根的分化,当 MS 基本培养基中加入 0.3 mg/L NAA 时,外植体的根分化率达到最大,为 33.3%。但根的状态较培养基中添加 0.2 mg/L NAA 的差。根状态的好坏直接影响移栽植株的成活率,一般认为主根多,且粗壮,须根也多的植株移栽后容易成活。添加 0.2 mg/L NAA 培养基的根分化率为 26.7%,与加入 0.3 mg/L NAA 并没有显著差异。因此,该研究中胚轴生根培养的适宜培养基为 MS+0.2 mg/L NAA。

2.3 再生小植株的移栽培养

将再生根和芽的小植株移栽到以园土、蛭石和草炭土等原料混合配制的营养土中培养。植株生长健壮,成活率达 90%以上(图 1)。

3 结论与讨论

以胚轴作外植体的离体再生研究报道较多,Sujatha 等^[6]以胚轴为外植体,通过对不同种类的激素包括 6-BA、

表 3 不同浓度 NAA 对胚轴生根的影响

Table 3 Effect of different concentrations of NAA for root induction from hypocotyl explants

NAA 浓度 Concentrations of NAA/mg · L ⁻¹	接种的再生芽外植体数 Explants number of regeneration buds/个	外植体根分化率 Differentiation rate of root/%	根状态 Growth of roots
0	15	0c	—
0.1	15	13.3b	主根多,须根少
0.2	15	26.7a	主根多,根较粗壮,须根较多
0.3	15	33.3a	主根少,根粗壮,有很少须根
0.4	15	26.7a	大多仅有 1 条主根,须根少



图 1 再生小植株移栽成活状况

Fig. 1 Regenerated plantlet survived after transplanted in soil

KT、ZT 和 TDZ 诱导丛生芽效果的比较发现,TDZ 对丛生芽的产生有显著的促进作用。张利明等^[7]也以胚轴为外植体测试了 TDZ 对芽诱导的效果,发现 MS 培养基中添加 TDZ 确实可以诱导胚轴产生大量的丛生芽,但这种丛生芽在下一步培养中很难进一步发育成完整小植株。而且为了芽伸长而在培养基中添加 GA₃ 会导致丛生芽的玻璃化。该试验为了避免 TDZ 对不定芽产生的不良影响,再者由于 TDZ 价格十分昂贵,所以在芽诱导培养时选择了 6-BA 和 ZT。该研究发现,较低浓度的 6-BA 明显促进了不定芽的分化,但相对较高浓度的 6-BA 却降低了芽的数量和分化率,这与 Alam 等^[8]试验结果一致,ZT 诱导胚轴产生不定芽的效果略差于 6-BA。该研究结果表明,MS+0.5 mg/L 6-BA 是较适宜的不定芽分化培养基;MS+0.2 mg/L NAA 是较适宜的根分化培养基。

参考文献

- [1] Anjani K. Castor genetic resources: A primary gene pool for exploitation [J]. Industrial Crops and Products, 2012, 35(1): 1-14.
- [2] Birch R G. Plant transformation: problems and strategies for practical application [J]. Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 1997, 48: 297-326.
- [3] Sujatha M, Sailaja M. Stable genetic transformation of castor (*Ricinus communis* L.) via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer using embryo axes from mature seeds [J]. Plant Cell Rep, 2005, 23: 803-810.
- [4] Malathi B, Ramesh S, Rao K V, et al. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation and production of semioleic acid resistant transgenic castor (*Ricinus communis* L.) [J]. Euphytica, 2006, 147: 441-449.

不同植物生长调节剂对“金傲芬”无花果组培的影响

陈 爽, 李金平, 马会勤, 张 文

(中国农业大学 农学与生物技术学院, 果树逆境生理与分子生物学北京市重点实验室, 北京 100193)

摘 要:以无花果“金傲芬”幼嫩带芽茎段为外植体, MS 为基本培养基, 采用常规组织培养方法, 研究了不同植物生长调节剂对“金傲芬”无花果组织培养的影响。结果表明: 2% 的 NaClO 对外植体消毒 6.5 min 能起到较好的消毒效果, 污染率为 28%; 适合“金傲芬”组培的初始培养基为 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 8.0 g/L(pH 5.8); 壮苗培养基为 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L+GA 0.2 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 8.0 g/L(pH 5.8); 生根培养基为 MS+IBA 1.0 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 8.0 g/L(pH 5.8)。

关键词:无花果; “金傲芬”; 组织培养; 植物生长调节剂

中图分类号:S 482.8 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)03-0109-03

无花果(*Ficus carica* Linn)为桑科榕属落叶乔木或灌木, 原产阿拉伯南部。果实柔软味甜, 具有较高的营

养价值和药用价值, 是一种特殊的果品。现代科学研究发现, 无花果能抑制癌细胞的蛋白合成, 具有明显的抗癌、防癌、增强人体免疫功能的作用^[1]。正因为无花果的食用、药用价值高, 对其研究也非常广泛^[2-4]。“金傲芬”为黄色鲜食无花果优良品种, 1998 年由美国加利福尼亚州引入我国, 已在山东、河北、四川等地引种栽培。但生产中采用扦插繁殖的繁殖系数低, 季节性强, 现采用无花果“金傲芬”幼嫩的带芽茎段作为外植体, 研究了各个培养阶段适合的培养基, 为苗木的快速繁殖提供理论依据, 满足对标准化苗木生产的需求。

第一作者简介:陈爽(1989-), 女, 在读硕士, 研究方向为果树生理和栽培。E-mail: cspollyanna@yeah.net.

责任作者:张文(1955-), 男, 本科, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为果树生理和栽培。E-mail: zhangwen@cau.edu.cn.

基金项目:北京市都市农业学科群建设资助项目; 北京市园林绿化局计划资助项目。

收稿日期:2012-10-17

[5] Ahn Y J, Chen G Q. *In vitro* regeneration of castor (*Ricinus communis* L.) using cotyledon explants[J]. Hort Science, 2008, 43(1): 215-219.

[6] Sujatha M, Reddy T P. Differential cytokinin effects on the stimulation of *in vitro* shoot proliferation from meristematic explants of castor (*Ricinus communis* L.)[J]. Plant Cell Rep, 1998(7): 561-566.

[7] 张利明, 侯玲玲, 李文彬, 等. 蓖麻组织培养和植株再生的研究[J]. 中国油料作物学报, 2009, 31(2): 253-255.

[8] Alam I, Sharmin S A, Mondal S C, et al. *In vitro* micropropagation through cotyledonary node culture of castor bean (*Ricinus communis* L.)[J]. Australian Journal of Crop Science, 2010, 4(2): 81-84.

Study on Regeneration of Castor Bean *in vitro* Using Hypocotyl Explants

LIU Peng^{1,2}, DONG Yong-yi¹, CHEN Yong-sheng^{2,3}

(1. College of Agriculture, Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao, Inner Mongolia 028042; 2. Engineering Research Center of Castor at Universities of Inner Mongolia Autonomons, Tongliao, Inner Mongolia 028042; 3. School of Life Science, Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao, Inner Mongolia 028042)

Abstract: Taking cotyledon explants of castor bean as materials, the effect of different species and concentrations of cytokinin on shoot induction and different concentrations of auxin on root induction were studied. The results showed that mature seed-derived hypocotyl explants produced adventitious shoots when placed on MS medium containing 0.5 mg/L 6-BA or 10.0 mg/L ZT. The rate of shoot regeneration was maximal (86.7% and 68.9% respectively). Shoots were transferred to root induction medium (MS+0.2 mg/L NAA), which root regeneration frequency achieved 26.7%.

Key words: castor bean; hypocotyl; *in vitro* regeneration