

侧柏胚性愈伤组织的诱导研究

曹亚琼, 张存旭

(西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要:以侧柏未成熟合子胚、胚根为试材,研究了基本培养基、不同外植体、植物激素、合子胚发育阶段等因素对侧柏愈伤组织诱导的影响。结果表明:未成熟合子胚、胚根在适宜的培养基上都能诱导出愈伤组织,DCR+2.0 mg/L 2,4-D+0.2 mg/L 6-BA+0.5 g/L谷氨酰胺是未成熟合子胚诱导愈伤组织的最佳培养基,诱导率高达 96.67%。DCR+1.0 mg/L 2,4-D+0.1 mg/L 6-BA+0.5 g/L谷氨酰胺是胚根诱导愈伤组织的最佳培养基,诱导率高达 93.33%。最佳采样时期为7月3日前后。

关键词:侧柏;胚性愈伤组织;未成熟合子胚;胚根;诱导因素

中图分类号:S 791.38 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)06-0108-03

侧柏(*Platycladus orientalis*)为柏科侧柏属常绿乔木或灌木,又名扁柏、香柏。侧柏适应性强,抗严寒、耐干旱瘠薄,在我国分布广泛,且用途广泛^[1]。侧柏中的精油具有较强的抗菌、抗霉菌能力,是良好的生态保健型绿化树种^[2-3]。侧柏主要以播种繁殖为主,但其出种率仅在 10%左右,鉴于侧柏的大规模应用,急需对其优良无性系进行快繁技术研究。与传统的种子繁殖相比,体细胞胚胎发生具有更高的繁殖效率和同步化水平。目前虽已有 30 多种松柏类植物诱导出体细胞胚^[4-8],但是柏科植物的体细胞胚胎发生仍有不少困难,尤其侧柏体胚诱导的研究在国内尚属空白。现以侧柏未成熟合子胚和胚根为试材,研究了不同外植体、基本培养基、植物激素、合子胚发育阶段等因素对侧柏愈伤组织诱导的影响。旨在为侧柏的快速繁殖提供一种高效途径,同时为其它柏科树种体胚诱导提供技术借鉴。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验分别于 2011 年 7 月 3、13、23 日,在西北农林科技大学校园内选取 10 株侧柏作为采集木,采集天然授粉未成熟的球果。9 月 19 日再次选取 10 株侧柏作为采集木,并采集天然授粉成熟球果。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的消毒 从球果中拨出未成熟或成熟的

侧柏种子,在流水下冲 4~5 h,在超净台上用 70%的酒精消毒 1 min,用 0.1%的 HgCl₂ 消毒 15 min,用无菌水冲洗 4~5 次。剥去种皮,将未成熟的合子胚直接接种于诱导培养基上,将成熟合子胚接种于 MS 基本培养基中,待种子发芽长出胚根后,将胚根水平接种于诱导培养基中上。

1.2.2 培养基与培养条件 生根培养基与培养条件:MS 培养基,光照(2 000 lx)14 h/d,培养温度 23~25℃。诱导培养基与培养条件:以 DCR、MLV 为基本培养基,每种基本培养基上均附加 0.5 g/L 谷氨酰胺,附加不同含量的 2,4-D 和 6-BA,pH 5.8。按不同的激素配比将诱导培养基分为以下 4 种:DCR1:DCR 基本培养基+2.0 mg/L 2,4-D+0.2 mg/L 6-BA+0.5 g/L 谷氨酰胺;DCR2:DCR 基本培养基+1.0 mg/L 2,4-D+0.1 mg/L 6-BA+0.5 g/L 谷氨酰胺;MLV1:MLV 基本培养基+2.0 mg/L 2,4-D+0.2 mg/L 6-BA+0.5 g/L 谷氨酰胺;MLV2:MLV 基本培养基+1.0 mg/L 2,4-D+0.1 mg/L 6-BA+0.5 g/L 谷氨酰胺。暗培养,温度 23~25℃。

1.2.3 接种 将 2011 年 7 月 3、13、23 日采集的侧柏未成熟种子经消毒后水平接种于 4 种诱导培养基上。将 2011 年 9 月 19 日采集的侧柏成熟种子经消毒后水平接种于 MS 培养基上,待成熟种子萌发长出胚根后,将胚根水平接种于诱导培养基上。

2 结果与分析

2.1 基本培养基对愈伤组织诱导的影响

将侧柏未成熟种子与胚根接种于 4 种诱导培养基上,若干天后均可诱导出愈伤组织,但基本培养基种类不同,愈伤组织诱导率也相差很大。由表 1 可看出,DCR 和 MLV 2 种基本培养基都可以使材料诱导出愈伤

第一作者简介:曹亚琼(1987-),女,陕西延安人,在读硕士,现主要从事园林植物遗传育种工作。E-mail:843894295@qq.com.

责任作者:张存旭(1961-),男,博士,副教授,现主要从事森林遗传及生物技术等方面的研究工作。

收稿日期:2012-12-10

组织,但诱导率明显不同。对未成熟合子胚,DCR1 的诱导率最高;对胚根,DCR2 的诱导率最高。2 种基本培养基相比,DCR 的诱导率明显高于 MLV,因此,DCR 是侧柏体胚诱导最适合的基本培养基。

表 1 不同培养基胚性愈伤组织诱导率

Table 1 The induction rates of embryogenic callus in different media

基本培养基	未成熟合子胚			胚根		
	接种数	诱导数	平均诱导率/%	接种数	诱导数	诱导率/%
DCR1	30	29	96.67	15	11	73.33
DCR2	30	15	50.00	15	14	93.33
MLV1	30	20	66.67	15	5	33.33
MLV2	30	9	30.00	15	6	40.00

2.2 外植体类型对愈伤组织诱导的影响

由表 2 可知,侧柏未成熟种子和胚根 2 种外植体均可在诱导培养基上诱导出愈伤组织,但外植体不同,愈伤组织的诱导时间、颜色、质地不同。由表 1 可知,DCR1 对侧柏未成熟种子的诱导率最高,DCR 2 对胚根的诱导率最高,DCR1、DCR2 是根据激素配比不同分类的,由此亦可知,外植体种类不同,诱导愈伤组织的最适激素配比不同。

表 2 不同外植体对愈伤组织诱导的影响

Table 2 Different explants of callus induced influence

外植体类型	诱导时间/周	颜色	质地	最适激素配比
未成熟种子	2	乳白色颗粒	较疏松	2.0 mg/L 2,4-D+0.2 mg/L 6-BA+0.5 g/L 谷氨酰胺
胚根	4	浅黄色颗粒	较紧实	1.0 mg/L 2,4-D+0.1 mg/L 6-BA+0.5 g/L 谷氨酰胺

2.3 激素种类及浓度对比对愈伤组织诱导的影响

以 DCR 为基本培养基,研究 2,4-D 与 6-BA 不同浓度对胚性愈伤组织诱导的影响。从表 3 可以看出,侧柏胚性愈伤组织在含有较高浓度生长素 2,4-D 和较高浓度的细胞分裂素 6-BA 培养基上诱导率较高。而胚根在含有较低浓度生长素 2,4-D 和较低浓度的细胞分裂素 6-BA 培养基上诱导率较高。

表 3 激素种类及浓度对比对愈伤组织诱导的影响

Table 3 Hormone kind and concentration proportion on callus induction influence

DCR	2,4-D	6-BA	诱导率/%	
	/mg · L ⁻¹	/mg · L ⁻¹	未成熟合子胚	胚根
DCR1	2.0	0.2	96.67	73.33
DCR2	1.0	0.1	50.00	93.33

2.4 未成熟合子胚不同采样时期对胚性愈伤组织诱导的影响

将 7 月份采摘的侧柏未成熟合子胚接种于 4 种培养基上。由表 4 可知,侧柏未成熟合子胚采样时期对胚性愈伤组织的诱导率影响较大,不论是哪种培养基,7 月 3 日采摘合子胚的胚性愈伤组织诱导率明显高于其它 2 个时期,诱导率最高达 96.67%。

表 4 不同浓度组合及不同采样时期对胚性愈伤组织诱导率的影响

Table 4 The induction rates of embryogenic callus on medium with different concentrations and combinations of 2,4-D,6-BA at different sampling dates

培养基种类	2,4-D	6-BA	诱导率/%		
	/mg · L ⁻¹	/mg · L ⁻¹	7 月 3 日	7 月 13 日	7 月 23 日
DCR1	2	0.2	96.67	76.67	46.67
DCR2	1	0.1	50.00	26.67	16.67
MLV1	2	0.2	66.67	56.67	40.00
MLV2	1	0.1	30.00	20.00	10.00

3 结论与讨论

培养基类型对侧柏胚性愈伤组织的诱导很重要。DCR1 是侧柏未成熟合子胚愈伤组织诱导的最适培养基,DCR2 是侧柏胚根愈伤组织诱导的最适培养基。据相关报道,针叶类植物体胚诱导需要低的含氮量^[9-11],可能由于 DCR 培养基大量元素中的含氮总量较低,所以它是侧柏体胚诱导的最适培养基。

大量试验表明,激素种类和浓度是诱导胚性愈伤组织的最重要因素^[12]。2,4-D 和 6-BA 是针叶类树种未成熟合子胚诱导胚性愈伤组织常用的 2 种激素^[10]。该试验结果表明,2.0 mg/L 2,4-D 与 0.2 mg/L 6-BA 是侧柏未成熟合子胚胚性愈伤组织诱导的最佳组合。1.0 mg/L 2,4-D 与 0.1 mg/L 6-BA 是侧柏胚根愈伤组织诱导的最佳组合。

外植体发育时期不同,胚性愈伤组织的诱导率差异很大。一般来说,幼嫩组织的诱导率较好。Becwar 等^[13]研究了松属植物和云杉属植物合子胚发育时期与胚性愈伤组织诱导频率之间的关系,发现子叶前期胚是最适合松属植物胚性愈伤组织的诱导。该试验结果表明,7 月 3 日前后为侧柏未成熟合子胚诱导胚性愈伤组织的最佳采样时间。

参考文献

- [1] 郑万钧. 中国树木志[M]. 北京:中国林业出版社,1998:10.
- [2] 黄洛华,龙玲,陆熙娴,等. 侧柏枝叶精油的化学组成与抗蚁性[J]. 林业科学研究,2004,14(4):416-420.
- [3] 蒋继宏,李晓储,陈凤美,等. 芳香型植物挥发油抑菌活性的研究[J]. 江苏林业科技,2004(3):7-8,13.
- [4] 桑艳朋,赵莉,王祯丽. 新疆城市园林绿化树种的选择[J]. 新疆农垦科技,2004(6):25-27.
- [5] 祝朋芳,罗凤霞,陈长青,等. 日本落叶松胚性愈伤组织的诱导及体胚的形成[J]. 辽宁农业科学,2001(5):46-47.
- [6] 贺凤美,王力,刘阳. 落叶松体细胞发生研究进展[J]. 辽宁林业科技,2000(6):33-35.
- [7] 郑均宝,王进茂,杜克久,等. 油松体细胞无性系的建立[J]. 遗传学报,2000,24(1):1-6.
- [8] 唐巍. 火炬松胚性愈伤组织诱导和植株再生的研究[J]. 林业科学,1998,34(3):115-119.
- [9] 金晓玲,何平. 乔木树种体细胞胚胎发生的研究与应用[J]. 林业科学研究,2003,16(3):343-350.

贺州荸荠开放式组织培养体系建立

吴桂容, 曲芬霞, 余炳锋

(贺州学院 桂东特色资源开发与利用重点实验室, 广西 贺州 542800)

摘要:以“贺蹄一号”荸荠为外植体,研究了抵制剂种类和浓度、蔗糖浓度、有机成分和培养方式对贺州荸荠开放式组织培养的影响。结果表明:当次氯酸钠浓度为 1.0% 时,污染率最低,为 23.3%,平均诱导率高达 79.0%;蔗糖浓度为 2% 时,抑菌效果较好,污染率为 23.0%;有机成分去除甘氨酸时污染率最低,为 11.0%,诱导率达 80.7%;接种材料在培养室中培养,污染率低但诱导率高,分别为 14.0% 和 87.7%;但是改善玻璃温室的环境条件,从而降低污染率,是开放式组织培养的有效途径之一。

关键词:荸荠;开放式组织培养;污染率

中图分类号:S 632.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)06-0110-03

荸荠(*Eleocharis tuberosa*)为莎草科多年生水生草本植物,俗称马蹄、地栗,已有 3 000 余年栽培史。地下有匍匐茎,先端膨大为球茎,皮色紫黑,肉质洁白,味甜多

汁,清脆可口,其营养价值高,除含有丰富的水分、淀粉、蛋白质,还含有较高的钙、磷、铁、胡萝卜素、VB1、VB2、VC 等物质,其苗秧、根、果实均可入药。中医认为,荸荠性味甘寒,功效清热化痰、生津开胃、明目清音、消食醒酒^[1]。自古有“地下雪梨”之美誉,北方人视之为“江南人参”^[2],是大众喜爱的时令食品,是一种优良的药食兼用的保健型果蔬类食品。长期使用传统的种球繁育手段导致荸荠种性退化问题较为突出,近十几年来国内开展了关于荸荠组织培养技术的研究,采用茎尖分生组织培养技术获得荸荠脱毒组培苗^[3],是保持品种优良特性,

第一作者简介:吴桂容(1970-),女,在读博士,副教授,研究方向为植物繁育技术。E-mail: hzwgr510@163.com.

基金项目:广西技术与开发资助项目(桂科转 10191001-6);广西教育厅计划资助项目(201012MS209);贺州市科学研究与技术开发计划资助项目(贺科转 1012007N);贺州学院植物学重点建设学科资助项目(2011ZDJSXK05)。

收稿日期:2012-12-11

[10] Li X Y, Huang F H, Gbur E F. Effect of basal medium, grow thregulators and phytagel concentration on initiation of embryogenic cultures from immature zygotic embryos of loblolly pine[J]. Plant Cell Reports, 1998, 17: 298-301.

[11] Ellis D D. Stabletrans form ation of Piceaglauca by particle accelerat ion [J]. Bio Technology, 1993, 11: 84-89.

[12] 翟晓巧, 翟翠娟, 刘新风. 木本植物体细胞胚胎发生及植株再生研究现状[J]. 河南林业科技, 2004, 24(2): 7-9.

[13] Becwar M R, Nagamani R, Wann S R. Initiation of embryogenenic cultures and somati cembryo development in loblolly pine(*Pinus taeda*) [J]. Can J For Res, 1990, 20: 810-817.

Study on Induction of Embryogenic Tissue of *Platycladus orientalis*

CAO Ya-qiong, ZHANG Cun-xu

(College of Forestry, Northwest Agricultural and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract: Taking the immature zygotic embryo and radicle of *Platycladus orientalis* as test materials, the effects of basic medium, different explants, plant hormones, zygotic embryo developmental stage in callus induction were studied. The results showed that immature zygotic embryo and radicle could induce on optimal medium. The optimal combination of medium for immature zygotic embryo was DCR+2.0 mg/L 2,4-D+0.2 mg/L 6-BA+0.5 g/L glutamine, the inducing rate was 96.67%. The optimal combination of medium for radicle was DCR+1.0 mg/L 2,4-D+0.1 mg/L 6-BA+0.5 g/L glutamine, the inducing rate was 93.33%. The best period of immature zygotic embryo sampling was around July 3.

Key words: *Platycladus orientalis*; embryogenic callus; immature zygotic embryo; radicle; initiation factors