

香樟子叶胚培养的研究

杜 丽

(南阳师范学院 生命科学与技术学院, 河南 南阳 473000)

摘 要:以香樟(*Cinnamomum camphora* L.)子叶胚为外植体,以 MS 为基本培养基,研究不同浓度植物激素组合对香樟子叶胚培养的影响。结果表明:在该研究所设浓度范围内,MS+BA 2.0 mg/L+IBA 1.0 mg/L 子叶胚萌发率为 41.7%,对香樟子叶胚萌发的诱导效果相对较好。

关键词:香樟;子叶胚;组织培养;萌发;体胚发生

中图分类号:S 792.23 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)14-0089-04

香樟(*Cinnamomum camphora* L.)属樟科樟属植物,是亚热带常绿阔叶林的代表树种。其树形优美,枝繁叶茂,绿荫蔽日,气势雄伟,是优良的城市园林绿化常用树种。在我国分布大体以长江以北为界,南至两广及西南,以江西、浙江、福建等东南沿海省份为多,因而在栽培范围上受到低温的限制。近年来,随着城市建设发展及园林绿化的新要求,为丰富北方园林的树种组合,改善冬季园林植物景观,不少园林工作者都在尝试引种此树^[1],香樟被广泛引种栽植到黄河流域的一些省份,用以丰富当地绿化树种。然而北方漫长而寒冷的冬季往往导致香樟生长受损,严重时甚至树木死亡,从而造成巨大的经济损失。因此,防治冻害就成为这一优良树种在北方城市顺利推广及应用的一个重要问题。

解决这一问题的主要方法是加强栽培管理和选育抗冻新品种,而后者是根本途径。采用生物技术方法,通过转基因手段进行分子育种,是一种“定向育种”,可有效缩短育种周期。生物技术改良香樟必须以高效植株再生体系的建立为研究基础,近年来,香樟组织培养相关研究已经取得初步进展,吴金寿等^[2]、辜夕容等^[3]、吴幼媚等^[4]、武芸^[5]以香樟茎段为外植体进行了快繁体系、愈伤组织诱导的相关研究;燕丽萍等^[6]以香樟果实去果肉,剥去种壳,接种种胚,提高种子发芽率;杜丽等^[7]的研究中,香樟合子胚通过体胚发生途径获得再生植株。这些研究为进一步完善香樟植株再生体系奠定了良好的基础。

胚培养是果树早熟类型品种的选育以及近年来对园林植物品种选育所采取的有效手段与成功方法之一,在早

熟西洋梨^[8]、早熟蟠桃^[9]、梅花^[10-11]、牡丹^[12-14]等育种方面已有很多成功的报道。通过胚培养的手段可以促使种子打破休眠,快速萌发,明显缩短育种年限,建立完善的植株再生体系,快速获得大量遗传性状一致的苗木。该研究以香樟的子叶胚为外植体,以 MS 为基本培养基,研究不同浓度植物激素组合对香樟子叶胚培养的影响,探索香樟子叶胚在离体条件下培养的最佳配方,完善香樟胚培养技术,建立香樟胚培养体系,以期为香樟转基因育种提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

8月中旬,以南阳师范院校内优良、健壮香樟的未成熟果实为供试材料,直径 1 cm 左右,取其果内子叶胚作为外植体。

1.2 试验方法

1.2.1 香樟子叶胚培养方法 采摘果实后,在超净工作台上,先用 70%酒精浸泡 45 s,再用 0.1% HgCl₂ 溶液浸泡 8 min,无菌水冲洗 3 次后,在无菌条件下切开发果,取出子叶胚,接种于各种培养基上。香樟子叶胚培养各种处理采用 MS 作为基本培养基,添加琼脂粉 8 g/L,蔗糖 30 g/L 以及不同浓度的植物激素,培养基 pH 均调至 6.0,121℃灭菌 20 min。子叶胚培养条件为(24±2)℃,暗培养;子叶胚萌发后,转入光照培养,周期为 16 h 光照/8 h 黑暗,强度为 2 000 lx 左右。

1.2.2 不同浓度植物激素组合对香樟子叶胚培养的影响 香樟果实消毒后,在无菌条件下取出子叶胚作为外植体,选择 MS 为基本培养基,附加不同浓度 BA(0、0.5、1.0、2.0 mg/L)和 IBA(0、0.5、1.0、2.0 mg/L)共 16 个处理,编号为 P1~P16,以确定不同浓度 BA 和 IBA 组合对香樟子叶胚培养的影响。试验使用培养皿直径为 9 cm,每皿接种 15 粒外植体,每一处理接种 4 皿,至少 60 个外植体;接种后的外植体,暗培养处理 4 周,统计子叶胚萌发率和体胚诱导率,以确定不同配方的培养基对香樟子

作者简介:杜丽(1978-),女,河南南阳人,博士,副教授,现主要从事园林植物应用及改良等工作。E-mail:dldldlucky@163.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31100511);河南省高校青年骨干教师计划资助项目(2010GGJS-161);南阳师范学院博士科研启动资助项目(nynu200746)。

收稿日期:2014-03-13

叶胚培养的影响,筛选出相应的最适配方。子叶胚萌发率=(诱导生芽的外植体总数/接种外植体总数)×100%;体胚诱导率=(诱导出体胚的外植体总数/接种外植体总数)×100%。

1.2.3 香樟胚培苗的培养 由香樟子叶胚从不同组合的胚培养基诱导出的胚培苗(芽、根齐备或具有芽器官的外植体),切割去除褐化的部分,转到胚培苗生长培养基(MS+BA 1.5 mg/L+IBA 0.5 mg/L+GA 0.5 mg/L),每4周转接到同样配方的培养基中继代,以期观察香樟子叶胚培苗的生长状况。

2 结果与分析

2.1 香樟子叶胚的萌发诱导和体胚发生

香樟子叶胚接种于不同培养基上暗培养。处理

1周之后,外植体陆续开始有萌动迹象,逐渐在胚芽处直接抽生出细长、嫩黄的芽器官(图1-A、B),这些芽器官从外植体上分离下来,或者将萌发的子叶胚直接转入光照培养,就可获得胚培苗;同时观察到,在某些配方中,子叶胚虽有芽器官的萌动,但抽生出的芽,为非正常器官,畸形的叶片更类似于白色子叶(图1-C),这类材料继续培养,能够观察到类似于子叶结构的增殖,可见这类子叶胚萌发接近于体胚发生,是香樟子叶胚培养畸形萌发,亦或者香樟子叶胚体胚畸形发生,这类现象在该试验统计中计入“香樟体胚发生”。

除此之外,在香樟子叶胚的培养中观察到根器官发生(图1-D),该试验,先形成根器官的香樟子叶胚,继续培养,难以观察到芽器官的形成,不能获得完整植株,这

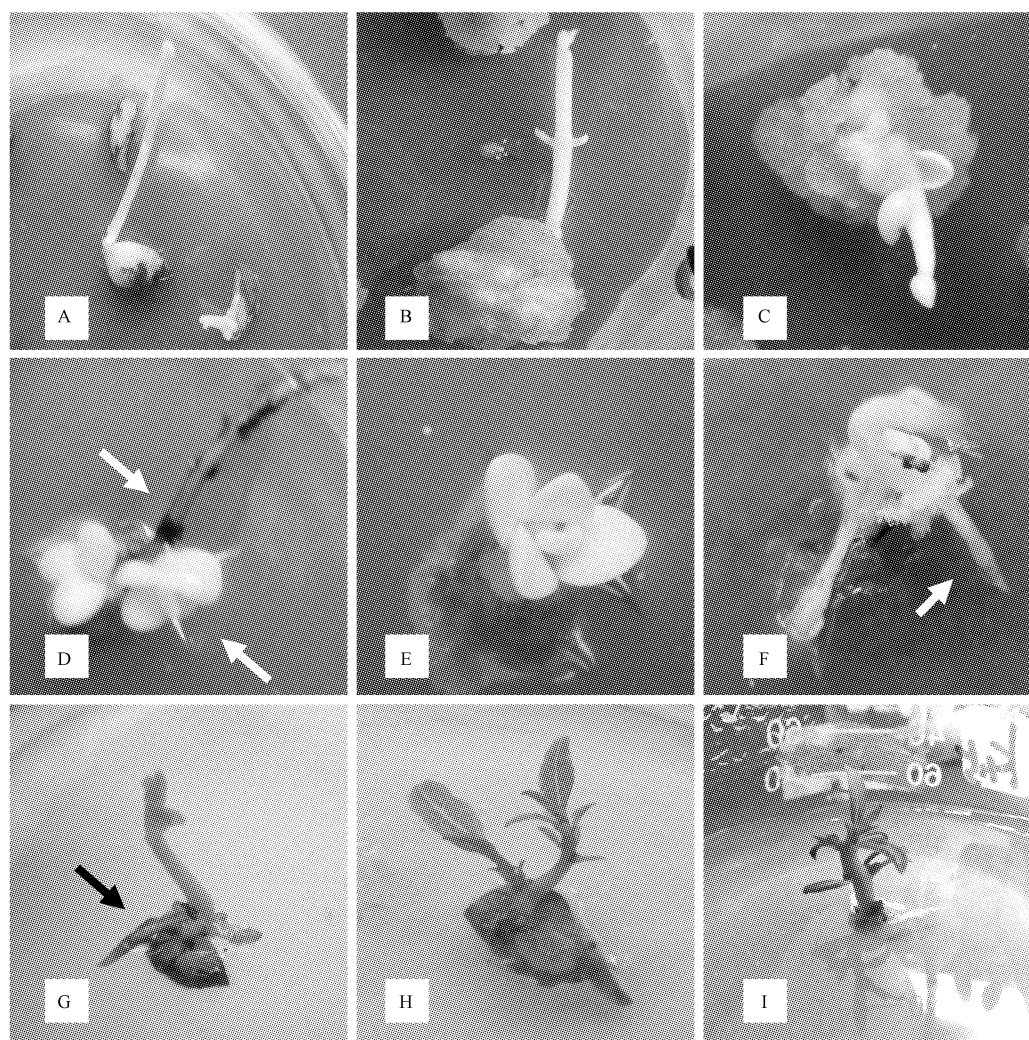


图1 香樟子叶胚培养的研究

注:A~C. 子叶胚的萌发诱导;D. 子叶胚根器官发生;E. 子叶胚上诱导出的体胚;F. 子叶胚见光培养;G~I. 长大后的胚培养苗;I. 胚培养苗。

Fig. 1 Research on cotyledonary embryo culture of *Cinnamomum camphora* L.

Note: A~C. Germination induction for cotyledonary embryo of *C. camphora*; D. Root induced from cotyledonary embryo; E. Somatic embryo induced from cotyledonary embryo; F. Cotyledonary embryo cultured in the light; G~I. Seedling germinated from cotyledonary embryo; I. The whole plantlet from cotyledonary embryo culture.

是该试验把根器官发生不计入子叶胚萌发数据的原因。在某些配方中,根器官发生的同时,观察到大量的白色子叶状体胚的形成(图 1-D)。

香樟子叶胚作为外植体,在不同配方的培养基上进行培养,可以同时观察到子叶胚萌发(图 1-A、B)和体胚发生(图 1-E)。通常情况下,香樟体胚为围绕子叶胚胚轴形成的白色子叶状结构(图 1-E)。

2.2 不同浓度 BA 和 IBA 组合对香樟子叶胚培养的影响

接种于不同浓度 BA 和 IBA 组合培养基中的香樟子叶胚,在暗培养 4 周之后统计子叶胚萌发率和体胚诱导率。由表 1 可知,BA 和 IBA 组合的配方,能够使香樟子叶胚抽生出正常芽器官(图 1-A)。其中单独使用 BA 的配方可观察到芽的低频发生,随着 BA 浓度的提高并附以 IBA 共同作用,子叶胚萌发率相应提高,配方 P11 (MS+BA 1.0 mg/L+IBA 1.0 mg/L)子叶胚萌发率为 28.3%、配方 P12(MS+BA 2.0 mg/L+IBA 1.0 mg/L)子叶胚萌发率为 41.7%;单独使用 IBA 的配方能够在外植体上观察到根器官发生,配方 P9(MS+IBA 1.0 mg/L)根发生率为 23.3%(数据未列出),同时在该配方中观察到子叶胚上有体胚的形成(图 1-D)。

表 1 不同浓度 BA 和 IBA 组合对香樟子叶胚培养的影响

Table 1 Effect of plant hormones(BA + IBA)concentration combinations on the cotyledonary embryo culture of *C. camphora*

配方号 No. of medium	BA /mg · L ⁻¹	IBA /mg · L ⁻¹	外植体数 No. of explants	子叶胚萌发率 Germination frequency/ %	体胚诱导率 S. E. induction frequency/ %
P1	0	0	60	0	13.3
P2	0.5	0	60	0	26.7
P3	1.0	0	60	6.67	36.7
P4	2.0	0	60	11.7	23.3
P5	0	0.5	60	0	26.7
P6	0.5	0.5	60	3.33	40.0
P7	1.0	0.5	60	3.33	46.7
P8	2.0	0.5	60	23.3	30.0
P9	0	1.0	60	0	36.7
P10	0.5	1.0	60	0	23.3
P11	1.0	1.0	60	28.3	36.7
P12	2.0	1.0	60	41.7	13.3
P13	0	2.0	60	0	16.7
P14	0.5	2.0	60	0	30.0
P15	1.0	2.0	60	0	16.7
P16	2.0	2.0	60	3.33	30.0

该试验中,香樟子叶胚在所有测试配方都能诱导体胚发生,甚至在不添加任何植物激素的 MS 基本培养基中,体胚诱导率也有 13.3%。配方 P7(MS+BA 1.0 mg/L+IBA 0.5 mg/L),体胚诱导率最高,达 46.7%。较低浓度的植物激素组合处理子叶胚,体胚为直接发生(图 1-E),随着 BA 和 IBA 浓度的提高,外植体愈伤组织化程度相应增加,在一些配方中观察到,外植体在体胚形成同时形成愈伤组织。对该试验的结果进

行分析推断,虽然植物激素组合处理香樟子叶胚,可诱导其生芽萌发,但是作为外植体进行离体培养时,子叶胚是较易于被诱导出体胚的外植体类型。

2.3 香樟胚苗的获得

将萌发的子叶胚转入胚培苗生长培养基 MS+BA 1.5 mg/L+IBA 0.5 mg/L+GA 0.5 mg/L 上进行光照培养,3~5 d 后,可以观察到萌发子叶胚的芽由嫩黄转绿,形态也由细弱转健壮(图 1-F);在胚芽生长的过程,外植体上的胚根亦能够正常形成(图 1-F、G);试验中观察到,香樟胚培苗的生长,由于植物激素的作用,胚芽的顶端优势并不显著,可见侧芽同时抽生(图 1-H);随着胚培苗的生长,子叶逐渐褐化变黑,丧失培养价值,在无菌条件下,切除子叶,继续培养最终可得香樟完整胚培苗植株(图 1-I)。

3 讨论

以香樟子叶胚为外植体,初步建立了胚培养体系,并进一步讨论了不同植物激素组合对于香樟子叶胚培养萌发诱导和体胚发生的影响。在 IBA 和 BA 组合的配方中,观察到较高的子叶胚生芽萌发,正常芽器官继续培养可形成完整胚培苗;但不同植物激素组合对于香樟子叶胚培养的影响有所不同,在 2,4-D 和 BA 组合的配方中,可观察到较高的体胚诱导率,达 58.3%(数据未列出)。

香樟子叶胚是较为容易诱导体胚发生的外植体类型^[7],其体胚诱导率跟外植体发育时期相关。杜丽等^[7]曾在武汉 7 月中旬接种香樟子叶胚,其体胚诱导最高可达 76.7%;而在南阳 8 月中旬接种的香樟材料,最高诱导率只有 58.3%。虽然因地理位置不同,存在物候期的差异,但亦可从侧面得知,处于较为幼年阶段的香樟子叶胚更容易诱导体胚发生。如需建立香樟胚培养体系,建议接种时期可以适当靠后选择,以期获得更多胚培苗;因香樟是核果,为便于获得外植体,接种时间也并非越晚越好,尽量选择香樟核形成变硬之前采摘果实。

参考文献

- [1] 闫德祺,禹明甫,刘德成,等. 香樟耐寒性试验研究[J]. 安徽农业科学,2007(33):10598.
- [2] 吴金寿,胡又厘,林顺权,等. 芳樟离体快繁与离体保存试管苗再生植株培养[J]. 福建农业大学学报,2005(1):46-50.
- [3] 辜夕容,黄建国,杨庆. 香樟离体培养体系的构建初探[J]. 中国农学通报,2005(2):97-100.
- [4] 吴幼媚,王以红,蔡铃,等. 香樟优良无性系快繁技术的研究[J]. 广西农业生物科学,2006(1):60-64.
- [5] 武芸. 香樟愈伤组织的诱导和改良[J]. 湖北民族学院学报(自然科学版),2010(2):216-218.
- [6] 燕丽萍,王太明,夏阳,等. 提高香樟种子组培发芽率的技术措施[J]. 山东林业科技,2006(6):45-46.
- [7] 杜丽,叶要妹,包满珠. 香樟未成熟合子胚体胚发生及植株再生研究[J]. 林业科学,2006(6):37-39,145.

草莓 DHAR 基因密码子偏好性分析

刘万达¹, 张丙秀², 魏媛媛², 王禹¹, 董超², 朱延明³

(1. 黑龙江省农业科学院 园艺分院, 黑龙江 哈尔滨 150069; 2. 东北农业大学 园艺学院, 黑龙江 哈尔滨 150030;

3. 东北农业大学 生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:以草莓为试材, 运用 CHIPS、CUSP 和 CodonW 程序分析了草莓 DHAR 基因的密码子偏好性, 并与大肠杆菌和酵母的基因组密码子偏好性及 7 种植物的 DHAR 基因密码子偏好性进行了比较, 同时基于 DHAR 基因的密码子使用偏好性进行了系统聚类分析, 以期在作物遗传改良中为草莓 DHAR 基因选择合适的遗传转化受体及进行基因优化提供依据。结果表明: 草莓 DHAR 基因更适合导入苹果等双子叶植物中, 若要提高草莓 DHAR 基因在大肠杆菌或酵母中的表达水平, 还需进行密码子的优化。

关键词:草莓; DHAR; 密码子偏好性; 聚类分析; 基因表达

中图分类号:S 668.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)14-0092-06

植物组织中的抗坏血酸可为人类提供抗坏血酸源, 同时也是植物体自身代谢必不可少的物质, 抗坏血酸在

植物中作为某些重要酶类的辅因子, 参与抗氧化作用、光合作用、细胞的分裂、生长发育以及信号传递等生理过程^[1]。草莓(*Fragaria ananassa* Duch.) 属蔷薇科(Rosaceae)草莓属(*Fragaria*)多年生草本植物, 其果实香嫩多汁, 除含糖、蛋白质及钙、镁、铁、磷等矿物质较高外, 还含有丰富的抗坏血酸(35~75 mg/100g)。抗坏血酸还原酶(dehydroascorbate reductase, DHAR)在植物抗坏血酸再循环中发挥重要作用。植物细胞内, 抗坏血酸在抗坏血酸氧化酶(AAO)和抗坏血酸过氧化酶(APX)作用下被氧化成单脱氢抗坏血酸(MDHA)和脱氢抗坏血酸(DHA)^[2]。脱氢抗坏血酸还原酶(DHAR)以谷胱甘肽

第一作者简介:刘万达(1982-), 男, 黑龙江富裕人, 硕士, 助理研究员, 现主要从事寒地果树新品种选育与配套栽培技术的研究及示范推广工作。E-mail: haaslwd@126.com.

责任作者:朱延明(1955-), 男, 博士, 教授, 现主要从事作物耐盐碱与低温分子生物学及基因工程等教学与科研工作。E-mail: ymzhu2001@yahoo.com.cn.

基金项目:农业生物功能基因重点实验室开放课题资助项目(NS-GJ2012-05)。

收稿日期:2014-03-21

[8] 姜英林, 冯霄汉. 早熟西洋梨胚培养技术研究[J]. 北方果树, 2012(6): 5-8.

[9] 冯建荣, 吉燕, 樊新民, 等. 早熟蟠桃的胚培养[J]. 石河子大学学报(自然科学版), 2009(1): 23-26.

[10] 潘晓, 陈瑞丹. “淡丰后”梅胚培养影响因素的研究[J]. 北京林业大学学报, 2010(S2): 88-92.

[11] 石文芳, 郝瑞杰, 王史琴, 等. 4 个梅花品种的胚培养及愈伤组织诱导

研究[J]. 中国农学通报, 2012(10): 198-201.

[12] 刘会超, 贾文庆, 王坤. 牡丹胚培养及丛生苗继代培养研究[J]. 北方园艺, 2010(6): 172-174.

[13] 曾端香, 袁涛, 王莲英, 等. 两个牡丹杂交系种子胚培养技术研究[J]. 热带农业科学, 2011(3): 8-12.

[14] 王莹, 何桂梅, 韩丽晓. 紫斑牡丹胚培养及幼苗生长的研究[J]. 湖南农业科学, 2012(9): 103-106.

Research on Cotyledonary Embryo Culture of *Cinnamomum camphora* L.

DU Li

(School of Life Science and Technology, Nanyang Normal University, Nanyang, Henan 473000)

Abstract: The cotyledonary embryo of *C. camphora* as the explants were cultured on MS medium supplemented with the different plant hormones combinations at different concentrations, the effect of plant hormones on the cotyledonary embryo culture was studied. The results showed that the highest germination frequency was 41.7% by using MS+BA 2.0 mg/L+IBA 1.0 mg/L.

Key words: *Cinnamomum camphora* L.; cotyledonary embryo; tissue culture; germination; somatic embryogenesis