

陈永胜,邵志敏,李国瑞,等. 蓖麻花药愈伤组织诱导及防褐化研究[J]. 江苏农业科学,2014,42(3):39-40.

蓖麻花药愈伤组织诱导及防褐化研究

陈永胜^{1,2}, 邵志敏³, 李国瑞^{1,2}, 黄凤兰^{1,2}, 王文跃^{1,2}

(1. 内蒙古民族大学, 内蒙古通辽 028000; 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 028000;

3. 赤峰市敖汉旗新惠六中, 内蒙古赤峰 024300)

摘要:通过改变花药接种前的预处理、培养条件,建立了高效蓖麻花药愈伤诱导体系,结果表明:以通蓖 5 号为试材,4 ℃ 预处理 3 d,维生素 C 浸泡 1.5 h,培养基中添加活性炭 0.6 g/L、维生素 C 200 mg/L,暗培养 15 d 可获得高诱导率、低褐化率的蓖麻花药愈伤组织。

关键词:蓖麻;花药;诱导愈伤;防褐化

中图分类号: S565.604.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)03-0039-02

蓖麻(*Ricinus communis* L.)为多年或一年生双子叶植物,多用于航空航天、化工、医药等行业,应用价值高、市场潜力大^[1]。我国是蓖麻种植大国,但蓖麻新品种的开发一直局限于杂交、选择等传统育种方式,没有将现代育种技术应用于蓖麻育种^[2]。花药培养可获得蓖麻育种上广泛应用的纯系品种,但较低的蓖麻花药愈伤诱导率、高褐化率一直是限制蓖麻花药离体培养的主要限制性因素。外植体培养过程中褐化的原因很多,机理较为复杂,多认为是培养条件、细胞死亡或是细胞中的酚类物质变质等因素导致^[3]。本研究通过接种不同基因型、维生素 C 浸泡、改变培养条件(暗培养、添加防褐物),探索适宜蓖麻花药培养的最适条件,以期有效提高诱导率、降低褐化率,建立高效蓖麻花药愈伤诱导体系。

1 材料与方法

1.1 试验材料

哲蓖 4 号、通蓖 5 号、通蓖 9 号蓖麻花药,采自内蒙古民族大学试验农场。在温度较低、日照较弱时,取健壮无病的植株上花被尚未张开且呈淡黄色的花蕾。

1.2 试验方法

1.2.1 材料准备 本研究根据黄凤兰等研究^[4],取同时期、质优的花蕾,流水冲洗 30 min,75% 乙醇消毒 30 s,0.1% HgCl₂ 灭菌 2 min,无菌水冲洗 3~5 次,转移至铺有灭菌滤纸的培养皿。去除花丝,每瓶接种 1/3 个花蕾(约 230 个),封口后置于培养室培养。在以下的试验设计中,每个处理接种 5 瓶,3 次重复。基础培养基:MS+蔗糖 40 g/L+琼脂 7 g/L+脯氨酸 600 mg/L+酸性水解酪蛋白 600 mg/L+NAA 1.0 mg/L+ZT 3.0 mg/L,pH 值=6.0。

1.2.2 蓖麻花药诱导愈伤防褐化体系筛选

1.2.2.1 不同基因型及低温预处理愈伤诱导率和褐化率 取哲蓖 4 号、通蓖 5 号、通蓖 9 号花药,在相同培养条件下筛

选最佳花药愈伤诱导基因型,并统计花药低温预处理 1、3、5、7、9 d 时的诱导率及褐化率。

1.2.2.2 暗处理对愈伤组织诱导的影响 以通蓖 5 号花药为材料,接种后暗处理 0、5、10、15、20 d,统计花药愈伤诱导率及褐化率。

1.2.2.3 维生素 C 浸泡处理对愈伤组织诱导的影响 以通蓖 5 号花药为材料,置于 100 mg/L 维生素 C 中分别浸泡 0、0.5、1.0、1.5、2.0、4.0 h,统计蓖麻花药愈伤组织的诱导率与褐化率。

1.2.2.4 防褐附加物对愈伤组织诱导的影响 以通蓖 5 号花药为材料,分别接种于添加不同浓度活性炭(0、0.3、0.6、0.9、1.2 g/L)和维生素 C(0、100、150、200、250 mg/L)的培养基中,统计诱导率及褐化率。

2 结果与分析

2.1 不同基因型及低温预处理愈伤诱导率和褐化率

从表 1 可知,3 个基因型的愈伤诱导率均随着低温预处理时间的增加呈先增后减的趋势,褐化率均呈先减后增的趋势,且均在低温处理 3 d 时褐化率最低。褐化具有一定的传播性,故选择褐化率最低、诱导率最高的最适基因型。综合表 1 可知,愈伤组织的褐化率与基因型差异相关,通蓖 5 号在低温预处理 3 d 时褐化率最低(3.20%),且此时 3 个基因型中通蓖 5 号愈伤诱导率也最高(15.94%)。

表 1 低温预处理对愈伤诱导及褐化的影响

处理时间(d)	愈伤组织诱导率(%)			愈伤组织褐化率(%)		
	哲蓖 4 号	通蓖 5 号	通蓖 9 号	哲蓖 4 号	通蓖 5 号	通蓖 9 号
0	8.91	10.19	8.06	22.14	15.78	13.53
1	13.69	12.87	12.45	18.40	12.72	16.84
3	14.95	15.94	15.68	9.71	3.20	4.02
5	19.43	22.53	19.65	19.41	14.59	12.58
7	16.19	14.49	10.72	26.54	21.01	20.45
9	5.39	6.94	2.69	45.42	39.25	42.65

2.2 暗处理对愈伤组织诱导的影响

如表 2 所示,花药愈伤诱导率随暗处理时间的增加有所提高,愈伤褐化率随时间的增加先减后增,且在暗处理 15 d 时愈伤诱导率达到最大值、褐化率达到最小值。

收稿日期:2013-08-01

基金项目:国家自然科学基金(编号:31060194)。

作者简介:陈永胜(1971—),男,内蒙古通辽人,博士,教授,主要从事作物生物技术研究。Tel:(0475)8314624;E-mail:chenys-2012@hotmail.com。

表 2 暗处理对愈伤组织诱导的影响

时间(d)	诱导率(%)	褐化率(%)
0	12.76	53.10
5	15.92	21.28
10	16.73	13.70
15	23.55	0.98
20	21.35	73.53

2.3 维生素 C 浸泡处理对愈伤组织诱导的影响

如表 3 所示,维生素 C 浸泡处理显著提高了花药愈伤诱导率,褐化率随着时间的增加呈先减后增的趋势。浸泡 1.5 h 时诱导率最高(28.56%)、褐化率最低(7.42%)。

2.4 防褐附加物对愈伤组织诱导的影响

由表 4 可知,随着活性炭量的增加,诱导率呈先升后降的趋势,褐化率呈先降后升的趋势,且浓度为 0.6 g/L 时诱导率最高(32.83%)、褐化率最低(11.28%)。培养基中添加维生素 C 后,诱导率及褐化率与添加活性炭的变化几乎一致,且

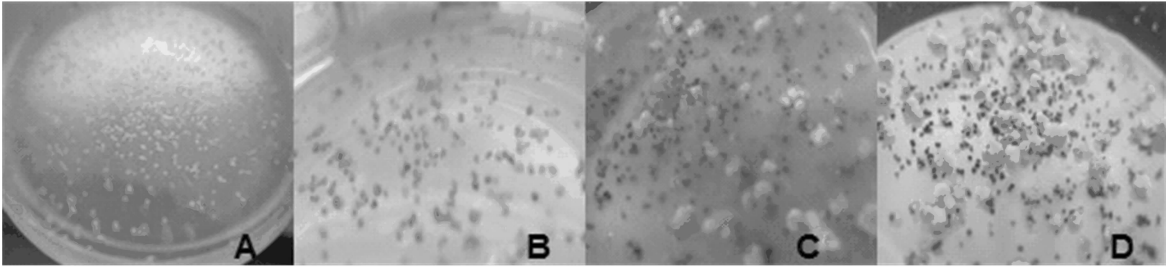
表 3 维生素 C 浸泡处理对愈伤组织诱导的影响

浸泡时间(h)	诱导率(%)	褐化率(%)
0	19.04	34.44
0.5	22.42	24.31
1.0	25.30	14.32
1.5	28.56	7.42
2.0	23.13	11.74
4.0	25.22	14.58

表 4 防褐附加物对愈伤诱导及褐化的影响

活性炭(g/L)	诱导率(%)	褐化率(%)	维生素 C(mg/L)	诱导率(%)	褐化率(%)
0	15.98	31.30	0	11.54	26.53
0.3	25.89	23.55	100	17.40	22.40
0.6	32.83	11.28	150	23.23	10.66
0.9	12.22	15.63	200	27.32	8.21
1.2	9.92	38.71	250	8.46	16.95

浓度为 200 mg/L 时获得最大花药愈伤诱导率(27.32%)、最小褐化率(8.21%)。蓖麻花药愈伤诱导过程见图 1。



A—花药接种; B—愈伤诱导过程; C—部分褐化的花药愈伤; D—防褐化筛选结果

图1 蓖麻花药愈伤诱导

3 讨论

组织培养过程中,外植体可能由于内分泌紊乱等原因分泌出酚等不利于组织生长、乃至影响存活的有害成分,导致组织褐化或死亡。故需在不影响愈伤诱导率的前提下,通过改变培养环境等因素建立高质量愈伤诱导体系。组织离体培养过程中不同基因型愈伤诱导的能力存在差异,有些组织较难形成愈伤^[5]。本研究分析了通蓖 5 号、哲蓖 4 号、通蓖 9 号的愈伤诱导差异,结果与邵志敏等所分析的结果^[6]一致,通蓖 5 号的诱导率及防褐能力均要高于其他 2 个品种,且 4 ℃遇冷可以有效地降低蓖麻花药愈伤的褐化率。

本研究又通过筛选不同的暗处理和维生素 C 浸泡时间、添加不同浓度的防褐物(活性炭、维生素 C),有效地提高了诱导率、降低了褐化率,成功地建立了高效蓖麻花药愈伤诱导体系。这与很多研究成果均不谋而合。雷攀登等发现 10 ℃下避光离体培养茶树腋芽 48 h 时褐变率最低^[7]。张文娥等使用维生素 C 5 g/L 浸泡碧桃茎段 30 min 能有效抑制碧桃褐化^[8],这与本研究采用维生素 C 浸泡的效果相近。吕宗友等发现适当添加活性炭、维生素 C 均能不同程度地提高愈伤诱导率和降低褐化率^[9]。韦凤娟等发现添加维生素 C、PVP、活性炭可有效控制外植体褐化现象^[10]。郑颖等发现添加活性炭 3 g/L 可以将台湾桫欂木组织培养的褐化率控制在 36.7%~45.6%^[11]。蓖麻花药离体培养的影响因素很多,与其他植物花药或是其余部位的诱导率相比还较低,还需要进一步完善,以建立高效蓖麻花药再生体系,为培育高产高效的蓖麻良种

奠定基础。

参考文献:

[1] 郑 鹭,祁建民,陈绍军,等. 蓖麻遗传育种进展及其在生物能源与医药综合利用潜力[J]. 中国农学通报,2006,22(9):109-113.

[2] 曾祥艳,王东雪,马锦林. 我国蓖麻良种选育研究现状及发展策略[J]. 广西热带农业,2010,131(6):27-29.

[3] 杨亚萍,郑新强. 茶树组织培养中的褐化控制研究[J]. 茶叶,2013,39(1):3-7.

[4] 黄凤兰,萨日娜,孟凡娟,等. 蓖麻花药愈伤组织诱导的研究[J]. 作物杂志,2009(6):59-63.

[5] 宋钦虎,郭新梅,裴玉贺,等. 抑制玉米幼胚愈伤组织褐化的研究[J]. 农学报,2012,2(5):24-28.

[6] 邵志敏,陈永胜,黄凤兰,等. 低温预处理与光照条件对蓖麻花药愈伤组织诱导的影响[J]. 内蒙古民族大学学报:自然科学版,2012,27(2):189-193.

[7] 雷攀登,吴 琼,徐奕鼎,等. 茶树腋芽离体培养中的褐化控制研究[J]. 中国农学通报,2012,28(7):190-193.

[8] 张文娥,潘学军,杨仕国,等. 碧桃组织培养中褐化及其抑制研究[J]. 贵州农业科学,2009,37(1):11-12.

[9] 吕宗友,苏衍普,赵国琦,等. 不同防褐化措施对苏丹草愈伤诱导以及抗褐化的效果研究[J]. 草业学报,2011,20(3):174-181.

[10] 韦凤娟,廖克波,杨 梅,等. 擎天树组培外植体消毒与褐化抑制的研究[J]. 中国农学通报,2011,27(31):18-22.

[11] 郑 颖,秦红玫,黎云祥. 台湾桫欂木组织培养中污染和褐化的防止[J]. 江苏农业科学,2013,41(2):64-65,117.