

陈永胜,邵志敏,李国瑞,等. 蓖麻花药愈伤组织增殖及防褐化研究[J]. 江苏农业科学,2014,42(4):46-48.

蓖麻花药愈伤组织增殖及防褐化研究

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. 内蒙古自治区赤峰市敖汉旗新惠六中, 内蒙古赤峰 024300)

摘要:褐化很大程度上限制了蓖麻花药增殖培养研究, 本研究通过改变蓖麻花药愈伤组织的培养基成分、添加防褐剂来建立高效增殖体系, 最终确定蓖麻花药愈伤增殖最佳培养基为 1/2MS + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 7 g/L + NAA 0.3 mg/L + ZT 5.0 mg/L + 脯氨酸 750 mg/L + 酸性水解酪蛋白 750 mg/L + 6-BA 2.0 mg/L + 维生素 C 400 mg/L + 活性炭 0.6 mg/L, pH 值 = 5.8。

关键词:蓖麻; 花药; 愈伤组织增殖; 防褐化

中图分类号: S565.604.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)04-0046-02

蓖麻(*Ricinus communis* L.) 为一年生或多年生双子叶植物, 其副产品多用于航空航天、化工、医药、农业等, 市场潜力较大^[1]。我国是蓖麻种植第二大国, 但蓖麻新品种的开发一直处于落后水平, 近年来才将现代生物技术应用于蓖麻育种^[2-3]。蓖麻花药立体培养所得的植株都是纯系, 自交后代不发生性状分离, 在育种上有很高的应用价值。国内蓖麻花药培养研究起步较晚, 且褐化一直是花药培养过程中的难题, 主要表现外植体增殖、诱导初分化或是再分化过程中, 自身组织会向培养基释放褐色物质导致培养基逐渐变褐, 外植体也随之死亡^[4-5]。褐化很大程度上限制了蓖麻花药离体培养的效率, 除了本身基因型的差异外, 可添加防褐物、调整培养基成分、改变培养环境等来防止褐化^[6-7]。本研究通过改变蓖麻花药愈伤增殖过程中培养基条件、添加褐化抑制剂, 以期有效降低褐化率, 建立高质量的蓖麻花药培养体系。

1 材料与方法

1.1 试验材料

通蓖 5 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, 取健壮无病植株上尚未张开且呈淡黄色的蓖麻花蕾。

1.2 试验方法

1.2.1 蓖麻花药愈伤组织诱导 蓖麻花药愈伤组织诱导参照黄凤兰等研究成果^[8-10]。4℃预处理花蕾 5 d, 流水冲洗 30 min, 无菌条件下用 75% 乙醇消毒 30 s, HgCl₂ 消毒 2 min, 无菌水冲洗 5 次, 最后转至铺有滤纸的培养皿中。愈伤诱导培养基为: MS + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 7 g/L + 脯氨酸 750 mg/L + NAA 0.9 mg/L + 6-BA 1.5 mg/L + 酸性水解酪蛋白 750 mg/L + 抗坏血酸 100 mg/L, pH 值 = 5.8。将 3/5 个花蕾花药均匀分至培养基表面进行愈伤组织诱导, 约 230 个/瓶。

1.2.2 愈伤组织增殖防褐化筛选 筛选“1.2.1”节结果中直径为 3 mm 左右、淡绿色致密型的花药愈伤组织, 进行防褐化筛选。每瓶培养基接种愈伤 23 粒, 2 次重复, 15 d 后统计褐化率、增殖率。(1) 无机盐浓度筛选: 筛选培养基中的无机盐浓度 (MS、1/2 MS、1/4 MS、1/8 MS、1/16MS), 建立适宜的愈伤组织增殖无机盐环境。(2) PGR 条件筛选: 筛选培养基中最佳激素 NAA (0.1、0.3、0.5 mg/L)、ZT (3.0、5.0、7.0 mg/L)、6-BA (0.1、0.2、0.3 mg/L) 浓度, 以提高愈伤增殖的效率。(3) 维生素 C 浓度筛选: 添加不同浓度的防褐添加剂维生素 C (0、200、400、600、800 mg/L), 筛选最适维生素 C 浓度。(4) 活性炭浓度筛选: 添加不同浓度的防褐添加剂活性炭 (0、0.3、0.6、0.9、1.2 g/L), 筛选最适活性炭浓度。

1.2.3 统计方法

1.2.3.1 愈伤组织增殖率

愈伤组织增殖率 = $\frac{(m_3 - m_2) - (m_1 - m_0)}{(m_1 - m_0)} \times 100\%$ 。式中: m_0 为继代前培养基与培养容器质量; m_1 为继代后培养基、培养容器与愈伤组织质量; m_2 为第 2 次继代前培养基与培养容器质量; m_3 为第 2 次继代后培养基、培养容器与愈伤组织质量。

1.2.3.2 愈伤组织褐化程度统计 依次用“+”“++”“+++”“++++”“+++++”表示褐化程度, 其中“+++++”褐化最严重; 依次用“*”“**”“***”“****”调节褐化程度。

2 结果与分析

2.1 花药愈伤组织诱导结果

花药愈伤组织诱导结果如图 1 所示, 其中多为浅绿色的致密型愈伤, 且褐化不明显。选取其中直径为 3 mm 左右的愈伤组织进行增殖培养。

2.2 愈伤组织增殖防褐化筛选结果

2.2.1 无机盐浓度筛选结果 由表 1 可知, 当无机盐浓度为 1/2MS 时, 愈伤增殖率高达 29.06%; 在各个无机盐浓度下, 愈伤组织的褐化率变化不大。

2.2.2 PGR 条件筛选结果 由表 2 可知, 处理 5 的愈伤组织的增殖率高达 33.99%, 呈嫩绿色, 颗粒状突起较多, 质地致密, 状态保持最好; 在不同激素组合下褐化程度没有显著差

收稿日期: 2013-08-02

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。



图1 花药愈伤组织诱导

表 1 无机盐浓度筛选结果

编号	无机盐浓度	增殖率 (%)	褐化程度
1	MS	23.42	++
2	1/2 MS	29.06	++
3	1/4 MS	21.40	++
4	1/8 MS	17.40	++
5	1/16MS	9.52	+++

表 2 PGR 条件筛选结果

编号	激素处理(mg/L)			增殖率 (%)	褐化程度
	NAA	ZT	6-BA		
1	0.1	3.0	0.0	17.11	++*
2	0.1	5.0	1.0	15.31	+++
3	0.1	7.0	2.0	17.95	+++*
4	0.3	3.0	1.0	20.85	+++*
5	0.3	5.0	2.0	33.99	+++*
6	0.3	7.0	0.0	27.76	++
7	0.5	3.0	2.0	31.42	+++*
8	0.5	5.0	0.0	26.03	+++*
9	0.5	7.0	1.0	27.98	+++*

异。所以最佳蓖麻花药愈伤增殖 PGR 组合为 NAA 0.3 mg/L + ZT 5.0 mg/L + 6-BA 2.0 mg/L。

2.2.3 维生素 C 浓度筛选结果 由表 3 可知,随着维生素 C 浓度的增加,愈伤组织的增殖率变化不明显;其中处理 2 和处理 3 的褐化程度明显低于其他处理,且处理 3 的增殖率高达 25.90%。所以添加维生素 C 400 mg/L 时可获得高增殖率、低褐化率的优质蓖麻花药愈伤组织。

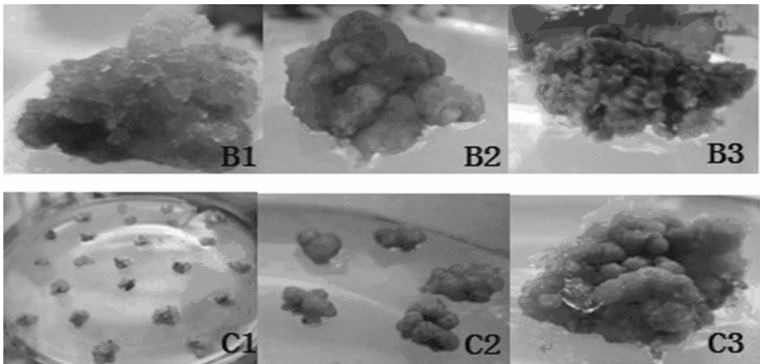
2.2.4 活性炭浓度筛选结果 由表 4 可知,随着活性炭浓度的增加,愈伤增殖率呈下降的趋势;添加 0.6 mg/L 活性炭时防褐化效果最佳。所以添加活性炭 0.6 mg/L 时可获得高质量的蓖麻花药愈伤组织。花药培养防褐化效果见图 2。

表 3 维生素 C 浓度筛选结果

编号	维生素 C (mg/L)	增殖率 (%)	褐化程度
1	0	29.06	+++
2	200	14.65	**
3	400	25.90	**
4	600	26.31	++
5	800	27.49	+

表 4 活性炭浓度筛选结果

编号	活性炭 (mg/L)	增殖率 (%)	褐化程度
1	0	18.93	+++
2	0.3	11.85	++
3	0.6	5.85	*
4	0.9	1.02	+++
5	1.2	3.32	+++*



B1、B2、B3为愈逐步褐化结果;C1、C2、C3为防褐化结果

图2 花药培养防褐化效果

3 结论与讨论

褐化是蓖麻花药培养的主要限制因素,最初愈伤为棕黄色,转为深褐色后停止生长,最后逐渐死亡。本研究通过改变愈伤组织的培养基成分、添加防褐剂来建立高效蓖麻花药愈伤增殖体系,当添加 400 mg/L 维生素 C、0.6 g/L 活性炭时对增殖培养过程中的愈伤组织起到了积极的防褐作用。最终确定最佳培养基组合为 1/2MS + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 7 g/L + 脯氨酸 750 mg/L + 酸性水解酪蛋白 750 mg/L + NAA 0.3 mg/L + ZT 5.0 mg/L + 6-BA 2.0 mg/L + 维生素 C 400 mg/L + 活性炭 0.6 mg/L,pH 值=5.8。

维生素 C 可作为抗氧化剂阻止褐变的发生^[11],但目前维生素 C 降低愈伤组织褐化率的机理尚不明确,有待进一步研究。近年来对活性炭促进花药离体培养的报道较多^[12-13],当花药离体培养时,由于新陈代謝紊乱,会产生多种不利于生长或是有毒的酚类等物质,活性炭具有较强的吸附特性且无选择性,从而有利于花药培养进程^[14]。但笔者发现,活性炭在一定浓度范围内降低愈伤组织的褐化程度;当超过一定浓度后,反而不利于愈伤组织生长和防褐化,可能是由于吸附了培养基中的生长调节物质,其中铁盐、维生素等与花药培养与分化密切相关。由于活性炭吸附的双重性,所以其调控花药愈伤生长及防褐化的作用也是双面的,更应深入研究其最合

林贵兵,万德光,严铸云,等. 基于 PCR-DGGE 的中江丹参轮作期间土壤细菌遗传多样性变化特征[J]. 江苏农业科学,2014,42(4):48-51.

基于 PCR-DGGE 的中江丹参轮作期间土壤细菌遗传多样性变化特征

林贵兵^{1,2},万德光²,严铸云²,杨新杰³,刘涛⁴

(1. 江西中医药大学药学院,江西南昌 330004;2. 成都中医药大学中药材标准化教育部重点实验室,四川成都 610075;

3. 陕西中医学院,陕西咸阳 712046;4. 成都大学,四川成都 610106)

摘要:为了解四川中江丹参轮作期间土壤细菌遗传多样性变化特征,分离提取土壤微生物 DNA,以细菌通用引物 PCR 扩增,DGGE 分离,切割条带、回收并测序,在 GenBank 中查得菌种。结果表明,中江丹参轮作期间,土壤细菌主要群落包括:*Alpha proteobacterium*,*Sphingomonas* sp.,Uncultured bacterium isolate LH2-12,Uncultured bacterium isolate DGGE gel band h,Uncultured *Arthrobacter* sp.,Uncultured bacterium isolate DGGE gel band a1-11,Uncultured *Sphingomonas* sp.。休种 1 年与当年种植丹参土壤细菌多样性相似,而与休种 3 年土壤细菌种群结构有明显差异;休种第 2 年属于过渡。说明中江丹参轮作期休种为其土壤细菌群落遗传多样性逐渐恢复平衡过程;且休地第 2 年是关键时期,与笔者前期采用培养法及土壤真菌群落结构相关的研究结果一致。

关键词:丹参土壤细菌;PCR-DGGE;遗传多样性;变化特征

中图分类号:S567.5⁺30.1;S154.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)04-0048-04

丹参为唇形科植物丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bge.)的干燥根及根茎,具有祛瘀止痛、活血调经、养心除烦的功效。在中药材生产质量管理规范(GAP)实施过程中,中药材种植快速发展;但也出现了一些严重的问题,如连作障碍。丹参忌连

收稿日期:2013-08-20

基金项目:国家自然科学基金(编号:81173493);国家科技支撑计划(编号:2006BAI09B03-4)。

作者简介:林贵兵(1981—),男,四川自贡人,博士,讲师,研究方向为中药资源可持续利用与药材质量标准化。Tel:(0791)87118997;E-mail:linguibing897@gmail.com。

通信作者:严铸云,博士。E-mail:cdtemyan@126.com。

适的作用浓度,以建立更加快捷的蓖麻花药愈伤增殖培养方法。

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势[J]. 中国农学通报,2006,22(9):109-113.
- [2]陈永胜,王永佳,王莹,等. 蓖麻毒蛋白 A 链基因 RNAi 转化研究[J]. 西北植物学报,2013,33(1):39-42.
- [3]王文跃,李国瑞,黄凤兰,等. 蓖麻茎秆 cDNA-AFLP 反应体系的建立[J]. 华北农学报,2013,28(2):86-90.
- [4]代建丽,宋婵婵,徐晨,等. 库拉索芦荟组织培养褐化现象的抑制研究[J]. 安徽农学通报,2013,19(6):23-24.
- [5]郑颖,秦红玫,黎云祥. 台湾椴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.
- [6]徐耀华,杨春华,刘晓波,等. 扁穗牛鞭草组织培养中褐化控制技术初探[J]. 草业科学,2013,30(2):212-217.
- [7]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.
- [8]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,连作导致病虫害严重,其质量和产量明显下降^[1]。土壤生物环境恶化是引起作物连作障碍形成的主要机制之一^[2]。研究表明,土壤微生物群落结构多样性与土传病害、连作障碍有着密切的关系^[3];对地黄^[4]、麦冬^[5]和苍术^[6]研究认为,土壤微生物群落失衡是引起连作障碍的主要因素之一。在前期的研究中,通过纯培养法试验发现,种植丹参的土壤中各类微生物数量与群落结构发生变化,重新建立土壤生态系统平衡;栽培丹参后土壤微生物群落自然恢复间隔至少为 2 年^[7]。前期的研究方法主要是通过培养法研究土壤微生物群落,但此法只能对土壤中的可培养优势微生物进行分析,而土壤中有绝大部分是不可培养微生物,因此培养法不能全面

作物杂志,2009(6):59-63,后插 1.

- [9]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.
- [10]李国瑞,黄凤兰,王文跃,等. 蓖麻花药愈伤组织诱导条件优化[J]. 内蒙古民族大学学报:自然科学版,2012,27(6):670-673.
- [11]刘强,张春庆,巩东营. 玉米花药培养中影响褐变的几个因素的初步研究[J]. 玉米科学,2005,13(1):39-40,43.
- [12]钱春艳,曹有龙,段安安,等. 枸杞花药培养若干影响因素的研究[J]. 江苏农业科学,2010(6):76-78.
- [13]Gland A,Lichter R,Schweiger H G. Genetic and exogenous factors affecting embryogenesis in isolated microspore cultures of *Brassica napus* L. [J]. Journal of Plant Physiology,1988,132(5):613-617.
- [14]Johansson L B,Calleberg E,Gedin A. Correlations between activated charcoal,Fe-EDTA and other organic media ingredients in cultured anthers of *Anemone canadensis* [J]. Physiologia Plantarum,1990,80(2):243-247.