

孙永健,于美一,徐智强,等. 杜仲胚乳诱导产生三倍体愈伤组织的研究[J]. 江苏农业科学,2015,43(9):90-92.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.09.025

杜仲胚乳诱导产生三倍体愈伤组织的研究

孙永健¹, 于美一¹, 徐智强¹, 孙 宁²

(1. 天津天狮学院生物与食品工程学院,天津 301700; 2. 天津农学院农学系,天津 300384)

摘要:探讨了水、赤霉素 GA₃ 对杜仲完整种子与剥离胚乳产生的愈伤组织的作用,设置了不同激素种类及浓度配比的培养基并在培养基中添加了酵母提取物与水解酪蛋白,研究了激素、外源有机添加物对胚乳愈伤组织的诱导与改造的作用。结果表明,最佳的前处理方式为:800 mg/L 的赤霉素浸泡完整种子 24 h;最佳的愈伤组织诱导培养基为:MS + 琼脂 6.3 g/L + 蔗糖 30 g/L + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 1.0 mg/L;对愈伤组织继代与改造有较好促进作用的外源有机添加物为:酵母提取物。

关键词:杜仲;胚乳培养;三倍体愈伤组织;赤霉素

中图分类号: Q943.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)09-0090-03

杜仲 (*Eucommia ulmoides* Oliv.) 别称思仙,主产于河南、四川、江苏等地,为杜仲科杜仲属植物,且杜仲科仅 1 属 1 种,为我国特有的一种名贵药用植物,资源稀少,具有补肾壮腰、抑制肿瘤生长、双向调节血压等作用^[1-3];它也是温带最具开发利用前景的胶源植物,在它的叶片、树皮、根皮和果皮中都含有杜仲胶,经济价值很高^[4-6]。杜仲为二倍体 (2n = 2x = 34) 落叶乔木,以种子繁殖为主,以收获树皮、树叶等营养体为主要栽培目的。杜仲种子中的胚乳是双受精的产物,因此是三倍体,鉴于多倍体植物具有器官巨大、抗逆性强和生化物质含量高特点,结合杜仲的药用和经济价值,多倍体育种应成为杜仲遗传改良的主要途径之一^[7-9]。因此,通过组织培养的方法,诱导杜仲胚乳产生三倍体愈伤组织,可以为后续再分化获得三倍体植株提供物质基础,而且利用三倍体植株细胞体积增大的特点可以提高杜仲单株产胶量或细胞次生代谢产物含量^[10-14]。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

杜仲成熟种子采自天津农学院。

1.2 试验方法

1.2.1 材料的前处理 将新采收的成熟饱满的杜仲翅果晾干,剥去果皮,取出种子,洗净。做以下 5 种处理:A:将种子沿背腹线切成两半,剔除其中种胚,留胚乳备用;B:按上述方法取得胚乳,用无菌水浸泡 24 h;C:按上述方法取得胚乳,置于 GA₃ 中浸泡 24 h (设置 GA₃ 的浓度分别为 C₁ 处理:

400 mg/L、C₂ 处理:600 mg/L、C₃ 处理:800 mg/L、C₄ 处理:1 000 mg/L);D:将完整的种子置于无菌水中浸泡 24 h;E:将完整的种子置于 GA₃ 中浸泡 24 h (设置 GA₃ 的浓度分别为 E₁ 处理:400 mg/L、E₂ 处理:600 mg/L、E₃ 处理:800 mg/L、E₄ 处理:1 000 mg/L)。将处理好的材料,用 70% 乙醇浸泡 15 s,无菌水冲洗 3 次,再用 0.1% HgCl₂ 处理 6 min,无菌水冲洗 5 次后备用。

1.2.2 愈伤组织的诱导 将灭菌后的胚乳置于无菌的培养皿中,在超净台中切除每扇胚乳子叶端的 3/4,将占种子全长 1/4 的胚根端胚乳接种到愈伤组织诱导培养基中;灭好菌的完整种子,先在无菌的环境下剥离种胚,取得胚乳,再按上述方法切割后接种。愈伤组织诱导培养基见表 1。

表 1 愈伤组织诱导培养基

处理	6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)	2,4-D (mg/L)
F1	1.0	0.5	0
F2	1.0	1.0	0
F3	1.0	0.5	0.5
F4	1.0	1.0	0.5

注:培养基为 MS + 琼脂 6.3 g/L + 蔗糖 30 g/L。

1.2.3 愈伤组织的继代与改造 将诱导产生的愈伤组织切下,接种到继代培养基中,继代培养基配方见表 2。

表 2 愈伤组织继代培养基

处理	酵母提取物 (mg/L)	水解酪蛋白 (mg/L)
G1	0	0
G2	800	0
G3	0	800

注:培养基为 MS + ZT 0.8 mg/L + NAA 0.8 mg/L + 琼脂 6.3 g/L + 蔗糖 30 g/L。

2 结果与分析

2.1 取材部位与前处理方法对愈伤组织诱导的影响

经不同方式处理后的材料接种于诱导培养基 2 周后,大

收稿日期:2014-08-28

基金项目:天津市滨海新区农业新品种新技术引进推广项目;天津天狮学院科研项目(编号:K12003)。

作者简介:孙永健(1983—),男,天津人,硕士,讲师,主要从事生物化学与植物细胞工程方面的教学与科研工作。E-mail:sunyongjian2008@126.com。

通信作者:孙 宁,硕士,高级实验师,主要从事植物生物技术方面的教学与科研工作。E-mail:snng79@sina.com。

部分胚乳开始膨大(图1)。为避免褐化现象加重,将膨大的部分切下,继续接种于相同成分的培养基中,再经35 d左右的培养,部分膨大的胚乳会形成疏松白色的愈伤组织(图2)。统计愈伤组织形成的数量发现,水和 GA_3 的浸泡对于胚乳脱分化形成愈伤组织具有促进作用,且 GA_3 的促进作用优于水,愈伤组织诱导率最高可达20.2%; GA_3 的促进作用会随着浓度的增大而增大,浓度为800 mg/L时,愈伤组织的诱导效果最好,当浓度达到1 000 mg/L时 GA_3 的促进作用又开始下降(表3、图3);完整种子中的胚乳相对于剥离出来的胚乳,脱分化形成愈伤组织的能力更强(表3)。

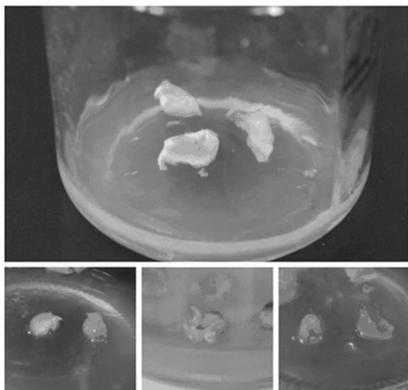


图1 接种2周后开始膨大的胚乳

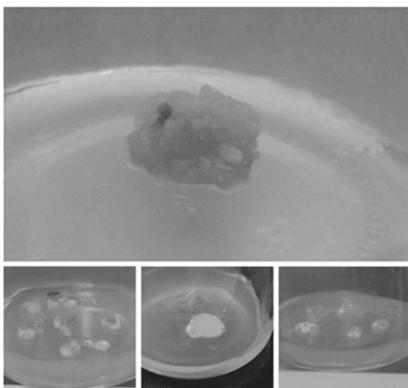


图2 由胚乳诱导产生的初生愈伤组织

表3 不同取材部位与前处理方法对愈伤组织诱导的影响

处理	接种胚乳数(个)	形成愈伤组织数(个)	诱导率(%)
A	105	0	0.0
B	111	0	0.0
C1	107	2	1.9
C2	107	3	2.8
C3	117	7	6.0
C4	109	5	4.6
D	110	12	10.9
E1	105	13	12.4
E2	110	16	14.5
E3	109	22	20.2
E4	109	19	17.4

2.2 培养基对愈伤组织诱导的影响

研究发现,在不添加激素的培养基中,胚乳虽然可以膨

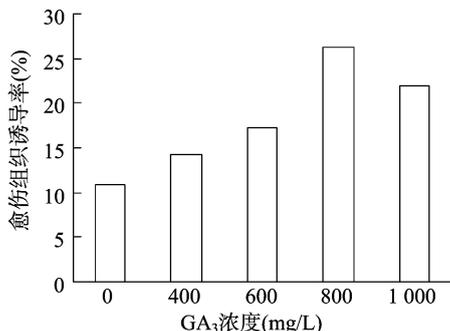


图3 不同浓度赤霉素(GA_3)对杜仲胚乳诱导愈伤组织的影响

大,但是不能形成愈伤组织。因此,向培养基中添加了3种不同浓度配比的激素。统计愈伤组织形成的数量发现,NAA在一定浓度范围内,具有促进杜仲胚乳形成愈伤组织的作用;虽然2,4-D在很多植物中具有促进愈伤组织形成的作用,但是在杜仲胚乳形成愈伤组织的过程中,2,4-D起了抑制作用,且这种抑制作用会随着培养基中其他激素浓度的增大而增大;诱导杜仲胚乳产生愈伤组织的最佳激素种类及浓度配比为:6-BA 1.0 mg/L + NAA 1.0 mg/L,诱导率最高可达11.4%(表4)。

表4 不同培养基对愈伤组织诱导的影响

处理	接种胚乳数(个)	形成愈伤组织数(个)	诱导率(%)
F1	294	27	9.2
F2	307	35	11.4
F3	296	21	7.1
F4	302	16	5.3

2.3 外源添加物对愈伤组织生长的作用

经诱导后初生的疏松白色的愈伤组织生长慢且不具备分化能力,需将其转移到继代培养基中进行继代培养。在继代1~2次之后,部分会转变成绿色且质地紧密、具有分化能力的愈伤组织(图4、图5),未转变的愈伤组织继续在相同的培养基中进行继代,会逐步转变。研究发现,激素种类及浓度配比为ZT 0.8 mg/L + NAA 0.8 mg/L时,对愈伤组织的继代与改造效果最佳;适当添加外源有机物对愈伤组织的改造具有促进作用,其中酵母提取物(YE)的促进效果最佳,愈伤组织改造率可达41.5%,新生的愈伤组织颜色绿且质地紧密,经2周继代培养后,增殖效果也较好(表5、图4)。

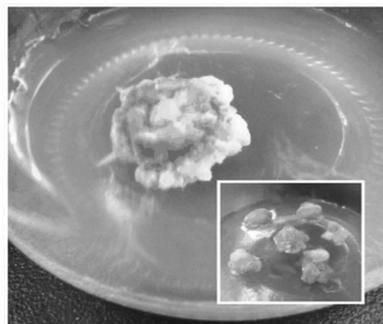


图4 添加酵母提取物的培养基中具分化潜能的愈伤组织

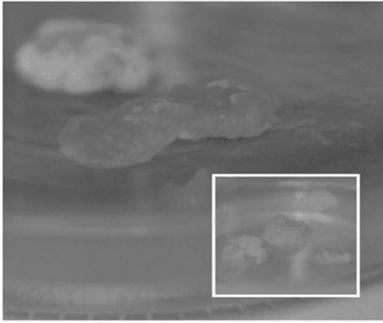


图5 添加水解酪蛋白的培养基中具分化潜能的愈伤组织

3 讨论

Srivastava^[8]在罗氏核实木胚乳培养研究中指出,利用成熟胚乳培养诱导愈伤组织时,必须有原位胚的参与或用 GA₃ 进行处理。本研究支持了 Srivastava 这一观点,水的浸泡对完整种子中的胚乳诱导愈伤组织有促进作用而对剥离的胚乳没有作用,说明了完整种子经水浸泡后休眠被打破,种子中的胚被活化,从而影响胚乳的诱导。而 GA₃ 具有打破种子休眠、促进发芽的作用,因此会对胚乳产生类似种胚在萌发过程中对其产生的影响,从而促进了胚乳愈伤组织的诱导。但 GA₃

表5 不同外源添加物对愈伤组织生长的作用

处理	接种愈伤组织数 (个)	愈伤组织变化数 (个)	改造率 (%)	愈伤组织质地	愈伤组织颜色	继代2周后愈伤 组织大小
G1	138	26	18.8	稍疏松	浅绿色	较大
G2	147	61	41.5	紧密	绿色	较大
G3	133	43	32.3	较紧密	浅绿色	大

为植物生长调节剂,须在一定浓度范围内使用,浓度过高,反而会对胚乳诱导愈伤组织产生抑制作用。

2,4-D 作为植物生长调节剂,可以促进植物组织的膨大,但它对胚乳愈伤组织诱导的抑制作用可能是由于其可以干扰植物体内激素的平衡,破坏核酸和蛋白质的代谢,从而抑制胚乳向生长旺盛的愈伤组织进行脱分化。在培养基中添加酵母提取物、水解酪蛋白等外源有机物,可以在继代培养时有效促进愈伤组织的改造与增殖,这是由于它们富含多肽、氨基酸、核苷酸、维生素、微量元素等营养成分,且比例协调,尤其是其所含的一些生长因子成分,可以对愈伤组织的生长、改造、再分化等具有较好的促进作用^[19]。

参考文献:

- [1]冉懋雄. 杜仲[M]. 北京:科学技术出版社,2002.
- [2]张康健,赵德义,董娟娥. 风靡全球的杜仲健康新理念[M]. 杨凌:西北农林科技大学出版社,2005.
- [3]赵玉英,耿 权,程铁民. 杜仲化学成分研究概况[J]. 天然产物研究与开发,1995,7(3):46-52.
- [4]林春玲,岳 红,瞿 润. 形状记忆材料杜仲胶的特性及研究进展[J]. 材料导报,2007,11(增刊3):374-376.
- [5]Hayman E P, Yokoyama H, Bai K Z. Stimulation of plant growth and gutta content in *Eucommia ulmoides* Oliv. by 2-diethylaminoethyl-3,4-dichloro-rophepylther[J]. Plant Growth Regulation, 1994, 14: 78-82.
- [6]华会明,尹宏权,李宝强,等. 杜仲化学成分的研究[J]. 分子植物育种,2003,1(增刊1):801-803.
- [7]李俊红. 杜仲组织培养再生体系的优化与多倍体诱导[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2008.
- [8]朱登云,田慧琴,蒋金火,等. 杜仲成熟干胚乳愈伤组织的诱导和植株再生[J]. 农业生物技术学报,1998,6(4):3-8.
- [9]Thomas T D, Bhatnagar A K, Bhojwani S S. Production of triploid plants of mulberry (*Morus alba* L.) by endosperm culture[J]. Plant Cell Reports, 2000, 19(4):395-399.
- [10]黄 勇. 杜仲组织培养的初步研究[D]. 武汉:华中师范大学,2003.
- [11]李 琰,张朝红,崔宏安,等. 杜仲愈伤组织诱导的研究[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2003,31(5):153-157.
- [12]李 琰,张朝红,崔宏安. 激素对杜仲幼茎愈伤组织诱导及生长的影响[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2004,32(1):57-60.
- [13]Zhang H F, Guo B L, Zhang C H, et al. Induction and identification of tetraploids in *Eucommia ulmoides* Oliv. [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2008, 35(7):1047-1052.
- [14]张海凤,郑 辉,陈新华,等. 药用植物多倍体研究进展[J]. 河北林果研究,2008,23(2):169-172,175.
- [15]余桂红,张 旭,孙晓波,等. 大麦青啤4号幼胚愈伤组织的诱导及植株的高频再生[J]. 江苏农业学报,2013,29(5):953-956.
- [16]曾爱松,宋立晓,高 兵,等. 结球甘蓝小孢子胚植株再生体系的优化[J]. 江苏农业学报,2013,29(1):228-230.
- [17]石 虎,杨永智,周 云,等. 马铃薯新品种青薯9号高效再生体系的建立[J]. 江苏农业科学,2013,41(5):14-19.
- [18]杜敏华,柯 涛,韩雪梅,等. 连香树下胚轴高频离体再生体系的建立[J]. 江苏农业科学,2013,41(10):47-49.
- [19]张红晓,经剑颖. 木本植物组织培养技术研究进展[J]. 河南科技大学学报:农学版,2003,23(3):66-69.