

孙 宁,王 赫,陈小强,等. 北海道黄杨叶片离体培养及其细胞耐盐性[J]. 江苏农业科学,2016,44(12):96-98.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.12.026

北海道黄杨叶片离体培养及其细胞耐盐性

孙 宁,王 赫,陈小强,李 凤

(天津农学院农学与资源环境学院,天津 300384)

摘要:以北海道黄杨叶片为材料进行愈伤组织诱导及细胞增殖培养试验,同时开展不同浓度 NaCl 胁迫下愈伤组织培养,探讨外源激素对叶片离体培养的影响及其愈伤组织的耐盐性。结果表明,北海道黄杨叶片诱导愈伤组织最适培养基为 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 6.3 g/L,有利于愈伤组织增殖的激素为 2,4-D 0.5 mg/L;0.2% NaCl 胁迫对愈伤组织生长影响较小,NaCl 浓度高于 0.4% 时,随盐浓度升高愈伤组织脯氨酸含量增加,生长量急剧降低。

关键词:北海道黄杨;愈伤组织;激素;盐胁迫

中图分类号:S792.119.04

文献标志码:A

文章编号:1002-1302(2016)12-0096-02

北海道黄杨(*Euonymus japonicus* L.)是卫矛科卫矛属的常绿阔叶乔木,它具有极强的耐寒性,能耐 $-23.9\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温^[1]。北海道黄杨具有树体高大挺拔、四季常青、冬天有红果可供观赏等特点,同时还有较强的净化空气的效果,适合作为绿化美化环境树种^[2]。

我国盐碱地总面积约 3 460 万 hm^2 以上,耕地盐碱化 760 万 hm^2 ,大约 20% 的土地发生盐碱化^[3]。我国盐碱地主要分布在东北、华北的农产区,特别是经济比较发达的沿海城市和生态环境比较脆弱的西北内陆区域。要改变这些盐碱地区温带城市中落叶树种比较单调的模式,发展多层次的城市绿化,需要多种四季常青、环境污染小的耐盐树种。

通过植物组织培养技术筛选培育耐盐性相对比较高的植物品种是提高盐碱地的利用率、减少土地浪费的有效解决方法之一。目前,国内外对北海道黄杨的离体培养已有部分研究,但大多集中在离体快繁方面,而利用愈伤组织培养来开展抗性育种研究极少。开展北海道的离体叶片愈伤组织培养及离体细胞盐胁迫研究,可为筛选北海道黄杨耐盐细胞系及抗盐突变株的选育奠定基础,并可为植物抗盐育种研究提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以完整无受损病虫害的北海道黄杨新生叶片为试验材料。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体消毒 将叶片用流水冲洗 30 min,无菌条件下在 75% 乙醇中浸泡 30 s 后,用无菌水冲洗 3 次,再用 0.1% 氯化汞浸泡 6 min,后用无菌水清洗 4~5 次。将叶片放置于无菌滤纸上吸干水分,剪为 1 cm^2 左右带叶脉的方形叶块,叶背

向下平铺接种于不同配方的培养基上。

1.2.2 初代培养试验 基本培养基采用 MS(蔗糖 30 g/L、琼脂 6.3 g/L,pH 值 5.8 左右),附加不同浓度的 6-BA、NAA、2,4-D,共设 10 个处理。培养温度 25 $^{\circ}\text{C}$,光照强度 1 200~1 500 lx,光照时间 12~14 h/d。接种后每隔 7 d 观察统计 1 次诱导率。

1.2.3 愈伤组织增殖培养 无菌条件下将叶片四周长出的愈伤组织切下,用刀片压碎至小颗粒状,均匀接入到继代增殖培养基中。基本培养基采用 MS(蔗糖 30 g/L、琼脂 6.3 g/L,pH 值为 5.8 左右),附加不同浓度的 NAA、2,4-D,共设 6 个处理。培养温度 25 $^{\circ}\text{C}$,暗培养。接种后每隔 7 d 观察 1 次愈伤组织变化。

1.2.4 愈伤组织盐胁迫培养 将增殖培养获得的愈伤组织称重记录后,按“2.2.3”节方法均匀接种到含不同浓度的 NaCl 的培养基中。基本培养基采用“2.2.3”节所筛选优化的配方,NaCl 浓度设置 0(CK)、0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0%,培养条件同上。接种后每隔 7 d 观察 1 次北海道黄杨愈伤组织在 NaCl 胁迫下的生长情况,测定游离脯氨酸含量。

2 结果与分析

2.1 不同激素浓度对叶片愈伤组织诱导的影响

叶片接种 30 d 后由愈伤组织诱导情况见表 1。从表 1 可以看出,A2 处理愈伤组织诱导率高达 82.3%,但诱导愈伤组织量很小;而 A8、A10 处理诱导率相对较高,均为 80%,且愈伤组织的形成量也较多;A7 处理诱导率相对较低,为 59%,但诱导形成的单块愈伤组织体积较大。

将未诱导出愈伤组织、诱导出少量愈伤组织和诱导出少量愈伤组织且褐化的 3 种叶片再次转接入 A8、A10 处理中进行培养。经过 10 d 后,原本未诱导出愈伤组织的叶片四周开始长出黄白色的愈伤组织,质地疏松为颗粒状;而原有少量愈伤组织的叶片四周也开始继续增殖愈伤组织,同样为黄白色,质地疏松;诱导出愈伤组织但愈伤组织褐化的叶片,能够在本已褐化了的组织周围长出新的浅黄色半透明状愈伤组织,其质地柔软疏松。

收稿日期:2015-10-20

基金项目:天津市高等学校创新团队(编号:TD12-5017);国家级大学生创业训练计划(编号:201410061114);天津市学院精品课程建设(植物细胞工程)。

作者简介:孙 宁(1979—),女,河北承德人,硕士,高级实验师,从事生物技术方面的研究与教学。E-mail:sning79@sina.com。

表 1 不同激素对叶片诱导愈伤组织的影响

编号	激素浓度 (mg/L)			诱导率 (%)	褐化率 (%)	污染率 (%)	愈伤组织生长状况
	6-BA	2,4-D	NAA				
A1	0.5			45.0	45.0	55.0	生长量小,易褐化
A2	1.0			82.3	58.8	17.6	厚约 0.05 cm
A3	1.5			56.5	34.8	13.0	厚约 0.1 cm
A4	2.0			45.8	37.5	29.2	厚约 0.3 cm,不易褐化
A5		0.2		37.5	15.4	75.0	白色晶状,厚约 0.3 cm
A6		0.5		57.1	8.3	33.3	厚约 0.6~1.0 cm,黄褐色,部分白色透明状
A7		1.0		59.0	7.1	0	黄绿色,厚约 1.0~1.5 cm
A8		1.5		80.0	9.1	0	黄绿色,厚约 0.5~0.8 cm
A9	0.5	0.5		40.0	40.0	20.0	厚约 0.3 cm
A10	0.5		0.2	80.0	22.5	7.5	厚约 0.3~0.4 cm,黄白色

2.2 不同激素浓度对愈伤组织增殖的影响

将叶片诱导获得的愈伤组织接入 6 种增殖培养基中,14 d 后愈伤组织呈黄白色、质地坚硬的小块状。用浓度为 0.5 mg/L 2,4-D 的培养基对愈伤组织的增殖效果最好,其次为添加 2,4-D 1.0 mg/L、NAA 0.5 mg/L 的处理,增殖效果也比较好,愈伤组织增殖量较多;而浓度为 0.2 mg/L 2,4-D、NAA 的处理虽然都对愈伤组织有增殖效果,但是增殖的速度非常慢,且增殖量非常少(表 2)。同时发现在接种 20 d 后,所有愈伤组织都开始出现褐化,且增殖速度越快、增殖量越多愈伤组织出现褐化现象的时间越早,并且褐化程度也越严重;此时的愈伤组织颜色为褐色,质地变软,不再呈坚硬的小块状。接种 30 d 后,全部愈伤组织褐化。因此继代增殖转接周期以 18~20 d 为宜。

2.3 NaCl 胁迫对愈伤组织的影响

2.3.1 NaCl 胁迫对愈伤组织生长的影响

2.3.1.1 愈伤组织在不同浓度 NaCl 胁迫下的形态特征 将

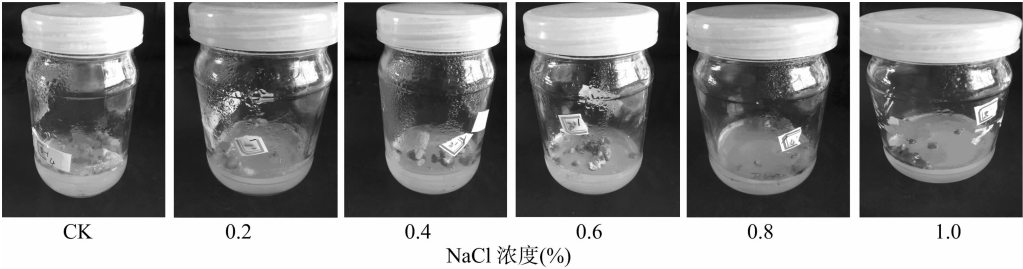


图 1 不同浓度 NaCl 胁迫下愈伤组织生长情况

2.3.1.2 NaCl 胁迫对愈伤组织生长量的影响 愈伤组织在 6 个 NaCl 浓度处理下培养 20 d 左右,取出愈伤组织进行称量,并与愈伤组织接种前鲜质量取差值,计算出这段时间内不同浓度 NaCl 胁迫下北海道黄杨愈伤组织鲜质量增长量的平均值。从图 2 可以看出,在 NaCl 胁迫下,北海道黄杨愈伤组织的鲜质量增长量均呈下降趋势,当 NaCl 浓度达 0.2% 时,愈伤组织鲜质量增长量与对照相比降低 18.69%;当 NaCl 浓度增大到 0.4%,增长量与对照相比降低 58.72%,愈伤组织增长量明显减少,且褐化情况也比较严重。表明 0.2% NaCl 对北海道黄杨愈伤组织生长影响较小,NaCl 含量大于 0.4% 时对其生长起到了明显的抑制作用。

2.3.2 NaCl 胁迫下愈伤组织游离脯氨酸含量的变化 植物在正常状态下,其体内脯氨酸含量比较低而且较为平稳,当植

表 2 不同浓度激素处理对愈伤组织增殖的影响

编号	激素浓度 (mg/L)		生长情况
	2,4-D	NAA	
B1	0.2		+
B2	0.5		++++
B3	1.0		+++
B4		0.2	+
B5		0.5	+++
B6		1.0	+

注:愈伤组织质量+少,++较多,+++多,++++极多。
增殖培养获得的愈伤组织接入含 NaCl 培养基中,14 d 后,愈伤组织发生轻微的褐化现象,且随着培养时间的延长褐化现象逐渐严重。其中处理 1、处理 2 仍有部分愈伤组织可保持增殖生长,而处理 3~处理 6 的愈伤组织生长量随着 NaCl 浓度的逐渐升高而减少,并且出现较为严重的褐化现象。培养 20 d 的愈伤组织生长状况见图 1。从图 1 可以看出,生长量均随着 NaCl 浓度增大而减小,同时褐化现象越来越明显。

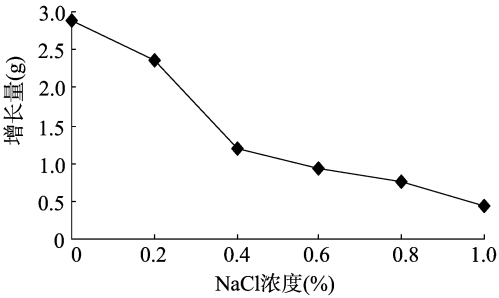


图 2 北海道黄杨愈伤组织在不同 NaCl 浓度下鲜质量增长量比较

物遇到干旱、盐碱等逆境时,其体内脯氨酸含量会急剧上升,而且其脯氨酸积累指数与植物的抗逆性有关,因此,游离脯氨酸含量常作为植物抗逆性检测的生理指标之一。

王一诺,李翠,肖冬,等. 中华石蝴蝶组织培养及试管开花诱导[J]. 江苏农业科学,2016,44(12):98-100.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.12.027

中华石蝴蝶组织培养及试管开花诱导

王一诺,李翠,肖冬,李林轩,韦莹,王晓峰,韦坤华

(广西壮族自治区药用植物园/广西药用资源保护与遗传改良重点实验室,广西南宁 530023)

摘要:以中华石蝴蝶(*Petrocosmea sinensis* Oliv.)的幼嫩叶片为外植体,以MS为基本培养基,研究植物生长调节剂多因素组合对中华石蝴蝶继代增殖和生根培养的影响,并诱导获得的无菌苗在试管中开花。结果显示,不同的生长调节剂配比对中华石蝴蝶继代培养和生根培养的影响不同,MS+1.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA+0.1 mg/L IAA 利于芽继代增殖,MS+0.5 mg/L IBA+0.1 mg/L NAA+1.0 g/L 活性炭适于诱导生根获得再生植株,MS+0.2 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA 利于试管苗开花,持续继代可抑制中华石蝴蝶的试管开花。

关键词:中华石蝴蝶;组织培养;继代增殖;生根培养;试管开花

中图分类号: S682.1+90.4+3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)12-0098-03

中华石蝴蝶(*Petrocosmea sinensis* Oliv.)为苦苣苔科石蝴蝶属多年生草本植物,产于云南北部、四川和湖北西部,生于

收稿日期:2015-10-15

基金项目:广西科学研究与技术开发计划(编号:桂科重 1355001-3-4、桂科重 14125008-2-21);广西壮族自治区卫生厅中医药科技专项(编号:GZPT1234);南宁市科学研究与技术开发计划(编号:20133032-4)。

作者简介:王一诺(1984—),女,广西梧州人,硕士,研究实习员,从事药用植物组织培养方面的研究。Tel:(0771)5602850;E-mail:yyzwyynuo@sina.com。

通信作者:韦坤华,博士,副研究员,主要从事药用植物生物技术研究。E-mail:divinekh@163.com。

不同浓度 NaCl 胁迫下,北海道黄杨愈伤组织中游离脯氨酸的含量见图3。北海道黄杨愈伤组织中游离脯氨酸的含量随盐浓度升高呈现先比较平缓后急剧上升趋势,在无盐及低浓度盐胁迫的情况下,愈伤组织内的游离脯氨酸含量均较低,随着培养基中 NaCl 浓度升高,脯氨酸含量变化呈急剧上升趋势,在盐浓度相对较高(1.0%)时游离脯氨酸含量最高,达 184.2 μg/g。

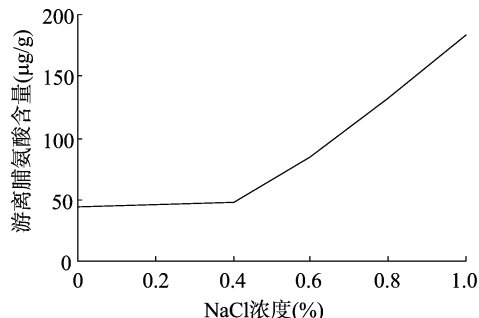


图3 NaCl 胁迫对北海道黄杨愈伤组织中游离脯氨酸含量的影响

3 讨论

在诱导叶片愈伤组织阶段,2,4-D 1.5 mg/L、6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L 这 2 个激素配比对愈伤组织的诱

低山阴处的石上。目前,苦苣苔科(Gesneriaceae)植物在全世界约有 140 属 2 000 余种,中国有 58 属(其中 28 属特产中国)463 种,从辽宁到海南均有分布,多数属、种分布于云南、广西、广东等省(区)热带及亚热带石灰岩的陡崖上^[1]。苦苣苔植物很多品种花色艳丽,极具观赏价值。此外,芒毛苣苔属、非洲紫苣苔属、大岩桐属,中国产的吊石苣苔、蚂蚱七、牛耳朵等具有药用价值^[2]。由于许多苦苣苔科植物分布区域狭窄,对生长条件要求苛刻,加上民间的过度采挖,使许多苦苣苔科植物的野生资源濒临绝种^[3]。

中华石蝴蝶不仅花色美丽,可作为观赏花卉,同时也是一种中药材,以全草入药,具有清热解表、健脾和胃等功效,可用于治疗感冒、小儿疳积等症状^[4]。本研究通过对中华石蝴蝶

导效果最好,诱导率最高。在试验中发现在叶片培养前期诱导出愈伤组织量很低的叶片,在转移到 6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L 的培养基中进行 2 次培养后,会促进叶片四周切口处愈伤组织的形成,诱导出愈伤组织厚度为 1.0~1.5 cm。在愈伤组织增殖培养中,愈伤组织增殖生长启动时间比较晚,15 d 左右开始启动,而在 30 d 时出现褐化现象;0.5 mg/L 2,4-D 对愈伤组织增殖效果最好。

在加入不同浓度 NaCl 的培养基中进行愈伤组织培养,NaCl 浓度为 0.2% 时愈伤组织长势没有受到太大影响,当 NaCl 含量上升到 0.4% 以上时,愈伤组织生长量出现明显的下降趋势,褐化现象逐渐严重,游离脯氨酸含量增加。因此,在后续研究中可选用大于 0.4% 的浓度作为耐盐细胞的诱变与筛选的 NaCl 浓度。

参考文献:

- [1]王新生. 北海道黄杨的特性和用途[J]. 中国林业,2008(10):44.
- [2]王瑞云,王玉国. 北海道黄杨试管快速繁殖技术研究[J]. 生物技术,2004,14(2):51-53.
- [3]周和平,张立新,禹锋,等. 我国盐碱地改良技术综述及展望[J]. 现代农业科技,2007(11):159-161,164.