

盾叶薯蓣胚乳的组织培养

郭永兵, 江道菊, 李特林

(长江大学 园艺园林学院, 湖北 荆州 434025)

摘要:分别以盾叶薯蓣成熟种子和未成熟种子的胚乳为材料进行组织培养。结果表明:愈伤组织诱导培养中,无论是成熟胚乳还是未成熟胚乳,采用 MS+6-BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +NAA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基诱导效果最佳,诱导率分别达到 83.3% 和 90.0%;以 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA+MS 培养基进行继代培养可达到比较理想效果; $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA+蔗糖 3%+ $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ CH+MS 培养基诱导芽的分化,效果最好,成熟胚乳和未成熟胚乳芽诱导率分别为 80.0% 和 90.0%。用 1/2MS 培养基进行生根培养时,ABT 生根粉溶液处理的生根效果,在浓度 200~300 mg/L 范围内没有显著差异,成熟胚乳再生植株生根率为 76.6%,未成熟胚乳再生植株为 83.3%。

关键词:盾叶薯蓣;胚乳;组织培养

中图分类号:S 632.103.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2007)10-0175-03

纵观胚乳培养研究历史,很多研究已经充分肯定了胚乳细胞在离体条件下可以无限增生和进行器官分化^[1,2]。对于已收获根茎的盾叶薯蓣来说,种子发育好坏甚至是否发育对种植业来说无关大局。因此,利用三倍体的胚乳来培育三倍体的植株以提高盾叶薯蓣产量在理论上是可行的。目前利用盾叶薯蓣的根茎等营养

器官进行组织培养比较容易成功^[3,4],而关于其胚乳进行组织培养的研究尚未见报道。研究可以为进一步通过细胞工程进行盾叶薯蓣品种改良或新品种的选育提供新的思路,也为推广和大量快速繁殖优质苗打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料和基本培养基

供试材料为当年收获的长江大学植物资源圃的盾叶薯蓣成熟果实和未成熟的果实。基本培养基(BM)2种:BM1 为 MS 培养基,BM2 为 MS 培养基+蔗糖 3%+

第一作者简介:郭永兵(1972-),男,湖北仙桃人,讲师,在读博士生,主要从事野生植物资源与利用研究。E-mail:guoyb@scbg.ac.cn。
收稿日期:2007-06-26

[7] 徐桂娟,罗晓芳,姚洪军.黑树莓的组织培养与快速繁殖[J].北京林业大学学报,2002(1):99-100.

[8] 刘兰英,李春玲.树莓的组培快繁技术研究[J].园艺学报,2004(4):

173-174.

[9] 蒋桂华,吴延军,谢鸣,等.树莓、黑莓组织培养及遗传转化研究进展[J].果树学报,2006(4):593-598.

Study on Tissue Culture and Rapid Propagation of Blackberry

JIANG Xiao-man, BAI Xin-fu, ZHAO Jian-ping

(School of Life Science, Ludong University, Yantai, Shandong 264025, China)

Abstract: Using stem segments with buds as explants, tissue culture and rapid propagation of Blackberry were studied. The results indicated that the appropriate media for respective culture stages were: for germination of axillary buds: MS+BA 1.0 mg/L +IAA 0.1 mg/L ; for multiplication: MS+BA 1.0 mg/L +NAA $0.05 \sim 0.2 \text{ mg/L}$, the multiple for multiplication reached to 8; for rooting: 1/2MS+IBA 0.1 mg/L or 1/2MS+NAA 0.05 mg/L and the rate of rooting was 96.3%. Transplanting rooted plantlet to a different substrata, the results showed that substrata which consists of garden-soil, perlite and wormcast was the most suitable for transplant and late growth, and survival rate was up to 96.9%, and transplant plantlet grow healthy.

Key words: Blackberry; Tissue culture; Rapid Propagation; Plant hormone

500 mg · L⁻¹CH₃,pH 值 6.0~6.2。

1.2 方法

恒温室组织培养,温度(25±1)℃,光照强度 3 000 lx,光照时间 10 h/d。

1.2.1 胚乳愈伤组织的诱导 分别从成熟和未成熟盾叶薯蓣果实中获得带翅的种子,将种子先用 75%的酒精浸 10 s,再将其放入 0.1%升汞溶液中消毒处理 8 min,后用 500 mg · L⁻¹无菌 GA₃溶液浸泡 24 h,然后在超净台上剥除种皮,剔除其种胚。最后将其接种到添加了不同浓度的 6-BA 和 NAA 的 BM1 培养基上。接种 8~10 d 后,胚乳出现膨大现象。培养 30 d 后,统计愈伤组织产生的块数,计算愈伤组织诱导率。

1.2.2 愈伤组织的继代培养 将诱导效果最佳的激素组合获得的愈伤组织转到补加不同浓度的 6-BA 和 NAA 组合的 BM1 培养基上进行继代培养 30 d。

1.2.3 再生植株的分化 将继代培养后的愈伤组织块在补加不同浓度的 6-BA 和 NAA 的 BM2 培养基上进行芽的分化培养。选择生长健壮的胚乳再生植株,切掉其基部的愈伤组织,然后将切口端浸泡在不同浓度 200~300 mg · L⁻¹的无菌 ABT 生根粉溶液中 3~5 s,再植入 1/2 MS 培养基中培养 30 d。生根苗经过练苗处理后移栽于苗床,常规苗床管理,计算成活率。

2 结果与分析

2.1 不同浓度的 6-BA 和 NAA 对胚乳愈伤组织的诱导的影响

在添加不同浓度的 6-BA 和 NAA 的 BM1 培养基上进行胚乳愈伤组织的诱导,结果如表 1。胚乳无论是来自于成熟果实的种子还是来自于未成熟果实的种子,在 10 种激素组合培养基中,以 MS+6-BA 1.0 mg · L⁻¹ + NAA 0.1 mg · L⁻¹(激素组合 ii)诱导效果最佳,诱导率分别为 83.3%和 90.0%,且愈伤组织结构致密,米黄色。激素组合 iv 的诱导率虽然最高,但是出现了胚乳异常膨胀现象,愈伤组织十分疏松,灰白色。在单独使用 NAA 处理(iii,vi,vii)时,随着处理浓度的增加,愈伤组织诱导率有升高的趋势;单独用 6-BA 处理(viii,ix,x)时,效果相反。这些结果表现了在一定浓度范围内,在高浓度 6-BA 和低浓度 NAA 的培养基上,产生的愈伤组织结构致密,颜色正常;而高浓度 NAA 和低浓度 6-BA 的培养基上,产生的愈伤组织生长旺盛,但结构疏松的现象。这与杨增海所述一致^[4]。从表 1 中还可以看出,来自于未成熟果实的胚乳除了在单独用 0.5 mg · L⁻¹ NAA 处理时,愈伤组织诱导率略低于成熟果实的胚乳外,其余情况下均高于成熟果实的胚乳。

2.2 愈伤组织的继代培养

将诱导效果最佳的激素组合(1.0 mg · L⁻¹6-BA + 0.1 mg · L⁻¹NAA)获得的、来自于不同外植体的愈伤组

织分别转到补加了 1.0 mg · L⁻¹6-BA + 0.1 mg · L⁻¹NAA 和 1.0 mg · L⁻¹6-BA + 0.2 mg · L⁻¹NAA 的 BM1 2 种不同激素组合的培养基中进行继代培养 30 d。观察结果表明:无论果实成熟与否,继代培养中 1.0 mg · L⁻¹6-BA + 0.2 mg · L⁻¹NAA + BM1 培养基的效果要比另一培养基好。成熟果实获得的胚乳愈伤组织块为淡黄绿色,而未成熟果实胚乳愈伤组织相对大而较疏松,颜色为淡黄色。

表 1 不同激素组合对诱导愈伤组织的影响

编号	激素组合/mg · L ⁻¹		外植体数		愈伤组织诱导率/%	
	6-BA	NAA	MFSE	IFSE	MFSE	GFSE
i	0.5	0.1	30	30	70.0	76.7
ii	1.0	0.1	30	30	83.3	90.0
iii		0.1	30	20	60.0	65.0
iv	0.5	0.5	30	30	86.7	93.3
v	1.0	0.5	30	30	53.3	66.7
vi		0.5	30	20	60.0	75.0
vii		1.0	30	20	73.3	85.0
viii	0.5		30	20	53.3	50.0
ix	1.0		30	20	43.3	50.0
x	1.5		30	20	33.3	43.3

注:MFSE:成熟果实种子中的胚乳;GFSE:未成熟果实种子中的胚乳,表 2 同。

2.3 再生植株的分化

表 2 不同激素组合对芽诱导的影响

编号	激素组合/mg · L ⁻¹		愈伤组织块数目		发芽诱导率/%	
	6-BA	NAA	MFSE	GFSE	MFSE	GFSE
I	0.1	0.05	15	20	80.0	90.0
II		0.10	15	20	66.7	75.0
III		0.15	15	20	53.3	70.0
IV	0.3	0.05	15	20	73.3	80.0
V		0.10	15	20	53.3	65.0
VI		0.15	15	20	50.0	40.0
VII	0.5	0.05	15	20	63.3	75.0
VIII		0.10	15	20	33.3	50.0
IX		0.15	15	20	26.7	40.0

从继代培养获得的愈伤组织块中选择直径为 2~4 mm 的愈伤组织块,在补加不同浓度 NAA 和 6-BA 的 BM2 培养基上进行芽的分化培养(结果见表 2)。20 d 左右有绿色细胞团出现并出现芽的分化。培养到第 25 天时,外植体为成熟果实胚乳的愈伤组织少部分已经有根分化现象,并有不正常的叶状体形成。编号 V—IX 这 5 种培养基中,不管是来自于哪一种外植体,都有部分的愈伤组织形成佛手状突起,在编号 V 和 VII 的培养基中还在突起上形成了芽丛。到第 30 天时,选择由 2 种外植体(成熟果实胚乳和未成熟果实胚乳)培育的、生长健壮的胚乳再生植株各 30 株,切掉其基部的愈伤组织,然后将切口端浸泡在不同浓度的(200~300 mg · L⁻¹)无菌 ABT 生根粉溶液中 3~5 s,再植入 1/2 MS 培养基中培养,在 20 d 左右就有根分化。培养至第 30 d 时(此时大部分根长达 1.5~2.0 cm),观察比较不同浓度无菌 ABT 生根粉溶液处理的生根效果,没有显著差异;成熟培乳

再生植株生根率为 76.6%, 未成熟培乳再生植株为 83.3%。然后将生根苗经过练苗处理后移栽于苗床, 常规苗床管理, 一个月后由成熟胚乳培育的幼苗和由未成熟胚乳培育的幼苗成活率都达到 90%。

3 讨论与小结

培养基中的植物激素对愈伤组织的诱导及分化具有十分复杂而重要的作用, 生长素和细胞分裂素的作用可以影响植物特定基因的激活与表达, 从而调节蛋白质的合成, 以此影响细胞的分裂、分化过程^[5]。一般情况下, 生长素/细胞分裂素比值高时, 主要诱导愈伤组织或根的形成, 这时生长素起主导作用; 生长素/细胞分裂素比值低时, 诱导芽的分化, 此时细胞分裂素起主导作用。这一点在试验中再一次得到了证实。在愈伤组织诱导以及继代培养过程中, $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NAA}/1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA}$ 、 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NAA}/1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA}$ 、 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NAA}/0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA}$ 均促进了愈伤组织的产生。而在诱导芽分化的激素配比中, 最佳激素组合 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NAA}/0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA}$ (表 2 中 I 组合) 的生长素/细胞分裂素比值明显低于这三者。

在处理的激素种类和浓度相似的情况下, 同一物种不同外植体的愈伤组织诱导以及再生植株分化的效果, 取决于外植体的分化状态和内源激素水平。在试验中, 进行盾叶薯蓣胚乳组织培养时, 用来自于未成熟果实的胚乳作为外植体效果比用来自于成熟果实的胚乳好。这是由于相对于来自成熟果实的胚乳而言, 未成熟果实

的胚乳生长代谢更旺盛, 分化程度低, 组织比较幼嫩且生长刺激物质水平较高, 对脱分化的诱导因此也较敏感。

综合试验结果, 可得出以下结论: 在试验激素组合范围内, 以 $\text{MS}+6\text{-BA } 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}+\text{NAA } 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 诱导胚乳愈伤组织可以达到最佳效果, $\text{MS}+6\text{-BA } 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}+\text{NAA } 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基进行继代培养可达到良好效果。 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA}+0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NAA}+\text{MS}$ 培养基+蔗糖 3%+ $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{CH}$ 培养基诱导芽分化效果最佳。用 1/2 MS 培养基进行生根培养时, ABT 生根粉溶液处理的生根效果, 在浓度 200~300 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内没有显著差异, 成熟培乳再生植株生根率为 76.6%, 未成熟培乳再生植株为 83.3%。进行盾叶薯蓣胚乳组织培养时, 用来自于未成熟果实的胚乳作为外植体效果比用来自于成熟果实的胚乳好。

参考文献

- [1] 李浚明. 植物组织培养教程[M]. 2 版. 北京: 中国农业大学出版社, 2002: 136-139.
- [2] 杨增海. 园艺植物组织培养[M]. 北京: 农业出版社, 1987: 164-174.
- [3] 任建伟, 白云, 张榕树, 等. 盾叶薯蓣愈伤组织的诱导与培养[J]. 中国药理学杂志, 1993, 28(9): 532-534.
- [4] 谢碧霞, 何业华, 易志军, 等. 盾叶薯蓣愈伤组织培养研究及其高产系的筛选[J]. 中南林学院学报, 1999, 19(4): 17-21.
- [5] 任冬梅, 黄学林, 黄上志. 细胞分裂素物质在植物组织培养中的作用机制[J]. 植物生理学通讯, 1996, 32(5): 373-377.

Tissue Culture of Endosperms in *Dioscorea zingiberensis* Wright Seeds

GUO Yong-bing, JIANG Dao-ju, LI Te-lin

(College of Horticulture and Gardening, Yangtze University, Jingzhou, Hubei 434025, China)

Abstract: Tissue culture of endosperms from *D. zingiberensis* seeds was studied. The results were as follows: When mature endosperms and immature endosperms were dealt with $\text{MS}+6\text{-BA } 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}+\text{NAA } 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, both of them had a callus inducement percentage of 83.3% and 90% respectively. And the culture medium composed of $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA}+0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NAA}+\text{MS}$ had excellent results in subculture. In the process of buds inducement, using $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA}+0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NAA}+3\% \text{ sugar}+500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{CH}+\text{MS}$ made the best result that there was a buds inducement percentage of 80% from calli of mature endosperms and 90% from calli of immature endosperms. In the process of generating root culture, the concentration of ABT rooting agentia had nothing with ratio of rooting in a range of 200~300 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. The rooting ratio of endosperm calli of mature seeds was 76.6% and that of immature was 83.3% respectively.

Key words: *Dioscorea zingiberensis* Wright; Endosperm; Tissue culture