

栾树离体幼胚成苗技术研究

李桂荣, 赵润洲, 余义和, 王新娟, 周明

(河南科技学院 园林学院, 河南 新乡 453003)

摘要:通过栾树离体幼胚可以产生愈伤组织和再生植株。外植体消毒时,最适宜的方法是先去种皮再消毒,消毒时间酒精处理 30 s,升汞处理 9 min;用 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 GA_3 对外植体进行预处理,可以促进幼胚的无菌萌发;6-BA 有利于幼胚的快速成苗,最佳激素浓度为 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,2,4-D 有利于产生愈伤组织,最佳激素浓度为 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 6-BA 与 2,4-D 易导致外植体褐化、坏死;在使用 AC 时,要考虑到 AC 的无选择吸附性,应加大使用附加物的浓度或降低 AC 的使用量。

关键词:栾树;幼胚;离体培养;外植体;愈伤组织

中图分类号:S792.04

文献标识码:A

文章编号:1001-7461(2006)06-0090-04

A Technological Study on Culture in Vitro of Immature Embryo of *Koelreuteria paniculata*

LI Gui-rong, ZHAO Run-zhou, YU Yi-he, WANG Xin-juan, ZHOU Ming

(College of Landscape, He'nan Institute of Science and Technology, Xinxiang, He'nan 453003, China)

Abstract: Callus and plantlets could be regenerated by culture in vitro of immature embryo of *Koelreuteria paniculata*. The best method for explant disinfection was to get rid of the seed coat first, and the disinfectant time would be 30 s with 75% alcohol, then 9 s with HgCl_2 . A pretreatment to the prerequisite with $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GA_3 could accelerate the aseptic germination of the embryo, and the optimal concentration of the hormone was $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 2,4-D was favorable to the generation of callus, and the optimal concentration of the hormone was $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Excessively high concentrations of 6-BA and 2,4-D would lead to the russet and death of the prerequisite. When AC was applied, the nonselective absorption must be considered, either increase the concentration of appendix substances or decrease the dosage of AC.

Key words: *Koelreuteria paniculata*; immature embryo; culture in vitro; explant; callus

栾树(*Koelreuteria paniculata*)为无患子科栾树属乔木。栾树顶生大型圆锥花序,膨大蒴果,伞形或球形树冠,秋季果实呈黄红色,且具紫色膜质果翅,具有较高的观赏价值。此外,栾树具有较高的药用价值,富含黄酮类化合物、木脂素类、有机酸类、甾醇类以及香豆素类化合物等,具有多种药理活性^[1,2]。近年来,随着对栾树化学成分和药理机能以及园林绿化的深入研究,栾树越来越受到人们的重视。但由于栾树种皮透水、透气性差以及其他生理原因,导致栾树种子发芽率很低,仅为 10%^[3],严重阻碍了对栾树资源的开发和利用。对栾树的胚进行离体快速成苗技术研究,可为栾树的快速成苗及其资

源的开发利用奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

试验在河南科技学院园艺植物组织培养研究室进行。试验材料为栾树的种胚。于 9 月份采集栾树种子,此时种子未成熟,种皮由绿变黄,种胚绿色、较幼嫩。

1.2 方法

外植体处理分为 2 种,处理 1 为先去种皮再消毒,消毒采用 70% 的酒精和 0.1% 的升汞。酒精消毒 30 s,然后用无菌水冲洗 2~3 次,再用升汞消毒 8~

10 min,最后用无菌水冲洗 4~5 次。处理 2 为先消毒后去种皮,消毒方法同上。接种时,取栲树种子的幼胚,将幼胚的两侧及两端除去,切成长约 4 mm、宽约 3 mm 的小方块,并在幼胚两面各划两刀,形态学上端朝下平放在培养基上。外植体接种前设置预处理,即在无菌条件下进行 GA₃ 浸种(0~10 mg·L⁻¹,24 h)。培养基以 B₅ 为基本培养基,添加不同浓度的 6-BA(1~5 mg·L⁻¹)、2,4-D (0.5~5 mg·L⁻¹)、活性炭(以下简称 AC)(1g·L⁻¹),蔗糖 20 g,琼脂 6 g,pH 5.8 左右。每一处理 20 瓶,重复 3 次。暗培养的温度为(24±1)℃,3 d 后改为光培养,白天培养温度为(26±1)℃,夜晚培养温度为(23±

1)℃,每天光照 14 h(6:00~20:00)。

2 结果与分析

2.1 离体幼胚无菌培养体系的建立

由表 1 可以看出,不同的消毒时间和消毒方法对外植体的消毒效果影响不同。当消毒时间为 8 min 时,处理 1 和处理 2 污染率分别为 75.6%和 51.1%;随消毒时间的延长,污染率明显下降。当消毒时间为 10 min 时,污染率分别下降到 15.6%和 8.9%。但随着消毒时间的延长,受伤率也随之上升,处理 1 和处理 2 消毒时间从 8 min 延长到 10 min 时,受伤率分别从 4.4%和 0 增加到 24.4%和 6.7%。

表 1 升汞不同消毒时间的效果
Table 1 Effect of HgCl₂ different of disinfectant time

处理	接种材料数 /个	消毒时间 /min	污染数 /个	受伤数 /个	污染率 /%	受伤率 /%	总污染数 /个	总污染率 /%
处理 1	45	8	34	2	75.6	4.4	60	44.4
	45	9	19	3	42.2	6.6		
	45	10	7	11	15.6	24.4		
处理 2	45	8	23	0	51.1	0	39	28.9
	45	9	12	1	26.6	2.2		
	45	10	4	3	8.9	6.7		

万方数据

消毒方法对污染率和受伤率有明显的影响。处理 2 的消毒效果(包括污染率和受伤率)明显优于处理 1,其主要原因是由于种皮的保护作用,一方面能够保护种胚免受外界环境的污染,同时还可以保护种胚不受伤害。对于未成熟的种子可以采用处理 2 的方法进行外植体消毒,但对于成熟种子则不能,因为成熟种子的外种皮坚硬,在无菌条件下不易剥种皮。综合以上各因素,在对栲树未成熟胚进行离体培

养时,最佳外植体的消毒方法是先去种皮再消毒,消毒时间酒精处理 30 s,升汞处理 9 min。

2.2 外植体的无菌萌发

幼胚有 2 种生长方式,即产生愈伤组织和直接成苗。接种 20 d 后,部分幼胚切口边缘产生少量愈伤组织,呈团状,生长致密,浅绿色,但其后未见有植株发生;大部分子叶是直接产生幼苗(图 1),幼苗单生,同时产生主根,须根少或无。



图 1 栲树离体幼胚的植株再生

Fig.1 Plantlet regeneration of *K. paniullata* in vitro immature embryo

2.3 预处理对离体胚成苗和愈伤组织形成的影响

研究表明(表 2),接种后 20 d 后,在没有添加

GA₃ 的培养基(空白对照)上,幼胚萌发率较低,愈伤组织的诱导率较高;添加 1 mg·LGA₃ 的培养基

上, 幼胚萌发率明显优于对照, 但愈伤组织的诱导率较对照有所降低; 随着 GA_3 的浓度的增加, 幼胚萌发率逐渐减低, 表现出抑制作用, 对愈伤组织的诱导表现出完全的抑制。适宜的 GA_3 浓度 ($1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 能够促进幼胚的萌发, 其主要原因是 GA_3 具有打破休眠的作用。因此, 1 mg/L 的 GA_3 对离体胚进行预处理有利于幼胚的快速萌发和直接成苗。

表 2 不同预处理对离体胚成苗的影响

Table 2 Effect of different pretreatment on bud growth of immature embryo

GA_3 浓度 $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	接种数	幼胚萌发数	幼胚萌发率 $\%$	诱导愈伤组织数	愈伤组织诱导率 $\%$
0	50	2	4.0	6	12.0
1	53	17	32.1	3	5.7
5	49	11	22.4	0	0.0
10	50	12	24.0	0	0.0

表 3 表明, 6-BA、2,4-D 对离体胚的直接成苗和愈伤组织的产生不是必须的, 在没有任何激素的情况下, 有少数的幼胚可以萌发, 且有少量的愈伤组织产生。适量的 6-BA、2,4-D 能够促进幼胚的萌发和愈伤组织的产生, 单独加入 $2\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 6-BA 能够增加幼胚萌发率, 但 6-BA 的浓度并不是越高越好, 高浓度的 6-BA ($5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 反而对幼胚的萌发产生抑制作用, 且易导致外植体的褐化、坏死; 只加入 $2\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 2,4-D 时, 使愈伤组织诱导率从

2.4 6-BA、2,4-D 对离体胚成苗和产生愈伤组织的影响

体细胞转化为胚性细胞是进行离体培养和基因差别表达的结果。但基因的差别表达需要一定的内外条件的诱导, 也就是说细胞分化必须具有相应的诱导因子。影响细胞分化的因素很多, 其中最重要的是激素的调节作用。

5.7% 增加到 34.1%, 同样高浓度的 2,4-D ($5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 也对愈伤组织的诱导产生抑制作用。同时, 加入 6-BA 和 2,4-D, 会使二者有利的促进作用相对地减弱, 即 6-BA 的添加会使 2,4-D 对愈伤组织诱导的促进作用受到抑制, 加入 2,4-D 也会削弱 6-BA 提高幼胚萌发率的作用。适宜诱导愈伤组织的激素为 $2\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 2,4-D, 有利于增加幼胚萌发数量的激素为 $2\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 6-BA。

表 3 不同种类、浓度的激素对离体胚直接成苗和产生愈伤组织的影响

Table 3 Effect of different kinds and concentrations of hormone on culture in vitro in immature embryo germinating directly and callus production

培养基号	6-BA $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	2,4-D $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	接种数	幼胚萌发数	幼胚萌发率 $\%$	诱导愈伤组织数	愈伤组织诱导率 $\%$
1	0	0	35	8	22.9	2	5.7
2	0	0.5	40	5	12.5	7	17.5
3	0	1	43	4	9.3	8	18.6
4	0	2	41	2	4.9	14	34.1
5	0	5	42	3	7.1	9	21.4
6	1	0	40	11	27.5	5	12.5
7	2	0	40	17	42.5	0	0
8	5	0	42	9	21.4	0	0
9	2	2	41	8	19.5	6	14.6

2.5 AC 在离体胚培养中的应用

AC 可以吸附培养基中的有害物质, 包括琼脂中的杂质、培养物在培养过程中分泌的酚、醌类物质, 以及蔗糖在高压灭菌时产生的 5-羟甲基糠醛等, 从而有利于培养物的生长^[4]。在 1~9 号培养基

中加入 $1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 AC, 结果表明, 在添加有 $2\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 4-D 和 $2\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 的培养基中, 其生长并不是最好, 不过在这两种培养基上表现出褐化、坏死现象有所缓解; 生长最好的培养基是添加有高质量浓度的 2,4-D 和 6-BA 的培养基, 而且较原先表

现出的褐化、坏死现象有较大的减轻。产生此种现象的原因是AC的吸附作用不具有选择性,其在吸附有害物质的同时,也将激素等有益附加物吸收了。因此在使用AC时,要考虑到AC的无选择吸附性,应加大使用附加物的浓度。

3 结论与讨论

研究结果表明,在外植体进行消毒时,最佳的处理方式是先去种皮再消毒,消毒时间酒精处理30 s,升汞处理9 min;用 $1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 GA_3 对外植体进行预处理,可以促进幼胚的无菌萌发;在培养过程中,6-BA、2,4-D对离体胚的直接成苗和愈伤组织的产生不是必需的,但培养基中单独添加2,4-D有利于愈伤组织诱导,其中以 $2\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的2,4-D最好,单独添加6-BA有利于增加幼胚萌发数,以 $2\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的6-BA表现最佳;过高浓度的6-BA、2,4-D易导致外植体的褐化、坏死;在使用AC时,要考虑到AC的无选择吸附性,加大使用附加物的浓度或降低AC的使用量。

无患子科进行离体培养研究较多是荔枝属和龙眼属,而栲树属在国内尚未见报道。黄祖珍等最早报道了荔枝成熟胚培养获得小苗的研究^[5];傅莲芳、周丽依等从荔枝的花药、幼胚中诱导出了愈伤组织,并分化出胚状体和再生植株^[6,7];邝哲师等也从荔枝幼胚的愈伤组织中成功地分化出体胚,并转化成完整的再生植株,从而为名优品种的推广种植提供了基础^[8];赖钟雄等研究了龙眼胚性细胞的建立与保持,指出龙眼幼胚培养诱导愈伤组织,生长调节剂不是必须的,但要获得松散的愈伤组织类型,必需附加一定质量浓度的2,4-D,且以单独使用为佳;并且在 $0.1 \sim 2\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的范围内,诱导率随质量浓度的增加而升高,并在 $2\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时达到73.33%。此外,过高浓度的2,4-D不利于愈伤组织的诱导^[9],这与

本研究结果相似。据报道^[10],2,4-D的存在对荔枝胚性愈伤组织的诱导有重要影响,当蔗糖浓度为 $30\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 或 $50\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,2,4-D为 $2 \sim 4\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时均有最好的结果;而2,4-D为 $1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,诱导率大大降低。赖钟雄认为培养基附加AC(质量浓度为 $5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),不仅愈伤组织诱导率降低,而且得到的愈伤组织只是白色紧实类型,并认为AC在龙眼松散型胚性愈伤组织的诱导中是有害的,应避免添加^[9]。研究表明^[11],每毫克活性炭大约能吸附100 mg左右的生长调节物质,尤其是当较高浓度的活性炭与常量的生长物质同时使用时,活性炭常常抵消生长调节物质的作用。作者认为,在使用AC时,要考虑到AC的无选择吸附性,应加大使用附加物的浓度或降低AC的使用量,从而发挥AC的作用。

参考文献:

- [1] 梁淑芳,马柏林. 栲树化学成分的研究进展[J]. 西北林学院学报,2004,19(1):119-122.
- [2] 杨小凤,雷海民,付宏征,等. 栲树种子中黄酮类化学成分[J]. 药学报,2000,35(3):208-211.
- [3] 柳振亮,刘克锋,赵和文,等. 栲树种子处理出苗试验初报[J]. 北京农学院学报,2002,17(1):41-44.
- [4] 刘用生,李友勇. 植物组织培养中活性炭的使用[J]. 植物生理学通讯,1994,30(3):214.
- [5] 黄祖珍,游恺哲. 荔枝茎段离体培养初探[J]. 广东农业科学,1990(3):27-29.
- [6] 傅莲芳,唐道一. 荔枝花粉植株诱导的研究[J]. 遗传学报,1983,10(5):369-374.
- [7] 周丽依,邝哲师,马雪筠,等. 荔枝幼胚培养及体细胞胚胎发生研究初报[J]. 广东农业科学,1999(5):14-15.
- [8] 邝哲师,周丽依,马雪筠,等. 荔枝体胚发生及成苗研究[J]. 广东农业科学,1997(1):15-17.
- [9] 赖钟雄,潘良镇,陈振光. 龙眼胚性细胞的建立与保持[J]. 福建农业大学学报,1997,26(2):160-167.
- [10] 俞长河,陈振光. 幼胚和花药培养诱导荔枝胚性愈伤组织[J]. 福建农业大学学报,1997,26(2):168-172.
- [11] 卜学贤,陈维伦. 活性炭对培养基中生长调节物质的吸附作用[J]. 植物生理学报,1988,14(4):401.