

植物组织培养技术在蓖麻上的应用研究

李靖霞¹, 朱国立¹, 李晓娜², 何智彪¹, 张智勇¹, 乔文杰¹

(1. 通辽市农业科学院, 内蒙古 钱家店 028015; 2. 通辽市农牧业局 植保植检站, 内蒙古 通辽 028000)

摘要: 文章阐述了组织培养技术在蓖麻上的应用研究情况, 并对起始材料、培养基和激素的选择使用提出了建议。

关键词: 组织培养; 蓖麻; 应用研究

中图分类号: S565.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-0907(2008)06-0081-02

Technology of plant tissue culture and its application research on castor

LI Jing-xia

(Tongliao Academy of Agricultural Science, Qijiadian 028015, China)

Abstract: This article expatiates the importance of tissue culture technology and its application research on castor breeding in our country, and also raises some suggestion on choosing initial materials, culture medium and hormone.

Key words: Technology of tissue culture; Castor; Application research

植物组织培养是指在无菌和人工控制条件下, 对植物的原生质体、细胞、组织和器官进行离体培养, 并控制其生长发育的一门技术。这项技术在花卉、水稻、小麦上已应用, 并取得了成果。我国蓖麻育种研究手段主要是杂种优势利用及常规育种, 育种年限长, 满足不了生产对品种的需求。利用单倍体育种技术, 对优良的变异植株, 通过染色体加倍获得基因型纯合的可育个体, 可缩短育种年限; 利用花粉、胚珠进行培养能加快蓖麻育种速度; 利用转基因工程可解决蓖麻的抗病、抗虫问题。蓖麻育种家已认识到在蓖麻研究中应用生物技术培育品种的重要性, 已将蓖麻的生物工程提到日程上来加以深入研究, 并取得了一定的研究成果。

1 我国蓖麻组织培养研究情况

我国蓖麻组织培养研究起步较晚, 目前做这方面工作的单位有云南省农业科学院油料作物研究所、广西大学和广西林科院、山东省淄博市农业科学研究院等。

云南省农业科学院油料作物研究所张庆澄、杨建国等, 探讨了蓖麻单雌系组培快繁技术, 并获得成果。利用单性雌株的顶芽、腋芽、带节的茎段, 通过起始培养基(1/3MS+6-BA0.5mg/L+IBA0.01mg/L)、芽增殖培养基(MS(改良)+6-BA0.5~0.8mg/L+IBA0.01~0.03mg/L)、生根培养基(1/2MS+NAA0.05 mg/L+适量活性炭), 培养基中添加 3%蔗糖、0.7%琼脂、pH 值 5.8、培养温度 24~27℃、光照 12~14 h/d, 光照度约为 1500 lx 的条件成功的培养出了蓖麻单雌品系(种)D033-1、D034-1 等, 并利用该技术对这些品系(种)进行快繁获得了大量苗。

广西大学张慧英等对蓖麻组培技术也进行了研究, 以蓖麻的根、茎、叶作外植体分别在附加不同激素的 MS 培养基上进行培养(培养条件 MS 为基本培养基, 添加不同的激素, 如: 2,4D、BA、NAA, 以及促进生长的物质氯化胆碱(CC)、水解乳蛋白; 蔗糖浓度 3%、琼脂 0.5%。愈伤组织诱导采用暗培养。其余试验需每天光照 10h, 光照强度为 1500~2000lx, 培养温度 25±2℃)。试验结果是: 茎段(侧芽或顶芽)在附加 BA 0.5 mg/L、NAA 0.001 mg/L、

水解乳蛋白(LH) 10 mg/L 和氯化胆碱(CC) 5 mg/L 的 MS 培养基上, 芽的增殖率最高, 可达 200%, 而且长势较好。说明在培养基中除附加一定量的细胞分裂素和生长素外, 再添加一定量的水解乳蛋白和氯化胆碱对丛生芽诱导有促进作用。

广西林科院王以红、韦家川等对蓖麻营养芽进行了离体培养试验研究, 成功的繁殖出再生植株。以 MS 为基本培养基, 附加 BA0.6~0.8mg/L 和 IAA0.5mg/L 为最初诱导不定芽的发生; 在附加 BA0.3mg/L 和 IAA0.2mg/L 上培养, 不定芽生长健壮, 继代周期约 20d, 增殖倍数 2~3 倍; 在继代培养中, VB2 和 VC 分别以 15mg/L、10mg/L 浓度添加, 可减轻或防止芽的褐化; IAA0.8mg/L 和 IBA0.2mg/L 共同促进单芽生根, 生根率 90%以上。

山东省淄博市农业科学研究院谭德云、陈祥梅等也进行蓖麻组织培养的研究, 是以成熟蓖麻种子为材料建立无菌系, 研究了不同播种方式、不同培养基、不同外植体、不同激素配比对愈伤组织诱导的影响。结论是: 无菌系的建立以根、茎、叶等为外植体时较难, 而以成熟种子为外植体时, 可在短期内就建立无菌系; 蓖麻种子剥去种皮在以纱布为支持物的培养基上出芽, 污染率低, 出芽时间提前了 27d, 幼苗长势也均好于其它培养基; 在以根、茎、叶为外植体进行愈伤组织的诱导时, 茎的愈伤组织诱导率最高, 但有部分愈伤组织呈玻璃化, 不宜开展下一步的试验。由叶得到的愈伤组织, 色淡绿, 较紧密, 生长正常, 适合进行下一步的试验, 适宜培养基为: MS+2,4D1.0mg/L+6-BA0.5mg/L+NAA0.02mg/L, 愈伤组织诱导率达 93%。

2 国外蓖麻组织培养研究情况

2.1 蓖麻组织培养研究进展

2.1.1 组织培养的起始材料研究 Sujatha 等以具丰富分生组织细胞的芽尖(shoottip)和胚轴(embryoaxis)为外植体进行了蓖麻离体再生体系研究。通过试验得出: 胚轴及其附近组织在培养基上迅速膨大, 说明这些分生组织细胞分裂速度非常快。随后在无任何愈伤组织形成的情况下膨大的胚轴上直接分化出很多芽。

这些芽经培养可以伸长、生根而再生成完整植株。

Sujatha 等对离体再生能力与基因型的关系进行研究,认为每个外植体再生芽的数量在蓖麻不同的基因型之间并无明显的差异。他们认为这种再生芽数量上的差异主要反映不同部位外植体再生能力的差异,并推测不同外植体对激素反应的差异是由于不同部位的细胞对激素的吸收和识别有差异,或者是由于激素作用机制的不同而造成的。

2.1.2 培养基和激素的作用 Sujatha 等使用 MS 基本培养基,只是在再生芽的生根阶段将基本培养基减半。证明基本培养基对蓖麻离体培养植株再生没有显著的影响。Sujatha 等为了测试对蓖麻组织培养芽再生最适的激素种类和浓度,在实验中分别使用了 0.5~10.0mg/L 的腺嘌呤(adenine)、BA(N6 benzyladenine)、激动素(Kn,kinetin)、TDZ(thiadiazuron)和玉米素(ZT,zeatin)。结果发现,在测试的所有浓度的腺嘌呤中,胚轴外植体只发育成单独的植株(即原有胚芽的萌发)而无任何增殖;激动素对潜伏芽的生长有作用(平均每个外植体产生 1.0~3.3 个芽)。同样是胚轴外植体,TDZ 对丛生芽的形成有显著作用,在 TDZ 培养基上培养一段时间后转到 BA 培养基,获得了较高的芽增殖率(每个外植体产生 33.3~40.0 个芽)。而对于芽尖外植体,在 BA 培养基上获得的再生芽数相当高,并在 BA 浓度为 2.0mg/L 时达到最高(每个外植体产生 46.7 个芽)。在 0.5mg/L 腺嘌呤的情况下这个数字最低(每个外植体产生 5.0 个芽)。此外,以胚轴为外植体时,他们发现了一个有趣的现象,即在 BA、Kn 和 ZT 培养基上,不定芽发生之后其数量保持恒定,没有进一步增殖。但在 TDZ 培养基上每个独立的外植体的芽数却在不断地增加。然而,在 TDZ 培养基上比较高的增殖指数却伴随着芽的伸长受到抑制,他们用继代培养的方法解决了这一问题。

Sujatha 和 Reddy 通过研究建立了一个比较成熟的蓖麻植株再生体系,并证明了 TDZ 有较高的细胞激素活性,在蓖麻组织培养中有积极的作用。实际上从 20 世纪 80 年代初起蓖麻的组织培养研究一直没有中断过,只是研究结果不甚理想,难以满足遗传转化研究的需求。Athma 等只在 25%~30% 的实验中经 10~20d 的培养从蓖麻芽尖获得了单个的芽。Sangduen 等报道了从芽尖获得了多芽的增殖,但没有提供每个外植体产生芽的比率。在 Reddy 等的实验中,79.1% 的培养物平均产生 5.2 个芽。Molina 等在 1mg/L BA 培养基上获得的最大值为每个外植体 4.4 个芽。Ahn 等(2006)同样用胚轴作外植体,在 20 μ mol/L BA 培养基上每个外植体平均产生 6.8 个芽,在 1 μ mol/L TDZ 培养基上每个外植体为 13.3 个芽,而当使用 1 μ mol/L TDZ 并经 7d 的黑暗处理时,平均每个外植体产生的芽数上升到 24.2 个。

2.2 蓖麻遗传转化研究进展

蓖麻遗传转化研究起步较晚,仅有的少量研究在 2005 年以后才陆续报道。Sujatha 等于 2005 年首次报道获得了转基因蓖麻植株。在此之前 McKeon 等于 2000 年向美国专利局提交了“蓖麻转化”的专利申请(2003 年 9 月公开)。而 Malathi 等于 2006 年报道了他们通过遗传转化方法获得了抗虫的蓖麻转基因植株。

3 结论与建议

3.1 组织培养的起始材料

对于像蓖麻这样植株再生比较困难的植物,组织培养的起始材料应选择那些包括分生组织在内的组织或器官,分生组织

细胞体积小,细胞排列紧密,细胞质浓厚。它们分裂速度快并具有较强的器官分化潜力。选择这样的组织或器官作为外植体,可以较容易地获得再生植株。为了进一步遗传转化研究考虑,外植体应尽量避免选择那些带有生长点和腋芽的组织或器官,因为这些部位的芽原基已经形成,很可能由于这些芽原基的发育而形成单独的芽而降低新生芽的频率。在进行遗传转化时,要使接受外源基因的细胞发育成新的芽原基。原有芽原基的生长会抑制新芽原基的形成和发育。

3.2 培养基和激素的作用

通过以上文献资料说明,使用基本培养基,没有观察到培养基对蓖麻芽再生的数量和芽的发育上有明显的差异,说明基本培养基对蓖麻离体培养植株再生没有显著的作用。广西林科院实验发现,细胞分裂素 BA 浓度 0.6mg/L、0.8mg/L 与生长素 IAA 浓度 0.5mg/L 的配比组合,对蓖麻营养芽进行离体初代培养时,有利于不定芽的分化,并且芽丛是直接由外植体的腋芽处萌动产生的。这一培养途径,有利于组培的再生植株保持原母本的遗传性状;不同浓度的细胞分裂素、BA 对蓖麻不定芽的分化和生长影响较大,当水平浓度每上升 0.1mg/L,不定芽分化的数量和不定芽生长的质量就表现有异。继代培养,高浓度 0.5mg/L 的 BA 促进不定芽的分化,但芽丛密集,芽顶易褐化。低浓度 0.3mg/L 的 BA 则使不定芽分化较少,形成的单芽多,但芽生长正常,叶色翠绿,将高低两种浓度的 BA 按顺序交替对蓖麻不定芽进行培养,可以获得不定芽分化较多又生长健壮的效果;山东省淄博市农业科学研究院以成熟蓖麻种子为材料建立无菌系进行不同培养基、不同外植体、不同激素配比对愈伤组织诱导的影响实验。结论是:两种培养基中,MS 和 B5 培养基的平均诱导率分别为 80.8% 和 78.6%,没有太大的差别。在含激素的 MS 培养基上茎的平均出愈率为 89.0%,根的平均出愈率仅次于茎段,在含激素的 MS 培养基上平均出愈率为 87.5%;叶片的诱导率平均为 65.8%,但得到的愈伤组织结构较紧密,颜色为淡绿色,生长良好。Sujatha 等为了测试对蓖麻组织培养芽再生最适的激素种类和浓度,在实验中分别使用了 0.5~10.0mg/L 的腺嘌呤(adenine)、BA(N6 benzyladenine)、激动素(Kn,kinetin)、TDZ(thiadiazuron)和玉米素(ZT,zeatin)。通过实验证明,TDZ 有较高的细胞激素活性,在蓖麻组织培养中有积极的作用。

参考文献:

- [1] 张庆澄,杨建国,郑树松,等.蓖麻单性雌株组织培养和快速繁殖[J].植物生理学通讯,2001,37(2):133-134.
- [2] 张慧英,韦家川.蓖麻组织培养技术探讨[J].广西农业生物科学,2001,20(3):233-234.
- [3] 王以红,蔡玲,吴幼媚.蓖麻营养芽离体培养再生植株的研究[J].广西热带农业,2003,(4):8-10.
- [4] 谭德云,陈祥梅,王光明,等.蓖麻无菌系建立方法的研究[J].农业科技通讯,2008,(1):60-61.
- [5] 谭德云,陈祥梅,王光明,等.特油作物蓖麻组织培养关键技术研究初报[J].中国农学通报,2008,24(1):29-32.
- [6] 李君,盖春英,马捷,向日葵幼胚培养技术的研究与应用[J].内蒙古农业科技,2006,(5):47-49.
- [7] 赵志强,李瑞英,吴俊华,等.美女樱的组织培养技术研究[J].内蒙古农业科技,2006,(3):25-26.

(责任编辑 侯旭光)