

翅果油树组织培养研究进展

刘群龙, 段国锋, 吴国良

(山西农业大学园艺学院, 山西太谷 030801)

摘要:翅果油树是中国特有的珍稀濒危植物, 具有重要的食用和药用价值, 但其繁殖比较困难。对翅果油树组织培养过程中外植体的选择和培养、培养基的筛选以及在培养过程中出现的褐化现象及其解决措施等研究进展进行了概述, 并提出了今后的研究方向。

关键词:翅果油树; 外植体; 培养基; 褐化

中图分类号:S664.9 **文献标识码:**A

Developments in Tissue Culture of *Elaeagnus mollis*

Liu Qunlong, Duan Guofeng, Wu Guoliang

(Horticulture College, Shanxi Agriculture University, Taigu Shanxi 030801)

Abstract: *Elaeagnus mollis* Diels is a rare and extinct plant in our country and has very important edible and medicinal value, but it is very difficult to regenerate. In this article, choosing and handling the explants, sieving the suitable medium and the question of browning were reviewed in tissue culture of *Elaeagnus mollis*. at last, its research direction was put forward.

Key words: *Elaeagnus mollis* Diels, Explants, Medium, Browning

翅果油树(*Elaeagnus mollis* Diels), 又名泽条旦、车勾只, 胡颓子科(Elaeagnaceae), 胡颓子属(*Elaeagnus*)植物, 多年生落叶灌木或乔木, 主要分布于山西的乡宁、翼城、河津以及陕西户县等地, 为中国特有树种, 20世纪80年代就被列为国家二级珍稀濒危保护植物, 已载入红皮书^[1,2]。翅果油树是优良的木本油料树种, 果实出仁率48%~50%, 种仁出油率30%左右^[3]。翅果油中的不饱和脂肪酸含量可达90%以上, 其中油酸及亚油酸极为丰富, 约占脂肪酸总量的85%左右, 是制造治疗高血压、高血脂、动脉硬化药物——“亚油酸丸”的良好原料^[4]。翅果油中V_E含量高达1558.1mg/100g, 如此之高在天然产物中实属罕见^[5]。而且, 翅果油中的V_E是8种V_E异构体中质量最优的^[6], 容易被人体吸收。另外, 翅果油树是中国放线菌结瘤植物资源的重要物种, 根系有丰富的根瘤, 固氮活性比当地大豆高^[7], 是改良土壤、绿化荒山的先锋树种。因此, 翅果油树具有重要的经济和科学价值及发展前景^[8]。

翅果油树繁殖方法主要有分根繁殖和种子繁殖两

种。分根繁殖时, 由于人为砍伐破坏相当严重, 现存大树较少, 靠分根繁殖的方法速度太慢^[9]。翅果油树种子发芽率低, 且寿命短, 隔年不萌发, 没有经过任何处理的种子, 发芽率仅为5.93%, 发芽后能正常发育成幼苗的仅为1.69%^[10], 经过混沙处理的种子发芽率为45.76%, 发芽后能正常发育成幼苗的也不过11.02%^[11], 这也极大的限制了它的繁衍、更新和扩展。众所周知, 采用组织培养方法可以进行快速繁殖。笔者围绕近些年来相关文献报道, 对翅果油树组织培养方面的研究进展进行了较为详尽的概述, 并提出了今后的研究方向, 从而为进一步认识和开发翅果油树资源提供科学参考。

1 外植体的选择与处理

翅果油树组织培养研究通常选用当年的种子、当年生幼嫩枝条上的叶片和茎段、一年生枝条的休眠芽及茎段作为外植体。

1.1 以叶片为外植体

翅果油树试管苗组织培养的最适宜的外植体为无菌实生苗的子叶, 子叶适宜诱导分化和愈伤组织的

基金项目: 山西农业大学青年科技创新基金“翅果油树种质资源的保存研究”(200124)。

第一作者简介: 刘群龙, 男, 1974年出生, 讲师, 研究方向为果树种质资源和遗传育种。通信地址: 030801 山西省太谷县山西农业大学园艺学院, Tel: 0354-6288331, E-mail: lq10288@126.com。

收稿日期: 2005-12-15, 修回日期: 2005-12-21。

诱导^[12]。以室外取材的叶片为外植体时,在5月上、中旬取的叶片均可诱导出不定芽,但5月上旬所取的幼嫩叶片,不定芽分化能力较强;5月下旬取材,则叶片较老,效果差^[13]。虽然翅果油树叶片上表面散布稀疏的分枝状表皮毛,但下表面分布较密,也多为分枝状表皮毛,叶主脉处最为稠密,多为星状毛^[14]。由于表皮毛的存在,给无菌培养体系的建立带来很大困难。酒精有很强的穿透力,适当延长酒精浸泡时间,可降低污染率。因此,当以叶片为外植体时,应先用75%的酒精浸泡3~4min,然后用0.1%的升汞灭菌6~8min,最后用无菌水冲洗5~6次^[13]。

1.2 以茎段为外植体

取材时期不同,接种的茎段形成无菌嫩梢的途径也不同。尹大泽等(2001)实验表明休眠芽的萌发表现为由秋季到冬季逐渐降低和由冬季到春季逐渐提高的规律性变化,其中以3月份取材最好,休眠芽能直接萌发成小苗,这主要与其内源性抑制物质的季节性变化有直接关系^[15,16]。同样,陈惠(1993)等研究也表明,4月上旬休眠茎段无器官发生能力,可通过诱导休眠芽直接萌发成小苗;但5月份所取的嫩茎均可诱导出不定芽,且以5月下旬取材为佳^[13]。另外,陈惠(1997)等把翅果油树嫩枝中段培养在基本培养基为MS,附加6-BA较高,NAA较低的培养基上培养30天,结果发现,创伤对愈伤组织的形成有刺激作用,且愈伤组织表层和近表层细胞可以分化出芽原基^[17]。

翅果油树茎表面的表皮毛,灰色或褐色,以盾状为主,因茎的老嫩其表皮毛形态略有不同。休眠芽的鳞片多覆盖盾状表皮毛,只在鳞片的尖端有少量星状和分枝状毛^[14]。同样,这些表皮毛的存在,也给无菌培养体系的建立带来很大困难,也应适当延长材料在穿透力较强的酒精中的浸泡时间。因此,当以茎段为外植体时,应先用75%的酒精浸泡5~6min,然后用0.1%的升汞灭菌6~10min,最后用无菌水冲洗5~6次^[13]。但是,无论是叶片还是茎段,在酒精中浸泡时间过长,很容易对材料造成损伤,因此可尝试采用其它种类的润湿剂如吐温及抽气减压法、磁力搅拌、超声振动等方法配合使用,使消毒剂能很好地渗入到材料表面,这样对材料的损伤小,又能达到理想的消毒效果^[18]。

1.3 以种子为外植体

翅果油树的种子属于种皮和生长抑制剂引起的双重休眠型,且以前者为主^[19]。因此,对于当年生种子可去除外果皮、中果皮后接种,但接种时间不宜过早,

否则会由于种子的后熟效应造成发芽率低;但如接种过晚,由于生长代谢物的抑制,发芽率也比较低;11月至12月中旬是比较适宜的接种时间,种子发芽率可达60%左右,并且在继代培养时,种子的增殖情况优于其它时期取材的种子^[12]。为扩大翅果油树组织培养的取材范围,在以已休眠的种子为外植体时,可去除种子的外果皮、中果皮以及种皮,获得裸露的种仁,接种后萌发率可达70%,但带革质种皮的已休眠的种子萌发率为零,且向培养基中分泌褐色的酚类化合物^[13]。至于去种皮的方法,可采用清水浸泡法,这样不伤害种子,剥皮较容易,且节约时间、药品和材料;采用硫酸浸泡法,则对种子的化学伤害强,造成种子不能成活;而物理去皮法对种子的创伤程度强,处理后能用于实验的种子少^[20]。对于种子的灭菌处理,可先用75%酒精灭菌8min,再用0.1%的HgCl₂处理10min为佳^[12,20]。

2 培养基的筛选

2.1 基本培养基

培养基是外植体赖以生长的物质基础。在进行翅果油树愈伤组织的诱导及其快速繁殖时,多采用MS为基本培养基,再附加多种外源激素,如6-BA、NAA、GA₃等,pH 5.7-5.8,蔗糖浓度30g/L,琼脂7g/L。闫桂琴等(2003)在进行无菌种子发芽时,将种子接种到1/2MS、水+琼脂两种培养基中,结果发现,1/2MS培养基中的种子发芽率稍高于水+琼脂中的,说明种子萌发时不需要从外界环境中吸收营养,而1/2MS培养基能提供种子萌发所需要的足够营养,水+琼脂则不能,因此种子无菌培养时1/2MS为最佳培养基^[21];但卢英梅等(2002)认为种子萌发的前期不需要外加营养,当试管种子苗生长一段时间,子叶的营养将要耗尽时,再及时转入1/2MS培养基,这样即不浪费材料有节约药品^[20]。

2.2 继代培养基

由于材料不同,形成完整植株的途径也就不同,因此,在继代培养过程中需要筛选不同的培养基。

2.2.1 愈伤组织的诱导及分化培养基 由于材料不同,愈伤组织诱导和分化的培养基也不同。以室外采集的较幼嫩叶片为外植体,接种到MS+BA₂+NAA₁+2,4-D_{0.5}或MS+BA₁培养基上,不仅能诱导出由薄壁细胞和小的分生细胞构成的颗粒状愈伤组织,而且不定芽的分化能力较强;但以较老叶片为外植体时,MS+BA₁+NAA_{0.5}适宜愈伤组织的诱导和分化^[13]。以无菌实生苗的茎、子叶为外植体,当MS培养基中BA浓度为0.5mg/L,NAA浓度为

0.02mg/L、0.04mg/L时,或NAA浓度为0.02mg/L,BA浓度为0.6mg/L、0.7mg/L时,脱分化情况较好,愈伤组织形成率高。但将愈伤组织诱导分化不定芽时,发现BA浓度过高不利于不定芽的形成,且芽苗长得低、弱;而MS+BA_{0.5}+NAA_{0.02}、MS+BA_{0.5}+NAA_{0.04}不仅适宜愈伤组织的诱导,而且适宜愈伤组织的再分化,芽苗长得高、壮^[12,20]。

2.2.2 茎段直接萌发培养基 在以当年生幼嫩枝条为外植体时,如培养基中附加不同浓度的2,4-D或较高浓度的BA(1~3mg/L),则腋芽不能萌发,且使得切口处所有组织中的活细胞均参与形成大量的愈伤组织,然后愈伤组织表层或近表层的一些染色深、核大、质浓的分生细胞团发育为芽原基,进而产生不定芽;但BA浓度降低后,可诱导当年生枝条萌发^[13,17]。当以休眠芽作为外植体时,在培养基中加入GA₃可打破休眠,提高萌发率;当休眠芽自然休眠解除后,在培养基中附加BA0.5mg/L、NAA0.1~0.5mg/L时,可促进休眠芽的萌发和成苗,且形成的小苗较粗壮^[15]。

2.3 生根培养基

在芽苗生根时,通常在培养基中附加低浓度的蔗糖,不附加蔗糖不仅不能生根,而且导致了无根苗的死亡^[13]。但碳源是否可用其它的种类如白糖、食用冰糖来代替,未见有报道。当以诱导产生的不定芽为外植体,在1/2MS培养基中附加NAA 0.02mg/L、GA 0.2mg/L、IBA 5~7.5mg/L、蔗糖 25g/L时,有利于根的诱导,生根率可达60%以上,而且诱导生成的根粗壮、木质化程度早;然而采取室外当年生枝条的茎段,无论接种到何种培养基上,均未生根^[12]。

3 翅果油树组织培养中的褐变现象及其解决措施

褐变是植物组织培养中较为普遍的一种现象,培养材料变褐主要是由于伤口处分泌酚类化合物,在有氧的条件下,酚类物质由多酚氧化酶催化,被氧化为醌,醌再通过非酶促聚合反应产生有色物质而导致组织的褐变,这类物质可以抑制细胞中其它酶的活性,影响细胞的正常代谢,严重时可导致组织的死亡。因此,酶促褐变的发生必须具备3个条件,即酶、底物和氧。在正常条件下,酚类物质分布在细胞的液泡内,而酶则分布在各种质体或细胞质内,这种区域性分布使底物与酶由质膜分隔开来。当外植体处于机械损伤等逆境时,细胞膜结构的破坏或细胞中物质区域化分布的破坏是酚类物质的酶促氧化和组织发生褐变的关键。引起褐变的因素是复杂的,就内因来讲,外植体材料的生理状态、基因型等都会影响褐变的发生;就外因而言,

取材的时期、部位和大小、培养基的成份包括激素的种类和浓度、培养条件、外植体受伤害的程度包括机械伤害和药剂伤害、培养时间的长短等也会影响褐变的发生^[18]。

在翅果油树组织培养中褐变现象比较严重。由于翅果油树内部酚类物质含量较高,各类外植体在组织培养时均会发生酚类物质的氧化,从而导致材料褐变。如何减轻或控制翅果油树组织培养中褐变的发生和发展,据闫桂琴等(2003,2004,)研究结果认为,可采取以下途径^[12,21]:①用无菌实生苗的各器官作为外植体来诱导愈伤组织及不定芽的分化;②选取幼嫩、分生能力强的茎段或处于生理代谢减弱时期的外植体;③降低培养基中无机盐浓度,如采用1/2MS或1/4MS培养基;④葡萄糖为碳源的培养基能有效防止褐变,麦芽糖次之,蔗糖最差;⑤在培养初期,将外植体置于弱光或黑暗条件下培养3~5d;⑥抗氧化剂V_C和Na₂S₂O₃能抑制褐变,但Na₂S₂O₃对褐变的抑制作用不及V_C,其中0.15g/L的V_C效果最佳,其次为0.1g/L和0.2g/L。吸附剂AC不能防止外植体褐变,且抑制愈伤组织的诱导。此外,张红梅等^[9]还提出热击和连续转移等方法来减轻翅果油树组织培养中外植体的褐变。

4 今后的研究方向

对翅果油树组织培养的研究至今已有十多年,专家和学者们通过大量的实验研究,已取得了可喜的成绩,但与此同时也遇到了一些尚待解决的问题,如试管嫩梢的生根、试管苗的锻炼和移栽等问题。同时还有一些新的课题如富含亚油酸和V_E的胚乳细胞的培养等问题值得研究。由此可见,对翅果油树组织培养方面的研究还未达到一定的深度和广度,而且该项技术在生产中也尚未得到实际应用。为此,有必要在前人研究的基础上继续进行深入研究,并将对该方面的研究推向一个更高的层次,以利于人类能更好地利用它,为人类创造更多的财富做出贡献。

参考文献

- 1 国家环境保护局,中科院植物所.中国珍稀濒危保护植物名录.北京:科学出版社,1987.96
- 2 张峰,上官铁梁.山西翅果油树种群多样性研究.植物生态学报,1999,23(5):471-474
- 3 王建军,段存礼.木本油料树木—翅果油树.中国野生植物资源,2004,23(1):30-31
- 4 王念文,刘世鹏,杨帆.翅果油树.中国油脂,2003,28(5):10-12
- 5 冯宝英,杨坪荣.翅果油树种仁化学成分分析研究.山西林业科技,1989,(4):6-9
- 6 陈晓蓉.翅果油树的开发与应用.山西食品工业,2004,(2):6

- 7 贾良智,周俊.中国油脂植物.北京:科学出版社,1987.403~404
- 8 刘群龙,董晓燕.翅果油树的开发价值及其发展前景.见郝荣庭,刘孟军.干果研究进展(4).北京:中国农业科学技术出版,2005.112~115
- 9 张红梅,吴国良,郝燕燕,等.翅果油树的研究进展.山西农业大学学报,2002,22(3):278~280
- 10 山西省林科所造林组.翅果油树调查试验初报.山西林业科技,1974,1:25~32
- 11 上官铁梁,张峰.我国特有珍稀植物翅果油树濒危原因分析.生态学报,2001,21(3):502~505
- 12 闫桂琴,张伟,张艳芳,等.翅果油树脱毒试管苗的组织培养技术研究.西北植物学报,2003,23(7):1297~1303
- 13 陈惠,白新生.翅果油树组织培养.见山西省植物学会编.北方植物学研究(第一集).天津:南开大学出版社,1993.74~79
- 14 陈惠,帝清平,杨瑞林,等.稀濒危植物翅果油树表皮毛的微形态观察研究.西北植物学报,2004,24(8):1390~1396
- 15 尹大泽,王小国,陈惠.翅果油树休眠芽和种子的试管萌发.中草药,2001,32(12):1113~1115
- 16 潘瑞炽,董愚德.植物生理学.第四版.北京:高等教育出版社,1995.373
- 17 陈惠,白新生.翅果油树茎段愈伤组织和芽发生的组织学研究.广西植物,1998,18(2):157~159
- 18 刘庆昌,吴国良主编.植物细胞组织培养.北京:中国农业大学出版社,2003.35~45
- 19 杜大至,李荣儿,原福虎,等.翅果油树种子的休眠和萌发生理.植物生理学通讯,1989,(6):36~38
- 20 卢英梅,程小丽,侯娟娟,等.翅果油树愈伤组织的继代培养.山西师范大学学报(自然科学版),2002,16(4):71~74
- 21 闫桂琴,田丽宏,杨利艳.濒危植物翅果油树愈伤组织诱导中褐变问题的研究.西北植物学报,2004,24(8):1384~1389

(责任编辑:陶冶之)