

愈伤组织悬浮培养法研究长喙田菁 (*Sesbania rostrata*) 根、茎、叶的重金属抗性^{*}

徐昊娟, 席嘉宾, 杨中艺

(中山大学草业与绿地技术研究中心, 广东 广州 510275)

摘 要: 通过悬浮培养长喙田菁 (*Sesbania rostrata*) 愈伤组织, 分别研究长喙田菁根、茎、叶各器官对重金属胁迫的反应, 并量化各器官的重金属抗性。研究结果表明, 愈伤组织悬浮培养方法能够有效测定植物根、茎、叶的重金属抗性; 长喙田菁根愈伤组织对 Pb、Zn、Cu 和 Cd 的抗性远高于茎和叶愈伤组织, 叶愈伤组织则对各重金属较为敏感, 其抗性只有根的 1/8~1/4。Pb 对根、茎、叶的半抑制质量浓度分别为 80、40 和 15 mg/L, Zn 则分别为 80、30 和 10 mg/L, Cu 分别为 20、8 和 4 mg/L, Cd 分别 15、8 和 6 mg/L。

关键词: 长喙田菁 (*Sesbania rostrata*); 重金属抗性; 愈伤组织; 悬浮培养

中图分类号: Q943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2001) 03-0084-04

长喙田菁 (*Sesbania rostrata*) 能抵抗不良环境, 有很强的重金属抗性, 是一种很好的重金属矿尾矿复垦的先锋植物。它能够在富含 Pb、Zn、Cu 等重金属元素的尾矿中发芽、生长、结瘤、固氮、开花、结实^[1]; 其能够忍耐的重金属质量浓度 (ED₅₀) 分别达到 Pb 32.90 $\mu\text{g/mL}$ 、Zn 5.32 $\mu\text{g/mL}$ 、Cu 4.40 $\mu\text{g/mL}$ 和 Cd 12.00 $\mu\text{g/mL}$ (根据 Yang and Wong, 未发表数据)。但目前尚不清楚其重金属抗性机理。为了探讨这一问题, 有必要分别测定长喙田菁的根、茎、叶的重金属抗性。传统的测定方法大多以植物整体为对象, 欠缺分别不同器官测定抗性的研究报告。本实验将采用愈伤组织悬浮培养法, 试图建立测定长喙田菁各器官重金属抗性的方法, 为从机理上研究该植物的重金属抗性提供一定的理论基础。同时, 由于组织细胞的悬浮培养能延续植物的原有特性, 生物量大, 并能稳定生产^[2], 因此, 应用悬浮培养可以研究植物在不受栽培环境影响下的生物特性。悬浮培养作为大量培养植物微组织的一种专门技术已被广泛应用^[3], 在植物的移植、代谢物的生产等方面应用最多^[4]。利用重金属诱导悬浮培养的组织产生重金属螯合物, 尤其是 Cd 的研究也不少^[5], 但在定量测定植物重金属抗性方面的研究不多。

1 材料和方法

1.1 材料及其处理

供试长喙田菁种子在 1991 年从日本引进, 并在广州经过两代繁殖。

以两种方法制备供试材料: ①盆栽苗 (主要为取得叶片材料): 用刀片划破种皮, 放在垫有 3 层滤纸的培养皿中, 浸泡, 种子吸满水分膨胀后, 保持湿润, 种子发芽后植于花盆中培养; ②无菌苗 (主要为取得茎和根材料): 采用无菌培养方法, 种子划破种皮后消毒, 使用经消毒的培养瓶和灭菌的营养液在无菌条件下培养。

1.2 愈伤组织的诱导

1.2.1 材料处理 取盆栽苗的叶片, 用 $\varphi=70\%$ 的酒精消毒 15 s 后, 用无菌水冲洗 3~5 遍, 然后用饱和漂白粉溶液消毒 5 min, 再用无菌水冲洗 5 遍。

茎和根则从无菌苗上切取。

1.2.2 培养液和培养方法 用 Ms 和 B₅ 营养液 (不加琼脂)^[6], 悬浮培养 (27 $^{\circ}\text{C}$) 上述经处理的长喙田菁的根、茎、叶。

1.3 愈伤组织的培养

1.3.1 愈伤组织诱导生长情况测定 称量每一培养瓶中所接种组织的生物量鲜质量, 以相同质量的鲜组织烘干 (70 $^{\circ}\text{C}$, 48 h), 再测干质量,

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30070126); 国家教育部骨干教师资助计划资助项目; 广东省自然科学基金资助项目 (980293)

收稿日期: 2000-07-19; 作者简介: 徐昊娟 (1975—), 女, 硕士生; 通讯联系人: 杨中艺。

取平均值 (m_0). 以后培养中, 每天取出 3 瓶中的组织, 同样条件下烘干后称量, 算取平均干质量 (m_t), 按公式“愈伤组织生物量相对增长率 $\% = (m_t - m_0) / m_0 \times 100\%$ (m_0 : 接种前生物量; m_t : 第 t 天测得的生物量)” 计算愈伤组织的相对生长.

1.3.2 长喙田菁抗性的测定 根据以往的实验结果^[1,2] 配制一系列质量浓度的重金属培养液, 接种已培养好的愈伤组织. 长喙田菁根、茎、叶培养液中重金属质量浓度如表 1 所示. 在培养过程中, 测定各重金属对各器官部位愈伤组织生长的半抑制质量浓度 (ED_{50})^[7] 和致死质量浓度.

表 1 根组织培养液 (B_5)
中重金属离子质量浓度
Tab 1 Concentrations of heavy metals
applied in root callus culture mg/ L

元素	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Pb	30	60	100	150	200	250	300	400	500
Zn	20	40	60	80	100	150	200	250	300
Cu	10	20	30	40	60	80	100	120	150
Cd	10	20	30	40	60	80	100	120	150

表 2 茎组织培养液 (B_5) 中
重金属离子质量浓度
Tab 2 Concentrations of heavy metals
applied in stem callus culture mg/ L

元素	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Pb	10	30	60	80	100	120	150	200	300
Zn	10	20	40	60	80	100	120	150	200
Cu	1	3	6	8	10	12	15	20	30
Cd	1	3	6	8	10	20	30	40	50

表 3 叶片培养液 (M_s) 中
重金属离子质量浓度
Tab 3 Concentrations of heavy metals
applied in leaf callus culture mg/ L

元素	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Pb	10	30	60	80	100	120	150	200	250	300
Zn	10	20	40	60	80	100	120	150	200	300
Cu	3	5	10	20	30	40	50	60	80	100
Cd	3	5	10	20	30	40	50	60	80	100

2 结 果

2.1 愈伤组织培养的适用培养基
试验结果表明, 叶片在 M_s 培养基中生长良好, 但在 B_5 培养基中很难诱导叶愈伤组织; 而茎则在 B_5 培养基中容易产生愈伤组织, 且生长良好; 根则在两种基本培养基中均能形成愈伤组织, 并生长很好. 据此确定了长喙田菁愈伤组织的诱导与培养方案, 即叶片选用 M_s 培养液, 茎选用 B_5 培养液, 根则依据条件方便, 两者均可, 本实验采用 B_5 培养液. 所有培养都采用悬浮培养, 以使组织充分与培养液接触.

2.2 愈伤组织正常生长情况
长喙田菁根、茎、叶愈伤组织相对生长量的系列数据如图 1 所示. 可以看出愈伤组织生长最佳时期为接种后第 10 天 (叶) 和第 6~8 天 (茎和根).

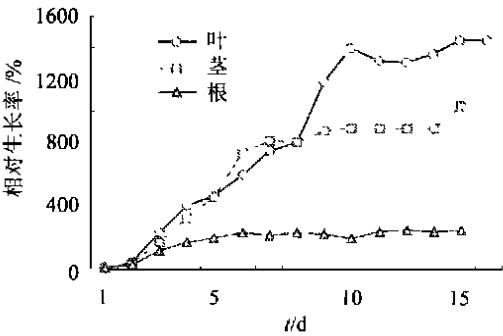


图 1 根、茎、叶愈伤组织生长情况
Fig 1 The growth of callus of
S. rostrata' s root, stem and leaf

2.3 长喙田菁各器官的重金属抗性
长喙田菁根、茎、叶愈伤组织在四种重金属胁迫下的半抑制质量浓度和致死质量浓度如图 2、3 所示. 各重金属对各器官愈伤组织生长的半抑制浓度和致死质量浓度均表现为根>茎>叶, 显示了根具有较强的重金属抗性.

3 分析与讨论

3.1 长喙田菁各部位组织培养对营养液的选择性
本试验结果显示, 长喙田菁茎和叶愈伤组织诱导对培养液有一定的选择性, 叶片选择 M_s , 茎则选择 B_5 , 根则无明显的选择性.

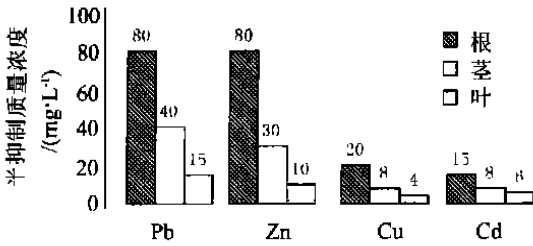


图 2 4 种重金属对长喙田菁愈伤组织生长的半抑制质量浓度

Fig. 2 ED_{50} of heavy metals for growth of root, stem and leaf callus of *S. rostrata*

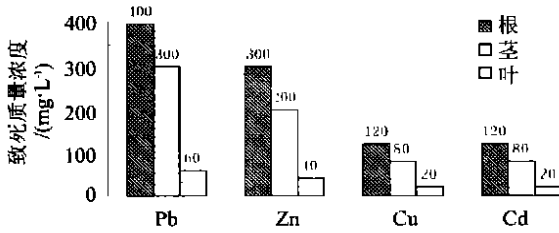


图 3 4 种重金属对长喙田菁愈伤组织生长的致死质量浓度

Fig. 3 Lethal concentrations of heavy metals for growth of root, stem and leaf callus of *S. rostrata*

M_s 和 B_5 中的大量元素和微量元素种类基本相同, 所用激素 M_s 主要为 IAA 和 KT, B_5 主要用 2, 4-D 和 KT. 所用有机物的量相差很大, M_s 中维 B_1 只有 0.1 mg/L, B_5 中却有 10 mg/L, 相差 100 倍.

另外, B_5 中的维 B_5 和维 B_6 是 M_s 的 2 倍. B_5 可能因其高的含 K 量和大量的维生素, 而有助于具丰富维管组织的茎和根的愈伤组织的形成. 叶组织较柔嫩, 没有茎中发达的形成层, 靠叶肉细胞形成愈伤组织容易受培养液中组分含量的影响, 可能更适于组分含量温和的 M_s 培养基.

根的愈伤组织形成可能主要取决于生长素和激动素的比例, 比例适中, 2 种激素含量差不多, 则有助于愈伤组织的形成. 具体原因还有待进一步的实验证明.

3.2 长喙田菁愈伤组织的生长特性

长喙田菁愈伤组织在前期生长较快, 以后增长缓慢, 甚至停止生长. 一个原因可能是营养物质的消耗, 另一个原因是组织培养到一定阶段, 会分泌一些物质抑制愈伤组织的继续形成和生长, 使组织进入再分化阶段. 这个时候若依据不

同目的, 调配激素的浓度和比例, 进行扩大培养, 就可由愈伤组织诱导出植株. 因此, 进行重金属抗性的定量测定时, 选择在愈伤组织增长停滞前, 而生物量又达到最大的时候测量, 可以很好的比较不同浓度重金属对长喙田菁组织的胁迫程度.

根由于其特殊的结构, 木质部细胞含量多, 细胞活力小, 分生能力差, 再加上长喙田菁根直径很小, 形成层非常薄, 因而根愈伤组织的诱导和培养是个难点.

茎、叶愈伤组织的诱导相对根而言要容易很多, 而且生物量增长很快, 切块大小、质地、形状等变化非常明显, 肉眼可直接观察, 根因为生长缓慢, 变化远不如茎、叶明显.

3.3 愈伤组织悬浮培养作为测定植物器官重金属抗性的可行性

本研究结果表明, 采用不同器官愈伤组织悬浮培养的方法能够有效测定植物各种器官的重金属抗性. 由于悬浮培养可使愈伤组织充分与溶液中的重金属接触, 且愈伤组织悬浮培养能延续植物的原有特性, 因此, 采用本方法应该能够真实地表现植物各组织部位在遗传学意义上的重金属抗性.

在实际操作上, 这一方法可以按以下步骤进行: ①取直径较大且能够为精密天平称量的容器为培养瓶; ②注入一定量的按所需重金属质量浓度梯度配制好的植物愈伤组织培养液 (为了衡量误差, 每个质量浓度应设置重复 3 次以上); ③消毒并冷却后切取 2~10 mg 植物器官组织 (根、茎、叶有所不同) 植入上述培养液; ④精确称取培养容器 (含培养液和植物组织) 的质量作为起始重量; ⑤置于摇床上培养以诱导愈伤组织并使其生长; ⑥按一定的时间间隔精确称取培养瓶的质量 (含培养液和植物组织); ⑦其与前一次称量结果之差则为愈伤组织增重 (如果要考虑水分损失所造成的误差, 可设置一不植入植物组织的空白对照, 在计算增重时加上该空白对照的减重值即可); ⑧根据各质量浓度处理条件下愈伤组织的增重与零浓度对照的比较计算半抑制质量浓度.

3.4 长喙田菁愈伤组织的重金属抗性

从本实验的结果来看, 长喙田菁的抗性主要表现在根部, 叶片对重金属毒害最为敏感. 以往的研究 (Yang and Wong 未发表数据) 以长喙田

菁种子根的伸长作为指标测量其对重金属胁迫的ED₅₀, 与本研究结果相比, 重金属对长喙田菁根愈伤组织生长的ED₅₀远高于对种子根伸长的ED₅₀, 对茎愈伤组织生长的ED₅₀则与种子根伸长的ED₅₀相近, 对叶愈伤组织生长的ED₅₀则低于对种子根伸长的ED₅₀. 由此可见, 本研究采用愈伤组织悬浮培养法研究长喙田菁的重金属抗性所取得的结果是比较客观的, 与传统研究方法所获结果有一定的可比性. 鉴于本实验结果证明了长喙田菁的重金属抗性主要体现在根部, 因此, 今后应重点研究长喙田菁根部组织的重金属抗性机理.

参考文献:

[1] YANG Z Y, YUAN J G, CHANG H T, et al. Germination, growth and nodulation of *Sesbania rostrata* grown on Pb/Zn tailings[J]. Environ Manage, 1997, 21: 617— 622.

[2] IBARAKI Y, KANEKO Y, KURATA K. Evaluation of embryogenic potential of cell suspension culture by texture analysis[J]. Trans ASAE, 1998, 41: 247— 252.

[3] KIERAN P M, MACLOUGHLIN P F, MALONE D M. Plant cell suspension cultures: some engineering considerations[J]. J Biotechnol, 1997, 59: 39— 52.

[4] YASUOMI I, KURATA K. Application of image analysis to plant cell suspension cultures[J]. Computers and Electronics in Agriculture, 2001, 30: 193— 203.

[5] AKIRA M, CHIAKI W, YUKIMASA H. Cadmium-binding peptide induced in fission yeast[J]. J Biochem, 1981, 90: 1561— 1564.

[6] 江苏省植物组织培养研究协会. 经济植物组织培养实用技术. 南京: 江苏科学技术出版社, 1988. 15 ~ 41.

[7] WONG M H, LAU W M, YIP S W. Effects of sludge extracts on seed germination and root elongation of crops[J]. Environmental Pollution, 1981(A): 87— 98.

An Investigation for Heavy Metal Tolerances of Root, Stem and Leaf of *Sesbania rostrata* by Using Callus Suspension Culture Method

XU Hao juan, XI Jia bin, YANG Zhong yi

(Grassland and Green land Research Center, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Heavy metal tolerances of root, stem and leaf of *Sesbania rostrata* were investigated by using callus suspension culture method. The results showed that the method was effective for testing the heavy metal tolerance of respective root, stem and leaf of *S. rostrata*. The highest tolerances to Pb, Zn, Cu and Cd were observed in the root callus. The tolerances in leaf callus were only 1/8 ~ 1/4 of that in root callus. ED₅₀s of Pb for growth of root, stem and leaf callus were 80, 40 and 15 mg/L, respectively. Those of Zn, Cu and Cd were 80, 30 and 10 mg/L, 20, 8 and 4 mg/L, and 15, 8 and 6 mg/L, respectively.

Keywords: *Sesbania rostrata*; heavy metal tolerance; callus; suspension culture