

费尔干猪毛菜愈伤组织的诱导、分化及植株再生体系的建立

高海波, 曾幼玲, 张富春*

(新疆大学生命科学与技术学院, 新疆生物资源基因工程重点实验室, 乌鲁木齐 830046)

摘要: 探讨了植物生长调节剂、外植体等因子对费尔干猪毛菜(*Salsola ferganica* Drob.) 愈伤组织诱导、分化与植株再生的影响。结果表明:2,4-D 与 6-BA 组合使用时,在一定浓度范围内均有愈伤组织产生,最佳的诱导培养基为 MS + 2,4-D 2.0 mg/L + 6-BA 0.2 mg/L,下胚轴为诱导愈伤组织的最佳材料;愈伤组织继代培养较好的培养基为 MS + NAA 0.1 mg/L + 6-BA 1.0 mg/L;愈伤组织不定芽分化培养基为 MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.05 mg/L;根分化的培养基为 1/2 MS + IBA 0.2 mg/L,且生根率可达 72%。以带柄子叶为外植体,诱导丛生芽的最佳分化培养基为 MS + 6-BA 1.0 mg/L,再生频率可达 90.74%。

关键词: 费尔干猪毛菜; 愈伤组织诱导; 分化; 植株再生

中图分类号: Q943.1; Q949.745.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2008)06-0634-05

Callus Induction, Differentiation and Establishment of Plantlet Regeneration System of *Salsola ferganica*

GAO Hai-Bo, ZENG You-Ling, ZHANG Fu-Chun*

(Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China)

Abstract: The effects of explants and plant growth regulators on callus induction, differentiation and plantlet regeneration of *Salsola ferganica* Drob. were studied. The results showed that the best medium of callus induction was MS medium with 2,4-D 2.0 mg/L + 6-BA 0.2 mg/L. Hypocotyl was the best explant. The best medium for the subculture of callus was MS + NAA 0.1 mg/L + 6-BA 1.0 mg/L. The MS medium with 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.05 mg/L was preferable for inducing adventitious shoot. The 1/2 MS medium with IBA 0.2 mg/L was suitable for the root differentiation and the rate of rooting was 72%. The best medium for inducing adventitious shoot of cotyledon with petiole was MS + 6-BA 1.0 mg/L and the shoot regeneration frequency was 90.74%.

Key words: *Salsola ferganica* Drob.; Callus induction; Differentiation; Plantlet regeneration

藜科植物多分布在中亚、北美和北欧的各类盐碱环境中,大多数的藜科植物具有广泛的生态适应能力。泌盐植物费尔干猪毛菜(*Salsola ferganica* Drob.)就是藜科植物中适应盐碱生境为数不多的先锋植物之一,具有重要的经济和生态价值。关于猪毛菜属植物的系统与地理分布、幼苗的发育解剖学结构、生物碱化学成分、叶和同化枝的旱生和盐生结构以及抗盐生理生化特征等已有研究报道^[1-5]。研究猪毛菜对各种盐碱环境的生态适应特征,对于改良盐碱环境、提供抗盐种质资源和抗盐基因工程研究等方面有着极其重要的意义。目前,植物抗盐基

因工程研究仍以拟南芥、烟草等非盐生的模式植物为主,通过农杆菌介导将耐盐相关基因转入拟南芥、水稻或烟草中以提高转基因植物的耐盐性^[6-8]。费尔干猪毛菜再生体系的建立不仅有利于建立盐生植物的遗传转化体系,还为进一步探讨抗盐基因在盐生植物抗盐中的作用机制提供了便利。本研究以费尔干猪毛菜的下胚轴、子叶和茎叶作为外植体诱导愈伤组织,优化继代与分化的条件,兼以子叶柄作为外植体诱导丛生芽,获得猪毛菜的再生植株,以期为研究猪毛菜细胞水平上的耐盐机理提供材料保障,也为通过费尔干猪毛菜开展耐盐的分子机制研究

收稿日期:2008-01-21,修回日期:2008-05-11。

基金项目:教育部科技基础平台项目(505016);教育部科学技术研究重点项目(205178);新疆生物资源基因工程重点实验室开放课题(XJDX0201-2007-01)。

作者简介:高海波(1983-),女,满族,硕士研究生,主要从事植物基因工程研究。

* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: zfcxju@xju.edu.cn)。

奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

费尔干猪毛菜(*Salsola ferganica* Drob.)种子采自新疆五家渠北沙窝干旱盐碱地。

1.2 方法

1.2.1 培养基及培养条件 以MS和1/2 MS为基本培养基。①种子萌发培养基:MS + 0.8% 琼脂。②诱导愈伤组织培养基:CK为MS + 0.8% 琼脂;MS1~MS8:MS + 6-BA x_1 mg/L + NAA y_1 mg/L + 0.8% 琼脂($x_1 = 0.5, 1.0; y_1 = 0.5, 1.0, 2.0, 4.0$);MS9~MS17:MS + 6-BA x_2 mg/L + 2,4-D y_2 mg/L + 0.8% 琼脂($x_2 = 0.2, 0.5, 1.0; y_2 = 1.0, 2.0, 4.0$)。③愈伤组织继代培养基:MS + 6-BA x_3 mg/L + NAA y_3 mg/L + 0.8% 琼脂($x_3 = 0.5, 1.0; y_3 = 0.1, 0.2, 0.3, 0.4$)。④愈伤组织分化培养基:MS + 6-BA x_4 mg/L + NAA y_4 mg/L + 0.8% 琼脂($x_4 = 0.2, 0.5, 1.0; y_4 = 0.05, 0.1, 0.2, 0.4$)。⑤带柄子叶不定芽的增殖和继代培养基:S1~S4:MS + 6-BA x_5 mg/L + 0.7% (0.8%, 0.9%, 1.0%) 琼脂($x_5 = 0.5, 1.0, 1.5, 2.0$)。⑥生根培养基:R1~R3:1/2 MS + IBA z_1 mg/L + 0.8% 琼脂($z_1 = 0.2, 0.5, 1.0$);R4~R6:1/2 MS + NAA z_2 mg/L + 0.8% 琼脂($z_2 = 0.2, 0.5, 1.0$)。培养基①~⑤中均附加25 g/L蔗糖,培养基⑥中附加15 g/L蔗糖。光照16 h/d,光强30~40 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,温度为(25±1)℃。

1.2.2 无菌苗的培养 将猪毛菜种子用70%乙醇消毒30 s后,无菌水冲洗3~4遍,再用0.1% (W/V)的HgCl₂消毒6 min,然后用无菌水冲洗5~6遍,接种于培养基①上,置于培养室中培养7 d,以获得无菌苗。

1.2.3 愈伤组织的诱导、继代及分化 将培养7 d的无菌苗的子叶、下胚轴和茎叶分别剪成长约0.5 cm的切段,接种在培养基②上,培养20 d后统计诱导率,并记录愈伤组织的颜色、质地及生长状况。按下列公式计算诱导率:诱导率=(形成愈伤组织的外植体数/接种的外植体数)×100%。将诱导出的愈伤组织每2周转接1次继续培养,将长势较好的愈伤组织分别转接到培养基③上,经20 d左右,观察愈伤组织的培养效果。将继代2次以上生长一致的愈伤组织分别接种到培养基④中,经过30 d培养,观察愈伤组织的长势及分化情况。

1.2.4 带柄子叶不定芽的诱导 将苗龄5 d的无

菌苗的带柄子叶(子叶基部约带0.5 cm的下胚轴)于MS基本培养基中预培养3 d后接种于培养基⑤上,20 d后统计不定芽的再生率和分化率。按下列公式计算不定芽的再生频率和分化频率:再生频率=(出芽的外植体数/接种的外植体数)×100%;分化频率=(外植体的出芽总数/接种的外植体数)×100%。

1.2.5 再生植株的生根与移栽 将从分化培养基中长出的小苗(或由带柄子叶诱导出的不定芽)取出,切去基部的愈伤组织,将其剩余部分转接入生根培养基⑥中。20 d后统计根的分化率。当苗的根长到一定长度时,炼苗4 d,从培养瓶中取出,洗去根部培养基,移入珍珠岩和蛭石的混合基质中,保湿遮阴。

2 结果与分析

2.1 不同植物生长调节剂的浓度对比对愈伤组织诱导的影响

本实验组合使用NAA、2,4-D和6-BA三种植物生长调节剂,20 d后观察愈伤组织的培养效果(表1)。使用NAA和6-BA组合时,低浓度的NAA各梯度均无明显的愈伤组织出现。高浓度的NAA尽管可以诱导出愈伤组织,但愈伤组织的诱导率较低,且生长缓慢。这说明NAA和6-BA的组合不适合用来诱导猪毛菜的愈伤组织。在2,4-D+6-BA组合中,各梯度均有愈伤组织出现,且诱导率最高可达80%以上。下胚轴愈伤组织颜色为黄绿色(图1:A),结构紧密,生长迅速。子叶愈伤组织颜色为黄白色(图1:B),结构较松散,生长缓慢。茎叶愈伤组织颜色为浅绿色(图1:C),结构也很紧密,生长也较快。下胚轴愈伤组织质地最佳,生长最快,是诱导愈伤组织的最佳材料。低浓度的6-BA和2,4-D的组合有利于愈伤组织的诱导,随着6-BA和2,4-D浓度的增加,诱导率降低。2,4-D 2.0 mg/L+6-BA 0.2 mg/L时下胚轴的愈伤组织诱导率及生长势均最佳,此时的愈伤组织是用作细胞培养的最佳材料。

2.2 愈伤组织的继代培养和分化

费尔干猪毛菜在适宜的培养基上都能诱导出愈伤组织,但在随后的继代培养过程中褐变现象较为严重(图1:D),即使频繁继代,效果也不理想,给继代培养带来了一定的困难。将猪毛菜愈伤组织从诱导培养基(2,4-D 2.0 mg/L+6-BA 0.2 mg/L)转接到附加不同浓度NAA的组合培养基进行继代培养,培养7 d左右,发现部分培养基中褐变症状有所缓解,愈伤组织接触培养基的褐变部分开始恢复,愈伤

表1 6-BA与NAA或2,4-D组合对诱导愈伤组织的影响

Table 1 The effects of different concentration of 6-BA in combination with NAA or 2,4-D on callus induction

处理号 Treatments code	植物生长调节剂的浓度(mg/L) Concentration of plant growth regulators			接种数 Number of explants	形成愈伤组织数 Number of callus	愈伤组织 诱导频率(%) Induction frequency of callus
	6-BA	NAA	2,4-D			
CK	0.00	0.00	0.00	107	0	0.00
MS1	0.50	0.50	0.00	101	0	0.00
MS2	1.00	0.50	0.00	105	0	0.00
MS3	0.50	1.00	0.00	106	20	18.87
MS4	1.00	1.00	0.00	105	15	14.29
MS5	0.50	2.00	0.00	104	28	26.92
MS6	1.00	2.00	0.00	106	28	26.42
MS7	0.50	4.00	0.00	102	14	13.73
MS8	1.00	4.00	0.00	113	13	11.50
MS9	0.20	0.00	1.00	107	52	48.60
MS10	0.50	0.00	1.00	103	63	61.17
MS11	1.00	0.00	1.00	112	79	70.54
MS12	0.20	0.00	2.00	113	91	80.53
MS13	0.50	0.00	2.00	106	75	70.75
MS14	1.00	0.00	2.00	104	63	60.58
MS15	0.20	0.00	4.00	113	64	56.64
MS16	0.50	0.00	4.00	110	58	52.73
MS17	1.00	0.00	4.00	102	52	50.98

组织质地紧密,生长良好,其中尤以 MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L 的继代培养效果较好。以不同浓度的 6-BA 和 NAA 的组合诱导愈伤组织分化时发现,高浓度的 NAA 几乎不能使愈伤组织分化,低浓度的 NAA 尽管可以诱导愈伤组织分化,但分化率极低。将所选的愈伤组织接种在分化培养基 MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.05 mg/L 上,培养 2 周后开始出现绿色的芽点,并继续分化为不定芽(图 1:E),但不定芽的分化频率仅为 25.00%。

2.3 带柄子叶丛生芽的诱导

接种在分化培养基⑤上的带柄子叶,经过 2 周培养,可以观察到生长点的部位出现丛生芽(图 1:F),其中尤以 MS + 6-BA 1.0 mg/L 分化培养基最有利于猪毛菜的芽苗再生(表 2), 平均每个外植体出

芽 4 ~ 5 个,再生频率可达 90.74%,然而丛生芽的玻璃化现象十分严重(图 1:G)。研究发现,琼脂浓度 $\leq 0.8\%$ 时,丛生芽玻璃化程度高达 21%,而琼脂浓度 $> 0.8\%$ 时玻璃化程度明显减轻,当琼脂浓度增加到 1% 时基本上无玻璃化现象。因此适量提高琼脂浓度对玻璃化有一定的抑制作用。

2.4 再生植株的生根与移栽

在研究不同浓度 NAA 或 IBA 对猪毛菜试管苗生根的影响时发现(表 3),IBA 可有效地促进猪毛菜幼苗的生根,尽管 NAA 可以诱导生根,但生根率很低,且生长缓慢。将分化出的苗转接于生根培养基 1/2 MS + IBA 0.2 mg/L 中,2 周后基部可长出 4 ~ 5 条 1.0 ~ 2.0 cm 长的不定根,株高可达 2 ~ 3 cm,生根率 72% (图 1:H)。培养 2 ~ 3 周,打开瓶盖,炼苗 4 d,从培养瓶中取出,洗去根部培养基,移入珍珠岩和蛭石的混合基质中,保湿遮阴,成活率可达 90% 以上(图 1:I)。

3 讨论

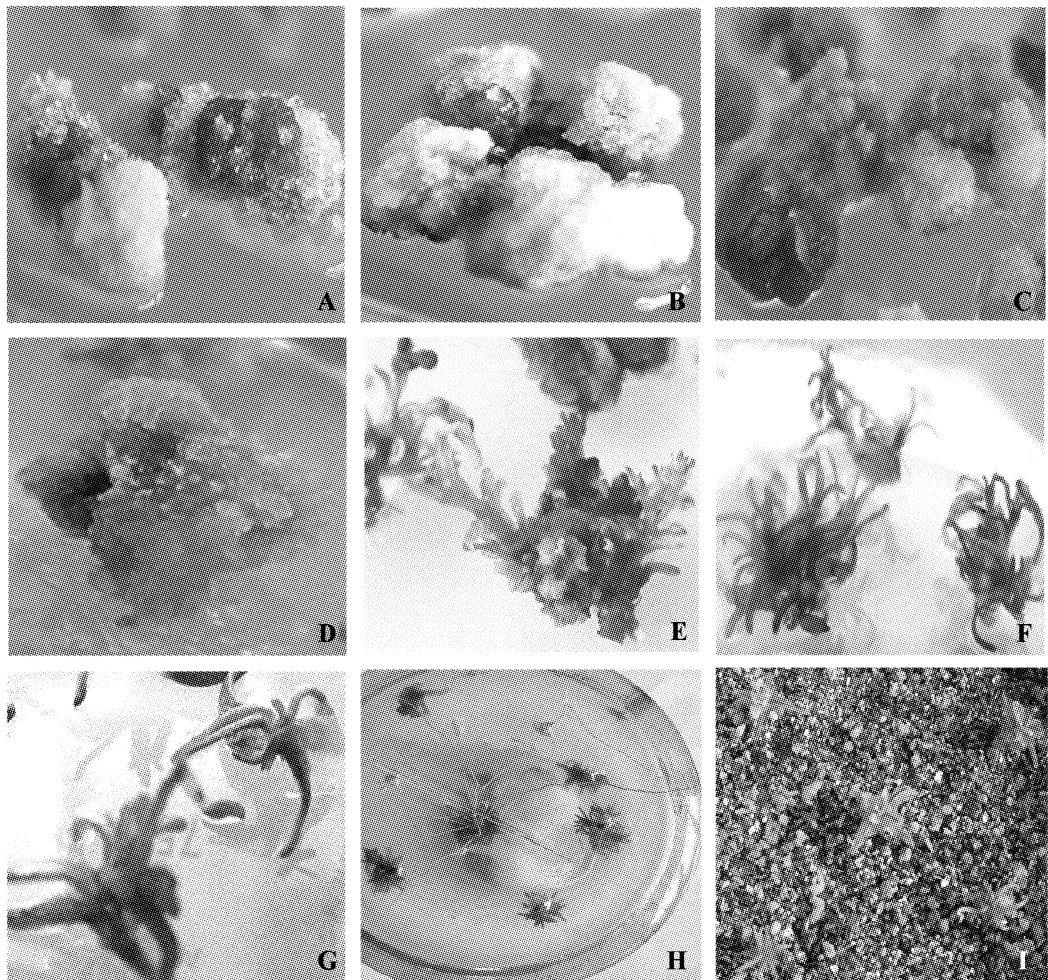
植物愈伤组织诱导中,影响诱导率的因素是多方面的,肖关丽等^[9]认为外植体之间愈伤组织诱导的差异主要是由于不同组织器官的内源激素水平的不同而引起的,但也有研究认为外源激素是愈伤组织诱导和绿苗分化的关键性因素^[10-12]。在费尔干猪毛菜愈伤组织诱导的各种因素中,不同种类和浓

表2 6-BA对猪毛菜带柄子叶的芽苗再生及其分化频率的影响

Table 2 The effects of 6-BA on shoot regeneration and differentiation frequency of cotyledon with petiole

处理号 Treatments code	6-BA 浓度 (mg/L) Concentration of 6-BA	接种数 Number of explants	出芽数 Number of explants with shoots	再生频率(%) Shoot regeneration frequency	分化频率(%) Polarization frequency
S1	0.50	112	87	77.68	155.36
S2	1.00	108	98	90.74	362.96
S3	1.50	105	64	60.95	182.86
S4	2.00	110	43	39.09	78.18

度的植物生长调节剂对不同类型的外植体而言,敏感度差异很大。总的来说,任意浓度的 NAA 和 6-BA 的组合均不适合用来诱导猪毛菜的愈伤组织。相比子叶和茎叶,下胚轴愈伤组织的质地更好且更易于诱导。研究还发现,2,4-D 是诱导猪毛菜愈伤组织必不可少的因素,而且 2,4-D 的浓度至关重要,高浓度的 2,4-D 适合子叶愈伤组织的诱导,而低浓度的 2,4-D 则有利于下胚轴愈伤组织的诱导。NAA



A. 下胚轴诱导的愈伤组织;B. 子叶诱导的愈伤组织;C. 茎叶诱导的愈伤组织;D. 褐化的愈伤组织;E. 愈伤组织分化的不定芽;F. 子叶柄不定芽的诱导;G. 玻璃化的幼苗;H. 不定芽诱导生根;I. 移栽后的再生植株
A. Callus from the hypocotyl; B. Callus from the cotyledon; C. Callus from the stem and leaf; D. Browning callus; E. Inducing adventitious shoot from callus; F. Inducing adventitious shoot of cotyledon with petiole; G. Vitrified young plant; H. Inducing root from plant; I. Transplant seedling of *Salsola ferganica* Drob.

图 1 猪毛菜愈伤组织的诱导、分化及植株再生

Fig.1 Callus induction, differentiation and plantlet regeneration of *Salsola ferganica* Drob.

表 3 不同浓度 NAA 或 IBA 对试管苗生根的影响

Table 3 The effects of different concentration of NAA and IBA on shoot rooting

处理号 Treatments code	植物生长调节剂的浓度 (mg/L) Concentration of plant growth regulators		接种苗数 Number of inoculated shoots	生根率 (%) Rooting rate	平均生根数 Average root number per shoot
	NAA	IBA			
R1	0.20	0.00	25	20.00	2.00
R2	0.50	0.00	25	36.00	2.00
R3	1.00	0.00	25	12.00	2.00
R4	0.00	0.20	25	72.00	3.00
R5	0.00	0.50	25	44.00	2.70
R6	0.00	1.00	25	24.00	1.60

与6-BA组合更有利于愈伤组织的继代及分化,因此,在实际工作中,选择合适的培养基和适当的激素配比,是提高诱导率的重要前提。

光照条件下的外植体或愈伤组织容易发生褐化现象,这是因为光照能够激活多酚氧化酶的活性,从而影响细胞的代谢,酚类物质被氧化后产生棕褐色的醌类物质,它们会逐渐扩散到培养基中,抑制其它酶的活性,毒害材料,尤其易发生在材料切口处^[13]。本研究采用不同浓度的6-BA与2,4-D或NAA的组合对愈伤组织进行继代培养过程中发现,低浓度的NAA可有效缓解褐变症状,而添加2,4-D不能改善褐化现象,这说明选用适当的外源植物生长调节物质对减轻褐化有一定的作用。培养材料的玻璃化是植物组织培养过程中经常遇到和较难克服的障碍。玻璃化现象是植物组织培养中特有的一种生理性病变。是培养环境中的一些物理、化学和生化因子共同作用使植物组织新陈代谢紊乱所致^[14]。本研究采用多种方法如增加通气度、增加琼脂或蔗糖浓度、降低激素浓度来预防玻璃化,研究发现适量增加琼脂的浓度对猪毛菜幼苗的玻璃化有较为明显的抑制效果。

组织培养中生长素和细胞分裂素两类物质的相对浓度控制着根、芽分化的模式,较高浓度的生长素有利于根的形成而抑制芽的形成;相反,较高浓度的细胞分裂素则促进芽的形成而抑制根的形成。为了利于芽的分化,在分化培养基上,一般应去掉2,4-D,添加细胞分裂素^[15]。本研究中,6-BA与NAA组合(MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L,pH 6.0)虽可诱导愈伤组织分化,但分化率不高。因此,提高猪毛菜愈伤组织的分化率还需要深入探讨。本研究成功建立了费尔干猪毛菜的再生体系,为在细胞和分子水平上研究猪毛菜的耐盐机理提供了有力的物质保障。

参考文献:

- [1] 黄俊华. 中国猪毛菜属(*Salsola* L.)植物的地理分布特点[J]. 干旱区地理,2005,28(3):325-329.
- [2] 孙小五,汪矛,毕冬玲,周树敏,郭洁,王丽. 猪毛菜幼苗的发育解剖学研究[J]. 西北植物学报,2005,25(5):917-922.
- [3] 赵云雪,丁杏苞. 猪毛菜中生物碱化学成分的研究[J]. 药学报,2004,39(8):598-600.
- [4] 邓彦斌,姜彦成,刘健. 新疆10种藜科植物叶片和同化枝的旱生和盐生结构的研究[J]. 植物生态学报,1998,22(2):164-170.
- [5] 孙黎,刘士辉,师向东,肖敏,汤照云,朱红伟,陈建中. 10种藜科盐生植物抗盐生理生化特征[J]. 干旱区研究,2006,23(2):309-313.
- [6] Guo S, Yin H, Zhang X, Zhao F, Li P, Chen S, Zhao Y, Zhang H. Molecular cloning and characterization of a vacuolar H⁺-pyrophosphatase gene, *SsVP*, from the halophyte *Suaeda salsa* and its overexpression increases salt and drought tolerance of *Arabidopsis* [J]. *Plant Mol Biol*, 2006, 60(1):41-50.
- [7] Zhao F, Wang Z, Zhang Q, Zhao Y, Zhang H. Analysis of the physiological mechanism of salt-tolerant transgenic rice carrying a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene from *Suaeda salsa* [J]. *J Plant Res*, 2006, 119(2):95-104.
- [8] Li Q L, Gao X R, Yu X H, Wang X Z, An L J. Molecular cloning and characterization of betaine aldehyde dehydrogenase gene from *Suaeda liaotungensis* and its use in improved tolerance to salinity in transgenic tobacco [J]. *Biotechnol Lett*, 2003, 25(17):1431-1436.
- [9] 肖关丽,杨清辉,李富生,杨生超,何顺长. 甘蔗不同叶位幼叶鞘内源激素与愈伤诱导率关系研究[J]. 种子,2002(1):6-8.
- [10] 葛台明,余毓君. 小麦花药培养的基因型和培养基效应研究[J]. 华中农业大学学报,1996,15(5):400-413.
- [11] 叶兴国,王连铮. 大豆花药愈伤组织的分化及内源激素的分析[J]. 作物学报,1997,23(5):555-561.
- [12] 罗琼,胡延玉,周开达. 内源激素对水稻成熟胚培养力的影响[J]. 中国水稻科学,1998,12(4):238-240.
- [13] 谢丽霞,杜建伟,李海杰,吴芷君. 植物组织培养中的褐变现象及解决途径[J]. 垦殖与稻作,2006(1):61-62,72.
- [14] 蔡祖国,徐小彪,周会萍. 植物组织培养中玻璃化的玻璃化现象及其预防[J]. 生物技术通讯,2005(3):353-355.
- [15] 周晓丽,刘广平. 三角叶滨藜子叶愈伤组织诱导及分化的研究[J]. 丹东纺专学报,2004,11(1):20-21.