

文章编号:1673-5021(2007)04-0050-06

心叶驼绒藜胚器官培养及再生体系的研究

郑晓红, 李柱, 付爱良, 杨刚, 沙吾列

(新疆维吾尔自治区草原研究所, 新疆 乌鲁木齐 830000)

摘要:以心叶驼绒藜无菌苗叶片、茎段、幼根为外植体,对通过器官发生的途径发育成再生植株进行了研究。结果表明:(1)、无菌苗的建立:用1/2MS+琼脂+蔗糖,出苗率高(90%以上)、苗壮。(2)、诱导培养基:用MS1+IAA0.2mg/L+KT0.1mg/L培养基,出愈率低,没有获得再生植株;用MS2+IAA0.2mg/L+KT0.2mg/L、MS3+IAA0.1mg/L+KT0.1mg/L培养基,叶片、茎段具有再生植株发育的能力,出愈率较高。(3)、生根培养基:用1/2MS+NAA0.1mg/L,生根率高、周期短;用1/2MS+IAA0.1mg/L,生根率低,周期长。

关键词:心叶驼绒藜;组织培养;愈伤组织;再生植株

中图分类号:Q943.1

文献标识码:A

驼绒藜属植物广泛分布于我国西北干旱荒漠地区。它具有抗旱、抗寒、耐高温、耐盐碱、抗风沙、产量高和牲畜适口性好等优良特性,在干旱荒漠区既是重要的饲用植物,又是防风固沙、保持水土不可多得的生态植物。本文对心叶驼绒藜[*Ceratoides ewersmanniana* (Stschegl. ex Losink.) Botsch. et Ikonn.]^[1]愈伤组织诱导再生体系的建立进行研究。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试材料为采自新疆旱生牧草研究中心试验地的第二代心叶驼绒藜种子。

1.2 方法

1.2.1 无菌苗的建立

选取籽粒饱满的种子,脱绒,用流水反复冲洗20min后在70%的酒精中浸泡30s,然后在15%次氯酸钠溶液中消毒8~10min,再用无菌水冲洗3~5次,将灭菌后的种子置于1/2MS+琼脂0.7%+蔗糖2%的培养基上,密封,在发芽箱(26±2℃,光照)中培养无菌苗。

1.2.2 外植体来源

外植体为无菌苗,采用发芽5~10d的无菌苗幼叶、茎段和幼根。

1.2.3 培养基

基础培养基采用MS(Murashige和Skoog)培养基,附加各种植物生长素(IAA、NAA、2,4-D)和细胞分裂素(KT),使用时按浓度定量吸取加入,pH值控制在5.8~6.0。

1.2.4 培养条件

愈伤组织诱导采用光照培养,将试验材料置于光强2000lx、温度为26±2℃的环境中,以16h/d光照时间进行培养。

1.2.5 培养基种类

进行组织培养要经过无菌苗形成、愈伤组织诱导、生根培养和炼苗等阶段。在不同阶段,我们采用了不同的培养基(见表1)。

表1 心叶驼绒藜组织培养不同培养阶段的培养基

Table 1 The culture medium in different culture phases of tissue culture of *Ceratoides ewersmanniana*

编号 Number	培养基用途 Use of culture medium	基本成分 Fundamental components
1	无菌苗形成	1/2MS+琼脂+蔗糖
2	愈伤组织诱导	MS+IAA+KT+琼脂+蔗糖
3	愈伤组织诱导	MS+2,4-D+NAA+KT
4	愈伤组织诱导	MS+N6+2,4-D+NAA+KT
5	生根培养	1/2MS+NAA+琼脂+蔗糖
6	生根培养	1/2MS+IAA+琼脂+蔗糖

注:无菌苗形成阶段1/2MS为大量元素减半,其它元素含量不变;生根培养阶段1/2MS为大量元素、铁盐减半,其它元素含量不变。以上培养基琼脂浓度为0.7%,蔗糖除生根培养基为2%外其余为3%。

Note: The formation of germfree plantlet; abundance of 1/2MS elements decreases by a half, but the other elements unchanged. Rooting culture medium; abundance of 1/2MS and iron salt elements decrease by a half, the other elements unchanged. The culture medium agar concentration mentioned above is 0.7%, besides 2% of rooting culture medium of sucrose, the concentration is 3%.

收稿日期:2006-10-27;修回日期:2007-05-09

基金项目:新疆维吾尔自治区科技攻关和重点科技项目(200231111)

作者简介:郑晓红(1957-),女,新疆乌鲁木齐市人,高级实验师、

2 测定内容与结果

2.1 建立无菌苗

无菌苗的建立是进行组织培养和再分化诱导形成再生植株的基础工作之一。通常大多数植物在建

立无菌苗时,采用基础培养基出苗率都高,且苗壮;但用在心叶驼绒藜上却出苗率较低,而且都是无根苗。为此,我们在基础培养基的基础上,加入1/2MS培养液进行对比试验,结果见表2、图3。

表2 基础培养基和1/2MS培养基对心叶驼绒藜无菌苗的影响
Table 2 The influence of wateriness culture medium and 1/2MS culture medium on *Ceratoides ewersmanniana* germfree plantlet

培养基 Culture medium	日期 Date	出苗率% Seeding emergence rate	叶长(mm) Leaf length	茎长(mm) Stem length	根长(mm) Root length
1/2MS+琼脂+蔗糖*	2006.3.6-3.13	94%	8.2	9.4	6.3
无菌水+琼脂+蔗糖	2006.3.6-3.13	52%	4.5	6.5	0

* 每个处理为6次重复。

Note: Six repetitions in each disposal.

2.2 评估愈伤组织生长速度的标准

诱导4周愈伤组织打分标准^[2]:

- 4分:愈伤组织直径3~3.9mm
- 5分:愈伤组织直径4~6.9mm
- 6分:愈伤组织直径7~9.9mm
- 7分:愈伤组织直径10~12.9mm

2.3 愈伤组织的诱导

愈伤组织诱导试验以植物细胞分裂素KT(糠基氨基嘌呤)、植物生长素NAA(奈乙酸)、IAA(吲哚乙酸)和2,4-D(2,4-二氯苯氧乙酸)等浓度变化为主要因素,共设19种处理,比较分析各处理因浓

度变化对愈伤组织诱导及生长的影响。

将生长5~10d的无菌苗子叶、茎段、幼根切成3~5mm的小段,接种到诱导培养基上进行离体培养;每个基因型接种于1个三角瓶中,温度控制在26±2℃,进行光照培养。

分别在诱导第1周、第2周和第4周后统计其出愈率,用打分法评估愈伤组织的生长速度。20~30d继代一次^[3]。最后,用平均得分评价愈伤组织的生长速度,比较各种培养基及不同浓度激素对愈伤组织的影响(见表3、图1、图2、图3),选出较佳诱导培养基。

表3 不同浓度的激素组合对心叶驼绒藜外植体愈伤组织的影响
Table 3 The influence of different concentrations hormone combination on explants callus of *Ceratoides ewersmanniana*

培养基 Culture medium	培养基代号 Medium code name	试验样品部位 Parts of test sample	出愈率% Callus induction rate	愈伤组织生长长度(mm) Callus grown length	得分 Point
1/2MS+2,4-D+NAA+KT	A1	叶	90	7.3	6
1/2MS1/2Fe+2,4-D+NAA+KT	A2	叶	95.8	7.3	6
1/3MS1/2Fe+2,4-D+NAA+KT	A3	叶	72.5	5.9	5
MS1+2,4-D+NAA+KT	A4	叶	61.7	5.5	5
MS2+2,4-D+NAA+KT	A5	叶	49.7	3.9	4
MS3+2,4-D+NAA+KT	A6	叶	86.5	4.1	5
MS1+N6+2,4-D+NAA+KT	A7	叶	92	4.4	5
MS2+N6+2,4-D+NAA+KT	A8	茎	49.7	3.9	4
MS2+N6+2,4-D+NAA+KT	A8	叶	100	6.6	5
MS3+N6+2,4-D+NAA+KT	A9	叶	100	6.9	5
MS1+IAA+KT	A10	叶	15	1.5	4
MS1+IAA+KT	A10	茎	18	7.3	6
MS1+IAA+KT	A10	根	0	0	0
MS2+IAA+KT	A11	叶	100	8.5	6
MS2+IAA+KT	A11	茎	100	10.2	7
MS2+IAA+KT	A11	根	33	2.2	4
MS3+IAA+KT	A12	叶	100	7.8	6
MS3+IAA+KT	A12	茎	33	7.6	6
MS3+IAA+KT	A12	根	0	0	0

注:接种数为100;N6为对MS母液中有有机成份进行置换。

Note: The inoculation number is 100; N6 for the replacement of organic contents in MS mother liquor.

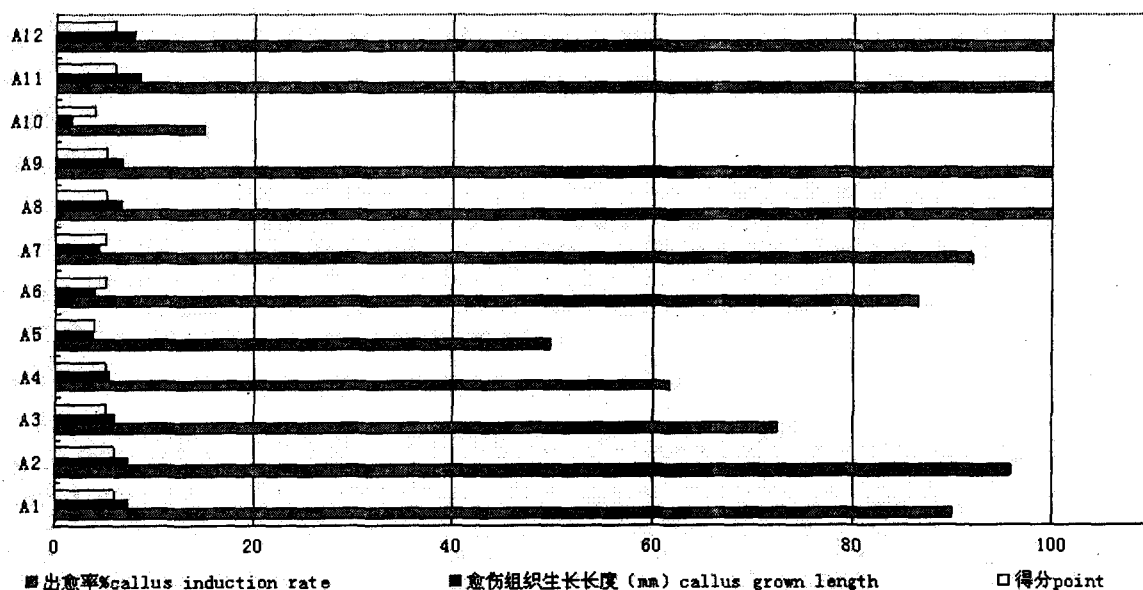


图 1 不同浓度的激素组合对叶片愈伤组织的影响
Fig. 1 The influence of different hormone concentration combination on callus of the lamina

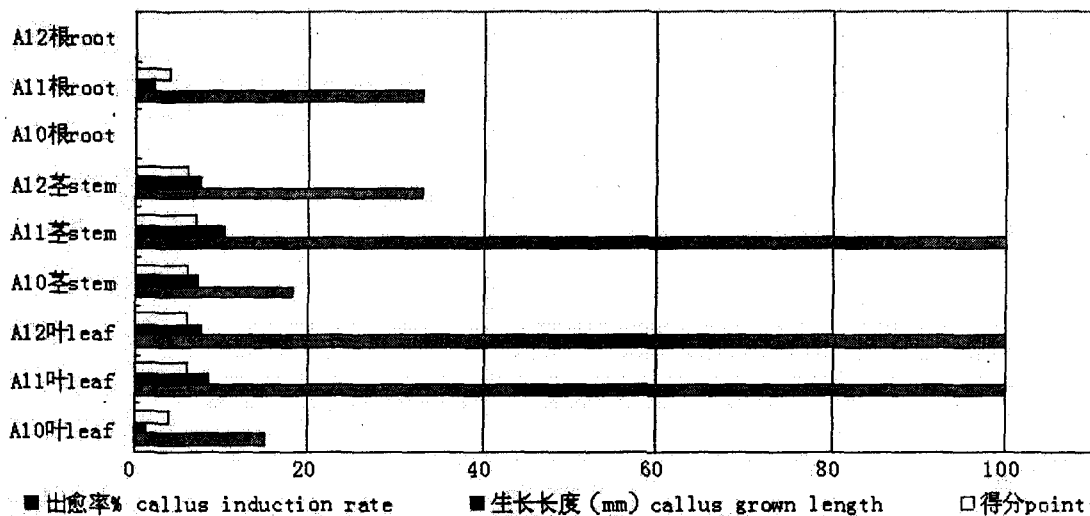


图 2 不同浓度的 IAA,KT 组合对外植体愈伤组织的影响
Fig. 2 The influence of different IAA,KT concentration combination on explants callus

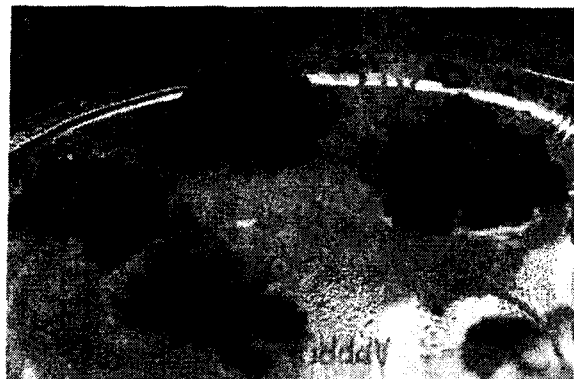


图 3 愈伤组织诱导
Fig. 3 Callus induction

2.4 再生植株的培养

在愈伤组织的诱导过程中,发现在含有 KT 和 IAA 的培养基中的愈伤组织上具有形成再生植株的能力。为此,我们就不同浓度的 KT 和 IAA 对心叶驼绒藜形成再生植株的能力进行了对比研究,结果见表 4、图 4。

2.5 生根培养

生根培养基选用基础培养基和 1/2MS 母液,分别采用四种处理(激素浓度范围在 0.1~0.5 mg/L),结果见表 5、图 5。取鲜嫩外植体枝条顶端 5~10cm 或再生植株做为供试材料,接种于生根培养基上,每瓶接种 3 株,温度控制在 $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$,光照条件同上,

进行诱导培养,一周后进行连续观察和继代培养。

表 4 不同浓度处理对诱导再生植株的影响 (接种数为 20)

Table 4 The influence of different concentration on regenerated plant (the inoculation number is 20)

培养基 Culture medium	部位 Parts	KT 浓度(mg/L) KT concentration	IAA 浓度(mg/L) IAA concentration	接种块数 Inoculation blocks number	小植株数 Embryo plantlets number
MS1	叶	0.1	0.2	20	0
MS2	叶	0.2	0.2	20	6
MS3	叶	0.1	0.1	20	4
MS1	茎	0.1	0.2	20	0
MS2	茎	0.2	0.2	20	4
MS3	茎	0.1	0.1	20	2



图 1 再生植株
Fig. 4 Plantlet organogenesis

表 5 四种培养基诱导生根的比较

Table 5 Comparing among four culture medium
induction rooting

培养基 Culture medium	接种植株数 Inoculation number	生根周期(d) Rooting cycle	生根数 Rooting number	生根率 % Rooting rate
无菌水	20	7~14	0	0
1/2MS	20	7~14	0	0
1/2MS+IAA	20	10	6	30
1/2MS+NAA	20	7	10	50

3 讨论与结论

3.1 心叶驼绒藜无菌苗首选培养基

从表 2 中可以看出,在心叶驼绒藜无菌苗的培养中,含 1/2MS 的培养基给低营养的培养物提供了营养,使其出苗率较基础培养基高出 42%,叶长 3.7mm,茎长 2.9mm,根长 6.3mm。接种 3 周后愈伤组织明显增大,出愈率与生长速度成正相关上升,所以含 1/2MS 培养基是心叶驼绒藜无菌苗建立的首选培养基。



图 5 生根培养后期
Fig. 5 Anaphase of rooting culture

3.2 心叶驼绒藜最佳愈伤组织培养基

在 MS1+IAA+KT 诱导培养基上,叶片、茎段出愈率低于 20%,叶片、茎段生长长度低于其它处理,幼根出愈率为零。在 MS2+IAA+KT 诱导培养基上,心叶驼绒藜叶片、茎段愈伤组织的出愈率为 100%,幼根出愈率较低,为 33%,茎段愈伤组织的生长长度明显高于叶片的和幼根的。在 MS3+IAA+KT 诱导培养基上,叶片出愈率为 100%,茎段的出愈率为 33%,叶片、茎段愈伤组织的生长长度为 7.8 mm、7.6 mm,幼根出愈率为零。

试验证明:MS2+IAA+KT 诱导培养基应作为心叶驼绒藜诱导愈伤组织的首选培养基。而在 MS1+IAA+KT 中,两种激素的配比不适宜此培养基。

3.3 心叶驼绒藜的器官发生培养基

在愈伤诱导过程中,如果基础培养基中添加了一定量的 IAA、KT,则叶片、茎段的愈伤组织上可再分化出植物器官,经 10d 左右这些愈伤组织有些部位形成茎芽,有些形成根;而幼根的愈伤组织部位未形成器官。在 MS1+IAA+KT 诱导培养基上,没有器官的发生。在 MS2+IAA+KT 诱导培养基上,叶片愈伤组织形成植物器官的频率为 30%;茎段愈伤组织形成植物器官的频率为 20%。在 MS3+IAA+KT 诱导培养基上,叶片愈伤组织形成植物器官频率为 20%;茎段愈伤组织形成植物器官率为 10%。

经过反复试验,我们发现心叶驼绒藜愈伤组织经过增殖、分化诱导培养后,可以形成愈伤组织。叶片、茎段的愈伤组织上可再分化出植物器官,而根的愈伤组织上不能形成器官分化,这说明无菌苗胚轴和子叶是最有效的外植体,而胚根愈伤组织的再分化有待于进一步研究。

3.4 外植体生根培养基

从表 5 中可以看出,外植体生根的最佳培养基为 1/2MS+NAA+琼脂+蔗糖,其生根率最高可达 50%;其次为 1/2 MS+IAA+琼脂+蔗糖,生根率为 30%;在没有添加激素的培养基中,植株生根率为零,故不能作为生根培养基。值得注意的是,一般来说 IAA 是植物生根的促进剂,而对心叶驼绒藜来说则 NAA 比 IAA 更能促进生根,而且具有周期短的特性。

从整个试验看,大多数培养基组合有这样的趋势:最容易获得愈伤组织和器官发生的部位是叶,其次为茎,最后是根。试验说明,对心叶驼绒藜来说,幼嫩组织容易进行组织培养和发生器官。从无菌苗的获得到生根培养的整个过程中可以看出,心叶驼绒藜组织形成对生长素和细胞分裂素的要求不同于其它大多数植物,具有某些特殊的要求才能得到满足。而培养基中 IAA 和 KT 的比例决定了根或芽的分化。

目前,关于藜科植物的组织培养资料较少,心叶

驼绒藜不同于其它植物,具有低营养、短寿命的遗传特性^[4];对培养基的适应种类少,对激素配比的适应范围很窄。心叶驼绒藜从外植体制备到扩繁,虽然在种间、种源间以及个体间均存在不同程度的差异,但均可以获得无菌苗,但它的愈伤组织形成及再生植株的扩繁还存在一定的困难,其困难程度可以直接影响到研究进度。

本试验试图通过愈伤组织增殖、分离培养获得再生植株,但没有成功,而从器官发生途径获得再生植株。试验说明,影响心叶驼绒藜组织培养繁殖的内在机理还不清楚。由此要达到心叶驼绒藜高效再生体系还有待进一步研究,因此通过外植体脱分化后的细胞进行再分化而形成幼苗(植株),是目前心叶驼绒藜繁育的一个途径。

参考文献(References):

- [1] 李柱,付爱良,郑晓红,杨刚. 播种深度对心叶驼绒藜出苗的影响[J]. 草食家畜,2004,12(4):111-112.
Li Zhu, Fu Ailiang, Zheng Xiaohong, Yang Gang. The influence of sowing depth to the germination of *Ceratoides ewersmanniana* [J]. Grassfeeding Livestock, 2004, 12(4): 111-112.
- [2] 马海燕. 苜蓿辐射突变体诱导和愈伤组织高效再生的研究[D]. 乌鲁木齐:新疆农业大学,2005
Ma Haiyan. Study on induction of radiated mutants and establishment of a high efficient regeneration system in alfalfa [D]. Urumqi: The Master of Xinjiang Agriculture University, 2005.
- [3] 程肖蕊,李彦舫,李喜文,张亚兰. 野大麦原生质体培养形成愈伤组织[J]. 中国农业科学,1998,31(5):85-87.
Cheng Xiaorui, Li Yanfang, Li Xiwen, Zhang Yalan. Calli induced from protoplasts of Shortsubulate barley [J]. Scientia Agricultura Sinica, 1998, 31(5): 85-87.
- [4] 易津,王学敏,谷安琳,徐军. 驼绒藜牧草种子水分生理幼苗的旱性研究[J]. 草地学报,2003,1(2):103-109.
Yi Jin, Wang Xuemin, Gu Anlin, Xu Jun. Study on the moisture physiology and drought resistance of *Ceratoides* seeds [J]. Acta agrestia Sinica, 2003, 1(2): 103-109.

Study in Regenerated Plants Induced from Embryo of *Ceratoides ewersmanniana*

ZHENG Xiao-hong, LI Zhu, FU Ai-liang, YANG Gang, SHA Wu-lie

(Grassland Research Institute of Xinjiang, Urumqi 830000, China)

Abstract: By using leaves, stem sections and young roots as explants, establishment the development of regeneration plant from organ was studied. results revealed that: 1. the establishment of germfree plantlet: Used 1/2MS + agar + sucrose, the burgeoning rate was high and plant was strong. 2. induction culture medium: Used culture medium MS1 + IAA 0.2mg/L + KT 0.1mg/L, callus induction rate was low and there was no regeneration; used MS2 + IAA 0.2mg/L + KT 0.2mg/L, MS3 + IAA 0.1mg/L + KT 0.1mg/L, the leaves, stem section obtain the power of regeneration, callus induction rate was high. 3. rooting culture medium: Used 1/2MS + NAA 0.1mg/L, the rooting rate was high and cycle was short. Used 1/2MS + IAA 0.1mg/L, the rate was low, and cycle was long.

Key words: *Ceratoides ewersmanniana*; Tissue culture; Callus; Regenerated plant

【责任编辑 刘天明】