

文章编号:1000-8551(2006)06-482-04

菊苣高效不定芽直接发生及其植株再生

韩晓玲 王玉华 李红民 郝建国 贾敬芬

(西北大学生命科学学院,陕西 西安 710069)

摘要:本研究以菊苣无菌苗叶片为外植体,建立了高效不定芽直接发生及其植株再生体系。在附加不同浓度 N-6-benzyladenine (6-BA)或与低浓度 α -naphthaleneacetic acid (NAA)组合的 MS 培养基上,5~7d 外植体表面不经过愈伤组织诱导阶段,直接形成不定芽。组织学观察表明,不定芽起源于叶片维管束薄壁细胞,且其微管组织系统与叶片外植体内微管组织系统紧密相连。6-BA 是不定芽直接发生所必需的,外植体的发育时期、取材部位和培养基蔗糖浓度对不定芽直接发生有重要影响。在附加 2.0mg/L 6-BA, 0.5mg/L NAA, 100mg/L Vc, 100mg/L VB₁, 300mg/L 脯氨酸和 40g/L 蔗糖的 MS 培养基上,培养 20d 龄基部叶片 15d 时,不定芽直接发生频率最高为 100%,每块外植体上产生的不定芽数量也最多,平均为 36~38 个。在 1/2 MS + IBA 0.5mg/L 培养基上,再生苗诱导生根频率为 97.58%,再生植株移栽于盆土中,100% 存活且生长良好,未见形态异常。

关键词:菊苣; 组织培养; 不定芽直接发生; 植株再生

AN EFFICIENT PLANT REGENERATION SYSTEM VIA DIRECT ADVENTITIOUS BUD FORMATION IN CHICORY

HAN Xiao-ling WANG Yu-hua LI Hong-min HAO Jian-guo JIA Jing-fen

(College of Life Science, Northwest University, Xian, Shaanxi 710069)

Abstract: An efficient plant regeneration system through direct adventitious bud formation is established using leaf segments of asepsis seedlings of chicory (*Cichorium intybus* L.). After 5~7d of culture, adventitious buds appeared directly from explants without any intervening callus on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with different concentrations of N-6-benzyladenine (BA) alone or together with 0.5mg/L α -naphthaleneacetic acid (NAA). According to histological observations, adventitious buds were originated from thin wall cell of vascular bundle of the leaves, and the vascular bundle systems of adventitious buds are closely connected with that of leaf explant. 6-BA was necessary for direct adventitious bud formation. The frequency and number of adventitious bud formation were strongly influenced by the development stage of explants and sucrose concentration. After 15 days culture, the 100% frequency of bud formation as well as an average of 36~38 adventitious buds per explant were obtained on MS medium supplemented with 2.0mg/L 6-BA, 0.5mg/L NAA, 100mg/L Vc, 100mg/L VB₁, 300mg/L proline and 40 g/L sucrose using 20-day-old leaves. When transplanted and cultured for about 10d on the 1/2 MS medium added 0.5mg/L indole-3-butyric acid (IBA), 97.58% rooting frequency was obtained. Plantlets grew well and appeared normal with no mortality after transfer to soil.

Key words: chicory; tissue culture; direct adventitious bud formation; plant regeneration

收稿日期:2005-12-16

基金项目:陕西省自然科学基金项目(2003C108)和省重点实验室重点项目(05JS48)

作者简介:韩晓玲(1963-),女,陕西临潼人,副研究员,主要从事植物细胞工程和基因工程研究。Tel: 13343471807;Emai:hand123@126.com。贾敬芬为通讯作者,Tel:029 88303484,13379224716;Emai: Jia J f 38@nwu.edu.cn

菊苣 (*Chicory*, *Cichorium intybus* L.) 为菊科菊苣属多年生草本, 既是高产优质的牧草^[1], 又是新兴的高档特色蔬菜, 并且菊苣含有菊糖、马栗树皮素、马栗树皮甙、野葛苣甙、山葛苣素和山葛苣苦素等特殊成分, 可药用, 具有防治黄胆型肝炎、心血管疾病和骨质疏松症等功效^[2,3]。近年来已有一些有关菊苣组织培养的报道^[4-6], 但都是通过间接的器官发生途径再生植株, 即外植体脱分化产生愈伤组织, 愈伤组织再分化成不定芽, 最后不定芽生根成苗。此法培养周期长, 程序复杂, 植株再生频率低, 易发生变异。本文以菊苣叶片为外植体, 通过不定芽直接发生途径, 旨在建立高效离体植株再生体系, 为菊苣快速扩繁和利用生物技术对其进行遗传改良奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 无菌实生苗的产生

菊苣种子由陕西省农业科学院牧草研究所提供, 品种为普那。种子用自来水冲洗, 70% 乙醇浸摇 30s, 0.1% $HgCl_2$ 表面消毒 10min, 无菌水冲洗 6 次, 接种于无生长调节剂的 MS^[7] 培养基上。每日光照 16h, 光照强度 2000lx, 培养温度 $25^{\circ}C \pm 2^{\circ}C$ 。

1.2 外植体不定芽的直接诱导

将 10、15、20、25、30d 龄菊苣无菌苗叶片切成叶柄、叶片基部和叶片顶部 3 部分, 分别接种在附加 2.0mg/L 6-BA、0.5mg/L NAA、100mg/L Vc、100mg/L V_{B1} 、300mg/L 脯氨酸和 40g/L 蔗糖的 MS 培养基上, 琼脂含量为 0.68%, pH 值调整至 5.8~6.2, 培养温度为 $25^{\circ}C \pm 2^{\circ}C$, 2500lx 光照培养。同时将 20d 龄无菌苗叶片接种在含不同激素配比的 MS 培养基上(表 2)或 MS + 6-BA 2.0mg/L + NAA 0.5mg/L + Vc 100mg/L + V_{B1} 100mg/L

+ 脯氨酸 300mg/L 的培养基上, 以比较激素和不同蔗糖浓度 (0~50g/L) 对不定芽直接发生的影响。培养 15d 后观察统计外植体上直接发生不定芽的数量和频率。不定芽直接形成频率 = (直接形成芽的外植体数/接种的外植体数) $\times 100\%$ 。

1.3 再生苗的生根、炼苗与移栽

将生长高度 3cm 以上的再生苗从外植体上切下, 培养于附加 0~1.0mg/L 吲哚丁酸 (IBA) 的 MS 或 1/2MS 培养基上, 当幼苗产生 3~5 条发达的根系后, 移去封口膜, 敞开瓶盖, 炼苗 4d, 选取生长健壮的再生植株, 洗净根部残留的培养基, 移栽于塑料钵中, 自然光下保湿培养。

1.4 组织学观察

培养 15d 的外植体于 Olympus 实体解剖镜下观察, 选取理想的组织切块照相, 然后用 FAA 固定液固定 24h 后, 石蜡包埋, 使用 LEICARN2135 型切片机切片, 厚度为 $9\mu m$, 切片按常规方法处理, 番红—固绿对染, 加拿大树胶封片, Olympus BX50 型显微镜下观察照相。

2 结果

2.1 叶片外植体不定芽的直接发生及组织学观察

10~30d 龄无菌苗叶片, 接种在含有 6-BA 或 6-BA 与低浓度 NAA 组合的 MS + Vc 100mg/L + V_{B1} 100mg/L + 脯氨酸 300mg/L + 蔗糖 40g/L 培养基上, 培养 5~7d 后, 在外植体的表面和切口处陆续产生绿色的不定芽芽点, 15d 后, 芽点进一步发育成不定芽, 芽的形成有单生(图 1-A) 和簇生(图 1-B、C) 两种方式, 这些不定芽的发生具有共同的特征, 即均从外植体上直接产生, 未经愈伤组织诱导阶段, 也未见其周围有任何愈伤组织形成。组织学观察表明, 不定芽起源于叶片外植体

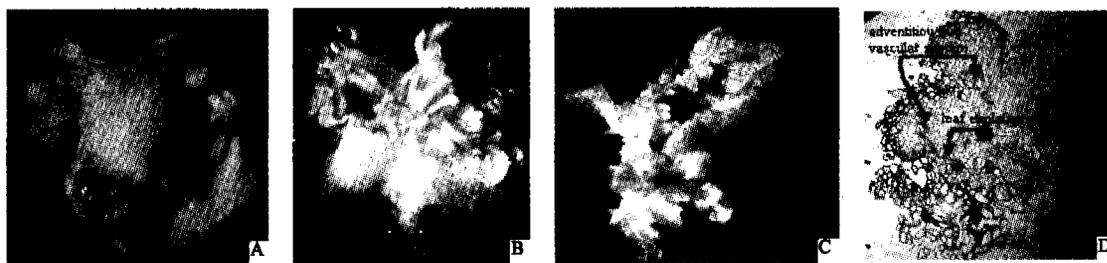


图 1 菊苣叶片不定芽直接发生的形态学和组织学观察

Fig. 1 Morphological and histological observation of direct adventitious bud formation of leaf explant of chicory (*C. intybus* L.)

A, B 不定芽直接从叶片切块表面发生; C, 大量不定芽直接从叶片外植体切口处发生; D, 不定芽从叶外植体直接发生的组织切片, 显示不定芽与叶外植体之间的微管组织系统密切相连。

A, B Adventitious buds directly arising from a leaf segment surface; C, Numerous adventitious buds directly induced from wounded parts of a leaf explant; D, Histological section of adventitious buds directly originated from thin wall cells of vascular bundle of the leaf segment, showing the tight connection of vascular systems between adventitious buds and leaf explant.

维管束的薄壁细胞,且其微管组织系统与叶片外植体的微管组织紧密相连(图1-D),这与体细胞胚胎所具有的独立的微管系统明显不同。

2.2 叶片年龄对菊苣不定芽直接发生的影响

将发芽10~30d龄的无菌苗叶片,接种在MS+6-BA 2.0mg/L+NAA 0.5mg/L+Vc 100mg/L+V_{B1} 100mg/L+脯氨酸 300mg/L+蔗糖 40g/L的培养基上,15d后统计外植体上直接产生的不定芽数。结果如图2所示,叶片发育年龄对菊苣体细胞器官直接发生有明显的影。较幼嫩的叶片易诱导产生愈伤组织,很少有不定芽的直接发生,而发育年龄较大的外植体,细胞分化程度较高且褐化严重,也不利于不定芽的直接形成,只有发育时期适中,如20d龄的叶片,方可高频率(100%)直接产生不定芽,而且不定芽形成速度快,接种6~7d即有不定芽发生,繁殖系数高,每块外植体上形成的芽数平均高达38.75个。

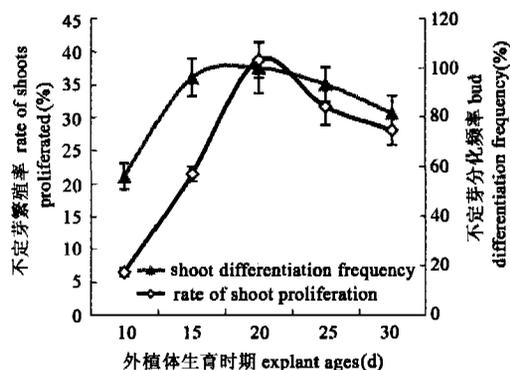


图2 叶片发育年龄对菊苣不定芽器官直接发生的影响

Fig.2 Effect of leaf development stage on direct adventitious bud formation of chicory

2.3 外植体类型对菊苣不定芽直接发生的影响

将20d龄无菌苗叶柄和叶片分别培养在MS+6-BA 2.0mg/L+NAA 0.5mg/L+Vc 100mg/L+V_{B1} 100mg/L+脯氨酸 300mg/L+蔗糖 40g/L的培养基上,培养5~7d,可在外植体上观察到不定芽直接发生。15d后统计结果(表1)表明:叶柄、叶片基端和叶片顶端均能直接产生不定芽,而且不定芽形成频率均为100%,但是每块外植体上产生不定芽的数量却显著不同,其中叶片基部最多,每块外植体上形成的芽数平均为36.08个,顶部次之,叶柄最少,为18.42个。

2.4 6-BA和NAA浓度及其配比对菊苣不定芽直接发生的影响

表2为20d龄无菌苗叶片在含有不同激素组合的MS+Vc100mg/L+V_{B1}100mg/L+脯氨酸300mg/L+蔗糖

40g/L培养基上培养15d的统计结果。在无外源激素的“J1”培养基和仅含有NAA的“J2”培养基上,叶片表面不能直接发生不定芽,但在含有6-BA的培养基“J3~J11”上,均有不定芽的直接形成。不定芽发生频率随着6-BA浓度的增加而递增,用激动素KT替代6-BA亦有类似的效果,可见,6-BA或KT是菊苣直接不定芽发生所必需的激素。当6-BA浓度为2.0mg/L时,添加低浓度的NAA(0.5mg/L)对不定芽发生频率有一定的促进作用(J9),而较高浓度NAA易诱导愈伤组织,不利于不定芽的直接发生。

表1 外植体类型对菊苣不定芽直接发生的影响

Table 1 Effect of explant type on direct adventitious bud formation of chicory

| 外植体类型 kinds of explants | 接种外植体数 No. of explants incubated | 直接发生芽频率(%) frequency of direct shoot formation | 每块外植体繁殖芽数 No. of proliferated shoots per explant |
|----------------------------|-------------------------------------|---|---|
| 叶片基部 leaf basal part | 70 | 100 | 36.08 ± 3.048 ^a |
| 叶片顶部 leaf apical part | 68 | 100 | 27.94 ± 2.367 ^b |
| 叶柄 petiole | 70 | 100 | 18.42 ± 2.013 ^c |

注:表中数据为四次重复平均值±标准误差;数值后的不同字母表示差异显著性(P<0.01),下表同。

Note: data in table represent mean ± S. E. of four replicates, values followed by different letters are significantly different (P < 0.01). The same as following table.

表2 植物激素对菊苣不定芽直接发生的影响

Table 2 Effect of the different phytohormones on direct adventitious bud formation of chicory

| 培养基编号 No. of media | 外源激素 phytohormone (mg/L) | | 接种外植体数 No. of explants inoculated | 芽直接发生频率 direct shoot formation frequency/% |
|-----------------------|-----------------------------|-----|--------------------------------------|---|
| | 6-BA | NAA | | |
| J1 | 0.0 | 0.0 | 48 | 0.0a |
| J2 | 0.0 | 1.0 | 50 | 0.0a |
| J3 | 0.5 | 0.0 | 50 | 22 ± 2.50b |
| J4 | 0.5 | 0.5 | 49 | 29.45 ± 1.50c |
| J5 | 1.0 | 0.0 | 49 | 52.5 ± 4.60 d |
| J6 | 1.0 | 0.5 | 50 | 65 ± 3.25e |
| J7 | 1.5 | 0.5 | 50 | 88 ± 4.55f |
| J8 | 2.0 | 0.0 | 49 | 96.3 ± 3.45g |
| J9 | 2.0 | 0.5 | 50 | 100 ± 0.00g |
| J10 | 2.0 | 1.0 | 50 | 84 ± 4.75f |
| J11 | 2.0 | 2.0 | 50 | 67.5 ± 5.25e |

2.5 蔗糖浓度对菊苣不定芽直接发生的影响

图3结果表明,蔗糖对菊苣叶片不定芽直接发生

有重要的影响。在无蔗糖的培养基上,叶片切块几乎不产生不定芽,而在含有蔗糖的培养基上均能直接形成不定芽,随着蔗糖浓度的升高,外植体上不定芽产生的数量和频率也随之增加,当培养基中蔗糖浓度为40g/L时,不定芽的发生频率最高(100%),每块外植体上形成的芽数也最多,平均为36.5个。可见较高浓度的蔗糖能有效提高不定芽的直接发生频率,这可能与高浓度蔗糖所产生的渗透胁迫作用有关。

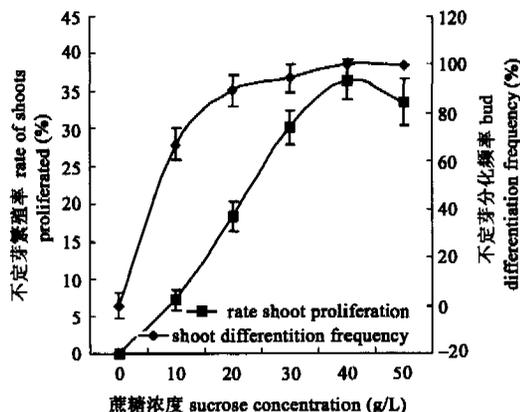


图3 蔗糖浓度对菊苣体细胞不定芽器官直接发生的影响

Fig.3 Effect of sucrose concentration on direct adventitious bud formation in chicory

2.6 培养基种类和吲哚丁酸 (IBA) 对菊苣再生苗生根的影响

不定芽形成的再生苗在附加不同浓度 IBA 的 MS 或 1/2MS 培养基上 8~10d 后产生不定根。14d 后统计生根情况,结果见图 4。培养基种类对再生苗生根有一定影响,高盐浓度 MS 培养基不利于根的形成,而盐浓度减半的 1/2MS 培养基比较适合菊苣再生苗的生根培养。

菊苣生根比较困难,在无 IBA 的 MS 或 1/2MS 培养基上根诱导率较低,低浓度 IBA 对菊苣再生苗生根具有明显的促进作用,其中 1/2MS + IBA 0.5mg/L 培养基最适合生根,诱导频率达 97.58%,而较高浓度 IBA 对根的形成有不利的影响。

2.7 炼苗与移栽

将生根培养基上生长 20d 左右,根系发达,生长健壮的小苗,敞开瓶盖炼苗,然后移栽于盆土中,再生植株成活率为 100%,生长良好,未见形态异常。

3 讨论

大量实验证明,外植体的生理状态和发育程度是影响植物组织培养的重要因素,生理代谢旺盛而分化

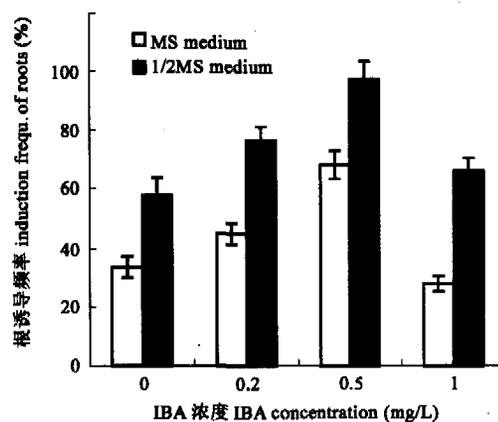


图4 培养基种类和 IBA 浓度对菊苣再生苗生根的影响

Fig.4 Effect of medium type and IBA concentration on root regeneration of adventitious buds of chicory

程度较低的外植体有利于愈伤组织诱导及器官分化。本试验中,不同发育年龄的菊苣叶片及其不同部位,不定芽直接发生的情况却有所不同,可能与外植体内源激素水平及生理状态不同有关^[8]。另外组培基因型对不定芽高效再生具有非常重要的影响,本文虽然未对不同基因型进行优化试验,但从本试验如此高效的不定芽再生结果不难看出,本试验所用品种普那是非常适合离体组织培养的。

6-BA 和 NAA 不同浓度组合及配比,控制着菊苣叶片细胞的分化和形态建成。当培养基中 NAA 使用浓度大于 6-BA 时,外植体脱分化形成愈伤组织;当两者用量相当时,叶片表面直接发生大量体细胞胚胎,同时在切口处诱导产生胚性愈伤组织(另文报道);而在仅有 6-BA 或 6-BA 与低浓度 NAA 组合的培养基上,方能直接分化不定芽。表明菊苣叶片对外源激素比较敏感。

菊苣组织培养国内外已有一些报道,但都是通过间接的器官发生途径再生植株^[4-6]。有关菊苣不定芽直接发生及其组织学观察的研究尚未见报道。本文以菊苣叶片为外植体,优化了不定芽直接发生的条件。组织学观察表明,不定芽起源于维管束的薄壁细胞,且其微管组织系统与叶片外植体的微管组织系统连接紧密。在优化的培养基上培养 15d 后,不经愈伤组织诱导阶段,直接产生大量不定芽(每块外植体平均产生 36~38 个),35~40d 内即可再生完整植株,缩短了培养周期,简化了培养程序,提高了植株再生频率和繁殖系数,为菊苣快速繁殖提供了一条经济有效途径,并在利用生物技术改良菊苣品质方面具有重要意义。

参考文献:

(下转第 459 页)

并且重复性好,与阳性对照之间的相关性不太强。原因可能是经过离子束的介导作用之后,水稻的基因组发生了一些变化,整合了玉米 DNA 片段,至于片段大小,还有待进一步对差异条带进行回收,取得确凿证据。

3 讨论

低能离子束介导转基因技术是创建于我国的一种新的物理遗传转化技术,已成功地将目的基因导入水稻获得转基因植株^[16]。借助离子束介导等方法转移活性裸露 DNA 大分子已成为当前基因工程研究的热点。这可能由于低能离子不仅在细胞的表面造成可修复的机械损伤成为外源 DNA 进入细胞内的通道,而且正离子与靶细胞的电荷交换使微孔通道积累正电荷,能吸引带负电荷的外源 DNA 分子进入细胞,同时离子束的动量、能量效应造成细胞内基因组 DNA 可修复的损伤,增加了外源 DNA 重组和插入细胞基因的几率,引起后代更为广泛的变异,为育种工作提供了更为丰富的种质资源。

通过离子束介导玉米基因组 DNA 转入水稻,对获得的变异株进行生理生化指标的测定结果表明,变异株有可能整合了玉米的基因片段,不同程度地表现出供体的性状。对变异株的 AFLP 扩增结果进行分析,扩增条带与阴性对照相似率很高,而与玉米的相似率很低,说明外源 DNA 导入植物后,后代的基因组结构与 DNA 受体高度相似,这与动物材料的试验结果一致^[15]。经离子束介导获得的变异株扩增条带与阴性对照存在明显的差异条带,出现了新增带、缺失带、增强带和减弱带等,这些差异带提示外源 DNA 可能已经

整合到受体的基因组中,同时为进一步寻找转基因的分子证据提供了帮助。

参考文献:

- [1] 余增亮,邱励俭,霍裕平. 安徽农学院学报,1991,18(4):251~257
- [2] Zengliang Yu, Jianbo Yang, Yuejin Wu, et al. Transferring Gus gene into intact rice cells by low energy ion beam. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, 1993, B80/81:1328~1331
- [3] 吴丽芳,李红,宋道军,等. 建立低能离子束介导小麦转基因方法并获得转 GUS 基因植株. 遗传学报,2000,27(11):982~991
- [4] Wu Lifang, Li Hong, Feng Huiyun, et al. Introduction of rice chitinase gene into wheat via low energy Ar⁺ beam implantation. Chinese Science Bulletin(科学通报),2001,46(4):318~322
- [5] 黄群策,代西梅. 低能氮离子束对不同倍性水稻的诱变效应. 杂交水稻,2004,19(3):57~61
- [6] 沈伟其. 测定水稻叶片叶绿素含量的混合液提取法. 植物生理学通讯,1998,24(3):62~64
- [7] 冯绪猛,罗时石,胡建伟,等. 农药对水稻叶片丙二醛及叶绿素含量的影响. 核农学报,2003,17(6):481~484
- [8] 杨敏文. 快速测定植物叶片叶绿素含量方法的探讨. 光谱实验室,2002,19(4):478~481
- [9] 汪斌,兰涛,吴为人,等. 水稻叶绿素含量的 QTL 定位. 遗传学报,2003,30(12):1127~1132
- [10] 许文亮,李娟,田廷亮,等. SODMC 对低温胁迫后水稻幼苗 SOD, POD 同工酶谱的影响. 华中师范大学学报(自然科学版),2002,36(1):84~86
- [11] 邹琦. 植物生理学实验指导. 北京:中国农业出版社,2000
- [12] 李和声. 植物生理生化实验原理和技术. 北京:高等教育出版社,2000
- [13] 张龙翔. 生化实验方法和技术. 北京:高等教育出版社,1997
- [14] 汤章城. 现代植物生理学实验指南. 北京:科学出版社,1999
- [15] 张春玲,陈元霖. 蓖麻蚕 DNA 导入家蚕引起遗传变异的研究:基因组 DNA 的 RAPD 检测. 遗传,1998,20(3):1~4
- [16] 杨剑波,余增亮. 应用低能离子束介导法获得水稻转基因植株. 科学通报,1994,39(16):1530~1534

(上接第 485 页)

- [1] 高洪文. 高产优质饲用植物—菊苣. 山西农业科学(增刊),1993,1-3
- [2] 孙红绪,陈文明. 高档绿色蔬菜—菊苣. 长江蔬菜,2000,5:25~26
- [3] Harsh Pal Bais, G A Ravishankar. *Cichorium intybus* L cultivation, processing, utility, value addition and biotechnology, with an emphasis on current status and future prospects. J Sci of Food and Agriculture, 2001,81(5):467~484
- [4] Varotta, Lucchin M, Parrinip. Immature embryos culture in Italian red

chicory. Plan Cell Tissue and Organ Culture, 2000, 62(1):75~79

- [5] 王绍明,张霞,刘彤. 菊苣花瓣的组织培养. 植物生理学通讯,2001,37(3):230
- [6] 程林梅,高洪文,赵茂林. 菊苣组织培养与植株再生的研究. 草业学报,2002,11(4):105~107
- [7] Murashige T, Skoog F. Revised media for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol Plant., 1962,15:473~497
- [8] 王小菁,李玲编. 植物生长调节剂在植物组织培养中的应用. 北京:化学工业出版社,2002,47