

## 卫星搭载胡萝卜组织培养研究

曹桦<sup>1</sup>, 杨军<sup>1,2</sup>

(1. 西华师范大学生命科学学院, 四川南充 637002; 2. 西华师范大学珍稀动植物研究所, 四川南充 637002)

**摘 要:**以经卫星搭载的胡萝卜种子发育而来的嫩叶为外植体, 诱导愈伤组织, 探讨诱导后胡萝卜愈伤组织对外源激素的反应。实验结果表明, 诱导松散型愈伤组织的最佳激素配比是  $1.0 \text{ mg/L } 2,4\text{-D} + 0.5 \text{ mg/L } 6\text{-BA}$ 。此愈伤组织移入含有  $0.1 \text{ mg/L}$  的 TDZ 培养基中能产生大量的芽, 但培养 20 d 左右芽膨大透明成绿色, 之后将芽移入含有不同种类不同浓度的生根培养基中都能生根且易于移栽。本实验为进一步筛选胡萝卜抗胁迫变异系奠定了基础。

**关键词:**卫星搭载; 胡萝卜; 组织培养; 细胞分裂素; 生长素

**中图分类号:**Q944.6 **文献标识码:**B

卫星搭载飞行过程中, 在高真空、微重力和重粒子辐射等因素的作用下, 可使生物材料发生多种生理生化<sup>[1]</sup>、细胞学<sup>[2,3]</sup>和遗传学<sup>[4-6]</sup>等特性改变。我国先后多次将生物材料送入太空, 目前已得到抗病小麦、高产水稻、特大青椒和长荚绿豆等突变系, 有的已开始推广<sup>[7]</sup>。

胡萝卜 (*Daucus carota* L.) 是世界上最重要的蔬菜作物之一, 占蔬菜生产总量的 3%, 达 135 000 000 t。由于其营养价值高, 且适于生食, 加工, 烹调等多种用途, 在世界范围内广泛栽培, 中国是农业大国, 胡萝卜作为蔬菜作物在人们生活中起着重要的作用, 目前主要是以未经诱变的胡萝卜的不同部分进行组织培养, 原生质培养, 悬浮培养, 通过器官形成或体细胞胚途径获得再生植株<sup>[8,9]</sup>。随着生长环境的改变, 筛选抗逆植物显得越来越迫切, 然而传统的育种方法筛选周期过长, 因此, 借助物理、化学诱变或体细胞变异, 利用植物组织培养技术筛选耐旱、耐盐及抗病的植株, 为作物及花卉的改良提供了一个良好途径<sup>[10,11]</sup>。

我们将胡萝卜种子经卫星搭载后, 对萌发植物的嫩叶进行组织培养研究, 探讨不同激素的影响, 建立再生体系, 为在离体条件下筛选突变体做了先期性的工作, 现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材 料

将“神舟4号”卫星搭载的胡萝卜种子种植在西华师范大学生命科学学院实验地, 2个月后, 取萌发植株的嫩叶为组织培养外植体。

### 1.2 方 法

嫩叶经自来水清洗数遍, 然后在 75% 的酒精中消毒 10 s, 无菌水冲洗三遍后, 用 0.1% 的升汞消毒 10 min, 用无菌水冲洗 5 遍, 切成 0.3 - 0.5 cm 的小块接种于含有不同种类激素的 MS 培养基中, 除 IAA 为过滤灭菌外, 其余均在  $121^\circ\text{C}$ , 15 p 灭菌 15 min, 放置在光强度为 1 000 lx, 温度为  $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ , 光周期为 12 h/d 的培养室中进行培养, 经 2 - 3 次继代, 愈伤组织状态稳定时, 再转入含有不同种类, 不同浓度的诱芽培养基中培养, 经过一段时间后, 在相同的培养基上进行继代培养, 比较两次的实验结果, 挑选处于最佳生长状态的芽移入生根培养基中进行诱导生根培养。

收稿日期: 2005 - 11 - 21

基金项目: 四川省杰出青年基金项目 (05ZQ026 - 017); 四川省重点学科建设项目 (SZD0420)

作者简介: 曹桦 (1981 - ), 女, 四川江油人, 西华师范大学生命科学学院硕士研究生, 主要从事植物组织培养以及生理学方面的研究。

通讯作者: 杨军 (1973 - ), 男, 重庆忠县人, 西华师范大学生命科学学院副研究员, 博士, 主要从事细胞生物学和遗传学研究。

## 2 结果分析

### 2.1 不同激素对胡萝卜叶的愈伤组织的影响

在分别添加有浓度为 1.0 mg/L 的 NAA, IAA, 6-BA, 2,4-D 以及 1.0 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L 6-BA 的 MS 培养基中,发现 10d 左右所有培养基中的叶片都膨大,但大部分叶片不久就死亡,只有在添加有 IAA 的培养基中,叶片愈伤化,并长出根,但仍不能形成愈伤组织,仅在 1.0 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L 6-BA 的培养基中叶片于 35d 左右有愈伤组织形成,经过 2-3 次继代后,后者培养基中的愈伤组织状态趋于稳定,形成了淡黄色的、质地疏松的愈伤组织。

### 2.2 不同激素对芽的影响

从 1.0 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L 6-BA 的培养基中挑取生长旺盛的愈伤组织,切成边长为 0.5 cm 左右的小块,放入含有不同浓度梯度的 6-BA 或 TDZ 的培养基中,诱导芽的形成,20d 后统计芽分化频率,结果如图 1,2。

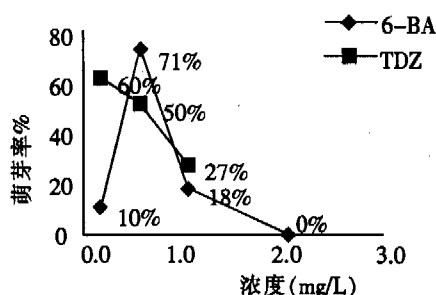


图 1 不同浓度的 6-BA 和 TDZ 对愈伤组织萌芽率的影响

Fig.1 Effects of different phytohormones on germination frequency of carrot callus

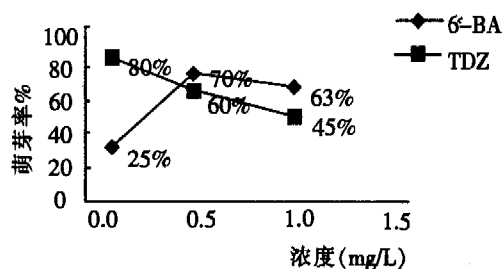


图 2 在相同浓度的培养基上继代培养 20d 后, 6-BA 和 TDZ 对愈伤组织萌芽率的影响

Fig.2 Effects of different phytohormones on germination frequency of carrot callus after 20 days in the same medium

由图 1 可知,随着 6-BA 浓度的增加,愈伤组织在 6-BA 为 0.5 mg/L 时萌芽率达到最大值,为 71%;但随着 6-BA 浓度的进一步增大,愈伤组织的颜色由淡黄色变为深绿色,硬度也逐渐增大,当浓度达到 2.0 mg/L 时,愈伤组织不再萌芽。而随着 TDZ 浓度上升,萌芽率则呈现出一个线性递减的趋势,表现出对芽形成具有抑制作用。同时,在含有 6-BA 的培养基上形成的芽先长出叶,而在含有 TDZ 的培养基上形成的芽则出现玻璃化现象,基部膨大呈透明状(图 3,4)。

在相同的培养基上进行继代培养,结果如图 2。继代后在不同浓度、不同激素上的萌芽率都显著提高,但萌芽的最适浓度由 0.5 mg/L 6-BA 变为 0.1 mg/L TDZ,而萌芽率也由 71% 上升到 80%。

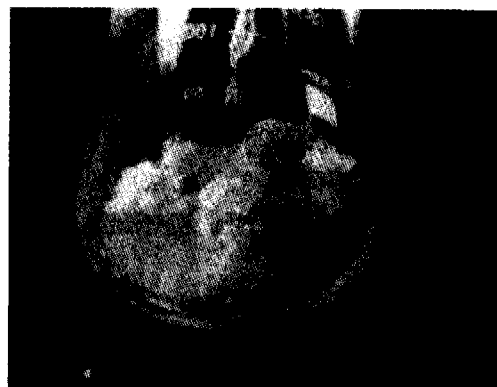


图 3 在含有 0.5mg/L 的 6-BA 中所形成的芽  
Fig.3 Shoots formed on MS medium with 0.5mg/L 6-BA



图 4 在含有 0.1mg/L 的 TDZ 中所形成的芽  
Fig.4 Shoots formed on MS medium with 0.1mg/L TDZ

2.3 不同浓度对根的影响

取源于 0.1mg/L 的 TDZ 中的芽,接种于含有不同浓度、种类生长素的 MS 培养基上诱导生根,培养 20d 后统计实验结果(见表 1).

表 1 不同激素对胡萝卜芽的生根影响

Tab.1 Roots induction in shoots of carrot on MS medium with various auxins

| 激素      | 浓度(mg/L) | 生根率% | 平均根数 | 平均根长(cm) | 平均茎长(cm) |
|---------|----------|------|------|----------|----------|
| control | 0.0      | 45%  | 1.78 | 1.77     | 1.93     |
|         | 0.1      | 45%  | 1.56 | 1.14     | 2.34     |
| NAA     | 0.5      | 20%  | 1.25 | 0.40     | 2.57     |
|         | 1.0      | 50%  | 2.60 | 1.33     | 2.96     |
|         | 0.1      | 55%  | 1.73 | 1.47     | 1.87     |
| IAA     | 0.5      | 45%  | 2.89 | 1.47     | 1.75     |
|         | 1.0      | 55%  | 2.27 | 1.58     | 2.04     |

在未添加任何外源激素的的 MS 培养基上,胡萝卜芽能够自发形成不定根(图 5). 在添加 NAA 或 IAA 后对诱导频率的影响不大,但对根长度反而有抑制作用. 添加高浓度的生长素有利于增加不定根的数目, IAA 为 0.5 mg/L 时,平均每个芽的基部可形成 2.89 条根. 相比较而言,添加 NAA 比添加 IAA 更有利于生根培养基中芽的延长(图 6),NAA 为 1.0 mg/L,平均芽长达到 2.96 cm.



图 5 在无激素培养基上的生根情况  
Fig.5 Roots formed on MS base medium



图 6 在 0.1mg/L 的 NAA 上的生根情况  
Fig.6 Shoots formed on MS medium with 0.1mg/L NAA

3 讨 论

从本文的实验结果可以看出,以种子经卫星搭载后萌发出的再生植株嫩叶为外植体,能够建立起有效的胡萝卜的组织培养和植株再生体系. 将后代的嫩叶接种在含有不同浓度不同激素的培养基上,发现只在 1.0mg/L 2,4 - D + 0.5mg/L 6 - BA 的培养基上形成淡黄色的、质地疏松的愈伤组织,这与 1.0mg/L 2,4 - D + 0.5mg/L KT 的激素配比基本一致<sup>[12]</sup>,但有报道说只在含有 2,4 - D 的 MS 培养基上愈伤组织继续生长,并在三星期后出现绿色芽点且分化出大量的芽和根<sup>[13]</sup>. 将形成的愈伤组织移入含有不同浓度梯度的 6 - BA 或 TDZ 的培养基中发现高浓度的细胞分裂素能够抑制芽的形成,但萌芽的最适浓度是 0.1mg/L 的 TDZ,但由于 TDZ 的细胞分裂素活性远远高于 6 - BA<sup>[14]</sup>,因此使得形成的芽基部出现玻璃化现象. 在生根培养基中添加高浓度的生长素有利于增加不定根的数目但对根长反而有抑制作用.

在空间育种领域大部分工作都是将搭载种子直接在大田中筛选<sup>[15,16]</sup>,但空间诱变与组织培养相结合也逐渐成为筛选抗胁迫变异系的有效途径,利用此方法已在卫星搭载亚麻后代中筛选出 PEG 和 NaCl 抗性系或在红豆草中耐盐愈伤组织的筛选及植株再生也获成功<sup>[17,18]</sup>. 这表明本文筛选出的有助于形成愈伤组织以

及分化再生出植株的最佳激素组合,为其以后通过添加适当的胁迫因子筛选具有抗逆性植株从而获得更为优质营养的胡萝卜品种打下基础。

#### 参考文献:

- [1] COWLES J R, SCHELD H W, LEMAY R, et al. Growth and Lignification in Seedlings Exposed to Eight Days of Microgravity [J]. Ann. Bot., 1984, 54: 33 - 48.
- [2] HALSTEAD T W, DUTCHER F R. Plants in Space [J]. Ann. Rev. Plant Physiol, 1987, 38: 317 - 345.
- [3] KORDYUM E, BARANENKO V, NEDUKHA E, et al. Development of Potato Minitubers in Microgravity [J]. Plant Cell Physiol, 1997, 38(10): 1111 - 1117.
- [4] NEVZGODINA V, GAUBIN Y, KOVALEV E E, et al. Changes in Developmental Capacity of Artemia Cyst and Chromosomal Aberrations in Lettuce Seeds Flown Aboard Salyut - 7 (Biobloc III experiment) [J]. Advances in Space Research, 1984, 4(10): 71 - 76.
- [5] HAGEN U. Radiation Biology in Space: a Critical Review [J]. Adv. Space Res., 1989, 9(10): 3 - 8.
- [6] KOSTINA L, ANIKEEVA I, VAULINA E. The Influence of Space Flight Factors on Viability and Mutability of Plant [J]. Adv. Space Res., 1984, 4(10): 65 - 70.
- [7] 蒋兴村. 863 - 2 空间诱变育种进展及前景 [J]. 空间科学学报, 1996, 16(增刊): 77 - 82.
- [8] 吴石君, 林忠平, 马 诚, 等. 从胡萝卜愈伤组织分离的原生质体获得再生植株 [J]. 遗传学报, 1977, 4(4): 363 - 364.
- [9] 宛新杉, 夏镇漠, 王辅德, 等. 不同培养条件对胡萝卜根原生质生长的影响 [J]. 植物生理学报, 1983, 9(2): 211 - 215.
- [10] 贺道耀, 余叔文. 水稻高脯氨酸愈伤组织变异体的筛选及其耐盐性 [J]. 植物生理学报, 1995, 21(1): 65 - 72.
- [11] 范家霖, 杨保安, 张建伟, 等. 组织培养在菊花辐射育种中的应用研究 [J]. 河南科学, 1996, 14(2): 455 - 459.
- [12] 尹文兵, 李丽娟, 黄勤妮, 等. 胡萝卜愈伤组织的诱导及细胞悬浮培养研究 [J]. 山西师范大学学报, 2004, 18(2): 71 - 76.
- [13] 宛新杉, 王辅德, 宋永根, 等. 胡萝卜根原生质体培养和植株再生 [J]. 植物生理学通讯, 1987, (6): 30 - 33.
- [14] 秦静远. TDZ 在植物组织培养中的应用 [J]. 杨凌职业技术学院学报, 2005, (4): 19 - 22.
- [15] 邓立平, 郭亚华, 张军民, 等. 空间诱变在甜椒育种中的应用 [J]. 空间科学学报, 1996, 16(增): 125 - 131.
- [16] 蒋兴村, 陈芳远. “8885” 返地卫星搭载对水稻种子遗传性的影响 [J]. 科学通报, 1991, 36(23): 1820 - 1824.
- [17] 徐云远, 牛炳韬, 贾敬芬. 卫星搭载亚麻后代中 PEG 和 NaCl 抗性系的初步筛选 [J]. 西北植物学报, 2000, 20(2): 159 - 163.
- [18] 徐云远, 王鸣刚, 贾敬芬. 红豆草耐盐愈伤组织的筛选及植株再生 [J]. 西北植物学报, 2000, 20(1): 15 - 21.

## Tissue Culture of *Daucas carta L.* Treated by Space Flight

CAO Hua<sup>1</sup>, YANG Jun<sup>1,2</sup>

(1. College of Life Sciences, China West Normal University, Nanchong 637002, P. R. China;

2. Institute of Rare Animals and Plants, China West Normal University, Nanchong 637002, P. R. China)

**Abstract:** The seeds of *Daucas carta L.* were treated by space flight, and young tender leaves of the germinated plants were used as explants for callus induction, testing the effects of different exogenous hormones on the tissue culture. The results indicated that callus were efficiently induced on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  2,4 - dichlorophenoxyacetic acid (2,4 - D) and  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  6 - benzylaminopurine (6 - BA). A high frequency of regenerated shoots was obtained on MS medium with  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  Thidiazuron (TDZ) but vitrified gradually after 20 days of culture. After 20 days regenerated shoots were transferred to rooting medium with or without different various cytokinin. All of them regenerated roots and could be transplanted. The experiment could be used for the selection of stress tolerant flax lines on *Daucas carta L.*, and also lay a foundation for the future.

**Key words:** space flight; *Daucas carota L.*; tissue culture; cytokinin; auxin