

影响普那菊苣高效再生相关因素的研究

张丽君^{1,2}, 程林梅², 李贵全¹, 孙毅²

(1.山西农业大学, 山西 太谷 030801; 2.山西省农业生物技术研究中心, 山西 太原 030031)

摘要: 以普那菊苣叶片为外植体, 通过培养基优化、抗生素敏感性试验等对其再生体系进行了研究。结果表明, MS+6-BA1.5 mg/L+IBA0.2mg/L+AgNO₃0.5mg/L+Vc 0.3mg/L 为诱导愈伤形成和芽再生的最佳培养基, 诱导率为 100%; MS+NAA1.5mg/L 为最适生根培养基, 生根率为 98%。卡那霉素和头孢霉素添加实验表明, 26mg/L 卡那霉素是普那菊苣苗能够存活的上限; 500~750mg/L 头孢霉素是抑制农杆菌过度生长的最适浓度范围。研究初步建立了普那菊苣的高效再生体系, 为进一步对其进行遗传转化研究奠定了基础。

关键词: 普那菊苣; 叶片; 组织培养; 植株再生

中图分类号: Q945 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-2481(2008)02-0069-04

Study on Factors of Affecting High Efficiency Regeneration of *Cichorium intybus*

ZHANG Li-jun^{1,2}, CHENG Lin-mei², LI Gui-quan¹, SUN Yi²

(1. Shanxi Agricultural University, Taigu Shanxi, 030801, China;

2. Agri-Biotechnology Research Center of Shanxi Province, Taiyuan Shanxi, 030031, China)

Abstract: The regeneration system of *Cichorium intybus* L. cv. Puna, using its leaves as explants, was studied by optimizing phytohormone combinations and antibiotics concentrations in the media. The results of medium selection suggested that the medium for callus induction and shoot regeneration was MS+6-BA1.5mg/L+IBA 0.2mg/L+AgNO₃0.5mg/L+Vc0.3mg/L and the regeneration frequency was up to 100%. The optimum medium for rooting was MS + NAA 1.5 mg/L, and the rooting frequency was 98%. The results of antibiotic experiment showed that Kanamycin concentration up to 26 mg/L was the maximum amount for the survival of chicory plantlets; the growth of *Agrobacterium strain* can be inhibited completely when Cefazolin sodium concentration was between 500 ~ 750mg/L. In this study the effective regeneration system of *Cichorium intybus* was established which laid a solid foundation for further study of genetic transformation of *Cichorium intybus*.

Key words: *Cichorium intybus*; Leaf; Tissue culture; Plant regeneration

普那菊苣(*Cichorium intybus* L.cv.Puna)为菊科菊苣属多年生草本植物。它既是高产优质的牧草^[1], 又是新兴的高档特色蔬菜, 并且菊苣还有菊糖、马栗树皮素、马栗树皮甙、野葛甙、山葛甙素和山葛甙苦素等特殊成分, 可药用, 具有防治黄疸性肝炎、心血管疾病和骨质疏松症等功效^[2,3]。菊苣喜暖湿润性气候, 日均气温 15~30℃ 生长尤其迅速, 耐寒性能良好, 根系可耐 -20~-15℃ 低温, 在 -8℃ 时叶片仍呈深绿色。夏秋高温季节, 只要水肥供应充足, 仍具有较强的再生能力。菊苣对生长的土壤没有十分严格的要求, 但以肥沃的沙质土壤种植生长最为良好。菊苣在南方一年收割 6~8 次, 在北方也能收割 3~4 次, 其生物学产量比被称为牧草之王的苜蓿高

20%~30%。但在我国, 菊苣栽培大部分都集中在南方地区, 主要是由于其生长期对水肥条件要求较高, 需要有充足的水分和肥料供应, 但生长期忌田间积水, 因此低洼地、水稻田一般不宜种植。菊苣叶片中含有咖啡酸等生物碱, 因此表现出独特的抗病虫性强的特性, 在整个生育期极少发生病虫害。菊苣较耐盐碱, 据测定在 pH 值为 8.2, 含盐量 0.17% 的土壤生长良好^[4]。如果能通过基因工程手段, 提高菊苣的耐旱和耐瘠性, 将有可能扩大其在北方的种植, 充分发挥其生物学优势, 目前国内外普那菊苣相关研究多集中在高产栽培方面, 而有关普那菊苣组织培养和基因转化方面的研究报道较少^[5-9]。本研究旨在建立高效的再生体系, 为菊苣快速扩繁和利用生物技术

* 收稿日期: 2007-12-02

项目来源: 山西省自然科学基金(20060110992)和农科院高新课题(YGX0507)

作者简介: 张丽君(1981-), 女, 河北邢台人, 在读硕士, 主要从事农业生物技术研究。

通讯作者: 孙毅, sunyi692003@yahoo.com.cn

对其进行遗传改良奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 植物材料 本研究以普那菊苣叶片作为建立转化体系的试验材料。

1.1.2 所用培养基编号及配方 基本培养基为 MS 培养基, pH 5.8。愈伤组织和芽诱导筛选培养基: MS + 3% 蔗糖 + 0.6% 琼脂^[7], 附加不同的激素(表 1)。根诱导筛选培养基: MS(或 1/2MS)+3%蔗糖 +0.6%琼脂^[7], 附加不同的激素(表 2)。外植体培养在 25~28℃条件下, 光照强度为 1300~1500Lux, 光照时间为 12h/d。

预培养与共培养基^[7]: MS+6-BA1.5mg/L+IBA0.2mg/L

1.2 愈伤组织诱导和芽分化^[7]

将取自大田的叶片用 75% 酒精处理 1~2min, 0.1% 的升汞处理 10~14min, 无菌水冲洗 3~6 次, 然后切成 0.5cm×0.5cm 的小块, 接种于愈伤组织诱导培养基上。

1.3 根的诱导和植株再生

根据愈伤组织分化的情况, 从设置的 12 种诱导培养基中筛选出一种分化效果最好的培养基。然后用该培养基进行芽分化诱导培养, 待芽长 2~3cm 时, 从其基部切下, 插入到生根培养基中, 进行根的诱导, 以形成再生植株。

1.4 成苗的移栽

再生苗长到一定高度, 去掉三角瓶的封口膜, 在培养室进行一周时间的炼苗, 然后, 将苗移栽到温室花盆中。

2 结果与分析

2.1 最佳再生培养基的筛选

2.1.1 愈伤组织和芽的分化 外植体接种到诱导培养基上 3d 后, 叶片四周开始膨胀, 5d 后, 整个小块开始弯曲, 并进一步膨胀变大, 10d 后, 膨大的愈伤组织在相同的培养基上发生丛生芽的分化, 20d 后, 芽生成。在本实验中, A9、A10、A11 和 A12 培养基诱导的出愈率都达到了 100%, 芽的诱导分化率也明显高于 A1、A2、A3 和 A4 培养基的诱导效果(表 3)。因此,

表 1 愈伤组织和芽诱导培养基

| 培养基编号 | 培养基成分 |
|-------|--|
| A1 | MS + 6-BA 2.0 mg/L + IBA 0.1 mg/L |
| A2 | MS + 6-BA 2.0 mg/L + IBA 0.2 mg/L |
| A3 | MS + 6-BA 1.5 mg/L + IBA 0.1 mg/L |
| A4 | MS + 6-BA 1.5 mg/L + IBA 0.2 mg/L |
| A5 | MS + 6-BA 2.0 mg/L + IBA 0.1 mg/L + AgNO ₃ 0.5 mg/L |
| A6 | MS + 6-BA 2.0 mg/L + IBA 0.2 mg/L + AgNO ₃ 0.5 mg/L |
| A7 | MS + 6-BA 1.5 mg/L + IBA 0.1 mg/L + AgNO ₃ 0.5 mg/L |
| A8 | MS + 6-BA 1.5 mg/L + IBA 0.2 mg/L + AgNO ₃ 0.5 mg/L |
| A9 | MS + 6-BA 2.0 mg/L + IBA 0.1 mg/L + AgNO ₃ 0.5 mg/L + Vc 0.3 mg/L |
| A10 | MS + 6-BA 2.0 mg/L + IBA 0.2 mg/L + AgNO ₃ 0.5 mg/L + Vc 0.3 mg/L |
| A11 | MS + 6-BA 1.5 mg/L + IBA 0.1 mg/L + AgNO ₃ 0.5 mg/L + Vc 0.3 mg/L |
| A12 | MS + 6-BA 1.5 mg/L + IBA 0.2 mg/L + AgNO ₃ 0.5 mg/L + Vc 0.3 mg/L |

表 2 根诱导培养基

| 培养基编号 | 培养基成分 |
|-------|----------------------|
| B1 | 1/2MS |
| B2 | 1/2MS + NAA 1.0 mg/L |
| B3 | 1/2MS + NAA 1.5 mg/L |
| B4 | 1/2MS + NAA 2.0 mg/L |
| B5 | MS |
| B6 | MS + NAA 1.0 mg/L |
| B7 | MS + NAA 1.5 mg/L |
| B8 | MS + NAA 2.0 mg/L |

表3 不同激素浓度对比对愈伤诱导和芽分化的影响

| 培养基 | 接种数 | 愈伤组织数 | 出愈率(%) | 分化芽数 | 再生速度和生长状况 |
|-----|-----|-------|--------|------|-----------|
| A1 | 100 | 38 | 38 | 299 | + |
| A2 | 100 | 42 | 42 | 307 | + |
| A3 | 100 | 29 | 29 | 289 | + |
| A4 | 100 | 33 | 33 | 310 | + |
| A5 | 100 | 82 | 82 | 462 | ++ |
| A6 | 100 | 83 | 83 | 482 | +++ |
| A7 | 100 | 86 | 86 | 499 | ++++ |
| A8 | 100 | 88 | 88 | 520 | ++++ |
| A9 | 100 | 100 | 100 | 573 | +++ |
| A10 | 100 | 100 | 100 | 589 | +++ |
| A11 | 100 | 100 | 100 | 601 | ++++ |
| A12 | 100 | 100 | 100 | 604 | +++++ |

6-BA+IBA+AgNO₃+Vc 是普那菊苣理想的愈伤组织诱导和芽分化诱导激素组合。从后续对根的诱导情况来看, A12 培养基较适合愈伤组织的诱导和丛生芽的生成, 并且在愈伤诱导速度上要快于其它筛选培养基, 单个外植体丛生芽的分化个数也要多于其它筛选培养基。所以本研究后期愈伤分化均用 A12 诱导培养基。

2.1.2 根的诱导 在根的诱导过程中, B7 培养基要明显优于其它筛选培养基。刘用生和李友勇^[10]报道, 活性炭对根诱导的促进作用: 主要是由于活性炭加到根诱导培养中, 可以模拟土壤的黑暗环境, 而且活性炭可以吸附由于植物代谢而产生的一些有害物质, 如酚类物质引起的副作用组织褐化死亡。本研究选用 B7 培养基 MS+NAA1.5mg/L 在其中加入活性炭, 并有没有添加活性炭的培养基对比实验, 发现活性炭对普那菊苣幼根的诱导没有明显的促进作用^[10]。从各种生根培养基的生根效果看, B7 培养基的生根效果最好。将在 A12 培养基上诱导的芽插入 B7 培养基中 3d 后就产生根, 且都是直根, 根系又粗又壮, 刚开始时根大约长 0.5cm 左右, 根粗 0.1cm 左右, 20d 以后主根大约长 15cm 左右, 根粗 0.3cm 左右。

2.2 敏感性试验^[11]

2.2.1 卡那霉素对普那菊苣苗的影响 将普那菊苣无菌苗移插在含不同浓度卡那霉素的 MS 培养基上进行普那菊苣苗的卡那霉素敏感性试验研究。六个卡那霉素浓度处理设置分别为 0, 10, 20, 30, 40, 50 mg/L。移插 3 周后调查在各培养基上, 普那菊苣苗生长及存活情况。结果显示, 含 0 和 10mg/L 卡那霉素的培养基对普那菊苣苗生长无明显影响, 且移插苗全部成活; 含 20mg/L 卡那霉素的培养基上, 苗的存活率仅为 28%, 且存活幼苗的生长已受到明显抑制, 植株变得矮小瘦弱。在卡那霉素含量大于 30mg/L 的

培养基, 幼苗仅能存活数日, 且生长微弱, 其后全部死亡。为了更准确研究卡那霉素浓度在 20 ~ 30mg/L 间对普那菊苣苗生长的影响, 又进一步对卡那霉素浓度设置了 20, 22, 24, 26, 28, 29mg/L 六个处理, 与上述苗培养和调查方法相同, 结果发现, 卡那霉素浓度 26mg/L, 是普那菊苣苗能够承受的卡那霉素上限。此结果可为做遗传转化研究时, 用标记基因对转化苗进行筛选提供卡那霉素浓度值的依据。

2.3.2 头孢霉素对农杆菌影响 不同植物品种, 甚至同一植物的不同品种对抗生素耐受力不同^[12,13], 必须通过实验找到适当的抗生素添加浓度。

外植体与农杆菌共培养后, 需要加入适当的抗生素抑制农杆菌的过度生长而引起的组织污染、死亡, 直至影响转化效率。本实验就头孢霉素的抑菌效果进行筛选, 抑菌效果以用农杆菌液浸泡苗在培养基上培养时, 苗自身或其茎附近培养上有没有农杆菌生长为依据。由表 4 可知, 随着头孢霉素的浓度增大, 抑制菌的效果愈加明显, 浓度为 750mg/L 时已无农杆菌生长, 而在头孢霉素浓度为 500mg/L 时, 其抑菌效果已达 90%。本着头孢霉素抑制农杆菌过度生长的原则, 在选择头孢霉素作为农杆菌抑制剂时, 适宜浓度介于 500 ~ 750mg/L 之间。

3 讨论

建立良好的外植体再生系统是菊苣基因转化的

表4 农杆菌对头孢霉素的敏感性

| 头孢霉素浓度 (mg/L) | 抑制菌效率 (%) |
|---------------|-----------|
| 250 | 50 |
| 500 | 90 |
| 750 | 100 |
| 1000 | 100 |
| 1250 | 100 |

关键环节,直接决定了转化的难易和转化后再生频率的高低。在目前已建立的以菊苣花瓣、叶片、叶柄、茎段等为外植体的再生体系中,由于品种的不同,其再生能力存在一定的差异^[6-9]。同时,这些再生体系大多是针对菊苣植株繁殖的需要而建立的快繁体系,并不适用于转基因研究所需要的高效的再生体系。

程林梅等^[7]在 MS+6-BA1.5mg/L+IBA0.2mg/L 培养基上培养菊苣,获得了 30%左右的再生率,但此培养基容易产生玻璃化苗和褐化苗;据 de Block 等^[14]和钟蓉等^[15]报道,加入少量 AgNO₃,及提高培养基中琼脂粉含量可以减少玻璃化苗的产生;对于组织培养过程外植体褐化问题,杜建中等^[16]报道,加入适量 Vc 可以降低褐化苗的出现。

本研究在上述研究结论的基础上,对诱导培养基、生根培养基的配方做了适当改进,如在各种培养基中加入适量的 Vc、AgNO₃ 等,并对各种激素添加成分和含量进行了对比试验研究。结果发现,MS+6-BA1.5mg/L+IBA0.2mg/L+AgNO₃0.5mg/L+Vc0.3mg/L 培养基最适合菊苣愈伤组织的形成,可有效防止外植体褐化及再生苗的玻璃化现象,而且出愈率、愈伤芽分化率均达 100%;而是不定芽形成再生苗在附加不同浓度 NAA 的 MS 或 1/2MS 培养基上 3~10d 后产生不定根,根系形态及生长正常。我们的研究还发现,菊苣生根比较困难,而且培养基种类对再生苗生根有一定影响,低盐浓度 1/2MS 培养基不利于根的形成,盐浓度较高的 MS 培养基比较适合菊苣再生苗的生根培养。在无 NAA 的 MS 或 1/2MS 培养基上,根诱导率几乎为零,低浓度的 NAA 对菊苣再生苗生根有明显的促进作用,其中 MS+ NAA1.5mg/L 培养基最适合生根,生根率达 98%。

由抗生素对普那菊苣的敏感性试验得知卡那霉素对普那菊苣苗的生长有一定的抑制作用^[11]。本研究中当卡那霉素浓度过高(>26mg/L)时就会导致普那菊苣苗的死亡。此结果可作为进一步转化研究中抗卡那霉素苗筛选时的卡那霉素浓度值。头孢霉素可以抑制农杆菌的生长,当头孢霉素过高(>750mg/L)时虽然能够完全抑制农杆菌的生长,但会

影响无菌苗的生根,头孢霉素过低(<500mg/L)时不能有效抑制农杆菌的生长,会使农杆菌过度繁殖,污染培养基和再生苗,直至导致幼苗死亡。本研究通过对不同培养基以及卡那霉素和头孢霉素浓度的筛选,建立了一个适用于菊苣外植体再生培养的高效再生体系,为进一步对菊苣的转化奠定了良好的基础。

参考文献:

- [1] 高洪文. 高产优质饲用植物——菊苣[J]. 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[J]. 长江蔬菜, 2000, 5: 25-26.
- [3] Bais HP, Ravishankar GA. *Cichorium intybus* L cultivation, processing, utility, value addition and biotechnology: with an emphasis on current and future prospects [J]. Science of Food and Agriculture, 2001, 81(5): 467-484.
- [4] 夏道伦. 高产优质饲用菊苣的栽培技术[J]. 农村养殖技术, 2006, 5: 27.
- [5] Varotto S, Lucchin M, Parrini P. Immature embryos culture in Italian red chicory[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2000, 62(1): 75-79.
- [6] 王绍明, 张霞, 刘彤. 菊苣花瓣的组织培养[J]. 植物生理学通讯, 2001, 37(3): 230.
- [7] 程林梅, 高洪文, 赵茂林. 菊苣组织培养与植株再生的研究[J]. 草业学报, 2002, 11(4): 105-107.
- [8] 韩晓玲, 王玉华. 菊苣高效不定芽直接发生及其植株再生 [J]. 核农学报, 2006, 20(6): 482-485.
- [9] 宋书锋, 曹凤. 普那菊苣高效再生体系建立和遗传转化研究[J]. 分子植物育种, 2006, 4(4): 565-570.
- [10] 刘用生, 李友勇. 植物组织培养中活性炭的使用 [J]. 植物生理学通讯, 1994, 30(3): 214-217.
- [11] 徐美隆, 张怀渝, 唐宗祥. 丽格海棠高效再生体系的建立及对抗生物敏感性研究[J]. 北方园艺, 2007, 7: 175-178
- [12] Mstias RJ, Boyol LA. Cefotaxime stimulates callus growth, embryogenesis and regeneration in hexaploid bread wheat [J]. Plant Science, 1986, 46: 217-223.
- [13] Okkel FT, Pederson MG. The toxicity to plant tissue and to *Agrobacterium tumefaciens* of some antibiotics [J]. Acta Horticulturae, 1988, 225: 199-207.
- [14] de Block, Brouwer D, Tenning P. Transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea* using *Agrobacterium tumefaciens* and the expression of the *bar* and *neo* genes in the transgenic plants [J]. Plant Physiology., 1989, 91(2): 694-701.
- [15] 钟蓉, 刘玉乐, 朱峰, 等. TA29-Barnase 基因导致油菜雄性不育的研究 [J]. 植物学报, 1996, 38(7): 582-585.
- [16] 杜建中. 影响芸苔属植物(*Brassica*)组织培养过程中外植体褐化的因素[J]. 山西农业科学, 2004, 32(1): 29-32.