

油葵叶片离体再生体系的建立

胡文冉¹, 黄乐平², 孟庆玉², 危晓薇², 葛峰², 李建平², 黄全生²

(1. 新疆农业大学农学院, 新疆乌鲁木齐 830052; 2. 新疆农科院核生所, 新疆乌鲁木齐 830000)

摘 要:以油葵自交种 7B7 的无菌苗子叶为诱导不定芽材料, MS 培养基为基本培养基, 研究油葵子叶组织培养有关影响因素。比较了不同培养基成分、不同碳源、不同附加物对不定芽分化的影响, 确定出油葵自交种子叶离体诱导再生芽的最佳培养基: 改良 MS(MS 大量、微量、铁盐、B₅ 有机) + 0.5% KNO₃ + 0.05% CH + 0.01% 肌醇 + 3% 葡萄糖 + 4 mg/L 6-BAP + 6~9 mg/L AgNO₃ + 2.6 g/L Phytigel, 建立了油葵相对高效的再生体系。为油葵基因转化的研究奠定了基础。

关键词:油葵; 子叶; 组织培养; 再生体系

中图分类号: S565.503.53

文献标识码: A

文章编号: 1001-4330(2006)01-0082-04

A Regeneration System from Cotyledon of Sunflower (*Helianthus annuus* L.)

HU Wen-ran¹, HUANG Le-ping², MENG Qing-yu², WEI Xiao-wei²,

GE Feng², LI Jian-ping², HUANG Quan-sheng²

(1. College of Agronomy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China; 2. Institute of Nuclear and Biological Technology, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830000, China)

Abstract: The related factors of tissue culture were studied by using cotyledon of 7B7, self-hybridized *Helianthus annuus* L. as inducible material and MS (Murashige and Skoog) as basic medium. The influence of regeneration of different composition of medium, source of carbon, additional substances on adventitious bud differentiation was compared, the best cultured medium was obtained: MS + 0.5% KNO₃ + 0.05% Casein Hydrolysate + 0.01% myo-inositol + 30% glucose + 4 mg/L 6-BAP + 6~9 mg/L AgNO₃ + 2.6 g/L Phytigel were reformed. The efficient regeneration system was established and the foundation of genetic transformation was laid.

Key words: *Helianthus annuus* L.; cotyledon; tissue culture; regeneration system

油葵是油用向日葵 (*Helianthus annuus* L.) 的简称, 是世界第二大油料作物, 也是我国北方重要的油料作物, 已经成为人们重要的食用植物油。油葵是新疆重要的经济作物^[1]。向日葵离体再生培养在 20 世纪的 80~90 年代取得了较快的进展。有人对贝母与棉花做过植株再生研究^[2~3], 利用向日葵的子叶、下胚轴、茎尖和未成熟胚等诱导再生植株也有较多的成功报道。但向日葵是难再生植物^[4], 加上其基因型的差异使得向日葵组织培养植株再生研究仅在有限的基因型上获得成功^[5]。以新疆的自交品种为材料进行研究的报道就更少。实验是以新疆当前主栽的油葵品种子叶为材料, 建立起一套相对高效的植株再生体系, 为油葵基因转化的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

自交系 7B7 由新疆农科院经作所提供。

1.2 方法

1.2.1 外植体的获得

将剥去种壳的油葵种子用 70% 酒精浸 30 s, 0.1% HgCl₂ 消毒 5 min。用无菌水冲洗 3~4 次, 然后浸泡于无菌水中。6 h 后去掉种膜, 将 2 片子叶分开, 把单片子叶各横切成靠近胚的中下部和顶部 2 个部分, 只取靠近胚的中下部作为外植体。将外植体表面朝下平放接种于芽诱导培养基上。

1.2.2 不定芽的诱导 (图 1, 图 2)

为寻求芽诱导的最佳培养基, 以 MS(MS 大量、微量、铁盐、有机) MS + 0.5% KNO₃ + 0.05% CH + 0.01%

收稿日期: 2005-09-09; 修回日期: 2005-11-07

作者简介: 胡文冉 (1974-), 女, 河南人, 在读研究生, 从事植物生物技术研究, (E-mail) huwra@sina.com, (Tel) 13579820755, 通讯作者: 黄全生 (1964-), 男, 新疆人, 研究员, 主要从事植物生物技术研究, (E-mail) hquansheng@126.com, (Tel) 0991-4527003。

基金项目: 新疆农作物细胞工程重点实验室开放课题

肌醇+3%蔗糖+3 mg/L 6-BAP+6 g/L 琼脂为基础^[6](CK),将外植体分别接种在以下7种不同的处理的培养基上:

(1)MS(MS大量、微量、铁盐、有机)+0.05%CH+0.01%肌醇+3%蔗糖+3 mg/L 6-BAP+6 g/L 琼脂;

(2)MS(MS大量、微量、铁盐、有机)+0.5%KNO₃+0.01%肌醇+3%蔗糖+3 mg/L 6-BAP+6 g/L 琼脂;

(3)MS(MS大量、微量、铁盐、有机)+0.01%肌醇+3%蔗糖+3 mg/L 6-BAP+6 g/L 琼脂;

(4)MS(MS大量、微量、铁盐、有机)+0.5%KNO₃+0.05%CH+0.01%肌醇+1%蔗糖+3 mg/L 6-BAP+6 g/L 琼脂;

(5)MS(MS大量、微量、铁盐、有机)+0.5%KNO₃+0.05%CH+0.01%肌醇+2%蔗糖+3 mg/L 6-BAP+6 g/L 琼脂;

(6)改良MS(MS大量、微量、铁盐、B₅有机)+0.5%KNO₃+0.05%CH+0.01%肌醇+3%蔗糖+3 mg/L 6-BAP+6 g/L 琼脂;

(7)改良MS(MS大量、微量、铁盐、B₅有机)+0.5%KNO₃+0.05%CH+0.01%肌醇+3%葡萄糖+3 mg/L 6-BAP+6 g/L 琼脂。

从以上7种培养基中筛选出最佳培养基后,再分别比较激素6-BAP 1~6 mg/L、6 g/L 琼脂粉和2.6 g/L Phytigel 两种不同固化剂及AgNO₃ 1~15 mg/L(梯度为1)对不定芽分化的影响。实验中所利用的培养基pH值均为5.8。以玻璃锥形瓶为培养容器,以较透气的双层塑料膜封口,然后121℃高压灭菌20 min。培养温度为28℃,光照度2000 lx,光照时间16 h/d。在每种诱导培养基上设置3个重复,每个重复分别接种30个子叶外植体。

1.2.3 不定芽的伸长和生根

外植体接种约3周后,将在诱导培养基上分化出不定芽的外植体切成小块,3 cm以下的不定芽转至伸长培养基上[改良MS(MS大量、微量、铁盐、B₅有机)+0.01%肌醇+3%蔗糖+0.4mg/L6-BAP+0.5mg/LIAA+6g/L琼脂],3cm以上的不定芽转至生根培养基[MS(MS大量、微量、铁盐、有机)+0.01%肌醇+3%蔗糖+NAA 0.2 mg/L+6 g/L 琼脂或1/2MS]上。图3,图4



图1 不定芽的诱导

Fig.1 Induction of adventitious bud



图2 不定芽

Fig.2 Adventitious bud



图3 再生植株生根

Fig.3 Rooting of regeneration plants

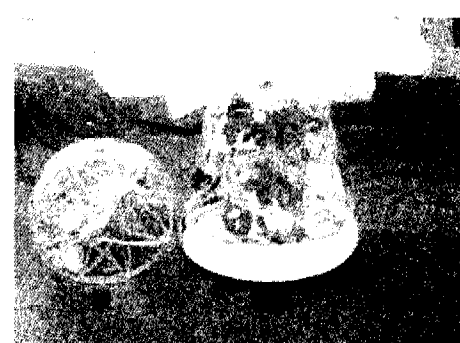


图4 再生植株及根

Fig.4 Regeneration plants and their roots

1.2.4 组培苗的移栽

经生根培养 3 周左右,根长 0.5 cm 时移栽成活率最高。根太短时吸收能力差,而根太长时不容易从培养基中取出,也不易洗净根部的培养基,在移栽过程中根的损伤大,因此,根过长或过短都不利于移栽成活。在移栽前将培养基封口膜揭开,放入清水浸泡 3~5 d,然后将试管苗小心从培养基中取出,洗净其根部的培养基,移栽到蛭石和土壤(1:1)的混合苗床上,浇足定根水,用喷雾法浇水 1 次/d,大棚温度控制在 25℃ 左右,两周后长出新根,植株开始正常生长。20~25 d 后移栽入土壤。

2 结果与分析

2.1 不定芽发生

外植体接种 4 d 左右时,子叶块的颜色由乳白色转为深绿色,并生长膨大,6 d 后膨大数倍,卷曲,在近胚轴的叶柄处发出肉眼可见的突起,这种突起排列没有规律性。10~14 d 此处的突起相继增多,原有的突起进一步发育,从而呈现出不同的形态而相互紧挨着成簇存在。15 d 后外植体上的成簇突起发育成一簇叶丛,出现肉眼可见的芽丛。图 1,2

2.2 影响因素

2.2.1 不同附加物及激素对不定芽分化的影响

实验表明,几种处理在前期的芽诱导中表现并不十分明显,但直接影响着不定芽的分化频率。不加 0.5% KNO₃、0.05% CH 中的一个及两者均不加直接影响着芽分化的频率。不加 0.05% CH 的培养基中芽分化的频率为 67%,虽然个别丛芽的长势好于加 0.05% CH,但其整体长势不整齐且丛芽色泽为黄绿色。而在 0.5% KNO₃ 及 0.05% CH 都不加的培养基中芽分化频率则为最低(47%),由此可见 CH(水解酪蛋白)在油葵的不定芽分化中有一定的促进作用。另外发现随着蔗糖浓度的下降,丛芽的长势和分化频率均明显下降,且利用葡萄糖做碳源的培养基上外植体的长势比同浓度的蔗糖做碳源的培养基上的长势好,MS 有机成分改为 B₅ 培养基有机成分上的丛生芽长势较为整齐。利用 Phytigel 做固化剂的培养基上的丛生芽也明显高于利用琼脂的培养基。比较不同的 6-BAP 可以发现 6-BAP 浓度低,不定芽分化率低;但浓度过高丛生芽密集,可有效伸长的芽反而下降,玻璃化程度加重,不能得到较高质量和数量的不定芽。基于以上从而确定培养基:改良 MS(MS 大量、微量、铁盐、B₅ 有机) + 0.5% KNO₃ + 0.05% 水解酪蛋白 + 0.01% 肌醇 + 3% 蔗糖 + 4 mg/L 6-BAP + 6~9 mg/L AgNO₃ + 2.6 g/L Phytigel 为芽分化的最佳培养基。表 1

表 1 不定芽诱导培养基对不定芽诱导的影响

Table 1 Effect of inducible medium of adventitious bud on induction of adventitious bud

培养基名称 Name	接种外植体数 Number of explant	外植体长势 Growing state of explant	分化率(%) Differentiation
1	90	膨大,卷曲,稍发黄 Expansion, curl, light yellow	47.3
2	90	膨大,卷曲,浅黄绿色 Expansion, curl, light kelly	67
3	90	膨大,卷曲,黄绿色 Expansion, curl, kelly	47
4	90	膨大,卷曲,发黄,长势很差 Expansion, curl, yellow, poor growing state	50.2
5	90	膨大,卷曲,浅黄绿色,整体长势慢 Expansion, curl, light kelly, slow growing state	59.5
6	90	膨大,卷曲,绿色,丛芽整齐 Expansion, curl, green, neat dense buds	80
7	90	膨大,卷曲,绿色,丛芽整齐 Expansion, curl, green, neat dense buds	85
B(CK)	90	膨大,卷曲,稍发黄 Expansion, curl, light yellow	70.3

2.2.2 AgNO₃ 对不定芽分化的影响

据报道在用外植体诱导不定芽的培养中添加适量的 AgNO₃ 可显著提高一些物种的植株再生频率。原因是植物细胞在离体培养过程中会产生乙烯,尤其是在密闭的容器中,乙烯的过度积累会直接影响到

外植体的生长和芽的分化,而 AgNO_3 是乙烯合成的抑制剂^[7]。实验也表明:在油菜离体培养中加入 6~9 mg/L 的 AgNO_3 能提高油菜子叶不定芽的分化频率。过高的 AgNO_3 浓度(12 mg/L 以上时)反而抑制不定芽分化,且畸形芽频率增加。

3 讨论

3.1 通过研究子叶离体组织培养的影响因子,发现了芽分化的出芽部位多集中在外植体临近下胚轴一端切口边缘与维管束的交接处,另一端很少有芽生成,说明了其存在极性现象。同时不定芽的发生还与所处理的油菜种子的生理状态有关,所以选取外植体时要选择正处于生理活性最佳状态的子叶,并注意切取的部位,离下胚轴近的一端既不能留的太多,以免发出实生苗而影响丛芽的生长,但又不能切去的太多,以免切去其出芽部位(这一点在其他植物上也得到相似的结论^[7])。接种外植体时应使其远轴面(正面)朝下放置于培养基上,反之,远轴面(反面)朝上时虽然也能诱导出丛生芽,但刚发出的丛生芽嵌入培养基因其茎的扭曲而成畸形芽。研究中还发现在子叶接种后黑暗中培养 1 d 再转至光下培养可明显改善丛生芽的长势。这与他人在甜瓜子叶的离体培养中的观察相符^[8-9]。在油菜子叶直接再生不定芽的过程中,外植体上一开始出现很多的不定叶和不定叶原基,并不意味着后期就能产生很多的不定芽,不定芽原基一般在形态较正常的不定叶的近轴面的基部。所以可通过调整子叶外植体与培养基的接触适时切分叶丛和不定芽等措施可增加不定芽的再生数。

3.2 实验中还发现诱导出的丛生芽应在培养后的一个月及时切割,否则丛生芽因培养时间过长而死亡。同时应及时将芽转入生根培养基,否则芽转入生殖生长而难以生根。当然,试验中还存在许多问题需要摸索,尚需继续努力来提高芽的分化率。

参考文献:

- [1] 贺宾,高燕,向理军,等.油菜茎尖周围分生区培养及高频率芽再生[J].新疆农业科学,2004,41(2):86-88.
- [2] 高燕,贺宾,范弢,等.贝母愈伤组织的诱导及植株再生[J].新疆农业科学,2005,42(1):35-37.
- [3] 黄金生,危晓薇,孟庆玉,等.早熟陆地棉体细胞培养胚胎发生和植株再生的研究[J].新疆农业科学,2005,42(4):269-271.
- [4] 马雪霞,蓝海燕,宋荣.向日葵(*Helianthus annuus*)的组织培养及芽分化研究[J].新疆农业科学,2002,39(1):23-24.
- [5] 刘公社.向日葵悬浮培养再生芽[J].植物学报,1989,31(9):668-672.
- [6] N. Dhaka S. L. Kothari Phenylacetic acid improves bud elongation and in vitro plant regeneration efficiency in *Helianthus annuus* L [J]. Plant Cell Rep 2002, (21):29-34.
- [7] 王洋,崔继哲,李翠玲.大白菜高频再生体系的建立及策略[J].园艺学报,2005,32(4):701-703.
- [8] 蔡润,黄伟华,潘俊松,等.甜瓜子叶离体培养直接再生不定芽的形态学和解剖学观察[J].武汉植物学研究,2002,20(5):338-342.
- [9] 钟俐,钟伶.新疆优质甜瓜高效离体再生体系的建立[J].新疆农业大学学报,2002,25(1):31-34.

本刊被《中国学术期刊文摘》收录

《中国学术期刊文摘》创刊于 1994 年,是我国惟一的综合性科技检索期刊。该刊精心选择了我国最重要的和最有影响的 300 多种学术期刊作为来源期刊,学科覆盖理、工、农、医和社会科学。主要刊登国家自然科学基金、国家省(部)级基金支持课题论文和综述,有摘要和题录两种形式,年登载论文量约 30000 篇。刊出时间一般在原始论文发表半年之内。每期附有关键词和作者检索。该刊为月刊,页码 400 页。