

·组织培养简讯·

海滨锦葵胚轴愈伤组织诱导及植株再生

郑熙^{1,2}, 王学英¹, 单莹^{1,2}, 金华², 阮成江^{2*}¹ 沈阳农业大学生物科学技术学院, 沈阳 110161; ² 大连民族学院生命科学院, 大连 116600

摘要 以海滨锦葵(*Kosteletzkya virginica*)胚轴为外植体, 在9种不同激素配比的培养基上进行愈伤组织诱导、继代培养、不定芽分化及生根培养, 确定了植株再生的最适培养条件: (1)愈伤组织诱导最适培养基为MS + IAA 1.0 mg·L⁻¹ + KT 0.3 mg·L⁻¹ + sucrose 30 g·L⁻¹ + agar 8 g·L⁻¹, 愈伤组织诱导率为93.94%; (2)不定芽诱导最适培养基为MS + IAA 0.1 mg·L⁻¹ + ZT 0.5 mg·L⁻¹ + sucrose 30 g·L⁻¹ + agar 8 g·L⁻¹, 不定芽诱导率为65.83%; (3)生根最适培养基为MS + sucrose 30 g·L⁻¹ + agar 8 g·L⁻¹, 生根率为96.67%。炼苗移栽后, 成活率可达85%。

关键词 胚轴, 海滨锦葵, 植株再生, 组织培养

郑熙, 王学英, 单莹, 金华, 阮成江 (2007). 海滨锦葵胚轴诱导愈伤组织及植株再生. 植物学通报 24, 194–199.

海滨锦葵(*Kosteletzkya virginica*)为锦葵科多年生草本植物, 作为发展盐土农业的盐生植物, 1992年从美国引入我国。多年滩涂实验结果表明, 海滨锦葵能适应我国江苏、山东、辽宁等省沿海滩涂生境, 是一种优良的耐盐油料植物(Ruan et al., 2004)。但是, 在我国滩涂种植的海滨锦葵自然生长群体内, 个体产量间存在显著差异, 品质优良不齐(Ruan et al., 2003), 急需改良。转基因植物育种是提高产量和改良品质的重要方法之一, 而建立高效的植株再生体系是转基因育种成功的前提条件(林荣双等, 2003)。Cook等(1989)以海滨锦葵的茎段和胚为外植体进行了愈伤组织诱导及植株再生实验, 以胚为外植体采用不同浓度的NAA与2-IP组合, 没有得到再生植株。本实验以海滨锦葵胚轴为外植体, 在不同培养基上进行愈伤组织、不定芽诱导以及植株再生培养, 以期获得高频再生体系, 为进一步利用转基因方法培育海滨锦葵优良新品系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

海滨锦葵(*Kosteletzkya virginica*)种子采收于大连民族

学院海滨锦葵试验地。该试验地为2005年春利用2004年秋采收于江苏盐城滩涂海滨锦葵试验地的种子种植后所建立。

1.2 方法

1.2.1 培养基

以MS(Murashige and Skoog, 1962), 1/2 MS和MSB(包括MS基本培养基的大量元素、微量元素和铁盐与B5基本培养基的有机成分)(Gamborg et al., 1968; 程林梅等, 2001; Jin et al., 2005)培养基为基本培养基, 以不同的激素浓度组合共设计了3种愈伤组织诱导培养基M1、M2和M3, 1种愈伤组织增殖继代培养基M4, 3种不定芽诱导培养基M5、M6和M7, 2种生根培养基M8和M9(表1)。实验开始前曾对培养基中添加的激素种类进行预试验, 结果发现IAA和KT以及IAA和ZT的激素组合对愈伤组织诱导有较好效果, 所以采用IAA和KT、IAA和ZT以及2, 4-D的激素组合做进一步筛选。所有培养基均每升添加30 g蔗糖、8 g琼脂, 在灭菌前将pH值调至5.8。激素类物质均为过滤灭菌, 在基本培养基高压灭菌后加入。

收稿日期: 2006-07-18; 接受日期: 2006-11-14

基金项目: 国家自然科学基金(No.30500071)、国家科技部中-比国际合作项目(No.200441505)和大连民族学院人才引进启动基金(No.20056104)

* 通讯作者。E-mail: ruan@dlnu.edu.cn

表1 培养基成分

Table 1 Composition of media

Medium	Composition of plant growth substances (mg·L ⁻¹)
M1	MS + 2,4 - D 0.5
M2	MS + IBA 1.0 + ZT 0.1
M3	MS + IAA 1.0 + KT 0.3
M4	1/2MS + IAA 0.3 + ZT 0.3
M5	MS + IAA 0.1 + ZT 0.3
M6	MS + IAA 0.1 + ZT 0.5
M7	1/2MS + IAA 0.1 + ZT 0.5
M8	MS ^a
M9	MSB ^b

^a 具体配方参见 Murashige and Skoog (1962)^b 包括 MS 基本培养基的大量元素、微量元素和铁盐以及 B5 基本培养基的有机成分, 具体配方参见 Murashige and Skoog (1962) 和 Gamborg (1968)^aDetailed directions in Murashige and Skoog (1962)^bIncluding in macro-elements, micro-elements and iron salt of MS basic media, and organic components of B5 basic media, detailed directions in Murashige and Skoog (1962) and Gamborg (1968)

1.2.2 胚轴的获得

将海滨锦葵种子置于超净工作台上, 用75%乙醇浸泡10分钟, 双蒸水冲洗3次, 浓硫酸浸泡1小时, 再用双蒸水冲洗5次以上, 完成表面消毒。将冲洗干净的种子置于灭菌滤纸上, 吸干水分。浓硫酸的腐蚀作用使种子的种皮变软, 并且易于剥落。由于海滨锦葵种子体积小, 因此胚轴的获得难度较大。用镊子和手术刀将种子的种皮剥落, 得到完整的胚。用手术刀切取胚轴部分(从2片子叶相连的基部切除子叶, 且切下后2片子叶不分离, 以确保切除生长点)。最后, 将胚轴部分放入75%乙醇中浸泡消毒10秒, 时间过长会导致外植体脱水死亡, 时间短又达不到表面灭菌效果, 因此严格控制灭菌时间是确保整个实验成功的关键。并且注意在种子去皮后应尽量保持表面湿润。最后接种到愈伤组织诱导培养基中进行培养。

1.2.3 愈伤组织诱导

采用M1、M2和M3三种培养基进行愈伤组织诱导, 每种处理接种外植体55个, 设3次重复。培养温度: (26±1)℃; 相对湿度: 70%–80%。接种后先完全暗培

养72小时, 再转入培养箱内, 光照14小时/天, 光强45 μmol·s⁻¹·m⁻²。在诱导初期的5–6天, 0.5%左右刚启动的愈伤组织会长出芽, 此时可通过芽的形态和产生时间确定其不是不定芽。首先, 这些芽与后期产生的不定芽在形态上有很大的区别, 此时的芽会直接产生细长弯曲的茎, 这与继代后诱导不定芽时所表现出的丛芽形态形成鲜明的对比。其次, 生长点只要经过不到10天的培养便可以产生芽, 而不定芽产生要经过愈伤组织的诱导培养、继代培养和不定芽诱导培养, 需要的时间约60天以上。因此, 在愈伤组织诱导率和植株再生率计算过程中均要将这一部分数据舍弃。培养20天后分别统计愈伤组织诱导率(产生愈伤组织的外植体数/接种外植体数×100%)和褐化率, 然后转入继代培养基M4中增殖愈伤组织。

1.2.4 不定芽诱导及植株再生

继代21天后, 愈伤组织生长达到直径1.0–1.5 cm时, 将愈伤组织取出, 切成0.5–1.0 cm³小块, 将其转入不定芽诱导培养基进行培养。采用M5、M6和M7三种处理, 每处理设3次重复。分别统计培养10、20和25天后不定芽的数量和诱导率(产生不定芽的愈伤组织数/接种愈伤组织数×100%)。不定芽长至2–3 cm时, 移至生根培养基M8和M9中。不定芽诱导及植株再生的培养条件与愈伤组织诱导条件一致。不定芽诱导以及生根培养时均采用透气封口膜封口, 以防止产生玻璃化苗(蔡能等, 2003)。

1.2.5 炼苗移栽

当幼根在生根培养基上长到2 cm左右时, 去除玻璃瓶的封口膜, 在室内自然光下炼苗3–5天。然后将组培苗从瓶中取出, 漂洗清理黏附于苗根上的培养基和松散的愈伤组织, 漂洗后保持组培苗根部湿润, 迅速假植到含水量60%的营养土(腐植土:珍珠岩=3:1, v/v)中, 并保持营养土表面湿润。培养14天左右移栽入花盆, 转至室外培养。统计成活率(成活苗数/移栽的组培苗总数×100%)。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织诱导

3种愈伤组织诱导培养基,在接种2-3天后,外植体都会膨大,经20天培养均可产生愈伤组织。刚诱导的愈伤组织多为浅黄色,半透明状,结构松散,表面湿润。在光照14小时/天光周期条件下培养一段时间后,愈伤组织颜色加深,少数M2、M3培养基中愈伤组织出现浅绿色,而M1培养基上的愈伤组织一直为半透明浅黄色。3种培养基诱导愈伤组织的启动速度、愈伤组织质量和得率不同。诱导20天统计结果(表2)显示3种培养基诱导效果有明显差异($F = 28.500$, $P < 0.01$)。

3种培养基中以M3诱导愈伤组织的效果最好,诱导率为93.94%,其次为M1,诱导率为87.27%。M1诱导愈伤组织的褐化率最低,为9.70%,M2和M3愈伤组织褐化率分别为31.45%和22.58%。前期的预试验表明,褐化可通过在培养基中添加活性炭等吸附物质解决。愈伤组织诱导20天后,转入M4增殖培养基进行继代培养14天。继代培养后的愈伤组织明显增大,愈

伤得率可达到2.5 g/皿,且愈伤组织明显比刚诱导的愈伤组织生长旺盛,培养14天后进行不定芽诱导。

2.2 不定芽诱导及植株再生

选择继代增殖培养后浅黄色半透明、表面光滑、生长旺盛的愈伤组织,切成0.5-1.0 cm³小块,转入不定芽诱导培养基M5、M6和M7中,每个处理接种40块左右愈伤组织,诱导愈伤组织分化。培养10、20和25天后统计不定芽诱导情况,结果表明3种培养基对不定芽的诱导有明显差异($F = 34.357$, $P < 0.01$)。

表3和图1显示,在M5、M6和M7 3种培养基中,M7对不定芽诱导效果最佳(图2 A),即1/2 MS + IAA 0.1 mg·L⁻¹ + ZT 0.5 mg·L⁻¹ + sucrose 30 g·L⁻¹ + agar 8 g·L⁻¹,25天时诱导率可达65.83%,其次为M6,诱导率为61.67%,M5诱导效果最差,培养25天后诱导率仅为45.00%。3种培养基诱导的不定芽均为丛生芽,将产生不定芽的愈伤组织在3种培养基中继续继代培养,丛芽产生率均在50%以上。

将M7诱导产生的不定芽从基部切下,转到生根培

表2 不同培养基对愈伤组织诱导率和褐化率的影响

Table 2 Effects of different media on callus induction and browning

Medium	No. of explants inoculated	No. of explants producing calli	Average frequency of callus induction (%)	No. of browning calli	Percentage of browning calli (%)
M1	55	48.00 ± 0.577 ^c	87.27 ± 0.01	5.33 ± 0.333 ^b	9.70 ± 0.01
M2	55	41.33 ± 0.677 ^b	75.15 ± 0.01	13.00 ± 0.577 ^a	31.45 ± 0.01
M3	55	51.67 ± 1.202 ^a	93.94 ± 0.02	11.67 ± 0.333 ^a	22.58 ± 0.01
ANOVA			$F = 28.500$, $P < 0.01$		$F = 90.600$, $P < 0.01$

每种处理接种55个外植体,3次重复。 $P < 0.01$ 水平上的差异显著性。表中数字右上角字母表示邓肯氏分析结果。

Fifty-five explants inoculated in each treatment with 3 replicates. Significant differences at the $P < 0.01$ level. Different superscripts indicate the results of Duncan's test.

表3 不同培养基对不定芽诱导的影响

Table 3 Effects of different media on shoot regeneration

Medium	No. of calli inoculated	Mean frequency of shoot regeneration (%)		
		10 d	20 d	25 d
M5	40	6.67 ± 0.02 ^a	35.00 ± 0.01 ^c	45.00 ± 0.01 ^c
M6	40	7.50 ± 0.02 ^a	41.67 ± 0.01 ^b	61.67 ± 0.01 ^b
M7	40	6.67 ± 0.01 ^a	47.50 ± 0.01 ^a	65.83 ± 0.01 ^a
ANOVA		$F = 0.600$, $P = 0.579$	$F = 16.900$, $P < 0.01$	$F = 34.357$, $P < 0.01$

每种处理接种40块愈伤组织,3次重复。 $P < 0.01$ 水平上的差异显著性。表中数字右上角字母表示邓肯氏分析结果。

Forty calli were inoculated in each treatment with 3 replicates. Significant differences at the $P < 0.01$ level. Different superscripts indicate the results of Duncan's test.

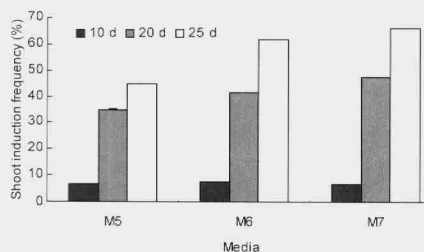


图1 不同培养基上不定芽的分化频率

Figure 1 Shoot induction frequency on 3 tested media

培养基 M8 和 M9 中进行不定根的诱导。每个处理接种 30 个不定芽, 分别在培养 10 和 20 天后记录生根情况。表 4 表明, 海滨锦葵是一种生根较容易的植物, 不定芽转至 MS 和 MSB 培养基培养 10 天左右均可产生不定根, 且最终生根率分别为 96.67 % 和 94.44 %。M8 培养基的生根率在培养第 10 天后低于 M9 培养基, 为 36.67 %, 但在第 20 天统计结果反而超过 M9 培养基, 90 个不定芽中有 87 个产生不定根, 生根率达到 96.67 %。在 M8 培养基中生根的小苗生根速度快, 茎粗壮, 叶片正常生长, 根系发达, 根粗而长(图 2 B); 而在 M9 培养基中生根的小苗茎较纤细, 叶片较小, 生根数多, 且根细长。

2.3 炼苗移栽

当幼根在生根培养基上长到 2 cm 时, 去除玻璃瓶的封口膜, 将组培苗从瓶中取出, 漂洗清理黏附于苗根上的培养基和松散的愈伤组织, 漂洗后保持组培苗根部湿润,

迅速假植到含水量 60% 的营养土(腐植土:珍珠岩=3:1, v/v)中(图 2C)。室内自然光下炼苗 3~5 天。此时注意保持营养土表面湿润, 控制室内湿度在 70%~80% 之间, 温度 25℃ 左右, 此条件下幼苗可以健康生长。培养 2 周后移栽入花盆, 转至室外培养。统计幼苗成活率为 85%。

2.4 结果分析

Cook 等(1989)分别以海滨锦葵的茎段和成熟胚为外植体, 进行了海滨锦葵愈伤组织诱导及植株再生实验, 以茎段为外植体成功地得到了再生植株, 但以成熟胚为外植体却没有得到再生植株。本实验前期参照该方法以茎段和成熟胚为外植体, 利用 NAA 与 2-IP 组合进行植株再生, 但未得到再生植株。随后以胚轴为外植体, 用不同浓度的 IAA 和 ZT 组合试验, 成功地再生了海滨锦葵植株, 再生率为 64%。

外植体在 M1、M2 和 M3 3 种培养基中均能成功诱导愈伤组织。各种指标显示 M1 和 M3 均优于 M2, M1 培养基诱导愈伤组织的褐化率最低, 仅为 9.70 %, M3 培养基诱导愈伤组织的褐化率为 22.58%。但由于 M1 所采用的激素是 2,4-D, 在随后进行的不定芽诱导中会导致畸形苗产生。并且, 愈伤组织的褐化可通过添加抗氧化物质, 如添加 Vc(高国训, 1999)、吸附剂活性炭(刘用生和李友勇, 1994)和 PVP(姚洪军等, 1999)等方法解决。我们的预试验也证明活性炭对海滨锦葵愈伤组织的褐化有较好的抑制作用。综合考虑, 作者认为以 M3 培养基为最佳, 即: MS + IAA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + KT $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + sucrose $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ + agar $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 最适合海滨锦葵愈伤组织诱导。愈伤组织诱导初期, 生长点切除不净的胚轴有可能通过生长点直接产生芽, 此时产生的芽会直接

表 4 培养基对生根培养的影响

Table 4 Effects of media on root induction

Medium	No. of shoots inoculated	10 d			20 d	
		No. of shoots rooted	Mean frequency of root induction (%)		No. of shoots rooted	Mean frequency of root induction (%)
M8	30	11.00 ± 0.577	36.67 ± 0.01		29.00 ± 0.577	96.67 ± 0.01
M9	30	12.67 ± 0.882	42.22 ± 0.03		28.33 ± 0.882	94.44 ± 0.03

每种处理接种 30 个不定芽, 每个处理做 3 次重复。

Thirty shoots inoculated in each treatment with 3 replicates.

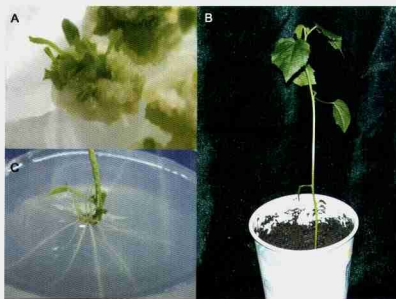


图2 海滨锦葵的植株再生

- (A) M7 培养基上的不定芽分化;
(B) M8 培养基上的生根情况;
(C) 再生植株

Figure 2 Plant regeneration of *Kosteletzkya virginica*

- (A) Shoot induction on M7 medium;
(B) Root induction on M8 medium;
(C) Regenerated plant

产生长而弯曲的茎,而愈伤组织继代培养后进行不定芽诱导而产生的芽多为丛芽,两者从产生时间和芽的形态上均可区分开。

MS培养基是植物组织培养中应用最广泛的一种培养基。Jin等(2005)报道棉花组织培养的最佳基本培养基为MSB培养基(包括MS基本培养基的大量元素,微量元素和铁盐及B5基本培养基的有机成分)。由于棉花与海滨锦葵同属锦葵科,所以本实验设计了MS与MSB的生根诱导的对比实验。结果显示,海滨锦葵不定芽生根诱导在MS培养基和MSB培养基中的诱导差异不大,在MSB培养基中生根量较大,但在MS生根培养基上茎叶的生长情况较好。

参考文献

- 蔡能,易自力,李祥 (2003). 改善植物大规模组织培养条件的研究进展. 植物学通报 20, 745-751.
程林梅,孙毅,刘少翔 (2001). 基因型和激素浓度对大豆植株再生的影响. 植物学通报 18, 367-370.
高国训 (1999). 植物组织培养中的褐变问题. 植物生理学通讯 35, 501-502.
林荣双,梁丽珊,肖显华,王顺珍 (2003). 花生幼叶为外植体的植

- 株再生系统的建立. 植物学通报 20, 307-312.
刘用生,李友勇 (1994). 植物组织培养中活性炭的使用. 植物生理学通讯 30, 214-217.
阮成江,何祯祥,钦佩,谢民 (2003). 海滨锦葵数量性状的相关和主成分分析. 南京林业大学学报(自然科学版) 27(5), 6-10.
姚洪军,罗晓芳,田视亭 (1999). 植物组织培养外植体褐变的研究进展. 北京林业大学学报 21, 78-84.
Deborah AC, Debra MD, John LG (1989). Regeneration of *Kosteletzkya virginica*(L.) Presl. (Seashore Mallow) from callus cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 17, 111-119.
Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968). Nutrient requirement of suspension culture of soybean root cells. *Exp Cell Res* 9, 195-198.
Jin SX, Zhang XL, Liang SG, Nie YC, Guo XP, Huang C (2005). Factors affecting transformation efficiency of embryogenic callus of upland cotton (*Gossypium hirsutum*) with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 81, 329-237.
Murashige T, Skoog FA (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plantarum* 15, 473-497.
Ruan CJ, Qin P, Chen JW, Han RM (2004). Analysis of nutritive compositions in the seeds of *Kosteletzkya virginica*. *Acta Agron Sin* 30, 901-905.

Callus Induction and Plant Regeneration from Embryo Exes of *Kosteletzkya virginica*

Xi Zheng^{1,2}, Xueying Wang¹, Ying Shan^{1,2}, Hua Jin², Chengjiang Ruan^{2*}

¹Biological Science and Technology College, Shenyang Agriculture University, Shenyang 110161, China

²College of Life Sciences, Dalian Nationalities University, Dalian 116600, China

Abstract The embryo exes of *Kosteletzkya virginica* were used as explants for induction of callus, buds and roots on nine culture media with different hormone combinations. The best results were achieved on the following media: (1) 93.94% callus induction on MS medium supplemented with 1.0 mg·L⁻¹ IAA, 0.3 mg·L⁻¹ KT, 30 g·L⁻¹ sucrose and 8 g·L⁻¹ agar; (2) 65.83% shoot induction on MS medium supplemented with 0.1 mg·L⁻¹ IAA, 0.5 mg·L⁻¹ ZT, 30 g·L⁻¹ sucrose and 8 g·L⁻¹ agar; and (3) 96.67% rooting on MS medium containing 30 g·L⁻¹ sucrose and 8 g·L⁻¹ agar. The survival rate of the plantlets was 85% after being transplanted into soil.

Key words embryo exes, *Kosteletzkya virginica*, plant regeneration, tissue culture

Zheng X, Wang XY, Shan Y, Jin H, Ruan CJ (2007). Callus induction and plant regeneration from embryo exes of *Kosteletzkya virginica*. *Chin Bull Bot* 24, 194–199.

* Author for correspondence. E-mail: ruan@dlnu.edu.cn

(责任编辑: 白羽红)

中国植物学会古植物学分会第11届学术讨论会

为了进一步拓展我国古植物学的研究事业, 促进学科之间的交叉和同行之间的交流与合作, 中国植物学会古植物学分会将于2007年3月23–26日在珠海召开第11届学术讨论会。本次会议由中国植物学会古植物学分会主办, 中山大学生命科学学院和广东省植物学会承办, 珠海淇澳-担杆岛省级自然保护区协办。组委会诚邀从事古植物学和相关学科研究的同仁参会交流。

会议日程

3月23日 在中山大学(珠海校区)报到

3月24日 学术交流研讨

3月25日 珠海近海岛屿生态及红树林植被考察

3月26日 参观澳门世界文化遗产及博物馆

会务费

(1)只参会、不参加考察: 100元

(2)参会并参加珠海考察: 200元

(3)全程参加会议及考察: 500元

联系方式

通讯地址: 广东省广州市新港西路135号 中山大学生命科学学院 邮编: 510275

联系人: 金建华 博士, 廖文波 博士

电话: 020-84113348, 84115882(O); 传真: 020-84034957

手机: 13924215068

E-mail: Lssjjh@mail.sysu.edu.cn; Lsslwb@mail.sysu.edu.cn

会议第一轮通知详见中国植物学会网站 www.botany.org.cn