

灰绿藜幼嫩花序的组织培养及植株再生

蒋刚强, 曾幼玲, 张富春*

(新疆大学生命科学与技术学院, 新疆生物资源基因工程重点实验室, 乌鲁木齐 830046)

摘要: 选用盐碱地灰绿藜(*Chenopodium glaucum* L.) 幼嫩花序为外植体, 建立了快速而高效的离体组织培养体系。在附加 1.0 mg/L 6-BA 和 0.4 mg/L IBA 的 MS 培养基上培养 35 d 可诱导出不定芽, 诱导频率达到 66.7%; 不定芽在此培养基上可快速扩增和长期继代培养。不定芽转至 1/2 MS + NAA 0.2 mg/L 培养基中培养 2 ~ 3 周, 生根形成完整植株。

关键词: 灰绿藜; 幼嫩花序; 不定芽; 再生植株

中图分类号: Q943.1; Q949.745.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2007)04-0413-04

Tissue Culture and Plant Regeneration from Immature Inflorescence Explants of *Chenopodium glaucum* L.

JIANG Gang-Qiang, ZENG You-Ling, ZHANG Fu-Chun*

(Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China)

Abstract: A protocol was reported for high frequency adventitious shoot induction and plantlet regeneration from immature inflorescence explants of *Chenopodium glaucum*. Adventitious shoots were induced from immature inflorescence cultured on MS medium supplemented with 1.0 mg·L⁻¹ 6-BA and 0.4 mg·L⁻¹ IBA for 35 days. Induction frequency of adventitious shoots was about 66.7%. Adventitious shoots were further multiplied vigorously and maintained for a long time on the same medium for adventitious shoot induction. Rooting was achieved after adventitious shoot was transplanted to 1/2 MS + NAA 0.2 mg/L medium for 2 - 3 weeks.

Key words: *Chenopodium glaucum*; Immature inflorescence; Adventitious shoots; Plant regeneration

盐碱地是地球上广泛分布的一种土壤类型, 约占陆地面积的 25%, 是重要的土地资源。灰绿藜(*Chenopodium glaucum* L.) 是藜科植物中适应盐碱生境为数不多的先锋植物之一, 具有重要的经济价值和生态价值^[1]。灰绿藜在改善并利用盐碱地、降低土壤盐分、促进植物抗盐机制研究、提供抗盐种质资源和抗盐基因工程等方面有着非常重要的意义。关于灰绿藜种子重量、萌发特性与环境适应关系、营养器官抗旱、抗盐结构特征、盐胁迫下叶绿体与叶片光合特性变化等已有研究报道^[2-9]。李金耀、蔡伦等还对灰绿藜等藜科盐生植物中与耐盐相关的 NHX 基因进行了初步研究^[10,11]。到目前为止, 拟南芥、烟草和水稻等模式植物在植物抗盐基因工程中仍发挥着主要作用, 但这些模式植物均为非盐生植

物, 盐生植物的遗传转化体系尚未建立起来。而且这些模式植物中, 除了拟南芥可以通过农杆菌浸染花序进行转基因操作外, 其它植物均需要通过组织培养建立再生体系进行转基因。在盐生植物的抗盐机制及相关抗盐基因的研究中, 除了研究这些基因在非盐生植物中过量表达或下调对抗盐的作用外, 利用基因敲除或 RNAi 技术来探讨抗盐基因在盐生植物抗盐中的作用就显得十分迫切和重要, 这首先需要建立盐生植物的再生体系。本实验首次以灰绿藜的幼嫩花序为外植体, 研究不同的激素种类及浓度配比等因素对灰绿藜芽的诱导、增殖及生根的影响, 以期找到最适合的再生培养基, 达到建立灰绿藜再生植株体系的目的, 为下一步利用基因敲除或 RNAi 来研究灰绿藜耐盐的分子机理奠定基础。

收稿日期: 2007-01-24, 收稿日期: 2007-04-17。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30460015); 教育部科学技术研究重点项目(205178); 新疆高校创新研究群体基金项目(XJEDU2004G02)。

作者简介: 蒋刚强(1982 -), 男, 硕士研究生, 主要从事植物基因工程研究。

* 通讯作者: (Author for correspondence. E-mail: zfcxju@xju.edu.cn)。

1 材料与方法

1.1 材料

乌鲁木齐郊区盐碱地野生灰绿藜 (*Chenopodium glaucum* L.) 植株的幼嫩花序。

1.2 外植体的消毒

灰绿藜的花数朵聚集成团伞花序,排列成间断的穗状花序或圆锥花序。将灰绿藜的幼嫩花序置于烧杯中,用自来水冲洗 30 min,再用洗衣粉液清洗 5 min,剪成长 1.0 cm 左右的切段,每个切段带有 4~5 个团伞花序。在超净工作台上用 70% 酒精浸泡 30 s,无菌水冲洗 2 次,0.1% (W/V) 的 HgCl_2 消毒 5 min,无菌水冲洗 5 次,无菌滤纸吸干表面的水分,再将单个团伞花序取下接入诱导培养基中。培养条件为光照 16 h,黑暗 8 h,光照强度约为 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,相对湿度 70% 左右,温度 25~27℃。不定芽的诱导频率为形成不定芽的团伞花序数占总的团伞花序数的百分比。

1.3 培养条件

培养温度 25~27℃,光照时间 $16 \text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$,光照强度 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。培养基为①诱导不定芽培养基: **MS1**: MS + 6-BA 0.10 mg/L (单位下同) + IBA 0.40; **MS2**: MS + 6-BA 0.50 + IBA 0.40; **MS3**: MS + 6-BA 1.00 + IBA 0.40; **MS4**: MS + 6-BA 1.50 + IBA 0.40; **MS5**: MS + 6-BA 0.10 + IAA 0.4; **MS6**: MS + 6-BA 0.50 + IAA 0.4; **MS7**: MS + 6-BA 1.00 + IAA 0.4; **MS8**: MS + 6-BA 1.50 + IAA 0.4; ②不定芽的增殖和继代培养基: MS + 6-BA 1.0 + IBA 0.4; ③生根培养基: **R-1**: 1/2MS + NAA 0.20; **R-2**: 1/2 MS + NAA 0.40; **R-3**: 1/2 MS + NAA 0.60; **R-4**: 1/2 MS + IBA 0.20; **R-5**: 1/2 MS + IBA 0.40;

R-6: 1/2 MS + IBA 0.60。以上培养基 ① 和 ② 的蔗糖浓度为 3.0%, ③ 的蔗糖浓度为 1.5%; 琼脂为 $7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 6.0。

2 结果与分析

2.1 不定芽的诱导及增殖

把灰绿藜幼嫩花序外植体接种于芽诱导培养基 MS1~MS8 中(表 1,图 1:A),外植体在 15 d 左右开始萌动,整个花序开始膨大(图 1:B),形成数个芽点,培养到 35 d 左右,芽点长大,形成 2 片真叶,并逐渐形成小芽(图 1:C)。当 6-BA 浓度达到 1.0 或高于 1.0 时,部分花序的基部出现愈伤组织(图 1:D)。在培养到第 35 d 的时候对幼芽形成情况进行了调查统计,由表 1 可看出,与对照相比,在 IBA、IAA 与不同浓度的 6-BA 组合的培养基上,幼嫩花序外植体形成不定芽的情况差别很大。在 0.4 mg/L 的 IBA 培养基上添加 1.0 mg/L 的 6-BA,对于不定芽的形成具有最好效果,培养 35 d 后,不定芽的诱导频率达到 66.7%,并且生长健壮。此时将幼芽继代在新鲜的相同培养基中,20 d 后形成丛生芽(图 1:E)。这些芽丛可以在此种培养基上快速扩增和长期继代培养。在 IBA 浓度一定的情况下,6-BA 的浓度对灰绿藜幼嫩花序形成不定芽的影响显著。当 6-BA 浓度为 0.1 mg/L 时,不定芽的诱导频率为 26.6%,当 6-BA 浓度增大到 1.0 mg/L 时,不定芽的诱导频率最大为 66.7%,而当 6-BA 浓度继续增大到 1.5 mg/L 时,不定芽的诱导频率又降低,而且幼芽易玻璃化。IAA 与 6-BA 的组合虽然可以诱导出不定芽,但无论从生长状况还是诱导频率方面都不如 IBA 与 6-BA 的组合,另一方面,在 IAA 浓度一定的情况下,不定芽的诱导频率随着 6-BA

表 1 6-BA 与 IBA 或 IAA 组合对灰绿藜幼嫩花序不定芽形成的影响

Table 1 The effects of different concentration of 6-BA in combination with IBA or IAA on adventitious shoot formation of immature inflorescence of *Chenopodium glaucum*

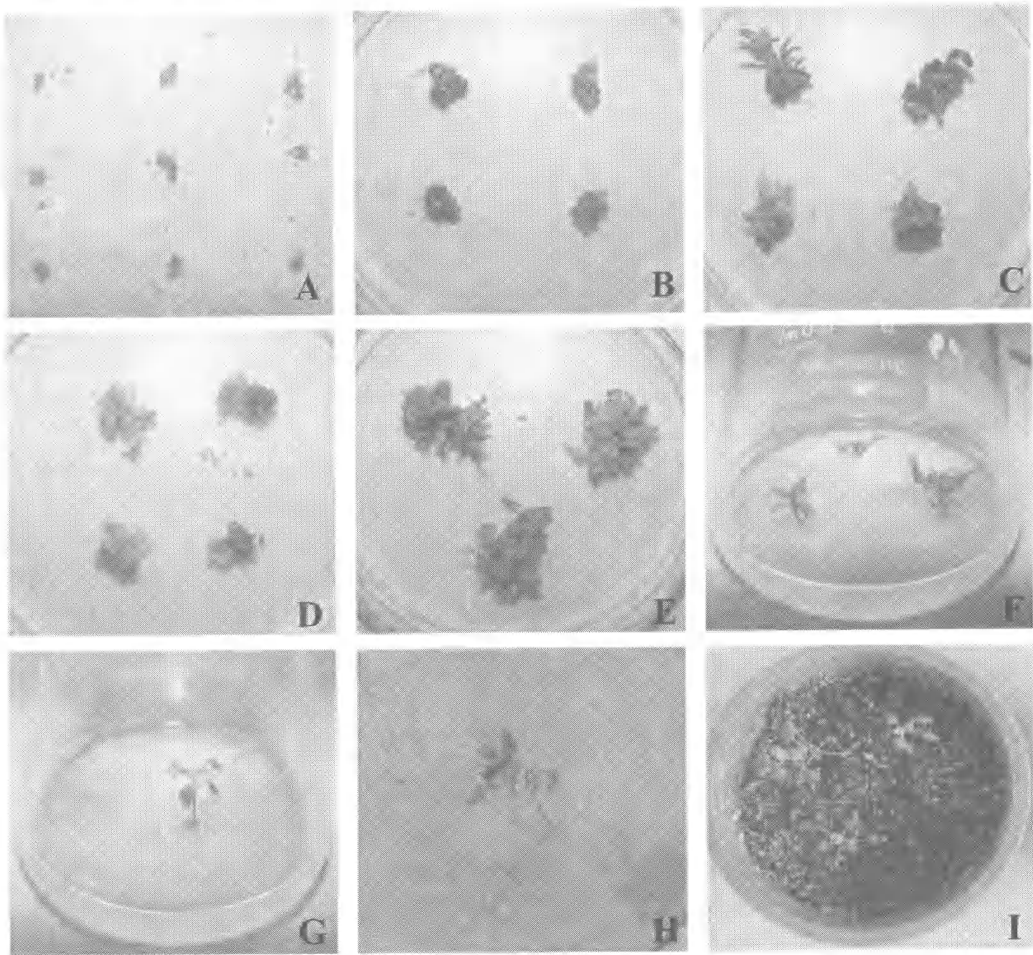
处理号 Treatments code	激素浓度 (mg/L) Hormone concentrations			接种数 Number of total inflorescence	形成不定芽数 Number of inflorescence forming adventitious shoots	不定芽诱导频率 (%) Induction frequency of adventitious shoots
	6-BA	IBA	IAA			
CK	0.00	0.00	0.00	27	0	0
MS1	0.10	0.40	0.00	45	12	26.6
MS2	0.50	0.40	0.00	45	19	42.2
MS3	1.00	0.40	0.00	45	30	66.7
MS4	1.50	0.40	0.00	45	23	51.1
MS5	0.10	0.00	0.40	45	10	22.2
MS6	0.50	0.00	0.40	45	9	20.0
MS7	1.00	0.00	0.40	45	15	33.3
MS8	1.50	0.00	0.40	45	21	46.7

浓度的增大而上升,当 6-BA 浓度增大到 1.5mg/L 时,不定芽的诱导频率最大为 46.7%,但玻璃化现象严重。

2.2 不定根的诱导及植株移栽

丛生芽培养 60 d 后,芽高约为 1.0 cm。取粗壮

的幼芽接种在 1/2MS 培养基中进行壮苗(表 2,图 1:F),10 d 后转接于生根培养基 R-1 ~ R-6 上,2 ~ 3 周能生根(图 1:G,H),除 R-6 外,生根率均可达 80% ~ 100%。不同浓度的 IBA 和 NAA 对灰绿藜的生根效果差异较大,两者在较低浓度



A. 花序的初始培养;B. 膨大的花序;C. 花序分化出不定芽;D. 花序形成愈伤组织;E. 不定芽扩散形成丛生芽; F. 壮苗培养; G、H. 诱导生根;I. 移栽成活的再生植株
A. Initialization state of inflorescence explants; B. The swollen inflorescence explants; C. Inducing adventitious shoot from inflorescence; D. The callus of inflorescence; E. The proliferation of adventitious shoots; F. Strong culture of adventitious shoots; G, H. Rooting of adventitious shoots; I. Transplant seedling of *Chenopodium glaucum*

图 1 灰绿藜幼嫩花序的组织培养过程
Fig. 1 Tissue culture from immature inflorescence explants of *Chenopodium glaucum* L.

表 2 不同浓度 NAA、IBA 对灰绿藜试管苗生根的影响
Table 2 The effects of different concentration of IBA and NAA on shoot rooting of *C. glaucum*

处理号 Treatments code	激素浓度 (mg/L) Hormone concentrations		接种苗数 Number of inoculated shoots	生根率 (%) Rooting rate	平均生根数 Average root number per shoot	根生长情况 Growing characers of roots
	NAA	IBA				
R-1	0.20	0.00	25	100	6.20	主侧根明显,细长
R-2	0.40	0.00	25	92	5.60	主侧根不明显,短,较细
R-3	0.60	0.00	25	88	4.20	主侧根不明显,短,毛状根
R-4	0.00	0.20	25	80	5.80	主侧根明显,短,较细
R-5	0.00	0.40	25	92	5.50	主侧根不明显,短,较细
R-6	0.00	0.60	25	72	4.80	主侧根不明显,短,毛状根

注:生根率 = 生根苗数/接种总苗数。
Note: The rooting rate = Number of rooting shoots/Number of inoculated shoots.

(0.20 mg/L)时,均能促进根的萌发,且根发育正常。但在较高浓度时,形成的根为分枝多、毛状的畸形根,影响了根的质量,移栽难以成活。综合起来看,添加少量的生长素 IBA 或 NAA 的 1/2 MS 培养基有利于灰绿藜的无菌苗生根。待根长至 2~3 cm 时,开瓶炼苗 3 d 后移入蛭石和腐殖土(1:2)混合的基质中,保持 75% 的湿度,50% 的自然光,移栽成活率达 90% (图 1:I)。

3 讨论

植物组织培养主要受外植体、培养基和培养环境三大因素的调控,其中培养基中生长调节剂的种类及配比在植物形态建成中起决定作用。植物细胞具有全能性,但对于特定的器官或细胞能否表现出全能性则取决于是否具有适宜的激素诱导,只有在细胞分裂素与生长素的合理配置下,才能有较高的诱导频率,细胞分裂素和生长素的比值大时有利于不定芽的形成^[12]。同时在植物离体培养过程中,外植体的内源激素水平不断变化,生长素类物质存在极性运输现象,由此导致了其体内分布的特异性改变,这一变化与器官发生密切相关^[13]。培养基中加入生长调节物质可以改变和影响外植体的内源激素水平,从而导致灰绿藜幼嫩花序外植体在附加不同植物生长调节剂的培养基中进行离体培养时,不定芽的诱导频率差异很大。较高浓度的 6-BA 有利于不定芽的形成,但当 6-BA 浓度过高时,诱导的幼芽容易玻璃化,这可能是由于细胞分裂素浓度过高会导致芽结构畸形^[14]。从我们的实验结果来看,MS + 0.4 mg/L IBA + 1.0 mg/L 6-BA 培养基最适合灰绿藜幼嫩花序不定芽的诱导。灰绿藜花序苗的生根比较容易,在本次实验中,培养一定时间(25 d 以上),无根苗的生根率都能达到 90% 以上。NAA 及 IBA 的添加对于根的发生具有促进作用,但当 NAA 及 IBA 过高,使根过度生长,反而影响了根的质量,这对以后的成苗不利,这与崔广荣等^[15]报道的结果相似。灰绿藜的幼嫩花序再生植株体系的建立,是其应用于植物基因工程的必须步骤,相继的研究应

集中在其遗传转化体系的建立和完善方面。

参考文献:

- [1] 赵可夫,李法曾. 中国盐生植物[M]. 北京:科学出版社,1999.
- [2] 刘志民,李荣平,李雪华,骆永明,王红梅,蒋德明,南寅镛. 科尔沁沙地 69 种植物种子重量比较研究[J]. 植物生态学报, 2004,28(2):225-230.
- [3] 刘志民,李雪华,李荣平,蒋德明,曹成有,常学礼. 科尔沁沙地 31 种一年生植物萌发特性比较研究[J]. 生态学报,2004,24(3):648-653.
- [4] 段德玉,刘小京,冯凤莲,李存植. 盐分和水分胁迫对盐生植物灰绿藜种子萌发的影响[J]. 植物资源与环境学报,2004,13(1):7-11.
- [5] 李雪华,蒋德明,刘志民,李晓兰. 温带半干旱地区一年生植物种子的萌发特性[J]. 生态学报,2006,26(4):1194-1199.
- [6] 肖雯,张振霞,贾恢先. 几种盐地植物根解剖结构的研究[J]. 甘肃农业大学学报,1998,33(1):90-93.
- [7] 黄志伟,彭敏,陈桂琛,史萍. 青海湖盐碱湿地灰绿藜叶的形态解剖学研究[J]. 西北植物学报,2001,21(6):1199-1203.
- [8] 肖雯. 五种盐生植物营养器官显微结构观察[J]. 甘肃农业大学学报,2002,37(4):421-427.
- [9] 冯立田,卢元芳. 盐胁迫下灰绿藜叶片光合特性与叶绿体离子调节的研究[J]. 曲阜师范大学学报(自然科学版),1998,24(3):57-61.
- [10] 李金耀,马纪,蔡伦,王艳,张富春. 灰绿藜和碱蒿 NHX 基因 3'-UTR 序列的差异性分析[J]. 植物生理学通讯,2005,41(2):219-223.
- [11] 蔡伦,张富春,马纪,李金耀,陈邦党,恩特马克·布拉提拜. 新疆 3 种藜科盐生植物 NHX 基因的克隆与序列分析比较[J]. 植物生理学通讯,2005,41(3):383-387.
- [12] Ibrahim R, Debergh P C. Factors controlling high efficiency adventitious bud formation and plant regeneration from *in vitro* leaf explants of rose [J]. *Scientia Horticulturae*, 2001,88(1):41-57.
- [13] 田志宏,严寒,李秋杰,费永俊,陈中义. 马蹄金愈伤组织诱导及植株再生研究[J]. 华中农业大学学报,2003,22,403-407.
- [14] Cushman J C, Wulan T, Kuscuglu N. Efficient plant regeneration of *Mesembryanthemum crystallinum* via somatic embryogenesis [J]. *Plant Cell Rep*, 2000,19,459-463.
- [15] 崔广荣,叶选怡,刘跃成,肖明,廖玲玲,刘月. 激素种类及其浓度对矮牵牛试管苗增殖及生根率的影响[J]. 武汉植物学研究,2005,23(4):389-392.