

· 组织培养简讯 ·

## 盐地碱蓬幼嫩花序的组织培养及植株再生

赵术珍 阮圆 王宝山\*

(山东师范大学生命科学学院逆境植物实验室 济南 250014)

**摘要** 选用盐地碱蓬(*Suaeda salsa*)幼嫩花序为外植体,建立了快速而高效的离体培养体系。在附加1.0 mg·L<sup>-1</sup>6-BA和0.4 mg·L<sup>-1</sup> IAA的MS培养基上培养25天可诱导出不定芽,诱导频率达到82.1%;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MS培养基中培养2~3周生根形成完整植株。

**关键词** 盐地碱蓬, 幼嫩花序, 不定芽, 再生植株

## Tissue Culture and Plant Regeneration from Immature Inflorescence Explants of *Suaeda salsa*

Shuzhen Zhao, Yuan Ruan, Baoshan Wang\*

(Key Laboratory of Stress Plant, College of Life Science, Shandong Normal University, Ji'nan 250014)

**Abstract** A protocol for high frequency adventitious shoot induction and plantlet regeneration from immature inflorescence explants of *Suaeda salsa* (a C<sub>3</sub> halophyte) was reported. Adventitious shoots were induced from immature inflorescence cultured on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-benzylaminopurine (6-BA) and 0.4 mg·L<sup>-1</sup> indole-3-acetic acid (IAA) for 25 days. Induction frequency of adventitious shoots was about 82.1%. Adventitious shoots were further multiplied vigorously and maintained for a long time on the same medium for adventitious shoot induction. Rooting was achieved on MS medium without any plant growth regulators after adventitious shoot was transplanted for 2–3 weeks.

**Key words** *Suaeda salsa*, 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。盐地碱蓬(*Suaeda salsa*)是典型的积盐型盐生植物, 在盐渍环境中能正常生长发育, 并完成其生活史。盐地碱蓬在我国分布极为广泛, 多数生于滨海洼地以及渠岸或田边轻度盐碱化土壤, 具有抗盐碱和耐海水的特点, 是广阔滩涂土地的一种先锋植物(顾淑容等, 1998)。盐地碱蓬在改善并利用盐碱地、降低土壤盐分、减少土壤水分蒸发、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(方孝东等, 2000)。我们对盐地碱蓬的耐盐机理已做了比较深入的研究(Li et al., 2004; Han et al., 2005)。到目前为止, 植物抗盐基因工程所用的转化体系均为非盐生植物, 如拟南芥、烟草和水稻等, 真盐生植物的遗传转化体系尚未建立起来。在这些非盐生植物中, 除了拟南芥可以通过农杆菌侵染花序进行转基因操作外, 其他植物均需要通过组织培养建立再生体系进行转基因操作。为了探讨盐生植物的抗

收稿日期: 2005-05-27; 接受日期: 2005-07-27

基金项目: 国家自然科学基金(30270793)和山东省自然科学基金重点项目(Z2004D03)

\* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: bswang@sdu.edu.cn

盐相关基因在抗盐中的作用,除了探讨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,这就需要首先建立盐生植物的再生体系。已有结果表明:以盐地碱蓬的子叶和下胚轴作为外植体诱导愈伤组织较容易,但是愈伤组织再分化困难。本实验首次以盐地碱蓬的幼嫩花序为外植体,研究不同的激素种类及浓度配比对盐地碱蓬植株再生的影响,以期找到最适合的再生培养基,达到高效建立盐地碱蓬再生植株体系的目的,为下一步利用基因敲除或RNAi来研究盐地碱蓬耐盐的分子机理奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 外植体的消毒

盐地碱蓬(*Suaeda salsa*)的花3~5朵聚集成团伞花序,排列成间断的穗状花序。将生长在室外15天左右的穗状幼嫩花序用自来水冲洗半个小时后,剪成长约0.8~1.0 cm切段,每个切段带有4~5个团伞花序。用70%(V/V)的乙醇消毒1分钟后,再用0.1%(W/V)的HgCl<sub>2</sub>消毒8~10分钟,然后用无菌水冲洗5~6遍。

### 1.2 不定芽的诱导

将经过消毒的团伞花序接种于芽诱导培养基SIM1~SIM6中(pH 5.8~6.0),置于培养室中培养。培养条件为光照16小时,黑暗8小时。相对湿度75%左右,温度25~27℃,光照强度约300 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>。各外植体均接种于容量为120 mL的三角瓶中,每瓶5~6个外植体,每处理5~6次重复。培养基附加0.7%琼脂、3%蔗糖,pH5.8。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 不定根的诱导

取粗壮的无根苗,接种在生根培养基上。

### 1.4 炼苗和移栽

当再生苗基部分化并形成根系后,去掉三角瓶的盖,炼苗3天。然后从瓶中取出植株,小

心洗去附着的琼脂培养基,在室温条件下进行砂土培养。

## 2 结果与分析

### 2.1 外植体的消毒

由于盐地碱蓬的团伞花序较小,若单独取下灭菌很容易变黑死亡,本试验将盐地碱蓬间断的穗状花序切成长约0.8~1.0 cm的片段,用70%(V/V)的乙醇消毒1分钟后,再用0.1%(W/V)的HgCl<sub>2</sub>消毒8~10分钟,然后用无菌水冲洗5~6遍。此处理可以有效的降低其死亡率,污染率也较低,成活率可达80%以上。

### 2.2 不定芽的诱导及增殖

把盐地碱蓬幼嫩花序外植体接种在含有0.4 mg·L<sup>-1</sup>的IAA和不同浓度的6-BA以及仅添加不同浓度的6-BA的芽诱导培养基上,外植体在10天左右开始萌动,整个花序开始膨大,形成数个芽点,培养到15天左右,芽点长大,形成2片真叶,并逐渐形成小芽(图1A)。在培养到第25天的时候对幼芽形成情况进行了调查统计,由表1可看出,与对对比,在添加不同浓度的6-BA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<sup>-1</sup>的IAA培养基上添加1.0 mg·L<sup>-1</sup>的6-BA,对于不定芽的形成具有最好效果,培养25天后,不定芽的诱导频率达到82.1%,并且生长健壮,芽体较肥大。此时将幼芽继代在新鲜的相同培养基中20天后形成芽丛,呈莲座状(图1B)。这些芽丛可以在此种培养基上快速扩增和长期继代培养。另一方面,在IAA浓度一定的情况下,6-BA的浓度对盐地碱蓬幼嫩花序形成不定芽的影响显著。当6-BA浓度为0.1 mg·L<sup>-1</sup>时,不定芽的诱导频率仅为18.4%,当6-BA浓度增大到1.0 mg·L<sup>-1</sup>时,不定芽的诱导频率最大为82.1%,而当6-BA浓度继续增大到1.5 mg·L<sup>-1</sup>时,不定芽的诱导频率又降低,而且幼芽易玻璃化。

### 2.3 不定根的诱导及植株移栽

丛生芽在培养到65天时,芽高为1.0 cm。

表1 不同培养基对盐地碱蓬幼嫩花序不定芽形成的影响<sup>\*</sup>Table 1 Adventitious shoots formation of immature inflorescence of *Suaeda salsa* on different shoot induction media

Media type	Phytohormones (mg·L <sup>-1</sup> )		No. of total inflorescence	No. of inflorescence forming adventitious shoots	Induction frequency of adventitious shoots (%)
	6-BA	IAA			
CK	0	0	25	0	0 <sup>a</sup>
SIM1	0.1	0.4	38	7	18.4 <sup>b</sup>
SIM2	0.5	0.4	30	17	56.7 <sup>c</sup>
SIM3	1.0	0.4	28	23	82.1 <sup>d</sup>
SIM4	1.5	0.4	40	6	15.0 <sup>ab</sup>
SIM5	0.5	0	40	19	47.5 <sup>c</sup>
SIM6	1.0	0	30	15	50.0 <sup>c</sup>

\*表中数字右上角字母表示邓肯氏分析结果,  $\alpha = 0.01$

\*Different superscripts indicate the results of Duncan'S test,  $\alpha = 0.01$



图1 盐地碱蓬幼嫩花序在 SIM3 培养基上的不定芽形成情况

A. 25 天后不定芽诱导情况; B. 不定芽的增生情况

Fig.1 Adventitious shoots formation of immature inflorescence of *Suaeda salsa* on shoot induction medium 3  
A. Adventitious shoots induction after 25 days; B. The proliferation of adventitious shoots

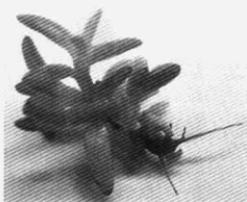


图2 不定芽的生根情况

Fig.2 Rooting of adventitious shoots

生长至具 4 片叶子时,取粗壮的幼芽,接种在 MS 培养基上,2~3 周能生根(图2),根系较发达的再生苗经炼苗后可移栽成活。

## 2.4 结果分析

植物离体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。在植物形态建成过程中,起主要作用的是培养基中生长调节剂组合的配比,细胞分裂素和生长素在外植体离体培养中的作用就是影响植物特定基因的激活与表达,从而调节特定蛋白质的合成,影响整个细胞的分裂及分化过程。细胞分裂素为有丝分裂和核分裂所必要,生长素对 DNA 复制和有丝分裂有一定作用,而 DNA 复制、有丝分裂、核分裂和胞质分裂都是细胞分裂的必要条件,因此植物生长调节物质影响外植体培养与形态建成源自其影响细胞分裂之故。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(田志宏和严寒,2003)。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,从而导致盐地碱蓬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,而当6-BA浓度相同时,生长素和细胞分裂素的组合使用优于单独使用;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(Cushman et al., 2000)。从我们的实验结果来看,MS+0.4 mg·L<sup>-1</sup> IAA+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA培养基最适合盐地碱蓬幼嫩花序不定芽的诱导。不定芽再接种在无激素的MS培养基上2~3周可以生根,但是生根数量偏少,根的生长情况也不太理想,最佳生根培养基及条件正在深入研究。

由于盐地碱蓬的团伞花序较小,通过肉眼观察不能确定所诱导的不定芽是团伞花序上原有腋芽的萌发还是花序直接再生,我们正在进行花序不定芽诱导的连续石蜡切片,以期确定不定芽的来源。

总之,本试验首次利用盐生植物盐地碱蓬幼嫩花序切段完成植株再生,为下一步研究盐地碱蓬的耐盐的分子机理打下基础。

### 参考文献

- 方孝东, 林栖凤, 屈良鹤 (2000). 植物耐盐机制及植物耐盐基因工程. 见: 植物进展 (第三卷), 李承森主编 (北京: 高等教育出版社), pp.155-156.
- 顾淑容, 马庆虎, 宋艳茹 (1998). 碱蓬茎段再生植株的研究. 植物学通报 **15**(4), 59-62.
- 田志宏, 严寒 (2003). 马蹄金愈伤组织诱导及植株再生研究. 华中农业大学学报 **22**, 403-407.
- Cushman, J.C., Wulan, T., Kuscuoglu, N., and Spatz, M.D. (2000). Efficient plant regeneration of *Mesembryanthemum crystallinum* via somatic embryogenesis. Plant Cell Rep. **19**, 459-463.
- Han, N., Shao, Q., Lu, C.M., and Wang, B.S. (2005). The leaf tonoplast V-H<sup>+</sup>-ATPase activity of a C<sub>3</sub> halophyte *Suaeda salsa* is enhanced by salt stress in a Ca-dependent mode. J. Plant Physiol. **162**, 267-274.
- Li, P.H., Wang, Z.L., Zhang, H., and Wang, B.S. (2004). Cloning and expression analysis of the B subunit of V-H<sup>+</sup>-ATPase in the leaves of *Suaeda salsa* under NaCl stress. Acta Bot. Sin. **46**, 93-99.

(责任编辑: 孙冬花)