

盐芥叶片组织培养再生植株的研究

蔡小宁, 杨阳, 杨平, 贲爱玲, 续晨 (南京晓庄学院生命科学系, 江苏南京 211171)

摘要 以盐芥叶片的切段为外植体, 在 MS 培养基上再生出完整的小植株。在培养基中添加 BA 3.0 mg/L 或 NAA 0.05 mg/L, BA 3.0 mg/L 较适合于愈伤组织和不定芽的诱导。研究建立起盐芥离体培养植株再生体系。

关键词 盐芥; 叶片; 组织培养; 植株再生

中图分类号 Q943.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)01-0042-02

Study on the Plant Regeneration in Tissue Culture of *Thellungiella halophila* Leaf

CAI Xiao-ning et al (Department of Life Science, Nanjing Xiaozhuang College, Nanjing, Jiangsu 211171)

Abstract With segments of *Thellungiella halophila* leaf as explants, the whole plantlet was regenerated on MS medium adding 3.0 mg/L BA and 0.05 mg/L NAA resp., and the results showed that 3.0 mg/L BA was more suitable for the inductions of callus and adventitious bud. The plant regeneration system of *H. halophila* cultured in vitro was established in the study.

Key words *Thellungiella halophila*; Leaf; Tissue culture; Plant regeneration

盐芥(*Thellungiella halophila*)是一种盐生植物,在我国沿海盐碱滩涂、新疆沙漠、北美和加拿大严寒地区均有分布,具有耐盐、耐旱、耐寒特性。盐芥与模式植物拟南芥有许多相似的特征,如个体小、生活周期短、自花传粉和基因组简单。它还与拟南芥有相近的亲缘关系,具有相似的形态和生活史,其基因序列与拟南芥非常相似(cDNA 序列中 90% 的核苷酸相同),它的基因组大小接近于拟南芥的 2 倍。拟南芥全基因组测序的完成,为应用比较基因组学、生物信息学手段、以盐芥为材料研究耐盐、耐旱、耐寒的分子机制提供了基础。近年研究表明,盐芥作为新的模式植物将会推动相关科学研究的发展^[1-3]。目前,仅见到盐芥组织培养的个别研究报告。刘发光等报道了应用盐芥种子萌发的无菌苗进行组织培养再生植株的研究结果^[4]。为此,笔者以生长在田间的盐芥植株为材料,研究了叶片外植体组织培养再生植株的培养条件。

1 材料与与方法

1.1 外植体的获取、灭菌、接种、培养 盐芥(*Thellungiella halophila*)种子来源于美国 ABRC (Arabidopsis Biological Resource Center)。首先将种子播种于营养土中,2 个月后移栽于田间,1~2 个月后摘取上部叶片,用自来水冲洗后,在 70% 酒精中浸约 20 s,以与蒸馏水按 1:1 混合的“84”消毒液稀释液浸泡 5 min,然后用无菌水冲洗 4~6 次。在超净工作台上将叶片和叶柄切成 0.3~0.5 cm,再均匀接种于添加各种激素的培养基上。培养温度(26±1)℃,光照度 3 000 lx,光照时间 14 h。

1.2 培养基 基本培养基为 MS 培养基^[5],添加各种激素(表 1)、蔗糖 30 g/L、琼脂 4.8 g/L。在灭菌前调整培养基 pH 值到 5.8,并且在 0.1 MPa(121℃)的条件下保持 20 min,以达到灭菌的效果。

2 结果与分析

2.1 盐芥叶片愈伤组织的诱导 将盐芥叶片和叶柄切成 0.3~0.5 cm 大小,再均匀接种于 M1、M2、M3、M4、M5 培养基

上诱导愈伤组织。表 2 表明,在 M1、M2、M3、M4 培养基上几天后大部分外植体开始膨大,3~4 周后长出淡黄色或绿色的愈伤组织。其中,M3、M4 培养基上的绿色愈伤组织还出现少量的绿芽点,且愈伤组织的数量多于 M1、M2 培养基;但 M5 培养基上的外植体基本没有反应,只表现为轻微膨大,3~4 周后褐化死亡。这表明含有过高含量细胞分裂素的培养基不适合诱导愈伤组织。

表 1 培养基代号与激素组合

Table 1 Culture media code and hormone combination

代号 Code	组合 Combination
M1	2,4-D 1.0 mg/L
M2	2,4-D 1.0 mg/L, BA 1.0 mg/L
M3	BA 3.0 mg/L
M4	NAA 0.05 mg/L, BA 3.0 mg/L
M5	TDZ 1.0 mg/L, BA 3.0 mg/L
M6	BA 0.5 mg/L

表 2 盐芥叶片愈伤组织的诱导

Table 2 Callus induction from leaves of *Thellungiella halophila* blades

代号 Code	诱导情况 Induction situation
M1	产生黄色愈伤组织,愈伤组织生长较慢,数量较少 Yellow callus, growth slowly, The quantity is less.
M2	产生的愈伤组织有少量为绿色,愈伤组织生长明显多于 M1 A little of callus is green, The quantity is remarkably more than M1
M3	产生的愈伤组织较多,基本为绿色,伴有少量不定芽 Much callus, mostly green, and some adventitious buds.
M4	产生较多的愈伤组织,大部分为绿色,伴有少量黄色愈伤组织和不定芽 Much callus, mostly green, with some yellow callus and adventitious buds
M5	外植体轻微膨大,最终褐化死亡 Explants bulbulated slightly, browning and death at last.

2.2 激素组合对盐芥叶片愈伤组织不定芽诱导的影响 将在 M1、M4 培养基上诱导获得的愈伤组织分别接种于 M3、M4、M6 培养基上进行不定芽的诱导培养,4 周后统计不定芽诱导结果(图 1)。从表 3 可以看出,同样接种于 M3、M4 培养基上,来源于 M1 的黄色愈伤组织不定芽诱导率明显高于来源于 M4 的绿色愈伤组织;不管愈伤组织来源于 M1 还是 M4,其不定芽诱导率均以接种于 M3、M4 培养基上为高。在愈伤组织诱导阶段,在 M3、M4 培养基上能够得到比在 M1、M2 培养基上多得多的愈伤组织。因此,盐芥愈伤组织诱导和不定

基金项目 南京晓庄学院生态学校级重点学科项目(2005-2008);南京晓庄学院科研启动基金(4051065)、重点项目(2007NXY10)。

作者简介 蔡小宁(1962-),男,江苏海安人,硕士,副研究员,从事农业生物技术方面的研究。

收稿日期 2007-10-08

芽的诱导均以 M3、M4 培养基为好。



图1 盐芥不定芽

Fig.1 Adventitious bud of *Thellungiella halophila*

表3 激素组合对盐芥叶片愈伤组织不定芽诱导的影响

Table 3 The effects of hormone combination on the healing tissues adventitious bud callus induction in *Thellungiella halophila* blades

起始培养基 Start medium	诱导培养基 Induction medium	接种数 No. of explants	诱导芽愈伤组织数 Callus for induction buds	不定芽诱导率 Adventitious buds induction rate// %
M1	M3	30	19	63.3
	M4	30	18	60.0
	M6	30	6	20.0
M4	M3	30	14	46.7
	M4	30	13	43.3
	M6	30	8	26.7

2.3 盐芥不定芽的继代和生根培养 将在不定芽诱导培养基上获得的丛生芽接种在 M6 培养基上继代增殖培养,3~4 周后选取较大的不定芽接种于 MS、1/2 MS 生根培养基,3~4 周后得到生根的完整小植株(图 2),生根频率分别达到 63.2% 和 72.0%。

3 讨论

盐芥作为新的模式植物将会引起越来越多的关注。有关盐芥耐盐基因功能和分子机理研究常需要开展基因的遗传转化研究。盐芥的组织培养再生体系的建立,将为转基因工作打下良好的基础。由于盐芥需要经过严格的低温处理才能开花,所以应用花浸泡法转基因受到一定的限制。而通



图2 盐芥完整小植株

Fig.2 Whole plantlet of *Thellungiella halophila*

过组织培养转基因随时都可以获得盐芥叶片,从而为开展转基因工作提供方便。

笔者获得了黄色和绿色的盐芥非胚性愈伤组织,与刘发光等在 MS + 6-BA 1.0 mg/L + IAA 0.5 mg/L 培养基上获得盐芥胚性愈伤组织的结果不同^[4]。这可能是由于 IAA 有利于胚性愈伤组织的形成,而 2,4-D 则有抑制作用。在该试验中,可能由于 NAA 用量很少,所以 NAA 对胚性愈伤组织形成的作用尚难定论。另外,IBA 是否有促进胚性愈伤组织的形成,也有待进一步研究。研究还表明,在培养基中添加 2,4-D 明显减慢了愈伤组织的生长速度。因此,为了获得较多的愈伤组织和较高的不定芽增殖系数,应避免使用 2,4-D 或减少 2,4-D 用量。

参考文献

- [1] BRESSAN R A, ZHANG C Q, ZHANG H, et al. Learning from the *Arabidopsis* experience. The next gene search paradigm[J]. *Plant Physiology*, 2001, 127:1354-1360.
- [2] INAN G, ZHANG Q, LI P H, et al. A Halophyte and cryophyte *Arabidopsis* relative model system and its applicability to molecular genetic analyses of growth and development of extremophiles[J]. *Plant Physiology*, 2004, 135:1718-1737.
- [3] AMTMANN A, BOHNERT H J, BRESSAN R A. Abiotic stress and plant genome evolution. Search for new models[J]. *Plant Physiology*, 2005, 138:127-130.
- [4] 刘发光,李美茹,李洪清.小盐芥的组织培养和植株再生[J].*植物生理学通讯*,2007,43(1):121-122.
- [5] MURASHIGE T, SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture[J]. *Physiol Plant*, 1962, 15:463-497.

(上接第 41 页)

150 万单位链霉素、150 万单位灰黄霉素,然后用塑料膜绑好,可减轻病害的发生;二是根部插瓶。在病树树冠下面东西南北各挖一个坑,于各坑寻找直径为 0.5~1.0 cm 的根切断,插在浓度为 150~200 mg/kg 装有四环素或土霉素、链霉素、灰黄霉素的药液瓶里,然后封口埋入土中,于 4 月下旬、6 月下旬、8 月上旬各治疗 1 次,效果明显^[1]。②使用中草药。种类有灭锈宁、克锈特、锈必治、锈净灵、除锈剂等。使用方法和时期为:4 月下旬至 5 月上旬进行根、干部注射和树下追施;5~7 月进行叶面喷洒、树干敷贴。使用剂量为:第 1 年 25~500 g/次,第 2~3 年 180~2 000 g/次。防治效

果:第 1 年防治率可达 61%,2 年以上防治率为 95% 以上^[6]。

参考文献

- [1] 吕佩珂,庞震,刘文珍,等.中国果树病虫原色图谱[M].北京:华夏出版社,1993.
- [2] 浙江农业大学,四川农学院,河北农业大学,等.果树病理学[M].上海:上海科学技术出版社,1979.
- [3] 李文慧,牛建新.苹果病毒的研究现状[J].*北方果树*,2006(7):3-4.
- [4] 林岗,林海霞.苹果绣果病类型与传播途径调查初报[J].*甘肃林业科技*,2001(6):72-74.
- [5] 周军,包军,陈卫军,等.苹果病毒病在国内的研究现状[J].*宁夏农林科技*,2000(3):42-43.
- [6] 林岗,林海霞.中草药防治苹果绣果病试验研究[J].*甘肃林业科技*,2003(6):5-7,30.