维普资讯 http://www.cqvip.com

紫叶酢浆草体细胞胚诱导和发育条件研究

李耀亭,陈存武
(皖西学院化学与生命科学系,安徽 六安 237012)

摘 要:通过组织培养方法,探讨生长素和细胞分裂素在紫叶酢浆草体细胞胚诱导和发育过程中的作用。结果表明0.5mg/L NAA是诱导胚性愈伤组织最适宜的生长素浓度,添加一定比例的6-BA可有效促进体细胞胚的发生;在附加激素浓度分别低于0.1mg/L NAA和0.5mg/L 6-BA的MS培养基上,体细胞胚能发育成完整的植株。因此,一定浓度的生长素是诱导紫叶酢浆草胚性愈伤组织的关键因素,细胞分裂素在体细胞胚的发生和发育过程中起增效作用。

关键词:紫叶酢浆草;组织培养;体细胞胚
中图分类号:Q943.1 **文献标识码**:A **文章编号**:1008-9632(2008)04-0055-03

紫叶酢浆草(*Oxalis traingularis A. St. Hil*)为酢浆草科,酢浆草属,多年生彩叶草本植物,具根状茎,原产美洲南部[1]。由于紫叶酢浆草叶柄颀长,叶片紫色鲜亮,花朵典雅且随光照强弱而自动开闭,具有极高的观赏价值,除用作观赏外,全草尚可入药,具有良好的开发前景。紫叶酢浆草种子败育,2001年从美国引进后只能通过组培方式进行繁殖[2~5]。在组织培养过程中发现紫叶酢浆草具有体细胞胚高频发生现象[6],深入研究植物体细胞胚的发生和发育机理,不仅对于揭示细胞分化、形态发生和合子胚发生等具有重要意义,而且为人工种子制作、突变体筛选等提供良好的实验体系。目前关于植物外源激素NAA和6-BA对紫叶酢浆草体细胞胚发生和发育过程的影响尚未见详细报道。本实验研究了NAA和6-BA对紫叶酢浆草体细胞胚的调节和影响,同时为其优良无性系的繁殖及人工种子制作积累资料。

1 材料和方法

1.1 植物材料

紫叶酢浆草,采自皖西学院植物园苗圃。

1.2 实验方法

1.2.1 胚性愈伤组织的诱导

紫叶酢浆草鳞茎、叶柄、叶片经70%酒精浸泡30s,0.1%升汞浸泡6~8min,无菌水冲洗5~7次,以0.5~1.0cm的切段为外植体。基本培养基采用MS培养基,附加不同的激素后可获得愈伤组织(表1),其中蔗糖浓度2%~3%,琼脂浓度0.7%,pH值为5.6~5.8。培养条件:培养箱温度(25±1)℃,光照时间12h/d,光照强度3000lx。将胚性愈伤组织每隔10d进行继代培养。

1.2.2 体细胞胚的诱导

将筛选的胚性愈伤组织转接至分化培养基上可诱导出大量的胚状体(表2)。隔天观察培养物,并对体细胞胚的诱导、生长进行评价,统计每块愈伤组织产生的体细胞胚、芽的数量。

1.2.3 体细胞胚成苗

将成熟胚分离,接种于无附加激素的MS培养基上或者附加浓度分别低于0.2 mg/L NAA和0.5mg/L 6-BA的MS培养基上,隔天观察植株发生情况。

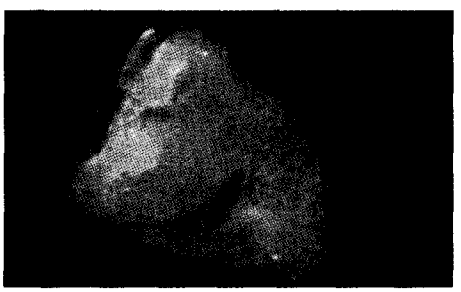

图1 绿色愈伤组织
Fig 1 Green callus

2 结果

2.1 愈伤组织的诱导

将无菌苗的鳞茎、叶柄和叶分别接种于诱导愈伤组织的培养基上,培养10d左右,接触培养基的边缘以

收稿日期:2007-04-18
作者简介:李耀亭(1980-),男,安徽阜阳人,在读硕士,从事植物生物技术研究。
基金项目:皖西学院自然科学基金青年项目,项目编号:WXZQ0411

维普资讯 http://www.cqvip.com

及两端维管束周围发生膨大现象并出现愈伤组织,诱导速度是:叶柄 > 叶 > 鳞茎,随培养时间延长,外植体整个表面出现愈伤组织。经筛选,MS + 1mg/L 6-BA + 0.5mg/L NAA 的培养基上诱导的愈伤组织为颗粒状胚性愈伤组织,并且能进一步分化和发育。在同时含有 NAA 和 6-BA 的培养基上,获得的愈伤组织呈绿色颗粒状(图1)。

2.2 胚性愈伤组织的继代培养和体细胞胚的分化

表1 不同外植体的愈伤组织诱导效果

Table 1 The result of the callus abduction on different explant

NAA	6-BA	鳞茎			叶柄			叶片		
(mg / L)	(mg / L)	接种数	愈伤数	诱导率(%)	接种数	愈伤数	诱导率(%)	接种数	愈伤数	诱导率(%)
0.5	1.0	20	20	100	20	20	100	20	20	100
0.5	0.5	20	20	100	20	20	100	20	20	100
0.5	0.2	20	20	100	20	20	100	20	18	90
0.5	0	20	20	100	20	20	100	20	12	60
0.2	1.0	20	19	95	20	19	95	20	6	30
0.2	0.5	20	16	80	20	18	90	20	5	25
0.2	0.2	20	15	75	20	17	85	20	3	15
0.2	0	20	10	50	20	14	70	20	2	10
0	0.5	20	1	0.5	20	4	20	20	0	0
0	0.2	20	0	0	20	3	15	20	0	0
0	0	20	0	0	20	0	0	20	0	0

经筛选,使用0.5mg/L NAA 能长期维持胚性愈伤组织的分化能力,并且能降低畸形胚的发生率。培养基 MS + 0.2mg/L NAA + 0.5mg/L 6-BA 为最适宜的分化培养基。在体细胞胚的诱导分化过程中,需要附加一定比例的6-BA,0.2mg/L NAA 能诱导大量的体细胞胚且畸形胚的发生率较低(图2)。

图2 大量体细胞胚发生

Fig 2 Massive somatic embryogenesis

2.3 体细胞胚成苗

将成熟胚(图3)转接于无激素或附加0 ~ 0.5mg/L 6-BA 以及 0 ~ 0.2 mg/L NAA 的 MS 培养基上,15d 左右发育成完整的植株(图4)。其中接种于无附加激素的 MS 培养基上,诱导根的生长势优于芽,而在附加 0.1 ~ 0.5mg/L 6-BA 和 0.1 ~ 0.2mg/L NAA 的 MS 培养基上,芽生长势较强(表2)。

图3 成熟体细胞胚

Fig 3 Mature embryoid

图4 体细胞胚发育成小植株

Fig 4 The plant morphogenesis from somatic embryogenesis

3 讨论

体细胞胚的发生是外源激素和内源激素综合作用的结果[7]。生长素是体细胞胚发生的重要条件[8]。在紫叶酢浆草的组织培养中,NAA 对体细胞胚的诱导作用是显著的,关键是其使用的浓度和存在时间的长短。在紫叶酢浆草体细胞胚发生的过程中,0.5mg/L NAA 有利于体细胞胚的进一步分化和发育,推测胚性愈伤组织经过诱导和驯化后已经产生了相应的内源激素。如果再继续使用原来浓度水平的生长素会对体细胞胚

维普资讯 http://www.cqvip.com

的分化起抑制作用[9]。为了促使体细胞胚进一步发育成苗,需将成熟胚转接至无激素或附加低0~0.1mg/L NAA的MS培养基中,如果此时仍采用较高浓度的NAA,将抑制生根,而且在愈伤组织的继代培养中若长期使用较高浓度的生长素,会造成大量的畸形胚,并且降低体细胞胚的诱导率,使愈伤组织的胚性逐渐丧失。说明生长素在体细胞胚发生和发育的不同阶段中的作用不是持续性的。

表2 NAA和6-BA对体细胞胚诱导和发育的影响

Table 2 Influence of NAA and 6-BA on embryos inducing and developing

NAA (mg/L)	6-BA (mg/L)	胚状体诱导率(%)	畸形胚发生率(%)	生长发育状况
0.5	1.0	60	30	生长迅速,易发育成苗
0.5	0.5	50	15	生长迅速,易发育成苗
0.5	0.2	45	15	生长迅速,易发育成苗
0.2	1.0	90	20	生长较迅速,易发育成苗
0.2	0.5	55	15	生长较迅速,易发育成苗
0.2	0.2	50	5	生长较迅速,易发育成苗
0.1	1.0	40	20	生长速度慢,不易发育成苗
0.1	0.5	30	20	生长速度慢,不易发育成苗
0.1	0.2	25	5	生长速度慢,易发育成苗
0	1.0	20	30	生长速度慢,不易发育成苗
0	0.5	20	30	生长速度慢,不易发育成苗
0	0.2	10	5	生长速度慢,不易发育成苗
0	0	40	5	生长速度慢,不易发育成苗

细胞分裂素在体细胞胚的发生和发育过程中起协同作用[10]。添加NAA的基本培养基中,当联用0.5~1mg/L的6-BA时,会大幅度提高体细胞胚的诱导率。而6-BA的使用浓度高于1mg/L时会产生玻璃化胚状体现象,同时抑制体细胞胚的进一步发育。单一添加6-BA也抑制体细胞胚的正常发育,说明在体细胞胚的发生发育过程中,生长素与细胞分裂素之间存在相互作用,单独使用生长素即可完成胚性愈伤组织的诱导,但在体细胞胚的进一步分化中,必须联用细胞分裂素。因此,推测生长素和细胞分裂素在体细胞胚的不同发育阶段起特定性作用。在体细胞胚的发育过程中,还发现疏松的颗粒状的愈伤组织容易诱导生成体细胞胚。

参考文献:

[1]张兴桃,高贵珍,方雪梅. 激素水平对三角紫叶酢浆草组织培养的影响[J]. 安庆师范学院学报,2006,12(2):96~100.

[2]王 利,王永清,张 帆. 三角紫叶酢浆草离体培养植株的再生研究[J]. 安徽农业科学,2005,33(2):238~239.

[3]余朝秀,李枝林,王玉英. 紫叶酢浆草鳞茎离体培养及快速繁殖研究[J]. 云南农业大学学报. 2004,19(4):433~435.

[4]半支莲. 紫叶酢浆草研究成果通过鉴定[J]. 中国花卉园艺,2002,(21):15.

[5]李 霖,宋宜颖,鲁润龙. 紫叶酢浆草的组织培养[J]. 植物生理学通讯,2002,38(4):360.

[6]裴新梧,王亚馥. 植物体细胞胚发生与作物育种[J]. 生物技术通报,2000,(5):15~17.

[7]萧浪涛,胡家金,邓秀新. 柑橘愈伤组织内源激素代谢与体细胞胚胎发生能力关系的研究[J]. 湖南农业大学学报,2001,27(3):197~199.

[8]肖显华,林荣双,王庆华,等. 2,4-D诱导的花生体细胞胚发生的组织学研究[J]. 植物学通报,1999,16(6): 691~695.

[9]崔凯荣,邢更生,周功克,等. 植物激素对体细胞胚胎发生的诱导和调节[J]. 遗传,2000,22(5):349.

[10]周俊彦,郭扶兴. 细胞分裂素类物质在植物体细胞胚发生中的作用[J]. 植物生理学通讯,1996,32(4): 247~253.

Study on inducing condition of somatic embryogenesis and embryoid growth of *Oxalis traingularis ASt. Hil.*

LI Yao-ting, CHEN Cun-wu

(Chemistry and Life-science Department, West Anhui University, Lu'an 237012, China)

Abstract: The effects of auxins and cytokinins on the process of somatic embryo genesis and embryoid growth of *Oxalis traingularis A. St. Hil.* by Tissue culture were studied. The results exclaimed that 0.5 mg/L NAA was the best concentration to induce embryonic callus. Certain ratio 6-BA will cooperate in the process of somatic embryo genesis. The plant would be regenerated when the somatic embryoid was transferred into the MS basal medium without plant hormones or with 0.2 mg/L NAA and 0.5 mg/L 6-BA. So a certain concentration of auxins was important to the induction of embryonic callus. Cytokinins were cooperative in the process of somatic embryo genesis and embryoid growth.

Keywords: *Oxalis traingularis A. St. Hil*; tissue culture; somatic embryoid