维普资讯 http://www.cqvip.com

车前不定芽直接诱导及再生体系的建立

曾建军[1],欧阳群[2],李晓红[1],解小红[1] (1.井冈山大学生命科学学院,江西吉安 343009;2.江西吉安一中,江西吉安 343000)

摘要 [目的]建立车前高效离体植株再生体系,为车前快速扩繁奠定基础。[方法]以车前无菌苗的下胚轴和子叶为外植体,以MS为基本培养基,研究了6-BA、NAA不同配比的培养基对车前下胚轴和子叶不定芽诱导的影响。[结果]MS培养基添加6-BA 2 mg/L,5~7 d的下胚轴不经过愈伤组织诱导阶段便可直接形成不定芽,不定芽诱导率为80%,每个外植体可产生7~8个不定芽。培养基中添加NAA促进不定芽的分化,但影响不定芽的诱导。6-BA与NAA配合使用时,外植体易分化愈伤组织。在添加NAA的MS培养基上,再生苗诱导生根频率为100%。将再生植株移栽于盆土中,可获得100%存活率,且生长良好。[结论]6-BA促进车前下胚轴直接分化不定芽,而NAA则影响不定芽的诱导,在不定芽诱导培养基中应避免添加NAA。

关键词 车前;下胚轴;子叶;不定芽直接诱导;组织培养
中图分类号 Q943.1　**文献标识码** A　**文章编号** 0517-6611(2008)05-01810-02

Direct Induction of Adventitious Buds and Establishment of Regeneration System in *Plantago asiatica* L.

ZENG Jian-jun et al (College of Life Science, Jinggangshan University, Ji'an, Jiangxi 343009)

Abstract [Objective] The research aimed to establish the high-effective plant regeneration system in vitro in *Plantago asiatica* L. and lay the foundation of rape propagation of *P. asiatica*. [Method] With the hypocotyls and leaves of P. asiatica aseptic seedlings as tested materials and MS as basic medium, the effect of the media with different matching of 6-BA and NAA on the induction of adventitious buds of hypocotyls and leaves of *P. asiatica*. [Result] The hypocotyls cultured on the MS medium with 2mg/L 6-BA alone for 5~7dcould directly differentiate into the adventitious buds without passing through callus induction stage and the induction of adventitious buds was 80 % and an average of 7~8 adventitious buds were obtained per explant. Adding NAA on the MS medium could promote adventitious root differentiation, but influence adventitious bud induction. When 6-BA was combined with NAA, the explants were easy to differentiate into callus. The rooting induction of regenerated seedlings cultured on the MS medium with NAA was 100 %. When the regenerated plants were transplanted into pots they could obtain the survival rate of 100 % and grow well. [Conclusion] 6-BA can promote hypocotyls of *P. asiatica* to directly differentiate into adventitious buds and NAA can influence adventitious bud induction, so NAA should be avoided to add on the medium of adventitious bud induction.

Key words *Plantago asiatica* L.; Hypocotyls; Leaves; Direct induction of adventitious buds

车前在江西吉安地区是传统的特种经济作物,然而自1990年以来,车前发生了严重的病害,尤其是车前草穗枯病(黑穗病)的危害逐年加剧,这种毁灭性病害严重损害了种植户的经济利益。利用基因工程技术将外源有益基因导入植物基因组中表达改良作物品质,是解决车前栽培中病虫危害的有效手段,而建立高效再生体系是叶盘法进行外源基因遗传转化的重要前期工作。李平等[1]、Mederos等[2-3]先后对大车前的微繁作了研究,以胚轴和叶片为外植体建立了大车前高效离体培养体系;王秀芝等[4]研究了平车前愈伤组织的诱导和继代培养;涂艺声[5]、王秀芝等[6]已初步建立吉安栽培车前离体再生体系,但该再生体系通过愈伤组织分化的植株在诱导过程中容易发生变异。为此,笔者以车前无菌苗的下胚轴和子叶为外植体,研究了不同激素和浓度配比对外植体不定芽直接诱导的影响,旨在建立高效离体植株再生体系,为车前快速扩繁和利用生物技术对其进行遗传改良奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 车前(江西省吉安县栽培种)。以MS为基本培养基,下胚轴及子叶分化培养基附加激素组合浓度如下:6-BA 1 mg/L,6-BA 2 mg/L,6-BA 1 mg/L+NAA 0.1 mg/L,6-BA 1 mg/L+NAA 0.5 mg/L,6-BA 2 mg/L + NAA 0.1 mg/L,6-BA 2 mg/L + NAA 0.5 mg/L,分别记为1号、2号、3号、4号、5号、6号。生根培养基为分别附加NAA 0.1、0.5、1.0 mg/L的MS培养基。培养基中添加3%蔗糖及0.8%琼脂,pH值5.8,温度(25±2)℃,光强2 000 lx,每天16 h光/8 h暗的光周期条件下培养。

1.2 方法

1.2.1 不定芽诱导,取车前种子用洗衣粉浸泡30 min,流水冲洗约1 h,转入超净工作台用浓度70%酒精浸泡30 s,无菌水冲洗1次。再用浓度0.1%升汞表面消毒6~8 min,倾去药液,再用无菌水漂洗6~8次,以灭过菌的滤纸吸干材料上的水滴。消过毒的种子在无菌条件下接种到不含激素的MS基本培养基上,暗培养5 d后转移至光下培养。待无菌苗长出15 d后,切取下胚轴1~2 cm的小段,子叶外植体剪成约0.5 cm^2,接种到含不同激素配比的培养基上。观察和记录试验情况,4周后计算不定芽诱导率。

1.2.2 再生苗的生根、炼苗与移栽。将生长高度3 cm以上的再生苗从外植体上切下,当幼苗产生3~5条发达的根系后,移去封口膜,敞开瓶盖,炼苗4 d,选取生长健壮的再生植株,洗净根部残留的培养基,移栽于塑料盆钵中,自然光下保湿培养。

2 结果与分析

2.1 不同激素组合对下胚轴不定芽诱导的影响 接种8~10 d左右,1、2号培养基,外植体切口处及中段膨大,14~17 d后有绿色芽点产生(图1)。2周后3~6号培养基中下胚轴也见膨大,并且绿色愈伤组织开始分化芽点。培养基激素组合与浓度配比不同,对下胚轴不定芽的诱导效果有较大差异。单独使用6-BA时下胚轴不定芽诱导时间早,且6-BA浓度为2 mg/L时不定芽诱导率最高为80%(表1),当配合NAA使用时,外植体易分化愈伤组织,且NAA浓度越高愈伤化程度越深;随继代培养时间增加,在添加NAA的培养基中外植体极易分化不定根,影响不定芽的分化。

2.2 不同激素组合对子叶不定芽诱导的影响 将无菌苗

作者简介 曾建军(1973-),女,江西井冈山人,硕士,副教授,从事植物生物技术研究。
收稿日期 2007-10-22

维普资讯 http://www.cqvip.com

注:1为下胚轴直接诱导不定芽;2为不定芽诱导;3为生根苗。

Note: 1: Adventitious bud directly induced by hypocotyls; 2: Induction of adventitious bud; 3: Seedlings with roots.

图1　车前不定芽直接发生再生体系

Fig. 1　Regeneration system of direct induction of adventitious bud in Plantago asiatica L.

表1　不同激素浓度对下胚轴不定芽诱导的影响

Table 1　Effects of hormone concentrations on induction of adventitious bud in hypocotyls

培养基序号 No. of culture medium	接种外植体数 No. of inoculated explants	平均诱导率//% Average induction rate
1	24	73
2	27	80
3	22	32
4	24	2
5	23	20
6	25	3

子叶接种到不同培养基中培养,8 d后子叶切口处开始膨大,15 d后子叶切口分化出绿色愈伤组织(图1),但一直未见愈伤组织分化不定芽。随培养时间延长,由切口处分化的愈伤组织逐渐褐化,部分直接分化大量不定根。

2.3　不定芽诱导生根情况　不定芽形成的再生苗在附加不同浓度NAA的MS培养基上生长14 d后统计生根情况,结果发现车前再生苗生根非常容易(图1),3种生根培养基中不定芽均分化大量生长健壮的不定根。因此,用MS+NAA 0.1 mg/L作为车前不定芽诱导不定根的培养基较适宜。

2.4　炼苗与移栽情况　将生根培养基上生长20 d左右、根系发达、生长健壮的小苗,敞开瓶盖炼苗,然后移栽于盆土中,结果再生植株成活率为100%,生长良好,未见形态异常。

3　结论与讨论

由于细胞结构及生理状态等不同,植物不同器官对植物激素的反应可能不一样[7-8]。该试验表明,6-BA能促进车前下胚轴直接分化不定芽,而对子叶直接分化不定芽无明显促进作用。在添加NAA的培养基中,车前下胚轴和叶片都极易形成愈伤组织并再分化形成不定根,影响不定芽的诱导,所以在不定芽诱导培养基中应避免添加NAA,这可能与车前离体组织本身含有内源生长素有关。

愈伤组织的细胞生长速度较快,细胞周期短,染色体发生变异的机率大,所以由愈伤组织分化的植株容易发生变异,在生产中的应用具有局限性。该试验中形成的不定芽未经过愈伤组织阶段,而是通过诱导由下胚轴直接产生的。由器官直接分化的不定芽发生变异的机率小,能够保持无菌苗的优良性状,为吉安栽培车前通过基因工程技术培育新抗病品种建立了一条高效离体培养体系。

参考文献

[1] 李平,陈华,李银心.大车前体外再生体系的建立和优化[J].生物工程学报,2005(6):64-70.

[2] MEDEROS S,MENDEZ M. Tissue culture studies on *Plantago major* L.:Use of shoot tip explants.*In vitro* plant.*In vitro* cell[J]. Development Biolog,1991,27:386.

[3] MENEROS S,MARTIN C,NAVARRO E,et al.Micropropagation of amedicinal plant *Plantago major* L.[J].Biologia Plantarum,1997,40(3):465-468.

[4] 王秀芝,张谦鹏,郭善利.平车前愈伤组织的诱导和继代培养[J].聊城师范学院学报:自然科学版,1997,10(2):82-85.

[5] 涂艺声.车前的离体培养和植株再生[J].江西科学,1995,3(13):149-152.

[6] 王秀芝,王琳,侯信营.车前的组织培养和植株再生[J].植物生理学通讯,1998,34(3):204.

[7] 薛建平,柳俊,蒋细旺.药用植物生物技术[M].合肥:中国科学技术大学出版社,2005:3.

[8] 潘瑞炽.植物组织培养[M].广州:广东高等教育出版社,2000:8.

(上接第1809页)

[37] 刘东明,伍有声,董祖林,等.木兰科植物主要害虫调查初报[J].江苏林业科技,2003,30(6):26-36.

[38] 林新春,蒋伦伟,蒋鸟琴.7属11种木兰科植物的过氧化物酶同工酶分析[J].江西林业科技,2004(4):6-7.

[39] 傅大立,赵东欣,孙金花,等.10种国产玉兰属植物挥发油成分及系统学意义[J].林业科学,2005,41(3):68-74.

[40] 刘明哲,邹玉红,陈晓辉,等.RP-HPLC法测定厚朴中厚朴碱[J].中草药,2006,37(5):775-776.

[41] 邓世明,程永现,周俊,等.长缘厚朴中的新苯醌及新木脂素类化合物[J].云南植物研究,2001,23(1):121-125.

[42] 陈笈,王伯初.厚朴的药理研究进展[J].重庆大学学报,2005,28(9):136-139.

[43] 刘虹,地力拜尔,姚志道.五味子抗氧化作用的研究与临床应用展望[J].新疆医学,2005,35(4):137-139.

科技论文写作规范——数字

公历世纪、年代、年、月、日、时刻和各种计数和计量,均用阿拉伯数字。年份不能简写,如1990年不能写成90年,文中避免出现"去年"、"今年"等写法。小于1的小数点前的零不能省略,如0.245 6不能写成.245 6。小数点前或后超过4位数(含4位数),从小数点向左右每3位空半格,不用","隔开。如18 072.235 71。尾数多的(5位以上)的数字和小数点后位数多的小数,宜采用$\times 10^n$(n为正负整数)的写法。数字应正确地写出有效数字,任何一个数字,只允许最后一位存在误差。