

2,4-D 对石刁柏愈伤组织诱导的影响

鲁旭东², 萧浪涛^{*}, 刘素纯, 刘华英, 陈小飞

(1. 湖南农业大学湖南省植物激素与生长发育重点实验室, 湖南长沙 410128; 2. 孝感学院生命科学技术学院, 湖北孝感 432000)

摘要 以石刁柏嫩茎为材料, 研究了 2,4-D 对其初始愈伤组织诱导和胚性愈伤组织发生的影响。结果表明: 仅仅只有 2,4-D 不能诱导石刁柏初始愈伤组织的发生; 胚性愈伤组织的诱导需要高浓度的 2,4-D, 其最佳激素组合为 2,4-D 10 ng/L + NAA 0.5 ng/L。

关键词 石刁柏; 植物激素; 胚性愈伤组织

中图分类号 Q945.51 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2006)21-5546-03

Effect of 2,4-D on Callus Induction in *Asparagus officinalis* L.

LU Xu-dong et al (Key Lab of Hunan Provincial Phytohormones and Growth Development, HNAU, Changsha, Hunan 410128)

Abstract We studied effect of 2,4-D on initial callus inducing and embryogenic callus occurring from *Asparagus tender stem* culture. The results indicated callus was not induced if there was only 2,4-D in the medium. High concentration of 2,4-D in the medium was suitable for embryogenic callus occurring. The best hormone combination of embryogenic callus inducing was 2,4-D 10 ng/L + NAA 0.5 ng/L.

Key words *Asparagus*; Phytohormone; Embryogenic callus

植物组织培养中, 愈伤组织的形成是一个植物材料、培养基成分和培养条件诸因素之间相互作用的复杂过程, 其中外源植物生长物质的种类和浓度是愈伤组织诱导能否成功的关键因素。石刁柏不仅是风味独特的名贵蔬菜, 且具有保健作用, 在国内外市场上很受人们的欢迎, 被誉为世界十大名贵蔬菜之一。前人对石刁柏的离体培养已作过较多的研究^[1-5], 但基因型不同的品种其离体培养具有很大的特异性。关于 2,4-D 对石刁柏初始愈伤组织诱导和胚性愈伤组织发生的研究还少见报道。笔者以优良的石刁柏栽培品种 UC800 为材料, 研究了 2,4-D 对其初始愈伤组织诱导和胚性愈伤组织发生的影响, 以期对石刁柏的植株再生和遗传转化以及种质保存奠定基础。

1 材料与方

1.1 材料 以湖南农业大学植物激素与生长发育重点实验室从美国引种栽培的石刁柏优良品种 UC800 为材料, 取其嫩茎作为外植体。

1.2 方法 初始愈伤组织诱导培养基为: 1. MS(无激素); 2. MS + 2,4-D 1 ng/L(单位下同); 3. MS + 2,4-D 2; 4. MS + 2,4-D 1 + BA 0.5; 5. MS + 2,4-D 2 + BA 0.5; 6. MS + 2,4-D 1 + KT 0.5; 7. MS + 2,4-D 2 + KT 0.5。胚性愈伤组织诱导培养基为: 1. MS + 2,4-D 2; 2. MS + 2,4-D 5; 3. MS + 2,4-D 10; 4. MS + 2,4-D 15; 5. MS + 2,4-D 20; 6. MS + 2,4-D 2 + NAA 0.5; 7. MS + 2,4-D 5 + NAA 0.5; 8. MS + 2,4-D 10 + NAA 0.5; 9. MS + 2,4-D 15 + NAA 0.5; 10. MS + 2,4-D 20 + NAA 0.5。

上述各种培养基均附加 3% 蔗糖, 0.8% 琼脂, pH 值 5.8。

取生长健壮、直径约 0.5 cm 的石刁柏嫩茎, 去苞叶和顶芽, 用 0.1% 升汞消毒 8~10 min, 无菌水洗 4 次, 无菌滤纸吸干表面水分, 将其切成 0.5 cm 的切段, 再纵切成两半, 切口朝下接种到上述各种初始愈伤组织诱导培养基上, 诱导初始愈伤组织, 并观察外植体脱分化和愈伤组织生长情况; 至培养后 25 d, 观察统计初始愈伤组织的诱导率和生长情况。

培养条件为: 光照 12 h/d, 光照强度 2 000 lx, 温度 (25 ± 1)。

将培养 25 d、绿色、致密、坚硬的初始愈伤组织切成 0.5 cm³ 的小块, 切口朝下接种到上述胚性愈伤组织诱导培养基上进行诱导。培养条件为: 光照 12 h/d, 光照强度 2 000 lx, 温度 (25 ± 1)。至培养后 50 d, 观察统计胚性愈伤组织的诱导率和生长情况。

2 结果与分析

2.1 2,4-D 对石刁柏初始愈伤组织诱导的影响 各种处理下初始愈伤组织的诱导及生长情况见表 1。表 1 表明, 2,4-D 对石刁柏嫩茎的启动培养和初始愈伤组织的诱导有较大的影响。在无激素的 1 号培养基上, 石刁柏 UC800 嫩茎不膨大, 至培养后 30 d, 也未见愈伤组织形成(图 1-1), 说明石刁柏 UC800 嫩茎的启动培养需要外源植物生长物质。但在仅仅只有 2,4-D 的 2、3 号培养基上, 石刁柏嫩茎的表现与在无激素的 1 号培养基上的表现基本相同, 外植体不膨大, 也不能诱导出初始愈伤组织(图 1-2, 3), 说明仅仅只有 2,4-D 也不能诱导石刁柏嫩茎的启动培养, 这与其他单子叶植物对 2,4-D 的反应有所不同, 也与其他石刁柏品种对 2,4-D 的反应不一样。说明植物组织培养由于遗传背景的不同具有很大的特异性。在 4、5、6、7 号培养基上, 石刁柏嫩茎都能够诱导出初始愈伤组织, 且诱导率都达到了 100%, 但以 7 号培养基上石刁柏初始愈伤组织的生长状况较好。在 7 号培养基上, 石刁

表 1 不同激素组合对石刁柏初始愈伤组织形成的影响

激素组合	接种数/块	膨大/d	愈伤组织/d	诱导率/%	生长状况
1	100	-	-	-	-
2	100	-	-	-	-
3	100	-	-	-	-
4	100	3	8	100	++
5	100	3	8	100	++
6	100	3	8	100	++
7	100	3	8	100	+++

注: 表中数据为 3 次试验的平均值; +++ 表示生长良好, ++ 表示生长一般, - 表示不生长。

柏嫩茎接种后 3 d 即开始发生变化, 首先是茎段的中部稍有膨大, 培养后 7 d 膨大已非常明显, 并在切段的两端部开始有绿色初始愈伤组织出现, 培养后 8 d 在切段的两端部已形成

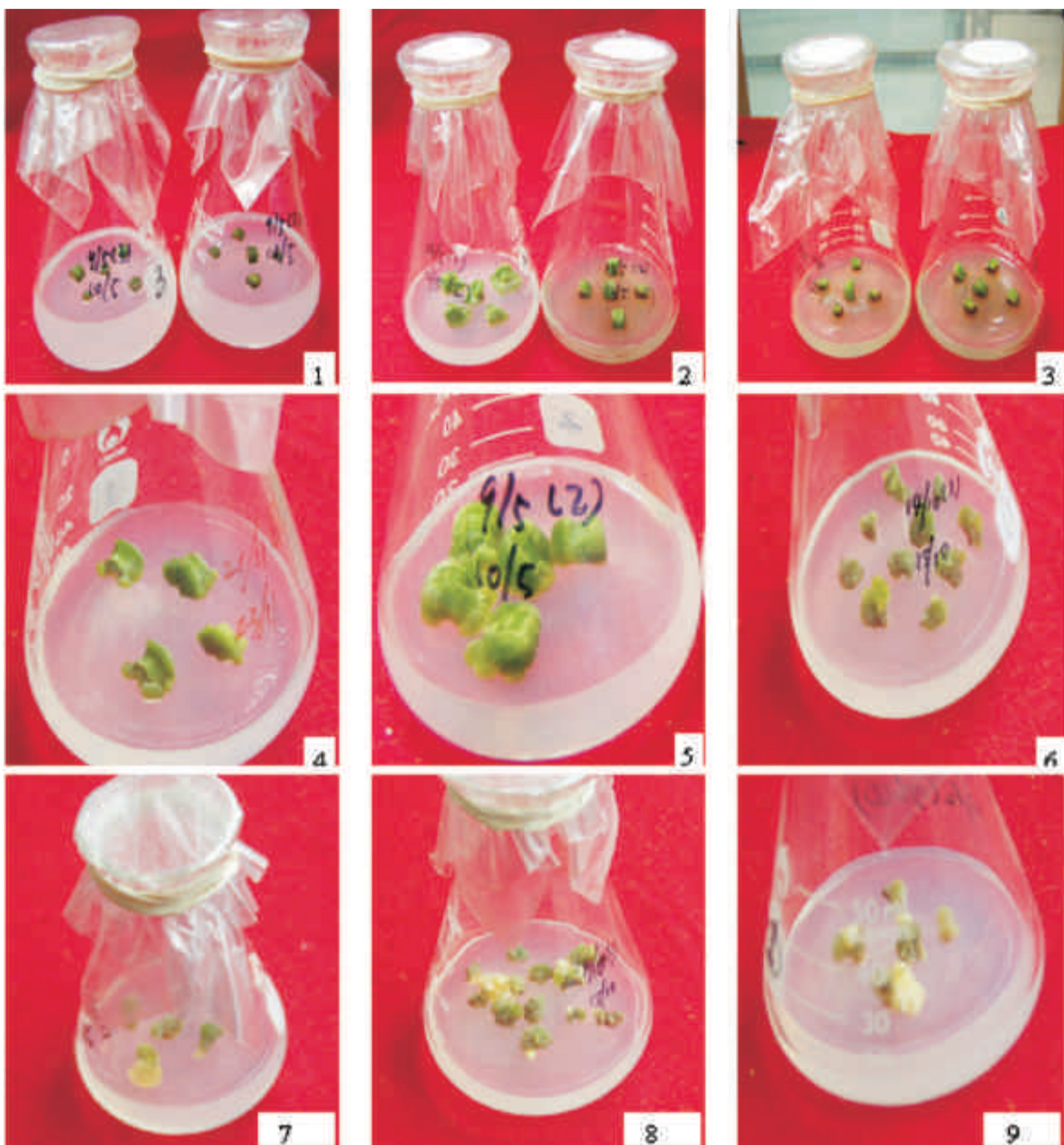
基金项目 国家教育部青年骨干教师基金资助项目[教科司 2000(65)]。

作者简介 鲁旭东(1962-), 男, 湖北孝昌人, 副教授, 从事植物生理学的教学与研究工作。* 通讯作者, E-mail: ltxiao@hnau.net。

收稿日期 2006-09-21

一薄层绿色愈伤组织(图1-4),培养后15~25 d,愈伤组织生长加快,形成瘤状、表面光滑、致密、坚硬的绿色愈伤组织,覆盖整个茎段(图1-5),培养后30 d 愈伤组织生长量达到最大,

以后生长逐渐变得缓慢,并从愈伤组织的边缘开始出现褐化,因此,初始愈伤组织在培养后25 d 需在相同培养基上进行继代培养。



注:1.1 号培养基上外植体;2.2 号培养基上外植体;3.3 号培养基上外植体;4,5,7 号培养基上诱导的初始愈伤组织;6,7,8 号培养基上诱导的非胚性愈伤组织;8,9.8 号培养基上诱导的胚性愈伤组织。

图1 石刁柏愈伤组织的诱导

2.2 2,4-D 对石刁柏胚性愈伤组织诱导的影响 各种处理下的胚性愈伤组织诱导和生长情况见表2。初始愈伤组织接

表2 各种处理下胚性愈伤组织诱导和生长情况

激素组合	接种数	块	诱导率 %	生长状况
1	100		-	-
2	100		11	++
3	100		21	++
4	100		17	++
5	100		13	++
6	100		-	-
7	100		18	+++
8	100		42	++++
9	100		28	+++
10	100		23	+++

注:表中数据为3次试验的平均值;++++表示生长良好,+++表示生长好,++表示生长一般,-表示不生长。

种到上述各种胚性愈伤组织诱导培养基后,愈伤组织增殖很慢,只是在原愈伤组织块表面很缓慢地长出一层新的愈伤组织,有些愈伤组织块甚至出现死亡现象,培养的前30 d,表现为愈伤组织的缓慢增殖,且全为非胚性愈伤组织(图1-6),并有团块状的非胚性愈伤组织形成(图1-7),40 d 时开始有很少量的黄色、细颗粒状、松散的胚性愈伤组织形成(图1-8)。以后胚性愈伤组织会逐渐增多,增殖逐渐加快,至培养后60 d 可形成较多的胚性愈伤组织(图1-9)。

3 讨论

外植体的启动培养是植物组织培养的第一步,不同的植物种类、同一植物的不同品种、不同的外植体,其启动培养所需的外界条件都不相同。于倩^[6]等的研究表明,不同种类的激素及其组合对山药愈伤组织的诱导和增殖具有明显的影响。有研究表明,外源植物生长物质中,2,4-D 对马蹄莲愈伤

组织的诱导和繁殖具有显著的影响,马蹄莲愈伤组织诱导的关键不在于外植体的来源,而与培养基中生长物质的组合有关。王铖等^[7]的研究指出,在不同种类和浓度的激素条件下,高羊茅种子愈伤组织的诱导率存在很大的差异,同时指出2,4-D是诱导高羊茅种子愈伤组织的关键因素。在该实验中,笔者以石刁柏 UC800 嫩茎作为外植体,对其脱分化和愈伤组织的生长进行了研究。结果表明,石刁柏 UC800 嫩茎外植体的启动培养和初始愈伤组织的生长需要外源植物生长物质,但培养基中仅仅只附加2,4-D 1种外源植物生长物质,同样不能诱导出初始愈伤组织。说明对单子叶植物愈伤组织有特殊诱导效应的2,4-D单独使用时不能使 UC800 启动培养,必需有其他植物生长物质配合使用才能完成 UC800 的脱分化过程。

胚性愈伤组织既是诱导体细胞胚发生的重要材料,同时又是种质资源离体保存、原生质体培养、外源基因转化以及体细胞融合的理想材料,因此研究胚性愈伤组织的诱导具有十分重要的意义。徐春香等^[8]研究发现,香蕉胚性愈伤组织的诱导率与基因组类型、品种和培养条件等因素有关。王家福等^[9]研究表明,不同的基本培养基对枇杷胚性愈伤组织的诱导有较大的影响,不同生长调节剂组合和碳源对胚性愈伤组织的形成有较大的影响,蔗糖作为碳源,有利于愈伤组织的生长。明凤等^[10]的研究也证明,外植体与基因型共同作用影响胚性愈伤组织的发生率。谢海燕等^[11]的研究也表明,2,4-D对狗牙根颖果胚性愈伤组织的诱导有显著的影响。范永梅等^[12]的研究证实,硝酸银不能促进冰糖橙未发育胚珠胚性愈伤组织的形成。在该研究中笔者发现,2,4-D是诱导石刁柏 UC800 胚性愈伤组织的关键因素,石刁柏 UC800 胚性愈伤组织的诱导需要高浓度的2,4-D,当2,4-D浓度达到10 mg/L时,胚性愈伤组织的诱导率最高,这与石刁柏其他品种胚性愈伤组织的诱导存在很大的差异,在其他植物上也鲜有报道。低浓度的2,4-D不能诱导石刁柏胚性愈伤组织的

生成,但浓度过高对愈伤组织的诱导也有抑制作用。在2,4-D IAA等生长素类植物生长物质中,2,4-D的诱导效果最好。但2,4-D单独使用时,诱导胚性愈伤组织的效果并不显著,而当2,4-D与NAA配合使用时,诱导效果明显增强,最佳激素组合为2,4-D 10 mg/L + NAA 0.5 mg/L。试验还发现,2种细胞分裂素类的植物生长物质中,BA对愈伤组织的生长有明显的促进作用,但对胚性愈伤组织的诱导却有抑制作用。凡诱导培养基中附加有BA,则不能诱导胚性愈伤组织的产生,但愈伤组织却能旺盛生长。2,4-D与KT的组合虽然能诱导胚性愈伤组织的产生,但诱导效果比2,4-D与NAA组合差。这些试验结果表明,胚性愈伤组织的诱导与基因型、外植体、激素种类和激素组合有密切的关系。

参考文献

- [1] 赵洁,程井辰,熊进,等.石刁柏愈伤组织根和芽分化过程中POD和SOD活性的变化[J].武汉植物学研究,1997,15(1):49-53.
- [2] 汪丽虹,王星,崔凯荣,等.石刁柏及党参体细胞胚发生过程中的淀粉代谢动态[J].植物学通报,1996,13(1):41-45.
- [3] 沈汉清,刘秋华,柯彤.石刁柏体细胞胚的培养与植株再生研究[J].福建农业学报,1996,11(2):21-24.
- [4] 汪丽虹,崔凯荣,白志根,等.石刁柏非胚性细胞和胚性细胞的超微结构及AMP酶的定位[J].兰州大学学报:自然科学版,1996,32(4):123-127.
- [5] 荣一兵,赵洁,程井辰.石刁柏愈伤组织类型与形态发生的关系[J].华中师范大学学报,1996,30(3):320-326.
- [6] 于倩,李明军.怀山药微型块茎愈伤组织的诱导形成及高频率再生[J].生态学报,2004,24(5):1022-1026.
- [7] 王铖,李青,辛燕.高羊茅种子愈伤组织诱导及植株再生研究[J].北京林业大学学报,2004,26(1):66-69.
- [8] 徐春香,陈厚彬,李建国,等.从香蕉胚性细胞悬浮系获得再生植株[J].植物生理学通讯,2004,40(2):161-163.
- [9] 王家福,刘月学.枇杷胚性愈伤组织的诱导和保存[J].福建农业大学学报,2000,29(3):305-310.
- [10] 明凤,李文雄.小麦胚性愈伤组织发生影响因素的研究[J].东北农业大学学报,2000,31(1):1-6.
- [11] 谢海燕,毛碧增,单兰兰,等.狗牙根颖果胚性愈伤组织的诱导和胚性细胞的超微结构及植株再生[J].植物生理与分子生物学学报,2004,30(2):209-215.
- [12] 范永梅,李东栋,甘霖.硝酸银对冰糖橙胚性愈伤组织诱导的影响[J].湖南农业大学学报,2003,29(4):338-340.