

胡伟,陈豫,伍洋. 不同激素浓度配比对萝卜愈伤组织形成的影响[J]. 江苏农业科学,2014,42(7):60-62.

不同激素浓度配比对萝卜愈伤组织形成的影响

胡伟,陈豫,伍洋

(宜宾学院生命科学与食品工程学院,四川宜宾 644000)

摘要:以萝卜直根形成层为试验材料,比较不同激素 NAA、2,4-D 和 6-BA 浓度配比对萝卜外植体形成愈伤组织诱导率和质量的影响。结果表明:(1)与不添加任何激素相比,不同激素浓度配比对萝卜愈伤组织诱导效果明显。(2)6-BA 分别与 NAA、2,4-D 配比诱导萝卜愈伤组织的比较表明,2,4-D 较 NAA 更适于诱导萝卜愈伤组织。(3)6-BA 与 2,4-D 浓度均为 0.050~0.075 mg/mL 的对比对萝卜愈伤组织诱导效果最好。

关键词:萝卜;激素;直根;愈伤组织;诱导率

中图分类号: Q943.1;S631.104⁺.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)07-0060-03

萝卜(*Raphanus sativus*)是中国主要的大众化蔬菜作物之一,在民间有“小人参”之美称,具有较高的食用价值和医用价值。萝卜采用常规育种手段需时长且劳动强度大,通过组织培养能够大量扩繁原种,并能更好地保持萝卜良种的性状。关于萝卜组织培养的研究,国内外都有大量报道^[1-9],但大多数研究中应用的激素种类比较单一,外植体的类型从萝卜的带柄子叶、子叶、下胚轴、花药等进行研究,但未涉及外植体萝卜根部对愈伤组织的影响。本试验旨在研究不同激素浓度配比下,以萝卜根部形成层为外植体进行愈伤组织的培养,分析不同激素配比对萝卜愈伤组织形成的影响及愈伤组织的生长情况,找出萝卜组织培养过程中适宜的激素配比浓度范围,为萝卜的组培技术提供理论参考。

收稿日期:2014-04-01

基金项目:发酵资源与应用四川高校重点实验室项目(编号:2012KFJ002);宜宾学院青年基金(编号:2012Q14)。

作者简介:胡伟(1981—),男,宁夏吴忠人,硕士,讲师,主要从事有机农业及作物生产系统模拟与决策研究。E-mail:wh_1981225@163.com

通信作者:陈豫,博士,副教授,主要从事农村沼气及生态农业研究。E-mail:chenyu@nwsuaf.edu.cn。

[35] Zhuang F L, Fuchs R T, Sun Z Y, et al. Structural bias in T4 RNA ligase-mediated 3'-adapter ligation[J]. Nucleic Acids Research, 2012, 40(7): e54.

[36] Langmead B, Trapnell C, Pop M, et al. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome[J]. Genome Biology, 2009, 10(3): R25.

[37] Li R Q, Yu C, Li Y R, et al. SOAP2: an improved ultrafast tool for short read alignment[J]. Bioinformatics, 2009, 25(15): 1966-1967.

[38] Li Heng, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform[J]. Bioinformatics, 2009, 25(14): 1754-1760.

[39] Bagijn M P, Goldstein L D, Sapetschnig A, et al. Function, targets, and evolution of *Caenorhabditis elegans* piRNAs[J]. Science, 2012, 337(694): 574-578.

1 材料与方法

1.1 试验材料

选用生长健壮、体型匀称、表面无伤痕的市场销售的新鲜萝卜。试验所用的 3 种激素为分裂素 6-BA(6-苄氨基嘌呤)和生长素 2,4-D(2,4-二氯苯氧乙酸)、NAA(萘乙酸)。

1.2 试验方法

1.2.1 诱导培养基的配制 在 MS 培养基中添加 3% 蔗糖、0.8% 琼脂和不同激素浓度配比(表 1),作为本试验诱导愈伤组织的培养基。配制好培养基后,用 0.1 mol/L 的 NaOH 或 0.1 mol/L 的 HCl 溶液在灭菌前将培养基 pH 值调至 5.8~6.0,然后将培养基分装到 100 mL 的三角培养瓶中,用封口膜封好瓶口,在 121℃ 下湿热灭菌 30 min,灭菌后冷却待用。

1.2.2 愈伤组织的诱导 用自来水将萝卜直根表面污物冲洗干净,用小刀切成小段放入烧杯中。先用 75% 乙醇对萝卜小段消毒 5 min,用无菌吸水纸吸干,再用 0.2% 氯化汞溶液消毒 3 min,放入无菌水中漂洗 2~3 次,用无菌吸水纸吸干。在无菌操作台上操作,把消毒好的萝卜直根放入无菌培养皿中,用消毒好的解剖剪将萝卜的形成层切成 0.5 cm³ 左右的小块,置于含有不同激素浓度配比的愈伤组织诱导培养基上,25℃ 暗培养,无需光照。外植体培养每隔 3~5 d 观察 1 次,

[40] Vaucheret H. MicroRNA-dependent trans-acting siRNA production[J]. Science's STKE, 2005(30): pe43.

[41] Hammell M, Long D, Zhang L, et al. MirWIP: microRNA target prediction based on microRNA-containing ribonucleoprotein-enriched transcripts[J]. Nature Methods, 2008, 5(9): 813-819.

[42] Betel D, Koppal A, Agius P, et al. Comprehensive modeling of microRNA targets predicts functional non-conserved and non-canonical sites[J]. Genome Biology, 2010, 11(8): R90.

[43] Bu D C, Yu K T, Sun S L, et al. Noncode v3.0: integrative annotation of long noncoding RNAs[J]. Nucleic Acids Research, 2012, 40: D210-D215.

[44] Deana A C, Belasco J G. The bacterial enzyme RppH triggers messenger RNA degradation by 5' pyrophosphate removal[J]. Nature, 2008, 451(7176): 355-358.

并记录萝卜切块愈伤组织的产生情况,25 ~ 30 d 后统计诱导率,计算公式如下:诱导率 = 形成愈伤组织的外植体数/接种的外植体数 × 100%。

2 结果与分析

2.1 不添加任何激素时萝卜愈伤组织的诱导率

在不添加任何激素的 MS 培养基上,萝卜愈伤组织诱导率为 6%,且愈伤组织出现的时间较晚,大约为 19 d,其形态为白色疏松状(表 2)。

2.2 不同浓度 6-BA 和 NAA 配比对萝卜愈伤组织诱导率的影响

由表 2(MS2 至 MS17)可以看出,无菌根形成层接种到不同浓度 6-BA 和 NAA 配比的 MS 培养基中,大部分培养基上的根在接种后 4 d 少部分膨大,1 周后全部膨大,大多数外植体在 14 d 后开始出现愈伤组织,愈伤组织颜色为淡黄色,质地较为紧密。与不添加任何激素相比,萝卜愈伤组织诱导率有了明显的提高,且愈伤组织出现的时间缩短了 5 d。当

6-BA 和 NAA 浓度均为 0.025 mg/mL 时其诱导率最低,为 20%;当 NAA 为 0.075 mg/mL,6-BA 浓度为 0.1 mg/mL 时,愈伤组织诱导率最高,为 31%。同时可以看出,6-BA 和 NAA 配比下,当 NAA 浓度不变时,随着 6-BA 浓度增大,萝卜愈伤组织的诱导率明显增大。

2.3 不同浓度 6-BA 和 2,4-D 配比对萝卜愈伤组织诱导率的影响

由表 2(MS18 至 MS33)可以看出,添加不同浓度 6-BA 与 2,4-D 配比的 MS 培养基对萝卜外植体进行培养,大约在 10 d 后开始出现愈伤组织,愈伤组织颜色为淡黄色,质地较为紧密。与不添加任何激素相比,萝卜愈伤组织诱导率有了明显的提高,且愈伤组织出现的时间缩短了 9 d。当 6-BA 和 2,4-D 浓度均在 0.050 ~ 0.075 mg/mL 时,愈伤组织诱导率在 40% 以上,在此范围内,随着激素浓度的升高,诱导率也随之升高;但超过其浓度临界点以后,诱导率随着激素浓度的升高有一定下降。

表 1 诱导愈伤组织培养基激素组成

编号	激素浓度(mg/L)			编号	激素浓度(mg/L)			编号	激素浓度(mg/L)		
	6-BA	NAA	2,4-D		6-BA	NAA	2,4-D		6-BA	NAA	2,4-D
MS1	0	0	0	MS1	0	0	0	MS1	0	0	0
MS2	0.025	0.025	0	MS18	0.025	0	0.025	MS34	0	0.025	0.025
MS3	0.050	0.025	0	MS19	0.050	0	0.025	MS35	0	0.050	0.025
MS4	0.075	0.025	0	MS20	0.075	0	0.025	MS36	0	0.075	0.025
MS5	0.100	0.025	0	MS21	0.100	0	0.025	MS37	0	0.100	0.025
MS6	0.025	0.050	0	MS22	0.025	0	0.050	MS38	0	0.025	0.050
MS7	0.050	0.050	0	MS23	0.050	0	0.050	MS39	0	0.050	0.050
MS8	0.075	0.050	0	MS24	0.075	0	0.050	MS40	0	0.075	0.050
MS9	0.100	0.050	0	MS25	0.100	0	0.050	MS41	0	0.100	0.050
MS10	0.025	0.075	0	MS26	0.025	0	0.075	MS42	0	0.025	0.075
MS11	0.050	0.075	0	MS27	0.050	0	0.075	MS43	0	0.050	0.075
MS12	0.075	0.075	0	MS28	0.075	0	0.075	MS44	0	0.075	0.075
MS13	0.100	0.075	0	MS29	0.100	0	0.075	MS45	0	0.100	0.075
MS14	0.025	0.100	0	MS30	0.025	0	0.100	MS46	0	0.025	0.100
MS15	0.050	0.100	0	MS31	0.050	0	0.100	MS47	0	0.050	0.100
MS16	0.075	0.100	0	MS32	0.075	0	0.100	MS48	0	0.075	0.100
MS17	0.100	0.100	0	MS33	0.100	0	0.100	MS49	0	0.100	0.100

2.4 不同浓度 NAA 和 2,4-D 配比对萝卜愈伤组织诱导率的影响

由表 2(MS34 至 MS49)可以看出,添加不同浓度 NAA 和 2,4-D 的 MS 培养基对萝卜外植体进行培养,大约在 13 d 后开始出现愈伤组织,愈伤组织颜色为白色,质地较为疏松。当 NAA 和 2,4-D 浓度为 0.025 mg/mL 时,诱导率最低,为 19%;当 NAA 和 2,4-D 浓度为 0.1 mg/mL 时,萝卜愈伤组织诱导率最高,为 41%;当 NAA 的浓度保持不变时,在 0.025 ~ 0.1 mg/mL 范围内,提高 2,4-D 的浓度,萝卜愈伤组织的诱导率有缓慢的提高。

3 结论与讨论

植物组织培养中,影响植物愈伤组织诱导的因素很多,主要有基因型、培养基、光照、温度、外植体、激素等因素^[7-14]。

这些因素的调控非常复杂,即使同一因素对不同植物愈伤组织的诱导均有不同的效应,甚至同一植株的不同部位、同一部位不同的发育时期效应均不同。一般认为,培养基中激素的种类、用量和配比,对诱发小孢子启动、分裂、生长和分化具有作用^[5]。本试验以萝卜的根为外植体时,在不添加任何激素的 MS 培养基上,萝卜愈伤组织诱导率很低,且愈伤组织出现的时间较晚,其形态为白色疏松状;但在不同激素浓度配比的 MS 培养基上萝卜愈伤组织诱导率有了大幅度提高,且愈伤组织出现的时间较早。在含有 6-BA 的培养基上诱导出的愈伤组织质地较为紧密,颜色为淡黄色,无 6-BA 的培养基上诱导出的愈伤组织质地较为疏松,颜色为白色。王玲等认为培养基中外源激素的种类、浓度及组合对培养材料的褐变起着重要作用^[15]。张海兰等研究黑松的愈伤组织认为,加入细胞分裂素 6-BA 不仅不能促进愈伤组织的生长,还使其褐

表 2 不同激素配比对萝卜愈伤组织诱导的影响

编号	愈伤组织出现时间(d)	愈伤组织形态	诱导率(%)	愈伤组织生长状况
MS1	19	白色疏松	6	+
MS2	16	淡黄色紧密	20	+
MS3	15	淡黄色紧密	24	++
MS4	14	淡黄色紧密	26	++
MS5	14	淡黄色紧密	28	++
MS6	15	淡黄色紧密	22	++
MS7	14	淡黄色紧密	26	++
MS8	14	淡黄色紧密	27	++
MS9	14	淡黄色紧密	30	+++
MS10	14	淡黄色紧密	23	++
MS11	14	淡黄色紧密	24	++
MS12	13	淡黄色紧密	26	++
MS13	14	淡黄色紧密	31	+++
MS14	14	淡黄色紧密	22	++
MS15	14	淡黄色紧密	25	++
MS16	13	淡黄色紧密	26	++
MS17	13	淡黄色紧密	30	+++
MS18	12	淡黄色紧密	27	++
MS19	11	淡黄色紧密	31	++++
MS20	10	淡黄色紧密	32	++++
MS21	10	淡黄色紧密	35	++++
MS22	11	淡黄色紧密	29	++
MS23	10	淡黄色紧密	44	++++
MS24	10	淡黄色紧密	45	++++
MS25	10	淡黄色紧密	43	++++
MS26	11	淡黄色紧密	38	+++
MS27	10	淡黄色紧密	45	++++
MS28	10	淡黄色紧密	46	++++
MS29	10	淡黄色紧密	39	+++
MS30	10	淡黄色紧密	38	+++
MS31	10	淡黄色紧密	37	+++
MS32	10	淡黄色紧密	38	+++
MS33	10	淡黄色紧密	35	+++
MS34	14	白色疏松	19	+
MS35	14	白色疏松	21	+
MS36	13	白色疏松	21	++++
MS37	14	白色疏松	19	+
MS38	13	白色疏松	22	++
MS39	13	白色疏松	21	++
MS40	13	白色疏松	24	++
MS41	13	白色疏松	34	++
MS42	13	白色疏松	26	++
MS43	13	白色疏松	24	++
MS44	13	白色疏松	35	+++
MS45	13	白色疏松	37	+++
MS46	13	白色疏松	33	+++
MS47	13	白色疏松	31	++
MS48	13	白色疏松	35	++
MS49	13	白色疏松	41	+++

注: + 表示愈伤组织生长量,越多说明愈伤组织生长量越大。
+,愈伤组织生长缓慢; ++,愈伤组织生长速度中等,松散性较好;
+++,愈伤组织生长快速,松散性好; +++++,愈伤组织生长极快,松散性很好。

变更加严重^[16]。李冬杰等研究红豆杉细胞培养中的褐化问题时,认为细胞分裂素类中 6-BA 有刺激多酚氧化酶(POO)活性提高、加重褐变的作用^[17]。

本试验以萝卜的根为外植体,6-BA 分别与 NAA、2,4-D 配比诱导萝卜愈伤组织,研究表明 2,4-D 较 NAA 更适于诱导萝卜愈伤组织,且当 6-BA 和 2,4-D 浓度均在 0.050~0.075 mg/mL 时,愈伤组织诱导效果最好。本研究结果与龙雯虹等^[18]不同,可能是由供试材料的基因型和外植体的不同引起的,可见,萝卜愈伤组织的再分化仍然是一个需努力探索的问题。

参考文献:

[1] Jeong W J, Min S R, Liu J R. Somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of radish (*Raphanus sativus* L.) [J]. Plant Cell Reports, 1995, 14 (10): 648-651.

[2] Pua E C, Sim G E, Chi G L. Synergistic effect of ethylene inhibitors and putrescine on shoot regeneration from hypocotyl explants of Chinese radish (*Raphanus sativus* L. var. *longipinnatus* Bailey) in vitro [J]. Plant Cell Report, 1996, 15 (9): 685-690.

[3] 武 剑, 龚义勤, 邓 波, 等. 萝卜雄性不育组织培养的研究 [J]. 贵州农业科学, 2003, 31 (5): 8-11.

[4] 张 丽, 赵秋菊, 付传翠, 等. 萝卜花药培养技术研究 [J]. 华北农学报, 2006, 21 (6): 55-58.

[5] 王绍辉, 高遐虹, 程继鸿, 等. 萝卜花药愈伤组织诱导及褐变因素初探 [J]. 中国农学通报, 2008, 24 (11): 350-354.

[6] 熊秋芳, 张雪清, 骆海波, 等. 萝卜组织培养的研究与应用 [J]. 长江蔬菜, 2006 (5): 36-38.

[7] 龙雯虹, 杨荣萍, 王建飞, 等. 萝卜诱导愈伤组织较适外植体及激素的筛选 [J]. 河南农业科学, 2006 (2): 93-95.

[8] 王 辉, 田义轲, 刘维信, 等. 萝卜组织和器官的离体培养 [J]. 青岛农业大学学报: 自然科学版, 2009, 26 (2): 109-112.

[9] 龙雯虹, 许 彬, 张丽萍, 等. 萝卜诱导愈伤组织的影响因素 [J]. 西南农业大学学报: 自然科学版, 2006, 28 (1): 131-133, 138.

[10] 姜灵敏, 徐有明, 张冬梅, 等. 红刺玫愈伤组织诱导再生体系的建立 [J]. 江苏农业学报, 2012, 28 (4): 914-916.

[11] 刘 浩, 李 胜, 马绍英, 等. LED 不同光质对萝卜愈伤组织诱导、增殖和萝卜硫素含量的影响 [J]. 植物生理学通讯, 2010, 46 (4): 347-350.

[12] 余桂红, 张 旭, 孙晓波, 等. 大麦苏啤 4 号幼胚愈伤组织的诱导及植株的高频再生 [J]. 江苏农业学报, 2013, 29 (5): 953-956.

[13] 周玲艳, 秦华明, 梁 红, 等. 胡萝卜再生体系的建立 [J]. 农业与技术, 2005, 25 (3): 94-95.

[14] 张宁宁, 夏明霞, 张 琼, 等. 卡特兰组织培养研究进展 [J]. 江苏农业科学, 2013, 41 (4): 42-44.

[15] 王 玲, 李勇军, 房亚南, 等. 魔芋组织培养的一步成苗技术研究 [J]. 西南农业学报, 2004, 17 (5): 636-638.

[16] 张海兰, 林晓佳, 赵博光. 激素对黑松愈伤组织褐变和增殖的作用 [J]. 山东农业大学学报: 自然科学版, 2002, 33 (4): 413-417.

[17] 李冬杰, 张进献, 魏景芳, 等. 培养基和培养条件与红豆杉细胞培养中褐化的关系 [J]. 植物生理学通讯, 2005, 41 (1): 95-98.

[18] 龙雯虹, 许 彬, 张丽萍, 等. 萝卜诱导愈伤组织的影响因素 [J]. 西南农业大学学报: 自然科学版, 2006, 28 (1): 131-133, 138.