

李 红,李 波,陈雪梅,等. 苜蓿愈伤组织细胞学观察及芽分化的研究[J]. 江苏农业科学,2015,43(6):49-51.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.06.013

苜蓿愈伤组织细胞学观察及芽分化的研究

李 红¹,李 波²,陈雪梅²,徐婉玉²,王 烨²

(1. 黑龙江省畜牧研究所,黑龙江齐齐哈尔 161000; 2. 齐齐哈尔大学生命科学与农林学院,黑龙江齐齐哈尔 161006)

摘要:以龙牧 801 苜蓿叶片诱导产生的愈伤组织为材料,将其接种在诱导和胚性发生培养基上,采用形态学、涂片法和石蜡切片法对愈伤组织的形态和内部细胞结构进行观察。此外,研究了 NAA 和 KT 对愈伤组织芽分化的影响。结果表明:胚性愈伤组织和非胚性愈伤组织在形态和细胞学特性方面均存在明显差异,苜蓿愈伤组织芽分化最佳激素配比为 0.5 mg/L NAA + 1.5 mg/L KT,研究结果将为苜蓿组培快繁奠定理论基础。

关键词:苜蓿;愈伤组织;解剖结构;芽分化

中图分类号:S541⁺.104 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)06-0049-02

紫花苜蓿 (*Medicago sativa* L.) 为豆科草本植物,是世界上种植最广泛的牧草之一,再生性和适应性较强^[1]。利用植物组织培养技术产生愈伤组织可以进行苜蓿的抗逆性育种,但是已有研究表明苜蓿愈伤组织的再分化率较低,易产生玻璃化现象,其中激素是影响苜蓿愈伤组织形成及分化的主要因素^[2]。因此,本试验通过对愈伤组织显微结构进行观察并研究激素对愈伤组织分化的影响,旨在为苜蓿组培快繁提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以龙牧 801 苜蓿叶片诱导出的愈伤组织为材料。愈伤组织诱导和继代培养基为 MS + 1 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L 6-BA + 8.5 g/L 琼脂 + 30 g/L 蔗糖,每 20 d 继代 1 次。胚性愈伤组织诱导培养基为 MS + 0.2 mg/L NAA + 0.1 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L KT + 8.5 g/L 琼脂 + 30 g/L 蔗糖^[3]。挑取新鲜的苜蓿愈伤组织,将其切成 5 mm³ 大小,接种于胚性愈伤组织诱导和芽分化培养基,在 23~25 ℃ 和 1 000~3 000 lx 的光照培养箱下培养。

1.2 试验方法

1.2.1 愈伤组织形态观察 对继代培养 8 d 的愈伤组织进行细胞表面结构、颜色和质地的观察。

1.2.2 愈伤组织涂片和石蜡切片制作 取新鲜的、长势良好的愈伤组织小块,放在培养瓶中,滴 3~5 滴卡宝品红染液,用注射器胶皮头将愈伤组织充分捣碎,吸取上层清液,滴 1 滴于干净的载玻片上,显微镜下观察并拍照。此外,选取新鲜的、长势较好的愈伤组织材料,进行常规石蜡切片制作,用番红和

固绿双重染色。

1.2.3 愈伤组织芽分化激素配比的筛选 选用 MS 培养基为基础培养基,添加 NAA 和 KT, NAA 浓度分别为 0.1、0.3、0.5 mg/L, KT 浓度分别为 0.5、1.0、1.5 mg/L, 2 种激素进行正交组合,共 9 种配方组合。将新鲜的愈伤组织分割成约 5 mm³ 的小块,接种到 9 种不同培养基中,每瓶 6~9 块。培养条件同上,培养 15 d 后对 1~9 号培养基的材料进行观察和统计。

2 结果与分析

2.1 胚性与非胚性愈伤组织形态上的差异

胚性愈伤是指具有胚胎发生能力的愈伤组织,它处于增殖旺盛和分化状态。非胚性愈伤是指愈伤组织中的细胞虽有增殖能力,但没有胚胎发生能力的愈伤^[4]。这 2 种愈伤组织在形态学和细胞学上有明显的差异。培养 8 d 的 2 种类型愈伤组织在形态上有明显的差异,其中胚性愈伤组织为淡绿色、质地致密、表面较粗糙且有颗粒状突起;而非胚性愈伤组织表明光滑、呈淡黄色、质地疏松(表 1、图 1)。

表 1 胚性与非胚性愈伤组织的形态比较

类型	颜色	质地	表面结构
胚性愈伤组织	淡绿色	较致密	较粗糙,表面有颗粒状突起
非胚性愈伤组织	黄绿色	较疏松	较光滑

2.2 解剖结构的观察

通过对愈伤组织显微结构观察(图 2)发现,胚性细胞与非胚性细胞差异显著。胚性愈伤组织细胞较小,细胞直径约 10 μm,胞质浓厚、染色深、细胞核大、细胞形状较规则,是排列紧密的近圆形细胞,具有分生组织细胞的特点。因此,胚性愈伤组织细胞分裂能力强,代谢活跃,具有体细胞胚发生能力。非胚性愈伤组织细胞大,直径约 20 μm,胞质稀薄、染色浅、细胞核小、形状不规则、排列疏松,细胞表面褶皱,分裂能力弱,无体细胞胚发生能力。初始愈伤组织细胞的形态结构位于上述两者之间,也无体细胞胚发生能力。

2.3 芽分化的最佳激素配比

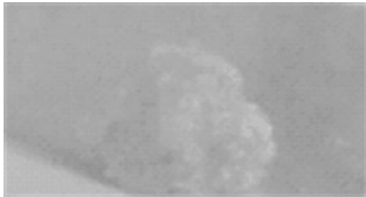
本试验在 MS 培养基上附加不同浓度的 NAA,并分别与

收稿日期:2014-07-01

基金项目:国家科技支撑计划(编号:2011BAD17B01-04);黑龙江省教育厅科学技术研究项目(编号:12521610)。

作者简介:李 红(1960—),女,山东莱芜人,研究员,主要从事牧草与饲料作物育种与栽培研究工作。E-mail:hljlhong@163.com。

通信作者:李 波,教授,主要从事细胞生物学的教学和科研工作。E-mail:libo1962@163.com。

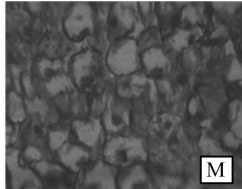
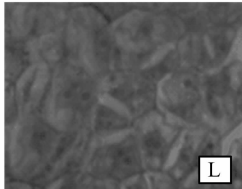
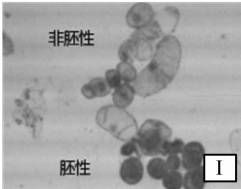
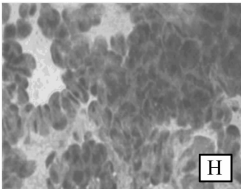
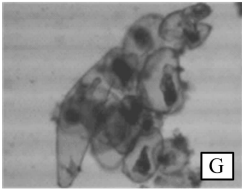


A.非胚性愈伤组织



B.胚性愈伤组织

图1 愈伤组织外部形态



G、H、I—愈伤组织涂片；L、M—愈伤组织石蜡切片；G、L—非胚性细胞；H、M—胚性细胞；I—胚性和非胚性细胞共存

图2 愈伤组织显微结构

表 2 激素配比对愈伤组织芽分化的影响

培养基编号	NAA 浓度 (mg/L)	KT 浓度 (mg/L)	愈伤组织接种数(块)	分化块数 (块)	分化率 (%)
1	0.1	0.5	47	9	19.1
2	0.1	1.0	42	7	16.7
3	0.1	1.5	40	11	27.5
4	0.3	0.5	45	5	11.1
5	0.3	1.0	44	11	25.0
6	0.3	1.5	48	11	22.9
7	0.5	0.5	49	17	34.7
8	0.5	1.0	43	13	30.2
9	0.5	1.5	43	21	48.8

不同浓度的 KT 配比,研究其对芽分化的影响,结果见表 2。接种 10 d 后,愈伤组织开始陆续长出绿色芽点(图 3),不同浓度的 NAA 和 KT 的芽的分化率有一定的差异,1~9 号培养基出芽率依次为 9>7>8>3>5>6>1>2>4,9 号培养基的出芽率最高,达到 48.8%,在 15 d 时长出丛生芽,MS 培养基添加 0.5 mg/L NAA、1.5 mg/L KT 时,苜蓿愈伤组织出芽率最高,其他培养基也有芽的分化,说明添加一定浓度的 NAA 和 KT 配合有利于苜蓿愈伤组织芽的再分化。

3 讨论

3.1 愈伤组织的鉴定为苜蓿不定芽的发生提供可能性

愈伤组织在长期继代过程中,有胚性和非胚性 2 类愈伤组织。胚性愈伤组织发生前要经历愈伤组织生长发育阶段。

苜蓿成熟叶片在含有一定浓度的 2,4-D 和 6-BA 的激素配比的培养基中可诱导出大量的愈伤组织,经长期培养愈伤组织失去绿色,变成淡黄色,有的愈伤组织失去胚性。愈伤组织在 MS+0.2 mg/L NAA+0.1 mg/L 6-BA+0.1 mg/L KT 培养基培养过程中,在培养 8 d 时,发现愈伤组织开始逐渐变成绿色,并逐渐形成颗粒状突起,此类愈伤组织即为胚性愈伤组织。接种的 208 块愈伤组织中有 163 块长出颗粒状突起,诱导率达 78.4%。对苜蓿愈伤组织采用形态学和细胞学方法对其发生的状态进行观察,能准确判断其愈伤组织的发生类型和愈伤组织是否进入胚性化,可为实现苜蓿愈伤组织的再分化创造条件。

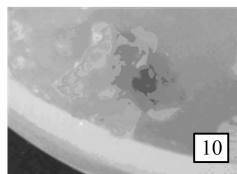
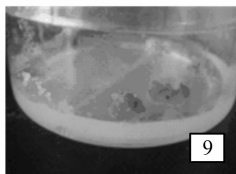
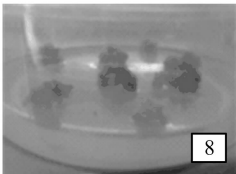
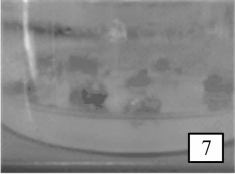
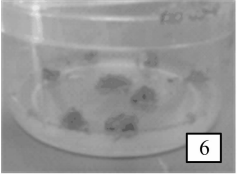
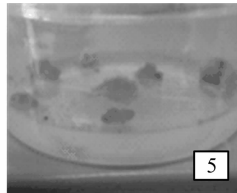
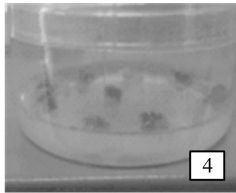
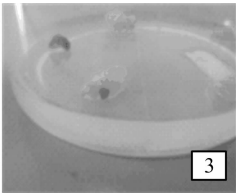
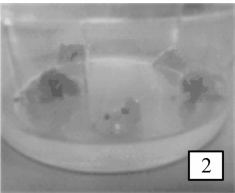
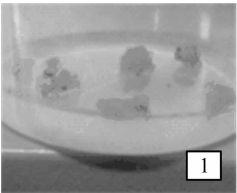


图3 激素配比对苜蓿愈伤组织芽分化的影响

3.2 植物激素对愈伤组织诱导和再分化的作用

激素是外植体愈伤组织诱导的关键因素,调节激素水平和组合已成为提高愈伤组织诱导与分化率的有效手段。不同的激素对植物细胞的识别能力不同,激素浓度不同,与植物细胞结合的机会也不同,因此不同种类和浓度的激素组合会影响愈伤组织的诱导和再分化。

如朱苏文等研究表明 2,4-D 对大岩桐愈伤组织诱导的作用最显著^[5];杜希华等研究发现单独使用细胞分裂素不能使愈伤组织生长,而同时加入一定配比的细胞分裂和生长素有利于愈伤组织的诱导,细胞分裂素是植物脱分化所必需的^[4]。在试验中发现添加一定配

黎海利,谭飞理,刘锴栋,等.聚花过路黄的组织培养和快速繁殖[J].江苏农业科学,2015,43(6):51-53.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.06.014

聚花过路黄的组织培养和快速繁殖

黎海利,谭飞理,刘锴栋,成夏岚

(岭南师范学院生命科学与技术学院,广东湛江 524048)

摘要:为建立聚花过路黄(*Lysimachia congestiflora* Hemsl)的组织快繁技术体系,以 MS 为基本培养基,研究不同浓度组合 6-BA、NAA 对不同外植体进行愈伤组织诱导、不定芽分化、增殖、生根的影响,筛选出适合聚花过路黄的最适外植体、培养基。结果表明,聚花过路黄最佳的愈伤组织及不定芽诱导培养基为 MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L,最佳外植体为顶芽,其次为带芽茎段。聚花过路黄在 MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L 培养基中增殖倍数最高,增殖倍数达 12.76,生长速度较快。聚花过路黄在 1/2MS 培养基上生根率达 100%。

关键词:聚花过路黄;组织培养;快速繁殖

中图分类号: Q945.5

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2015)06-0051-03

聚花过路黄(*Lysimachia congestiflora* Hemsl)别称临时救、黄花珠、九莲灯、大疮药、爬地黄等,为报春花科珍珠菜属多年生草本,主要分布于我国长江以南各省及陕西省、甘肃省南部地区、中国台湾,集药用、观赏、经济价值于一体^[1]。聚花过路黄植株低矮,茎下部匍匐,节上生根,覆盖力强,叶沿中脉、侧脉有紫红色斑纹,花 2~4 朵集生茎段或枝端,形成近头状的总状花序,花色艳丽,花冠内面基部紫红色,花期 4—6 月,是优良的地被植物。聚花过路黄全草入药,目前国内外关于聚花过路黄的研究多集中于对其化学成分及药用价值等方面^[2-7]。聚花过路黄花叶俱美,最适宜作为地被植物,但在城市绿地中应用较少,多处于野生状态。笔者对聚花过路黄进

行组织培养研究,旨在为聚花过路黄的园林推广、种苗工厂化生产提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

聚花过路黄于 2011 年 7 月采自广西壮族自治区贺州市姑婆山(24°34'N,111°32'E,海拔 568.3 m),引种成功后栽植于岭南师范学院生物园。

1.2 方法

1.2.1 无菌材料的获得及消毒处理 于晴天中午取生长期健康、无病虫害的聚花过路黄外植体,分别为顶芽、带芽茎段、叶片,外植体长度为 2~3 cm,用洗洁精漂洗外植体 10 min 左右,再用自来水冲洗 0.5~1.0 h,浸泡于无菌水中待用。将外植体用 70% 乙醇处理 15 s,然后用无菌水清洗 4~5 次,用 HgCl₂ 浸泡 6 min,最后用无菌水冲洗 6 次。处理后的外植体剪掉两头茎段,避免 HgCl₂ 渗入而影响营养吸收。

1.2.2 诱导培养基 基本培养基为 MS 培养基。将处理好的外植体分别接种于 3 种添加不同植物激素的 MS 诱导培养基上,诱导培养基配方分别为: M1, MS + 6-BA 0.5 mg/L +

收稿日期:2014-11-28

基金项目:国家星火计划(编号:2013GA780093);广东省湛江市热带特色资源植物技术开发重点实验室项目(编号:2014A06008);岭南师范学院博士启动项目(编号:ZL09011)。

作者简介:黎海利(1981—),女,黎族,广西宜州人,博士,讲师,研究方向为园林植物及园艺。E-mail:lihaili2425@126.com。

通信作者:刘锴栋,博士,副研究员,研究方向为园林植物及园艺。E-mail:liukaidong2001@126.com。

比的 2,4-D 和 6-BA 可以诱导苜蓿叶片产生大量的愈伤组织。2,4-D 和 6-BA 的浓度分别控制在 1.0 mg/L 和 0.5 mg/L 左右时有利于愈伤组织的诱导和继代培养,2,4-D 的浓度过高不利于愈伤组织的再分化。但是愈伤组织的不定芽的分化率和激素的浓度不呈正相关,如胡静等^[6]和伊风艳等^[7]研究发现,甘农 2 号杂化苜蓿和黄花苜蓿的最佳的芽分化培养基均为 MS + 0.5 mg/L KT 和 0.1 mg/L NAA。在本试验中发现在愈伤组织芽的分化中,可以配合添加一定浓度 NAA 和 KT,NAA 的浓度为 0.1~0.5 mg/L,KT 浓度为 0.5~1.5 mg/L 时,均有不定芽的分化,其中以 0.5 mg/L NAA 和 1.5 mg/L KT 组合下愈伤组织不定芽的分化率最高。

参考文献:

[1]李望丰,吕德扬,刘艳芝,等.诱导苜蓿胚性愈伤组织分化和再生

[J].吉林农业科学,2002,27(2):15-16,21.

[2]王庭辉,马晖玲.和田苜蓿组织培养中玻璃化现象研究[J].草原与草坪,2012,32(5):58-61,66.

[3]霍云谦.甘草愈伤组织诱导及体细胞胚的发生[D].保定:河北农业大学,2005.

[4]杜希华,孙秀玲,郝岗平,等.不同外植体和激素对银杏愈伤组织诱导和生长的影响[J].山东师范大学学报:自然科学版,2008,23(1):129-133.

[5]朱苏文,马庆,刘康武.植物激素对大岩桐愈伤组织诱导和芽分化增殖的影响[J].激光生物学报,2006,15(4):394-398.

[6]胡静,马晖玲,谢俊仁.甘农 2 号杂化苜蓿愈伤组织诱导及体细胞胚和芽分化的研究[J].甘肃农业大学学报,2007,42(4):87-91.

[7]伊风艳,石凤翎,展春芳,等.黄花苜蓿愈伤组织诱导及分化培养条件的研究[J].中国草地学报,2011,33(6):14-20.