

胡萝卜体细胞胚再生系统的建立

高金秋^{1,2}, 于丽杰¹

(1. 哈尔滨师范大学 生命科学与技术学院 黑龙江 哈尔滨 150025; 2. 白城师范学院 生物系 吉林 白城 137000)

摘 要: 选用胡萝卜栽培品种“开拓者”和“长城红玥”无菌苗的子叶和下胚轴作外植体, 对可能影响胡萝卜体细胞胚分化率的基本培养基、激素配比进行了研究。结果表明: 开拓者对 B5 培养基表现适应, 长城红玥对 B5 和 MS 培养基均表现适应。下胚轴外植体诱导体细胞胚的分化能力极显著地高于子叶。低浓度的 2,4-D(0.1~0.7 mg/L) 对体细胞胚的分化有促进作用, 6-BA 对体细胞胚分化有抑制作用。诱导开拓者下胚轴分化体细胞胚的优化培养基为 B5+2,4-D 0.1 mg/L, 分化率达 85%。诱导长城红玥下胚轴分化体细胞胚优化培养基为 MS+2,4-D 0.7 mg/L, 分化率达 73.3%。2 个品种的下胚轴在各自的优化培养基上分化体细胞胚的能力差异不显著。

关键词: 胡萝卜; 体细胞胚; 组织培养

中图分类号: S 631.203.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)08-0073-05

胡萝卜 (*Daucus carota* L.) 又名红萝卜、丁香萝卜、药性萝卜等, 是伞形科胡萝卜属的 2 a 生草本植物。因其营养丰富、又具药用价值, 且耐运输、易栽培、病虫害少和耐贮藏, 而成为人们常食蔬菜。同时又因其可食部分—贮藏根具有发达的韧皮部, 适合表达外源蛋白, 使很多科研工作者乐于用它作为植物生物反应器的受体^[1-3]。

第一作者简介: 高金秋(1976-), 女, 硕士, 讲师, 研究方向为植物分子生物学, 现从事基因工程及植物组织培养的教学工作。E-mail: wawa760824@yahoo.com.cn。
通讯作者: 于丽杰(1961-), 女, 博士, 教授, 现从事植物分子生物学的教学与科研工作。E-mail: yulijie1961@126.com。
基金项目: 黑龙江省自然科学基金资助项目(C0014); 哈尔滨市学科后备带头人基金资助项目(0071007002); 黑龙江省普通高等学校骨干教师创新能力资助项目。
收稿日期: 2009-03-20

因此, 建立胡萝卜的优良再生系统, 已经越来越受到人们关注。

早在 1958 年, Steward 和 Reinert 就已经从胡萝卜的愈伤组织通过体细胞胚途径诱导产生了完整植株; 随后在 1972 年, Granbow 又用胡萝卜的根和叶柄作为外植体通过体细胞胚途径诱导产生了再生植株; 之后关于胡萝卜组织培养的研究、体细胞胚发生机制的研究以及近 30 年来关于胡萝卜遗传转化的研究一直接连不断。目前用于胡萝卜离体培养产生体细胞胚的培养基差别很大, 基础培养基主要涉及 B5 和 MS, 所用激素的种类和浓度的差别就更大^[1-8]。

近年来, 育种者不断培育出新的胡萝卜优良品种。由于基因型的影响, 对不同的胡萝卜品种进行离体再生时, 所适应的培养基配方可能要发生相应的变化。该试验通过对培养基组成、外植体类型和品种进行筛选, 优

Study on Grapes Lateral Bud Stem Apex Regeneration System

LI Lu, WANG Yu, SHENG Yan-yan, JIAO Kui-bao, LIU Dan, GAO Qing-yu
(Horticulture College, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China)

Abstract: Took stems with single bud of the three types of grape, Jingya, Jingxiu and Hybrid strain No. 22 as explants. Studied on several factors such as disinfection methods, seasonal selections and medias, and educed the most suited rapid propagation *in vitro* of the three types of grapes.
Key words: Grape; *In Vitro*; Rapid propagation

化了胡萝卜品种长城红玥和开拓者的体细胞胚再生系统, 试验结果对胡萝卜的基因工程研究具有理论和实践意义。

1 材料与方法

1.1 供试品种及外植体

供试品种为开拓者(辽宁园艺种苗有限公司出售的商业用种子)和长城红玥(中种集团承德长城种子有限公司出售的商业用种子), 外植体为前述品种接种1周时的无菌苗子叶(两端切口)和下胚轴上切段(0.5~1 cm)。

1.2 方法

1.2.1 初代培养的建立 将子叶和下胚轴外植体分别接种于不同的胚性愈伤组织诱导培养基上, 每种培养基接种2培养皿(直径9cm), 每培养皿接种15个外植体。各胚性愈伤组织培养基均含3%蔗糖, 以琼脂固化, pH值5.8。胚性愈伤组织诱导培养基配方见表1。

1.2.2 外植体的继代培养及数据统计 初代培养接种1个月后, 将已脱分化的外植体继代转入MS₀培养基, 1

个月后相同条件下进行第2次继代。在胡萝卜的外植体被离体培养90 d左右时, 统计外植体分化体细胞胚的情况。外植体的分化率=分化体细胞胚的外植体数/接种的外植体数×100%。培养室内的温度23~27℃, 相对湿度45%~65%, 光强为1 500~2 000 lx, 每天光照16 h。

1.2.3 体细胞胚再生植株的继代培养和移栽 通过体细胞胚途径再生出的组培苗, 在其体细胞胚的子叶长达1 cm时, 将其继代转入1/2MS₀(所有MS培养基成分减半)培养基, 使其进一步发育长成健壮植株。体细胞胚组培苗长出6~7片真叶时, 先在培养瓶中进行昼夜变温(昼温22℃, 夜温14℃)练苗7 d, 然后移栽到以蛭石为基质的营养钵中。组培苗在移栽后的最初4 d要进行严格的保湿处理, 以避免因生理性失水而降低成活率, 与此同时仍进行昼夜变温锻炼。待移栽后的小苗长出新叶时(约2周左右), 再将其移栽到装有草炭:蛭石=1:1的营养钵中, 1周后即可转移到温室中进行常规管理了。

表1 胚性愈伤组织诱导培养基

| Table 1 Media for inducing embryogenic callus of carrot | | | |
|---|--|--------------------------|--|
| 培养基代码 Code names of media | 培养基的成分 Composition of medium/ mg · L ⁻¹ | 培养基代码 Codenames of media | 培养基的成分 Composition of medium/ mg · L ⁻¹ |
| A | MS+2.4-D 0.1 | H | B5+2.4-D 0.1 |
| B | MS+2.4-D 0.7 | I | B5+2.4-D 0.7 |
| C | MS+6-BA0.9+2.4-D 1.6 | J | B5+6-BA 0.9+2.4-D 1.6 |
| D | MS+6-BA1.8+2.4-D 0.4 | K | B5+6-BA 1.8+2.4-D 0.4 |
| E | MS+6-BA2.7+2.4-D 1.3 | L | B5+6-BA 2.7+2.4-D 1.3 |
| F | MS+6-BA3.6+2.4-D 0.1 | M | B5+6-BA 3.6+2.4-D 0.1 |
| G | MS+6-BA4.5+2.4-D 1.0 | N | B5+6-BA 4.5+2.4-D 1.0 |

1.2.4 试验数据的统计分析 将不同试验处理对体细胞胚分化率的影响进行差异显著性测验, 2个百分数(分

化率)的比较采用2×2列联表的独立性检验, 多个百分数的比较采用r×c列联表的独立性检验。

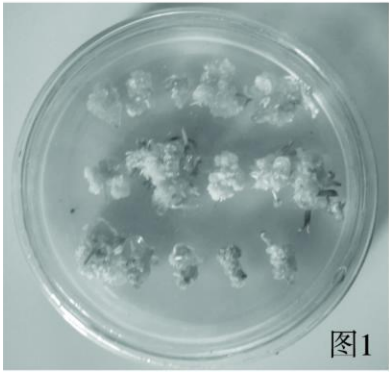


图1 开拓者下胚轴在B5+2.4-D 0.1培养基上初代培养后, 体细胞胚的分化状态

Fig. 1 After primary culture the somatic embryos differentiation of Kaituoze's hypocotyls induced by B5+2.4-D 0.1 medium

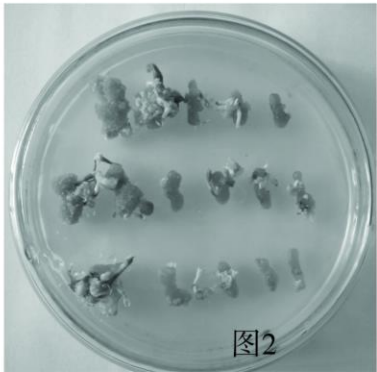


图2 长城红玥下胚轴在MS+2.4-D 0.1培养基上初代培养后, 体细胞胚的分化状态

Fig. 2 After primary culture the somatic embryos differentiation of Changchenghongyue's hypocotyls induced by MS+2.4-D 0.1 medium

2 结果与分析

初代培养的外植体在胚性愈伤组织诱导培养基上

接种第7天, 已经出现明显的脱分化现象。下胚轴外植体体积增大, 边缘细胞趋向松散; 而子叶外植体脱分化

的程度相对下胚轴较慢,仅两端切口处皱缩,叶面积大小不变。

离体培养 30 d 时,观察到在不同的胚性愈伤组织诱导培养基上,外植体的分化状态有明显差别。离体培养至 90 d 左右时,部分胚性愈伤组织已经通过体细胞胚途径分化出再生小苗。此时统计外植体的分化率,针对不同试验处理对分化率的影响进行独立性测验。

2.1 基础培养基对胡萝卜体细胞胚分化率的影响

按 1.2.1 的方法将供试品种的外植体分别接入 14 种胚性愈伤组织诱导培养基进行初代培养,30 d 后转移至 MS₀ 上继代培养。离体培养至 90 d 时,外植体的分化状态及试验数据见图 1、2 和表 2。

统计分析的结果表明,当以 B5 作为胚性愈伤组织诱导培养基的基本培养基时,开拓者的子叶和下胚轴外植体在 MS₀ 继代培养后,体细胞胚的分化率均极显著地高于 MS 基本培养基,说明 B5 培养基更适合于开拓者

的体细胞胚的诱导培养。

无论是以 MS 还是以 B5 作为胚性愈伤组织诱导培养基的基本培养基,长城红玥的下胚轴和子叶外植体在 MS₀ 上继代培养后,其体细胞胚的分化率均差异不显著,说明长城红玥对这 2 种基本培养基没有选择。

2.2 外植体类型对胡萝卜体细胞胚再生的影响

将开拓者的子叶与下胚轴接入 H 号培养基(B5+2,4-D0.1),长城红玥的子叶与下胚轴接入 B 号培养基(MS+2,4-D0.7),其它培养方法同上。90 d 后统计分化出体细胞胚的外植体个数,试验结果见表 3。统计分析的结果表明,对于同一品种而言,在相同的培养基上,不同的外植体类型胡萝卜体细胞胚的分化率有显著的差异,下胚轴分化体细胞胚的能力要极显著地高于子叶。而开拓者与长城红玥品种间下胚轴分化体细胞胚的能力,经统计分析表明差异不显著。2 个品种下胚轴分化体细胞胚的频率都很高。

表 2 基础培养基对胡萝卜体细胞胚分化率的影响

| Table 2 Effects on carrot embryoid differentiation frequency of different basic media | | | | | | | |
|---|---------------------------|-----------|--|-----------|--|------------------------------|----|
| 品种 Varieties | 外植体类型 Sorts of explant | MS | | B5 | | χ^2 值 χ^2 value | |
| | | 总数 Sum | 分化数率 Differentiation number frequency/ % | 总数 Sum | 分化数率 Differentiation number frequency/ % | | |
| 开拓者 Kaituo zhe | 子叶 cotyledons | 150 | 7(4.7) | 135 | 27(20.0) | 14.976 | ** |
| | 下胚轴 hypocotyls | 240 | 3(1.3) | 255 | 105(41.2) | 113.379 | ** |
| 长城红玥 Changcheng- hongyue | 子叶 cotyledons | 165 | 22(13.3) | 135 | 21(15.6) | 0.144 | |
| | 下胚轴 hypocotyls | 244 | 91(37.3) | 229 | 67(29.3) | 3.081 | |

注 ** $\alpha=0.01$ 。

表 3 外植体类型对胡萝卜体细胞胚分化率的影响

| Table 3 Effects on carrot embryoid differentiation frequency of different explants | | | | | |
|--|---------------------------|---------------------|-------------------------------|-------------------------------------|------------------------------|
| 品种 Varieties | 外植体类型 Sorts of explant | 接种数 Total number | 分化数 Differentiation number | 分化率 Differentiation frequency/ % | χ^2 值 χ^2 value |
| 开拓者 Kaituo zhe | 子叶 Cotyledons | 30 | 9 | 30.0 | 19.227 ** |
| | 下胚轴 Hypocotyls | 60 | 51 | 85.0 | |
| 长城红玥 Changchenghongyue | 子叶 Cotyledons | 30 | 5 | 16.7 | 17.24 ** |
| | 下胚轴 Hypocotyls | 30 | 22 | 73.3 | |

注 ** $\alpha=0.01$ 。

2.3 激素比对胡萝卜体细胞胚再生的影响

将开拓者和长城红玥的下胚轴分别接入 A~N 培养基中,其它方法同前,培养 90 d 时统计体细胞胚的分化率,试验结果见表 4。

对表 4 的数据进行统计分析结果表明,不同激素比对胡萝卜体细胞胚的分化率产生了极显著的影响。开拓者下胚轴在 H 号培养基上的分化率最高,达到 85%;但该分化率与 I 号培养基诱导的分化率 66.7%相比,差异不显著($\chi^2=2.864$),说明在 B5 基础培养基上,

开拓者的下胚轴对 2,4-D 在 0.1~0.7 mg/L 范围内的浓度变化,基本呈现相近的生理反应。最终确定开拓者下胚轴的最优胚性愈伤诱导培养基为 H(B5+2,4-D 0.1)。

长城红玥下胚轴在 B 号培养基上被诱导的体细胞胚分化率最高,达到 73.3%;但其与 A 号培养基诱导的 67.2%的分化率差异不显著,说明在 MS 培养基上,长城红玥的下胚轴对 2,4-D 在 0.1~0.7 mg/L 范围内的浓度变化,也基本呈现相近的生理反应。最终确定长城红玥下胚轴的最优胚性愈伤诱导培养基为 B(MS+2,4-D 0.7)。

观察外植体分化过程中的形态变化,注意到,胚性愈伤组织的形态变化,也与培养基中附加的外源激素的种类和使用剂量密切相关。

随着 6-BA 浓度的升高,分化出的愈伤组织相对的由疏松到致密,颜色由淡黄至深绿。开拓者的下胚轴在 M 号培养基上被诱导出的胚性愈伤组织,用 MS₀ 培养基继代 2 次后,体积平均约为 5×8×16 mm³,质地致密,颜色深绿(见图 3)。而随着 2,4-D 浓度的升高,分化出的胚性愈伤组织越来越松散,且颜色趋向淡黄色。开拓者的下胚轴在 J 号培养基上被诱导出的胚性愈伤组织,

用MS₀培养基继代2次后,体积平均约为4×7×13 mm³,质地相对疏松,颜色淡黄(见图4)。

2.4 品种对胡萝卜体细胞胚分化率的影响

由表4可以看出不同品种的胡萝卜下胚轴在相同培养基中的分化率,多数差异显著。尤其以B号培养基差异最为显著:开拓者下胚轴在B号培养基上的分化率

为0,长城红玥下胚轴在B号培养基上的分化率却高达73.3%。但在各自最优诱导培养基上,体细胞胚的分化率却差异并不显著,开拓者下胚轴在H号培养基上的分化率为85%,长城红玥下胚轴在B号培养基上的分化率为73.3%,说明只要恰当的选择诱导培养基,不同的胡萝卜品种均可能达到较高的体细胞胚分化率。

表4
激素对比对胡萝卜下胚轴分化体细胞胚能力的影响

Table 4
Effects on carrot embryoid differentiation frequency of different hormone composition

| 培养基 Media | 开拓者 Kaituoze | | | 长城红玥 Changchenghongyue | | |
|--------------|--------------|--------------------------|-----------------------|------------------------|--------------------------|-----------------------|
| | 接种总数 | 分化数 | 分化率 Differereftiation | 接种总数 | 分化数 | 分化率 Differereftiation |
| | Total number | Differereftiation number | frequency/ % | Total number | Differereftiation number | frequency/ % |
| A | 60 | 0 | 0 | 64 | 43 | 67.2 |
| B | 30 | 0 | 0 | 30 | 22 | 73.3 |
| C | 30 | 0 | 0 | 30 | 4 | 13.3 |
| D | 30 | 0 | 0 | 30 | 10 | 33.3 |
| E | 30 | 0 | 0 | 30 | 4 | 13.3 |
| F | 30 | 3 | 10 | 30 | 6 | 20.0 |
| G | 30 | 0 | 0 | 30 | 2 | 6.7 |
| H | 60 | 51 | 85.0 | 64 | 31 | 48.4 |
| I | 30 | 20 | 66.7 | 30 | 16 | 53.3 |
| J | 30 | 6 | 20.0 | 15 | 0 | 0 |
| K | 45 | 9 | 20.0 | 30 | 4 | 13.3 |
| L | 30 | 8 | 26.7 | 30 | 4 | 13.3 |
| M | 30 | 5 | 16.7 | 30 | 4 | 13.3 |
| N | 30 | 6 | 20.0 | 30 | 8 | 26.7 |

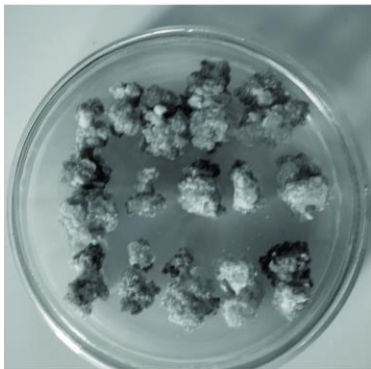


图3 开拓者下胚轴在M号培养基上被诱导再生
离体培养90 d时体细胞胚的分化情况

Fig. 3 After culture 90 days in vitro the somatic embryos differentiation of Kaituoze's hypo-cotyls induced by M medium

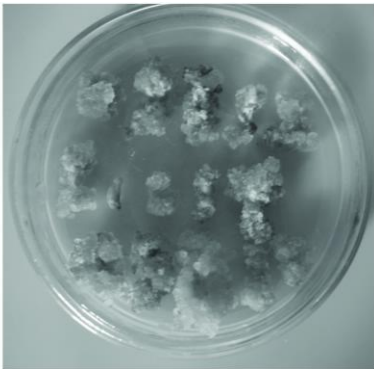


图4 开拓者下胚轴在J号培养基上被诱导再生
离体培养90 d时体细胞胚的分化情况

Fig. 4 After culture 90 days in vitro the somatic embryos differentiation of Changchenghong-yue's hypo-cotyls induced by J medium

3 讨论

通过组织培养建立植物再生系统时,基本培养基的种类、附加激素的种类和浓度、外植体的类型等因素都会对再生植株的分化率产生很大的影响,从而影响遗传转化的成败。

基础培养基的正确选择,是能否成功建立再生系统的基础。对基础培养基的筛选结果表明,品种不同、外植体不同,对基础培养基的选择性也不同。开拓者的下胚轴适合在B5培养基上培养,长城红玥对MS和B5培

培养基没有选择性。不同的研究者在对不同的胡萝卜品种进行体细胞胚诱导时,使用基础培养基以MS居多,一般认为MS培养基有利于体细胞胚的发生,因为它具有丰富的还原态氮(NH₄⁺),而NH₄⁺有利于体细胞胚的产生,并且它的作用不能被硝态氮(NO₃⁻)所代替⁹。

该试验中开拓者对B5培养基的选择性可能是由于B5培养基铵态氮含量低,而MS培养基铵态氮含量高,高铵对开拓者的再生有抑制作用¹⁰。

在建立再生系统时,另一个起重要作用的因素就是

激素的种类和浓度。在试验过程中发现,生长素与分裂素的配比不同,胡萝卜下胚轴分化出的体细胞胚的质量也不相同。随着 6-BA 浓度的升高,分化出的体细胞胚趋于细弱,且胚根发育不良;而随着 2,4-D 浓度的升高,分化出的体细胞胚趋于健壮,胚根也由分叉到弯曲。试验结果还提示说明,6-BA 对胡萝卜体细胞胚的诱导不起作用。生长素在诱导外植体脱分化产生愈伤组织和胚性细胞中起决定性作用,培养基中所添加的分裂素,只是增多了愈伤组织和体细胞胚的发生数量,而其浓度过高,反会产生负面作用^[11-12]。

对外植体的再生能力进行了比较,结果表明,下胚轴的分化率明显高于子叶。对品种的再生能力也进行了比较,不同品种在相同培养基上的再生能力差异显著,但在各自最优培养基上差异不显著。最后确定开拓者的培养基为 B5+2,4-D 0.1 mg/L;长城红玥的培养基为 MS+2,4-D 0.7 mg/L。

参考文献

[1] 王凌健,倪迪安,陈永宁,等.利用转基因胡萝卜表达肺结核疫苗[J].植物学报,2001,43(2):132-137.
[2] 张丽华.药用多肽基因植物表达载体的构建及其对胡萝卜和番茄的遗传转化[J].西北农林科技大学博士学位论文,2002:23-27.

[3] 郑回勇,郑金贵,黄碧芳.人乳铁蛋白基因转化胡萝卜研究初报[J].福建农林大学学报(自然科学版),2002,31(2):215-217.
[4] Satoh S, Kamada H, Harada H, et al. Auxin-controlled glycoprotein release into the medium of embryogenic carrot cells[J]. Plant Physiol, 1986, 81: 931-933.
[5] 刘雅,樊梦康,崔激.土壤根癌杆菌体外转化胡萝卜悬浮培养细胞[J].中国科学B辑,1987(5):507-512.
[6] 黄美娟,黄绍兴,苏都莫日根,等.采用调控培养方法提高胡萝卜体细胞胚活力的研究[J].科学通报,1993,38(6):550-553.
[7] 刘明志.酚类化合物促进含双元载体农杆菌对胡萝卜悬浮细胞的转化和植株再生[J].植物学报,1996,38(3):203-208.
[8] Hengel A, Guzzo F, Kammen A, et al. Expression pattern of the carrot EP3 endochitinase genes in suspension cultures and in developing seeds[J]. Plant Physiol, 1998, 117(1): 43-53.
[9] 张建铭,谈锋.植物体细胞胚的高频率诱导[J].生物技术通报,1996(4):8-11.
[10] 王关林,方宏筠.植物基因工程[M].2版.北京,科学出版社,2002:353.
[11] Masuda H, Oohashi S, Tokui Y, et al. Direct embryo formation from epidermal cells of carrot hypocotyls[J]. Journal of Plant Physiology, 1995, 145: 531-534.
[12] Sato S, Toya T, Kawahara R, et al. Isolation of a carrot gene expressed specifically during early-stage somatic embryogenesis[J]. Plant Molecular Biology, 1995, 28(1): 39-46.

Establishment of Embryoid Regeneration System of Carrot (*Daucus carota* L.)

GAO Jin-qiu^{1,2}, YU Li-jie¹

(1. Department of Biology, College of Life and Environment Science, Harbin Normal University, Harbin, Heilongjiang 150025, China;
2. Department of Biology, Baicheng Normal College, Baicheng, Jilin 137000, China)

Abstract: This study optimized factors which probably affected somatic embryogenesis frequency such as basic media, hormone composition in medium by using hypocotyls and cotyledons of *Daucus carota* L. var. Kaituoze and Changchenhongyue as explants. The results showed as follow; the suitable basic medium for Kaituoze was B5, and for Changchenhongyue was B5 as well as MS; the embryoid differentiation frequency of hypocotyls were very significant higher than that of cotyledons; Low density of 2,4-D(0.1~0.7 mg/L) had a promotable effect on somatic embryogenesis, whereas 6-BA had an inhibitory effect on somatic embryogenesis; the optimum combination for inducing Kaituoze's hypocotyls somatic embryogenesis was B5 agar medium with 0.1 mg/L 2,4-D, which differentiation frequency was up to 85%, and the optimum combination for inducing Changchenhongyue's hypocotyls somatic embryogenesis was MS agar medium with 0.7 mg/L 2,4-D, which differentiation frequency was up to 73.3%; the embryoid differentiation frequency of both hypocotyls on their optimum medium was no difference.

Key words: Carrot; Somatic embryos; Tissue culture