

胡萝卜愈伤组织诱导培养的研究

汪 洪^{1,2}, 夏 鸿 亮², 李 校 堃², 杨 树 林¹

(1. 南京理工大学 环境与生物工程学院, 江苏 南京 210094; 2. 温州医学院 药学院, 浙江 温州 325035)

摘 要:以胡萝卜“七寸人参”为试材,探讨了不同外植体、激素、培养基、光照对胡萝卜愈伤组织诱导的影响。结果表明:胡萝卜愈伤组织的诱导以下胚轴为外植体为宜;在添加 2,4-D 1.0 mg/L 和 KT 0.5 mg/L 的 MS 培养基上愈伤组织的诱导频率为 100%,且愈伤组织生长良好,增殖快速;光照对愈伤组织的诱导没有影响,但却进一步阻碍了愈伤组织的增殖生长。

关键词:胡萝卜;愈伤组织;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(2012)06-0103-03

胡萝卜(*Daucus carota* L.)为伞形科 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一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,尤其是近年来作为表达可食疫苗中较为理想的模式植物之一^[1-4]。而建立一个高效的、实用的组织培养快速繁殖体系则是研究植物遗传转化的基础。近年来,育种工作者不断培育出新的胡萝卜优良品种,而品种间存在一定基因型的差别,受基因型的影响,不同品种间胡萝卜愈伤组织的诱导培养条件也不一致。胡萝卜品种“七寸人参”生长强健,耐抽苔、耐热耐寒、耐旱耐湿,适应性强,高抗病;根型呈圆柱型,颜色鲜红,皮色光滑有光泽,丰产;不易裂根,成品率高,品质佳,耐运输,栽培广泛。因此,该试验以胡萝卜“七寸人参”为试材,研究了激素、外植体、光照、培养基类型等方面对胡萝卜愈伤组织诱导的影响,以期对胡萝卜高频再生、组织培养的工厂化生产及遗传转化奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

胡萝卜栽培品种“七寸人参”,购自杭州金科园艺种苗技术服务部。

1.2 试验方法

1.2.1 无菌苗的获得 将胡萝卜种子搓去种毛,用自来水清洗数遍,再于室温下用自来水浸泡种子过夜,使其

种子吸水膨胀,再用 70% 的酒精消毒 1 min,无菌水冲洗 3 遍后,用 20% 的次氯酸钠溶液浸泡 14 min,接着用无菌水冲洗 4 遍,接种在无激素的 MS 固体培养基上,在黑暗、(25±1)℃ 条件下培养,诱导无菌苗。待无菌苗萌发 4~5 d 后转入 16 h/d 光照条件下培养 2 d 后备用。

1.2.2 愈伤组织的诱导培养 将幼苗的下胚轴和子叶切成 0.4 cm 左右的小段,接种在附加不同激素的 MS 或 B5 固体培养基上诱导愈伤组织。诱导条件为全暗或 16 h/d 光照,每处理接种 30 个外植体,3 次重复,40 d 后统计其愈伤组织的诱导和生长结果。愈伤组织的诱导频率=(诱导出愈伤组织的外植体数/接种总外植体数)×100%。

2 结果与分析

2.1 激素对胡萝卜愈伤组织诱导的影响

将下胚轴接种在附加不同激素和浓度的 MS 固体培养基上,5 d 后下胚轴即开始膨大,随后开始诱导出愈伤组织。由表 1 可知,所有的外植体在只添加激素 2,4-D 的 MS 固体培养基上都诱导出愈伤组织,诱导频率均为 100%,而在不含 2,4-D 的培养基上没有诱导出愈伤组织(图 1-E)。由此可见,2,4-D 对胡萝卜下胚轴愈伤组织的诱导有着显著的作用。而在只添加激素 KT 的情况下,外植体不能诱导出愈伤组织,说明 KT 对胡萝卜下胚轴愈伤组织的诱导并无作用。在只添加 2,4-D 的 MS 固体培养基上,随着 2,4-D 浓度的增高,诱导出的下胚轴愈伤组织含水量增大,同时部分愈伤组织的表面及边缘处出现粘性增大并结块的现象(图 1-B、C),生长明显缓慢。而在添加低浓度(0.1 mg/L)的 2,4-D 培养基上诱导出的胡萝卜的愈伤组织生长明显地较高浓度下的愈伤组织生长快速,且愈伤组织松散性好,生长情况良好(图 1-A)。愈伤组织在后期继代培养中(与原诱导培养基同)生长良好,增殖快速。

试验结果表明,在 MS 固体培养基上添加 2,4-D 并

第一作者简介:汪洪(1974-),女,博士,副教授,现主要从事植物生物技术方面的研究工作。E-mail: anghong@126.com。

责任作者:杨树林(1953-),男,教授,博士生导师,现主要从事生物技术方面的研究工作。E-mail: yshulin@mail.njust.edu.cn。

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(Y3100459)。

收稿日期:2011-10-17

配合一定浓度的 KT 比单独使用 2,4-D 对胡萝卜愈伤组织诱导的效果更好,愈伤组织增殖更快速而且松散性较好。在 2,4-D 浓度一定(0.1 mg/L)的情况下,随着 KT 浓度的增高愈伤组织的诱导情况更好,即 G 组试验效果比较佳。当低浓度的 2,4-D 和低浓度的 KT 结合,即 2,4-D 浓度与 KT 浓度相同时,愈伤组织的诱导情况反而不及单独使用低浓度的 2,4-D 诱导的愈伤组织好(图 1-F),主要表现在愈伤组织的生长明显减慢。2,4-D 和 KT 浓度相当时,对胡萝卜愈伤组织的诱导不利情况在其它试验中也有类似结果^[5-6]。而在 KT 浓度一定的情况下(0.5 mg/L)与高浓度的 2,4-D(1.0 mg/L)结合(D 组)或者低浓度的 2,4-D(0.1 mg/L)结合(G 组),其诱导情况比较相似(图 1-D、G),只是后者在生长速度上比前者略微快一些,但松散性比前者略差一些,长时间继代后其生长状况不及 D 组。由此推测,一定浓度的 KT (0.5 mg/L)在胡萝卜愈伤组织的诱导上没有明显的作用,但能促进愈伤组织细胞的分裂速度、促进愈伤组织的增殖。

表 1 激素对胡萝卜下胚轴愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effect of hormones on calli induction from hypocotyls of *Daucus carota* L.

处理	激素 Hormones /mg · L ⁻¹		诱导频率	愈伤组织生长状况
Treatment	2,4-D	KT	Induction frequency/%	Callus state
A	0.1	0	100.00±0.00a	++
B	0.5	0	100.00±0.00a	+
C	1.0	0	100.00±0.00a	+
D	1.0	0.5	100.00±0.00a	+++
E	0	0.5	0.00±0.00b	—
F	0.1	0.1	100.00±0.00a	+
G	0.1	0.5	100.00±0.00a	+++

注:差异显著水平为 0.05。+,愈伤组织含水量大,或者部分致密,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; —,无愈伤组织。

Note: The significant level is 0.05. +, calli with high humidity and/or densification, poor growth; ++, calli with good looseness and growth; +++, calli with good looseness and better growth; —, no calli.

2.2 外植体类型对胡萝卜愈伤组织诱导的影响

每组试验中均以下胚轴和子叶为外植体同时进行愈伤组织的诱导试验(基本培养基为 MS 培养基)。结果表明,在各组试验中除了 E 组试验外,其它试验组均能诱导出愈伤组织,且诱导频率为 100%,该试验结果与下胚轴的试验结果类似,但和下胚轴相比,所有子叶诱导出的愈伤组织明显不及相同条件下下胚轴的愈伤组织好,表现为愈伤组织生长非常缓慢,而且松散性比较差,个别比较粘湿(图 1-H)。因此,对胡萝卜愈伤组织的诱导以下胚轴为外植体为宜。

2.3 培养基类型对胡萝卜愈伤组织诱导的影响

该试验选择下胚轴为外植体,在添加 2,4-D 0.1 mg/L 和 2,4-D 1.0 mg/L+KT 0.5 mg/L 的激素条件下考察了 MS 培养基和 B5 培养基对下胚轴愈伤组织诱导的影响。结果表明,相同激素条件下 B5 培养基不

及 MS 培养基上诱导的愈伤组织效果好。周玲艳等^[5]研究表明,在以胡萝卜块根为外植体的愈伤组织的诱导培养基上,B5 培养基与 MS 培养基诱导愈伤组织效果雷同;在高金秋等^[7]的研究中表明,以子叶和下胚轴为外植体,“长城红钥”对 B5 和 MS 均表现适应,而“开拓者”仅对 B5 表现适应。植物愈伤组织的诱导与基因型、外植体有关,因此,就胡萝卜“七寸人参”下胚轴愈伤组织的诱导而言,相同条件下,MS 培养基比 B5 培养基更适合。

2.4 光照对胡萝卜愈伤组织诱导的影响

该试验在 D 组试验的基础上考察了 16 h/d 光照和全暗的条件下下胚轴愈伤组织的诱导情况。在全暗的条件下,愈伤组织诱导频率为 100%,愈伤组织生长状况良好;而在 16 h/d 光照的条件下愈伤组织的诱导频率也为 100%,但诱导出的愈伤组织量非常少,且愈伤组织在增殖一段时间后很快就由浅黄色变为绿色而致密,之后几乎不再进行愈伤组织的增殖。该绿色的愈伤组织在 1 个月后就一直停留于绿色的愈伤组织的状况而不发生任何分化,最终致密而褐化死亡。因此,该试验表明,光照对愈伤组织的诱导频率没有影响,但明显地抑制着愈伤组织的增殖与生长。故胡萝卜愈伤组织的诱导适宜在暗培养的条件下进行。

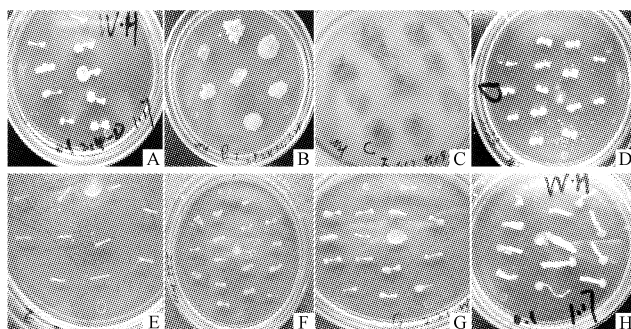


图 1 胡萝卜愈伤组织的诱导

注:A. 下胚轴愈伤组织的诱导(MS+2,4-D 0.1 mg/L); B. 下胚轴愈伤组织的诱导(MS+2,4-D 0.5 mg/L); C. 下胚轴愈伤组织的诱导(MS+2,4-D 1.0 mg/L); D. 下胚轴愈伤组织的诱导(MS+2,4-D 1.0 mg/L + KT 0.5 mg/L); E. 下胚轴愈伤组织的诱导(MS+ KT 0.5 mg/L); F. 下胚轴愈伤组织的诱导(MS+2,4-D 0.1 mg/L + KT 0.1 mg/L); G. 下胚轴愈伤组织的诱导(MS+2,4-D 0.1 mg/L + KT 0.5 mg/L); H. 子叶愈伤组织的诱导(MS+2,4-D 0.1 mg/L)

Fig. 1 Calli induction from carrot

Note: A. Calli from hypocotyls on MS medium with 0.1 mg/L 2,4-D; B. Calli from hypocotyls on MS medium with 0.5 mg/L 2,4-D; C. Calli from hypocotyls on MS medium with 1.0 mg/L 2,4-D; D. Calli from hypocotyls on MS medium with 1.0 mg/L 2,4-D and 0.5 mg/L KT; E. Calli from hypocotyls on MS medium with 0.5 mg/L KT; F. Calli from hypocotyls on MS medium with 0.1 mg/L 2,4-D and 0.1 mg/L KT; G. Calli from hypocotyls on MS medium with 0.1 mg/L 2,4-D and 0.5 mg/L KT; H. Calli from cotyledons on MS medium with 0.1 mg/L 2,4-D.

3 结论与讨论

影响植物愈伤组织诱导的因素很多,如光照^[8]、培

培养基种类与植物激素以及外植体^[9-10]、其它添加物如绿原酸和维生素等^[11],这些因素的调控是一个错综复杂的过程,即使是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。胡萝卜愈伤组织的诱导在国内外早已有报道,但在这些报道中结果不尽一致,有的甚至相反。因此,以胡萝卜“七寸人参”为材料,研究了激素、外植体、光照和培养种类对胡萝卜愈伤组织诱导及生长的影响,建立了胡萝卜愈伤组织诱导的最佳培养条件,即以胡萝卜下胚轴为外植体,在 MS+2,4-D 1.0 mg/L+KT 0.5 mg/L 培养基上能快速地诱导出愈伤组织,并且愈伤组织能在相同的培养基上快速大量地增殖,其增殖速率为原体积的 3~4 倍/周。

一般认为,诱导外植体脱分化和器官的建成关键在于生长素和分裂素的配比。生长素在诱导外植体脱分化产生愈伤组织中起决定性作用,而分裂素只是增加了愈伤组织的发生数量,其浓度过高反而产生负面作用^[12]。该试验结果表明,低浓度生长素 2,4-D 有利于胡萝卜愈伤组织的诱导,这与其它一些以外源激素考察胡萝卜愈伤组织诱导试验的结果一致,也有试验表明高浓度的 2,4-D 也能诱导愈伤组织^[13]。该试验还表明,2,4-D 与一定浓度的细胞分裂素 KT(0.5 mg/L)配合使用则有利于愈伤组织的快速增殖。

通过组织培养获得离体植株再生体系通常有器官发生和体细胞胚发生 2 种途径。器官发生包括直接发生和间接发生 2 种方式,直接器官发生耗时短、操作简便;而间接器官发生需先诱导愈伤组织,再经器官分化形成再生植株,愈伤组织培养不受季节限制,污染率低、诱导率高,是器官发生途径中常用的方式;体胚发生途径则多通过间接方式发生,即先诱导生成胚性愈伤组织,再从胚性愈伤组织诱导体细胞胚并使其成熟和萌发,进而得到完整植株。因此,愈伤组织的诱导是获得完整植株的重要环节。该试验得出了胡萝卜“七寸人

参”愈伤组织诱导的最佳条件,对日后利用胡萝卜栽培品种“七寸人参”建立离体再生体系奠定了基础,对利用胡萝卜细胞进行基因工程研究具有一定的理论和实践意义。

参考文献

- [1] Luchakivskaya Y, Kishchenko O, Gerasymenko I, et al. High-level expression of human interferon alpha-2b in transgenic carrot (*Daucus carota* L.)[J]. Plant Cell Rep, 2011, 30:407-415.
- [2] Imani J, Lorenz H, Kogel K H, et al. Transgenic Carrots; Potential Source of Edible Vaccines [J]. J. Verbr. Lebensm, 2007, 2(Supplement1):105.
- [3] Sunil Kumar G B, Ganapathi T R, Bapat V A. Production of Hepatitis B Surface Antigen in Recombinant Plant Systems; An Update[J]. Biotechnol Prog, 2007, 23:532-539.
- [4] Shaaltiel Y, Bartfeld D, Hashmueli S, et al. Production of glucocerebrosidase with terminal mannose glycans for enzyme replacement therapy of Gaucher's disease using a plant cell system [J]. Plant Biotechnol J, 2007(5): 579-590.
- [5] 周玲艳, 秦华明. 胡萝卜悬浮细胞系及高效再生系统的建立[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(16):3929-3931.
- [6] 杨艳梅, 刘玲, 巩振辉, 等. 胡萝卜高效再生体系的建立[J]. 华北农学报, 2004, 19(1):10-12.
- [7] 高金秋, 于丽杰. 胡萝卜体细胞胚再生系统的建立[J]. 北方园艺, 2009(8):73-77.
- [8] 褚四敏, 陈敏洁, 贾文妹, 等. 光质对植物组织培养的影响[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(2):665-666, 672.
- [9] 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.
- [10] 张娅, 曾君社, 周志勇, 等. 胡萝卜组织培养和高效遗传转化体系的建立[J]. 植物学通报, 2005, 22(增刊):37-42.
- [11] Franklin G, Dias A C. Chlorogenic acid participates in the regulation of shoot, root and root hair development in *Hypericum perforatum* [J]. Plant Physiol Biochem, 2011, 49(8):835-842.
- [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.
- [13] Kitamiya E, Suzuki S, Sano T, et al. Isolation of two genes that were induced upon the initiation of somatic embryogenesis on carrot hypocotyls by high concentrations of 2,4-D [J]. Plant Cell Reports, 2000, 19:551-557.

A Study on Calli Induction and Culture from *Daucus carota* L.

WANG Hong^{1,2}, XIA Hong-liang², LI Xiao-kun², YANG Shu-lin¹

(1. School of Environmental and Biological Engineering, Nanjing University of Science and Technology, Nanjing, Jiangsu 210094; 2. School of Pharmacy, Wenzhou Medical College, Wenzhou, Zhejiang 325035)

Abstract: Calli induction and proliferation from explants were regulated by several factors, the effect of hormones, different explants, light and media on calli induction from *Daucus carota* L. was investigated. The results indicated that the optimal explant for calli induction from carrot was hypocotyl rather than cotyledon. The optimal medium for calli induction was MS agar medium supplemented with 3% sucrose, 2,4-D 1.0 mg/L and KT 0.5 mg/L. The induced calli frequency of the carrot hypocotyls on this medium was 100%. Light had no effect on calli induction but it influenced calli proliferation.

Key words: carrot; calli; tissue culture