

长柄双花木愈伤组织诱导及植株再生

曾建军¹, 肖宜安¹, 孙敏^{2*}

(1. 井冈山学院 生命科学学院, 江西 吉安 343009; 2. 西南师范大学 生命科学学院, 重庆 400715)

摘要: 以长柄双花木当年生嫩梢上的叶柄、嫩茎、嫩叶为外植体, 对影响长柄双花木愈伤组织诱导和继代、分化主要因素进行研究。结果表明: 在培养基 MS+NAA 0.5 mg/L+2,4-D 2.0 mg/L 上, 三种外植体均可诱导愈伤组织, 其中叶片愈伤组织诱导率最高。该培养基还可作为愈伤组织继代培养基, 但继代培养周期不超过 2 周。愈伤组织接种在 MS+BA 2 mg/L 上分化不定芽, 根的诱导在 1/2MS+IBA 0.5 mg/L 培养基上进行。

关键词: 长柄双花木; 愈伤组织; 诱导; 继代培养

中图分类号: Q943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2006)06-0628-03

Callus induction and plant regeneration of *Disanthus cercidifolius* var. *longipes*

ZENG Jian-jun¹, XIAO Yi-an¹, SUN Min^{2*}

(1. College of Biology, Jinggangshan College, Ji'an 343009, China; 2. College of Life Sciences, Southwest China Normal University, Chongqing 400715, China)

Abstract: The stems, leaves and petioles explants from *Disanthus cercidifolius* Maxim. var. *longipes* H. T. Chang were cultured on MS medium with BA, NAA, 2,4-D, IBA of different concentration to induce regeneration plant. The results indicated that leaf was the best explant for callus induction, and the best suitable medium was MS+NAA 0.5 mg/L+2,4-D 2.0 mg/L, it also could be used as the medium for callus subculture. MS medium only supplemented with BA mg/L could obtain higher frequency of differentiation. When studying root regeneration culture, 1/2MS medium supplemented with IBA 0.5 mg/L had better root regeneration.

Key words: *Disanthus cercidifolius* var. *longipes*; callus; induction; subculture

长柄双花木 (*Disanthus cercidifolius* Maxim. var. *longipes* H. T. Chang) 为金缕梅科双花木属 (*Disanthus*), 我国特有种。仅零星分布于湖南、江西和浙江等省的部分县, 分布区局限, 且个体数量稀少, 每年形成的种子数量少, 目前已处于濒危状态, 被列为国家二级重点保护的濒危物种 (傅立国, 1992)。有文献报道了长柄双花木的形态、数量及林学特征 (李根有等, 2002; 肖宜安等, 2002), 而利用现代生物技术对其种质资源保护尚未见报道。我们利用组织培养对长柄双花木的愈伤组织诱导及继代培

养、植株再生进行了初步研究, 旨在比较不同培养基和外植体对长柄双花木愈伤组织诱导率的影响, 选出利于长柄双花木愈伤组织诱导和生长、植株再生的最佳培养基, 以期对长柄双花木保护生物学、引种驯化及育种提供理论和工作基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

长柄双花木采自井冈山国家自然保护区内。

收稿日期: 2005-03-14 修回日期: 2005-10-20

基金项目: 江西教育厅科技项目 (赣教 [2005] 232); 国家自然科学基金 (30560025) 资助 [Supported by Science and Technology Foundation of Education Department of Jiangxi Province ([2005] 232); the National Natural Science Foundation of China (30560025)]

作者简介: 曾建军 (1973-), 女, 江西井冈山人, 硕士, 讲师, 主要从事植物生物技术研究。

* 通讯作者 (Author for correspondence, E-mail: whooi@sina.com)

1.2 试验方法

基本培养基为 MS,蔗糖为 30 g/L,另加 8 g/L 琼脂进行固化。根据不同培养阶段附加不同激素,灭菌前将 pH 调至 5.8。每种外植体接种 5 瓶,每瓶 6 个外植体,培养温度 25 ± 2 °C,每天连续光照 10 h,光照度 1 000 lx。

选取当年萌发嫩茎、叶柄剪成 0.5 cm 长、嫩叶剪成 0.5~1 cm 见方小块,置于自来水中冲洗干净,1%洗衣粉浸泡 30 min,流水冲洗 2 h。无菌条件下 70%的酒精表面消毒 30 s,无菌水冲洗一遍。再用 0.1%升汞对侧芽、嫩叶、嫩茎分别消毒 3、4、5、8、10 min,然后进行培养。无菌水冲洗 8 次,一周后统计污染率。

愈伤组织诱导:三种外植体分别接种到 1~13 号不同培养基中;愈伤组织继代培养:将生长良好、质地疏松的愈伤组织接种到 2、3、6、12 号四种培养基中,培养 20 d 后,按下式计算褐化率:褐化率=褐化愈伤组织的块数/接种愈伤组织块数 $\times 100\%$ (表 1)。

愈伤组织再分化及生根培养:将经继代培养得到的愈伤组织置于表 4 分化培养基上,分化的不定芽移至生根培养基:1/2MS+IBA 0.5 mg/L。

2 结果与分析

2.1 消毒剂与消毒时间

结果分析表明,不同外植体对 0.1%升汞敏感性不同。侧芽消毒 8 min、嫩叶 4 min、嫩茎 6 min 时,外植体的杀伤程度和灭菌程度综合效果最好,污染率最小,成活率最高,消毒时间过长导致外植体在培养中褪绿死亡,尤其是嫩叶应严格控制消毒时间。

2.2 愈伤组织的诱导

2.2.1 不同激素种类对叶片愈伤组织诱导的效应

将无菌叶片接种到表 1 不同培养基中诱导愈伤组织。接种约 10~15 d,除 4、13 号培养基外,其它培养基上的外植体切口处膨大,开始形成愈伤组织。叶片切口处初始分化的愈伤组织为黄绿色颗粒状,随后逐渐长成黄白色较大颗粒状(图版 I:1)。培养基激素组合与浓度配比不同,对叶片愈伤组织的诱导效果有较大差异,由表 1 可见,当 NAA 0.5 mg/L 和 2,4-D 2.0 mg/L 配合使用时,叶片愈伤组织诱导率为 100%,并且生长迅速,质地疏松。与之相比,添加了 BA 的培养基上诱导的愈伤组织有致密和疏松二种,在这种培养基上长期培养愈伤组织易导致

其结团、质地不够松散,不利于增殖。

2.2.2 不同外植体愈伤组织的诱导 将消毒叶柄、嫩茎、嫩叶接种到 MS+NAA 0.5 mg/L+2,4-D 2.0 mg/L 培养(表 2)。培养 12 d 后茎段及腋芽切口处逐渐诱导出黄白色、颗粒状愈伤组织,叶片切口尤其是叶脉明显膨大,15 d 后所有外植体均诱导分化出愈伤组织,其中叶片四个切面均能诱导出黄绿色和黄白色愈伤组织,愈伤组织生长良好。因此,我们认为叶片为长柄双花木愈伤组织诱导最佳外植体。

表 1 不同激素浓度对叶片愈伤组织诱导的影响
Table 1 Callus induction with various concentrations of hormones from leaves

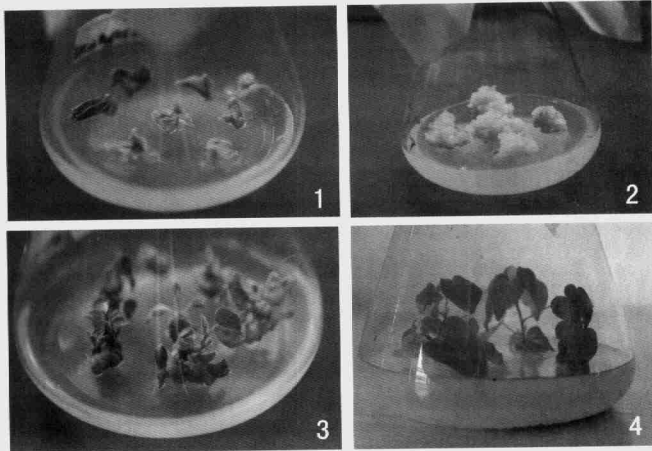
培养基 Medium	激素浓度(mg/L) Concentration of plant growth regulators			接种外 植体数 No. of explants	平均诱导率 Rate of callus induction (%)
	BA	NAA	2,4-D		
1	0	0.1	0.5	24	66.7
2	0	0.2	1.0	27	88.9
3	0	0.5	2.0	22	100
4	0.5	0.1	0	24	10
5	0.5	0.2	0	23	43.4
6	0.5	0.5	0	25	80
7	1.0	0.05	0.5	24	75
8	1.0	0.2	1.0	23	78.3
9	1.0	0.5	2.0	26	84.7
10	2.0	0.05	0	27	74
11	2.0	0.2	0	21	86
12	2.0	0.5	0	26	92.3
13	5.0	0.5	0	30	0

2.3 不同植物生长调节剂对长柄双花木愈伤组织继代培养的影响

愈伤组织接种到 2、3、6、12 号四种培养基。在培养初期,四种培养基上培养的愈伤组织都有较显著的增殖。20 d 后结果分析表明(表 3),在附加 2.0 mg/L 2,4-D 培养基上,愈伤组织增殖最明显,呈乳白色、疏松、颗粒状,将近 1/3 出现轻微褐化。与之相比,添加了 BA 的培养基上,虽然随 BA 浓度升高,愈伤组织增殖率也逐渐增高,但增殖的愈伤组织质地不同,有致密和疏松两种,褐化现象随 BA 浓度增高也更明显。根据愈伤组织增殖率和褐化情况不同,选用附加 2,4-D 2.0 mg/L 和 NAA 0.5 mg/L 的培养基作为愈伤组织继代培养培养基,培养周期不超过 2 周可避免褐化现象,数月后得到生长旺盛、疏松、乳白色的愈伤组织(图版 I:2)。

2.4 愈伤组织再分化和不定芽生根培养

在含有 BA 的培养基上,继代培养得到的愈伤组织均能分化出不定芽(表 4),其中在仅含 BA 2.0



图版 I 1. 叶片切口处分化愈伤组织; 2. 愈伤组织继代培养; 3. 在仅含 BA 培养基上分化的丛生芽; 4. 生根苗。
Plate I 1. Callus production from margins of intact leaves and the cut face of leaves section; 2. Callus subculture; 3. Shoot clumps formed MS medium with BA alone; 4. Rooting in microshoot on half-strength MS medium with IBA.

表 2 不同外植体愈伤组织的诱导
Table 2 Callus induction of different explants

外植体 Explants	接种数 No. of explants	愈伤组织诱导率 Callus inducing rate
叶柄 Petiole	32	+
嫩叶 Leaf	36	+++
嫩茎 Stem	35	++

注: “+”少量; “++”较好; “+++”最好。下同。
Note: “+” a little; “++” better; “+++” the best. The same below.

表 3 不同激素对比愈伤组织继代培养的影响
Table 3 Effect of various growth regulators on callus subculture

激素浓度(mg/L) Concentration of plant growth regulators			褐化率(%) Rate of browning	愈伤组织增殖率 Regeneration of callus
BA	NAA	2,4-D		
0.5	0	1.0	27.3	++
0	0.5	2.0	32.5	+++
0.5	0.5	0	13.0	+
2.0	0.5	0	42.1	++

表中数据为 20 d 后测定结果。The data was mensurated after 20 d.

mg/L 培养基上不定芽分化频率最高。在同时添加 NAA 的分化培养基上, 大部分愈伤组织分化出的是单苗。将分化的不定芽切下, 继续培养在相同培

养基上扩繁。结果表明在含 NAA 的培养基上, 不定芽基部因分化出大量愈伤组织抑制了其增殖, 而仅含 BA 的培养基上不定芽增殖倍率为 4~7 倍, 且分化的不定芽生长健壮。待不定芽长至 2 cm 左右, 接种在生根培养基上, 20 d 后不定芽基部分化 2~3 根不定根(图版 I: 4)。

表 4 不同激素对比愈伤组织分化培养的影响
Fig. 4 Effect of various growth regulators on callus differentiation

培养基成分(mg/L) Supplements to MS		愈伤数 No. of callus	再生愈伤数 No. of regeneration callus	频率 Freq. (%)
NAA	BA			
0	1.0	22	16	73
0.2	1.0	23	17	74
0	2.0	20	18	90
0.2	2.0	21	18	86

3 讨论

本试验利用长柄双花木叶柄、嫩茎、嫩叶为外植体建立了离体培养再生体系。三种外植体中, 叶片更容易脱分化形成愈伤组织。通过对长柄双花木外(下转第 601 页 Continue on page 601)

- 水稻幼穗发育早期特异表达的基因[J]. 科学通报, 45(13): 1 392—1 397.
- 骆 蒙, 孔秀英, 霍纳新, 等. 2002a. 基于抑制差减杂交方法的小麦抗白粉病相关基因表达谱[J]. 科学通报, 47(16): 1 237—1 241.
- J 萨姆布鲁克, D W 拉塞尔. 2002. 黄培堂, 等(译). 分子克隆实验指南(上册)[M]. 第 3 版. 北京: 科学出版社: 548.
- Chen W(陈 伟), Lu LX(吕柳新), Huang CM(黄春梅), et al. 2001. Studies on 'Wuye' litchi specific proteins in the embryo development('乌叶'荔枝胚胎发育过程特异蛋白的变化)[J]. *Acta Hort Sin*(园艺学报), 28(6): 504—508.
- Chen JH(陈健辉), Yang JH(杨俊慧), Pan KQ(潘坤清). 2001. Study on developmental process of aril in seedless-litchi(无核荔枝假种皮发育过程的研究)[J]. *Guihaia*(广西植物), 21(4): 362—366.
- Gao P, Wang GY, Zhao HJ, et al. 2003. Isolation and identification of submergence-induced genes in maize (*Zea mays*) seedlings by suppression subtractive hybridization[J]. *Acta Bot Sin*, 45(4): 479—483.
- Hinderhofer K, Zentgraf U. 2001. Identification of a transcription factor specifically expressed at the onset of leaf senescence[J]. *Planta*, 213: 469—473.
- Kim JY, Chung YS, Ok SH, et al. 1999. Characterization of the full-length sequences of phospholipase A2 induced during flower development[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1 489: 389—392.
- Kim JY, Chung YS, Paek KH, et al. 1999. Isolation and characterization of a cDNA encoding the cysteine proteinase inhibitor, induced upon flower maturation in carnation using suppression subtractive hybridization[J]. *Molecular Cell*, 9: 392—397.
- Liu CM(刘成明), Mei MT(梅曼彤). 2002. Identification of stenospermocarp mutants of litchi by RAPD(利用 RAPD 分析鉴别荔枝的焦核突变体)[J]. *Acta Hort Sin*(园艺学报), 29(1): 57—59.
- Luo M(骆 蒙), Kong XY(孔秀英), Huo NX(霍纳新), et al. 2002b. ESTs analysis of resistance to powdery mildew in wheat at primary infected stage(小麦抗白粉病侵染初期的表达序列标签分析)[J]. *Acta Genet Sin*(遗传学报), 29(6): 525—530.
- Yang YH(杨应华), Li L(李 蕾), Yu DN(余诞年). 2002. Research on the seed abortion and fruit development in a seedless litchi strain(温敏无核荔枝的种子败育和果实发育)[J]. *J Hainan Normal Univ(Nat Sci)*(海南师范学院学报(自然科学版)), 15(2): 71—74.
- Zhao XL(赵小兰), Su XH(苏晓华), Tian CW(田传卫), et al. 2005. Analysis of genes of *Rosa multiflora* 'Inermis4' expressed in response to *Agrobacterium tumefaciens* infection(根癌农杆菌胁迫下多花蔷薇的基因表达分析)[J]. *Sci Agric Sin*(中国农业科学), 38(7): 1 425—1 430.
- Zhang YS(张以顺), Xiang X(向 旭), Fu JR(傅家瑞), et al. 2004a. Cloning and sequencing of cDNA fragments differentially expressed between aborted and normal development embryo in litchi(荔枝胚败育差异表达基因 cDNA 片段的克隆及序列分析)[J]. *Acta Hort Sin*(园艺学报), 31(1): 25—28.
- Zhang YS(张以顺), Xiang X(向 旭), Fu JR(傅家瑞), et al. 2004b. Full-length amplifying and sequencing of S-adenosylmethionine synthetase gene in litchi aborted-embryo of "GuiWei"(荔枝败育胚 S-腺苷甲硫氨酸合成酶基因的全长扩增和序列分析)[J]. *Acta Hort Sin*(园艺学报), 31(2): 160—164.

(上接第 630 页 Continue from page 630)

植体叶片愈伤组织诱导、继代及再分化培养条件探究, 得到以下结论: 愈伤组织诱导和继代最佳培养基为 MS+NAA 0.5 mg/L+2,4-D 2.0 mg/L, 在仅含 BA 的 MS 培养基上, 愈伤组织分化大量健壮不定芽, 1/2MS+0.5 mg/L IBA 培养基有利不定芽生根。

在诱导叶片愈伤组织实验中发现, 较高浓度的生长素有利于愈伤组织诱导。许多研究表明 2,4-D 对外植体脱分化启动效果最好, 我们也有相同的结论, 但许多文献报道, 连续使用易使愈伤组织褐化。本试验结果表明, 将诱导分化的长柄双花木愈伤组织接种在含 2,4-D 培养基上继代培养, 愈伤组织增殖率最高, 增殖的愈伤组织每 20 天继代一次可避免褐化现象。

长柄双花木外植体在添加 NAA 培养基中极易诱导分化出愈伤组织, 不利于愈伤组织分化, 推测与长柄双花木外植体本身内源 NAA 含量高有关, 因

此在不定芽增殖和诱导不定根时应避免使用 NAA。在离体再生培养过程中, 不定芽和再生植株生长非常缓慢, 今后还需探索各种培养条件以促进长柄双花木再生植株生长。

参考文献:

- 傅立国. 1992. 中国植物红皮书——稀有濒危植物(第 1 册)[M]. 北京: 科学出版社: 324—32.
- Li GY(李根有), Chen ZH(陈征海), Qiu YD(邱瑶德). 2002. Quantitative distribution and forestry features of *Disanthus cercidifolius* in Zhejiang(浙江省长柄双花木数量分布与林学特性)[J]. *J Zhejiang Fore Coll*(浙江林学院学报), 19(1): 20—23.
- Xiao YA(肖宜安), He P(何 平), Deng HP(邓洪平), et al. 2002. Numerical analysis of population morphological differentiation of *Disanthus cercidifolius* Maxim. var. *longipes* in Jinggangshan(井冈山长柄双花木形态分异的数量分析)[J]. *J Wuhan Bot Res*(武汉植物学研究), 20(5): 365—370.