

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2014.06.019

刘艳丽,梁坤南,黄桂华,等. 柚木无性系愈伤组织诱导及植株再生[J]. 广西植物,2014,34(6):841—847

Liu YL,Liang KN,Huang GH,*et al.* Callus induction and plant regeneration of teak (*Tectona grandis*) clones[J]. *Guihaia*,2014,34(6):841—847

## 柚木无性系愈伤组织诱导及植株再生

刘艳丽, 梁坤南\*, 黄桂华, 曾炳山, 周再知, 马华明

(中国林业科学研究院 热带林业研究所, 广州 510520)

**摘要:**以柚木优良无性系 71-14 组培苗节间茎段为材料,MS 为基本培养基,采用正交设计对 6-BA、IBA、TDZ、NAA 等 4 个生长调节剂各 4 水平进行愈伤组织诱导,并以最佳组合使用不同浓度的 TDZ 进行柚木愈伤组织再生。结果表明:TDZ 对形成具再生能力的致密型愈伤组织影响最大,低浓度水平的 TDZ 和 6-BA 更易形成致密型愈伤组织;以愈伤组织大小、诱导率和致密型所占比例采用隶属函数法评定得出最优的愈伤组织诱导培养基为  $MS+0.9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}6\text{-BA}+0.04 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}\text{IBA}+0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}\text{TDZ}+0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}\text{NAA}$ ,愈伤组织诱导率达 80.78%、平均直径 1.65 cm,获致密型愈伤组织 83.0%;得出优化的再生培养基为  $MS+0.132 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}\text{TDZ}$ ,分化率为 34.22%;初步建立了以茎段为外植体的柚木优良无性系 71-14 的再生体系,为柚木转基因技术的研究提供技术支撑。

**关键词:** 柚木无性系; 生长调节剂; 愈伤组织诱导; 植株再生

**中图分类号:** Q943.1; S722.3      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1000-3142(2014)06-0841-07

## Callus induction and plant regeneration of teak (*Tectona grandis*) clones

LIU Yan-Li, LIANG Kun-Nan\*, HUANG Gui-Hua,  
ZENG Bing-Shan, ZHOU Zai-Zhi, MA Hua-Ming

(Research Institute of Tropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Guangzhou 510520, China)

**Abstract:** To establish a teak (*Tectona grandis*) regeneration system for further teak transformation, internode segments for clone 71-14 were selected for callus induction and differentiation. In this study, 6-BA, IBA, TDZ, NAA were used to study the effects of Plant Growth Regulators (PGRs) and their ratios on callus induction by an orthogonal design with four concentrations, then the optimal callus were used for differentiation with different concentration of TDZ. The results showed that TDZ had the greatest influence on the types of callus, compact callus were much easier to be formed in low concentrations of TDZ and 6-BA. Meanwhile, using membership function which the evaluation indicators were callus size, callus induction rate and the compact callus rate, the optimal combination of PGRs for callus induction was  $0.9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}6\text{-BA}+0.04 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}\text{IBA}+0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}\text{TDZ}+0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}\text{NAA}$ , with 80.78% callus percentage, 1.65 cm average diameter and 83.0% compact callus percentage. The highest callus differentiation rate was 34.22% with  $0.132 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}\text{TDZ}$ . Through this study, a regeneration system for teak clone 71-14 was initially established.

**Key words:** *Tectona grandis* clone 71-14; plant growth regulators; callus induction; plant regeneration

收稿日期: 2014-03-30      修回日期: 2014-05-16

基金项目: 国家林业公益性行业科研专项重大项目(201104001)

作者简介: 刘艳丽(1990-),女,湖南益阳人,在读硕士研究生,主要从事柚木抗性育种,(E-mail)yifanily@hotmail.com。

\*通讯作者: 梁坤南,研究员,硕士生导师,主要从事林木遗传育种与栽培技术研究,(E-mail)chinateak@163.net。

柚木(*Tectona grandis*)系马鞭草科(Verbenaceae)柚木属(*Tectona*)半落叶性高大乔木,原产于缅甸、印度、泰国和老挝。柚木具有生长迅速、纹理美观、耐腐抗虫和易于加工等优良特性,被誉为最重要的热带珍贵用材树种之一(White, 1991; 马华明等, 2003)。柚木用途极广,适于制作高档家具、木地板,也适于造船、桥梁以及露天建筑,是世界船舰、军需海航及海港、雕刻、红木家具和贴面板的重要用材(刘进平等, 2006)。随着国际市场对柚木需求逐年上升,加上来自天然林的柚木越来越紧缺,自 80 年代以来,柚木传统出口国如印度、泰国和印尼均已终止柚木的原木出口,目前仅有缅甸仍出口柚木原木,印尼只容许成品出口(马华明等, 2003),柚木在市场上十分短缺。

我国无柚木天然林分布,现存柚木种质资源基本由国外引进。且柚木幼林期不耐霜冻,国内适合种植的有海南、云南及广东、广西和福建的南部极少数地区(梁坤南等, 2011)。选育耐寒抗性柚木优良品种,在偶有霜冻地区推广种植尤为重要,常规育种的周期长、难度大、选择效率低(郑勇奇, 2001),转基因技术的应用给柚木无性系耐寒品种创制提供了一条选育途径。尽管 20 世纪 80 年代始,国内开展了柚木组织培养研究(王宝生等, 1980; 曹月华等, 1981),经过多年研究,已形成了成熟的适合规模化生产的组培快繁工艺技术(裘珍飞等, 2001)。但目前尚未建立合适的再生体系,这很大程度上限制了通过基因工程改良柚木的进程。本文拟通过柚木无性系愈伤组织的诱导与植株再生,建立柚木无性系再生体系,为柚木无性系转基因技术提供支撑。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

实验材料为中国林业科学研究院热带林业研究所选育的印度优良无性系 71-14,以该无性系无菌组培瓶苗的、不带腋芽的节间茎段为外植体。

### 1.2 方法与条件

1.2.1 愈伤组织诱导 根据单因素试验确定 4 种植物生长调节剂(6-BA、IBA、TDZ 和 NAA),各设 4 个浓度水平:6-BA(0.9、1.1、1.3、1.5  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )、IBA(0.04、0.08、0.12、0.16  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )、TDZ(0.02、0.05、0.08、0.11  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )和 NAA(0.8、0.9、1.0、1.1  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )。用正交设计  $L_{16}(4^5)$ ,16 个处理(组合)(表

1),每处理 3 次重复,每重复 6 瓶。切取 71-14 无性系无菌瓶苗长 0.5~0.7 cm 的节间茎段为外植体,每瓶接种 5 个外植体,每处理共接种外植体 90 个。

表 1 正交试验设计表  $L_{16}(4^5)$

Table 1 Orthogonal design of experiment

处理号 No. of treatment	生长调节剂浓度水平 Growth regulator concentration ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )				接种外植体数 No. of explant inoculation
	6-BA	IBA	TDZ	NAA	
1	0.9	0.04	0.02	0.8	90
2	0.9	0.08	0.05	0.9	90
3	0.9	0.12	0.08	1.0	90
4	0.9	0.16	0.11	1.1	90
5	1.1	0.04	0.05	1.0	90
6	1.1	0.08	0.02	1.1	90
7	1.1	0.12	0.11	0.8	90
8	1.1	0.16	0.08	0.9	90
9	1.3	0.04	0.08	1.1	90
10	1.3	0.08	0.11	1.0	90
11	1.3	0.12	0.02	0.9	90
12	1.3	0.16	0.05	0.8	90
13	1.5	0.04	0.11	0.9	90
14	1.5	0.08	0.08	0.8	90
15	1.5	0.12	0.05	1.1	90
16	1.5	0.16	0.02	1.0	90

以 MS 为基本培养基,添加蔗糖 30  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,琼脂 7.0  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,pH 调至 5.8。高温高压灭菌。接种材料先在 25  $^{\circ}\text{C}$  恒温箱中暗培养 28 d,再转入到培养室中进行光培养,光照时间为 12 h,光强 2 000 lx,温度为(25 $\pm$ 2) $^{\circ}\text{C}$ ;35 d 后观察外植体愈伤组织的大小、颜色、质地状况,并统计愈伤组织诱导率和褐化率。

1.2.2 植株再生 取节间茎段接种在 MS+0.9  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA+0.04  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA+0.02  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDZ+0.8  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 的培养基中诱导愈伤组织,光培养 30 d,切取茎段基部长出的愈伤组织接入 MS+TDZ(0.022~0.22  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 共 10 个浓度梯度)的培养基中,继代 3 次,转接周期为 20 d,观察愈伤组织生长和愈伤表面发生的变化。

### 1.3 数据处理与统计分析

愈伤组织诱导率(%)=诱导出愈伤组织的外植体数/接种外植体总数 $\times$ 100%;分化率(%)=已分化的愈伤组织数/接种的愈伤组织总数 $\times$ 100%;褐化率(%)=褐化愈伤组织的外植体数/接种外植体总数 $\times$ 100%;植株再生系数=再生芽数/形成再生芽的愈伤组织数。

所用数据采用 GENSTAT 和 SPSS18.0 软件进

行方差分析和邓肯多重比较。应用隶属函数法计算,以每个处理多项指标隶属值的平均来评判处理对愈伤组织的诱导能力,平均值越大诱导能力越强。

计算公式:  $M(X_{ij}) = (X_{ij} - X_{j\min}) / (X_{j\max} - X_{j\min})$

式中,  $M(X_{ij})$  为第  $i$  处理  $j$  指标的隶属函数值,  $X_{ij}$  为第  $i$  个处理  $j$  指标的测定值,  $X_{j\min}$  和  $X_{j\max}$  分别为  $j$  指标的最小和最大测定值。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同生长调节剂处理与浓度水平对愈伤组织诱导率、大小和褐化率的影响

对 16 个处理愈伤组织诱导率进行方差分析,结果表明(表 2):愈伤组织平均诱导率为 75.9%,处理间差异极显著,其中处理 3 和处理 12 诱导率分别达到 98.16% 和 84.23%,前者与另外的 14 个处理差异显著。不同处理对愈伤组织大小影响差异也极显著,其中处理 4 最大,平均直径为 1.78 cm,处理 7 其次,为 1.74 cm,处理 2 平均直径最低。从实验设计看,处理 4 是 6-BA 浓度水平最低、其他 3 种生长调节剂浓度水平最高的一个组合,尽管处理 4 的愈伤组织平均直径最大,但诱导率仅为 80.51%,与诱导率最高的处理 3 差异显著。处理 3 的诱导率最高,但愈伤组织平均直径仅 0.97 cm,与平均直径最大的处理 4 差异极显著,在 16 个处理中排序倒数第二。处理 3 愈伤组织诱导率虽高,但平均直径小,不利于下一步的愈伤组织继代。褐化率低有利于愈伤组织继代增殖,16 个处理愈伤组织褐化率从 0 到 10.71%,差异不显著。

不同生长调节剂浓度水平对愈伤组织的诱导率和平均直径影响表现不同(表 3)。6-BA 和 IBA 的不同浓度水平间愈伤组织诱导率差异显著,其中 6-BA 影响愈伤组织诱导率规律性明显,随着浓度增加,愈伤组织诱导率降低,即低浓度的 6-BA 更易于诱导愈伤组织;而 IBA 规律性不明显;TDZ 和 NAA 的不同浓度水平间愈伤组织诱导率差异不显著。TDZ 和 NAA 水平间平均直径差异分别达极显著和显著;而 6-BA 和 IBA 水平间差异不显著。4 种生长调节剂浓度水平间的褐化率差异均不显著。根据方差分析的显著性和极差大小可知,6-BA 和 IBA 是影响愈伤组织诱导率的主要因素。影响愈伤组织诱导率、平均直径及褐化率大小的排序分别为 6-BA

> IBA > NAA > TDZ, TDZ > NAA > 6-BA > IBA, NAA > TDZ > IBA > 6-BA。

表 2 不同生长调节剂处理对愈伤诱导的影响与邓肯多重比较

Table 2 Effects of different combinations for the four plant growth hormones on callus induction and the Duncan's multiple comparison (0.05, 0.01)

处理号 No. of treatment	愈伤组织 诱导率 Callus induction percentage (%)	处理号 No. of treatment	平均直径 Average diameter (cm)	处理号 No. of treatment	褐化率 Browning percentage (%)
3	98.16aA	4	1.78aA	14	0.00
12	84.23abAB	7	1.74aA	5	0.00
6	81.47bcAB	1	1.65abAB	8	0.00
11	81.06bcAB	11	1.60abABC	3	0.00
8	81.06bcAB	10	1.43abcABCD	4	0.21
1	80.78bcAB	14	1.37abcdABCD	10	0.44
4	80.51bcAB	5	1.27bcdABCD	16	0.51
7	78.82bcAB	6	1.26bcdABCD	9	0.62
5	77.81bcAB	9	1.21bcdABCD	6	1.28
16	75.60bcAB	8	1.12cdBCD	2	1.36
10	73.63bcAB	15	1.12cdBCD	11	2.45
13	70.02bcB	16	1.04cdCD	13	3.91
2	65.12bcB	13	1.02cdCD	7	6.70
15	62.43bcB	12	1.01cdCD	1	6.70
14	52.97cB	3	0.97cdD	15	8.07
9	52.27cB	2	0.92cdD	12	10.71
F 值	2.25 **		4.19 **		1.22ns
F value					
Fpr 显著性	0.007		<0.001		0.264
F significance					
平均 Mean	75.9		1.28		1.53

注: ns, \*, \*\* 分别表示方差分析的 F 值差异不显著、显著和极显著。小写或大写字母相同,表示两两间差异不显著或极不显著;反之,则表示差异显著或极显著。下同。

Note: ns, \*, \*\* mean the differences of F value in ANOVA are not significant, significant and very significant, separately. The lowercase or uppercase letters after the figures between two treatment are the same mean the difference was not significant or not very significant; Contrary, mean the difference was significant or very significant. The same below.

### 2.2 不同生长调节剂处理与浓度水平对愈伤组织质地的影响

不同处理对 71-14 诱导发现,愈伤组织以致密型居多,占 45.8%,而疏松致密型和疏松型分别为 23.6% 和 30.6%。16 个处理间三种类型愈伤组织差异均达极显著(表 4)。其中处理 1、2、3、5、6、9、11、15 形成的愈伤组织以致密型为主,占 52.1%~85.0%。处理 10、14、16 形成的愈伤组织以表面疏松,内部致密为主,占 50.8%~55.0%;处理 4、8 形成的愈伤组织以疏松型为主,分别占 80.8% 和 56.7%,其他 3 个处理的三种类型愈伤组织所占比例相差不大。

不同生长调节剂浓度水平对形成愈伤组织的质

表 3 6-BA、IBA、TDZ、NAA 不同浓度水平对 71-14 愈伤组织诱导的影响与邓肯多重比较

Table 3 Effects of different levels for 6-BA, IBA, TDZ, NAA on callus induction of clone 71-14 and the Duncan's multiple comparison (0.05, 0.01)

生长调节剂 Growth regulator	水平 Level	愈伤组织诱导率 Callus rate (%)	平均直径 Average diameter (cm)	褐化率 Browning rate (%)
6-BA	0.9	83.6a	1.329	1.1
	1.1	79.0a	1.383	0.7
	1.3	73.8ab	1.306	2.4
	1.5	65.5b	1.136	1.9
	F 值 F value	3.16 *	2.14ns	0.42ns
Fpr 显著性 F significance	0.027	0.098	0.74	
IBA	0.04	70.8ab	1.290	1.7
	0.08	67.9b	1.272	0.4
	0.12	82.7a	1.362	3.1
	0.16	80.5ab	1.23	1.2
	F 值 F value	2.79 *	0.57ns	0.82ns
Fpr 显著性 F significance	0.043	0.636	0.485	
TDZ	0.02	78.7	1.411aA	2.1
	0.05	73.2	1.086bB	3.3
	0.08	74.7	1.170bB	0.0
	0.11	76.3	1.488aA	2.0
	F 值 F value	0.29ns	6.86 **	2.04ns
Fpr 显著性 F significance	0.832	<0.001	0.111	
NAA	0.8	75.3	1.444a	4.5
	0.9	75.0	1.159c	1.4
	1.0	83.2	1.184bc	0.1
	1.1	68.7	1.368ab	1.6
	F 值 F value	1.92ns	3.64 *	2.17ns
Fpr 显著性 F significance	0.129	0.014	0.095	
平均 Mean		75.9	1.29	1.5

地影响不一(表 5,图 1),6-BA、IBA 和 TDZ 不同水平间形成致密型愈伤组织差异极显著,其中 TDZ 对致密型愈伤影响较大,水平间的极差为 38.52%,其次为 IBA(30.72%)、6-BA(27.09%),低浓度水平的 6-BA 和 TDZ 更易形成致密型的愈伤组织。6-BA 对疏松致密型的愈伤组织影响最大,水平间差异极显著,极差为 38.67%,随着浓度的增加,疏松致密型的愈伤组织所占比例增大;其他生长调节剂对疏松致密型愈伤组织的形成水平间差异不大。TDZ 和 IBA 则对疏松型的愈伤组织影响较大,水平间差异达极显著,其中 TDZ 水平间极差为 35.81%,随着浓度水平的增加,疏松型愈伤组织比例增大,IBA 水平间的极差则为 28.9%。

根据方差分析的显著性和极差大小,4 种生长调节剂对致密型和疏松型愈伤组织影响大小的顺序

表 4 不同处理对形成愈伤组织质地的影响与邓肯多重比较  
Table 4 Effects of different combinations for 6-BA, IBA, TDZ, NAA on callus types of clone 71-14 and the Duncan's multiple comparison (0.05, 0.01)

处理号 No. of treatment	致密型 Compact type (%)	处理号 No. of treatment	疏松致密型 Friable and compact type (%)	处理号 No. of treatment	疏松型 Friable type (%)
2	85.0aA	16	55.0aA	4	80.8aA
1	83.0aA	14	51.7aA	8	56.7abAB
3	76.0aA	10	50.8aA	7	39.6bcBC
15	71.5abAB	7	39.5abAB	5	39.6bcBC
11	55.7abcABC	13	38.3abcABC	10	36.7bcBC
9	55.6abcABC	12	36.7abcdABC	12	36.3bcBC
6	52.7abcdABC	6	34.6abcdABC	13	35.0bcBC
5	52.1abcdABC	11	31.3abcdeABC	9	29.2bcBC
8	38.3bcdeBC	9	15.2bcdeABC	3	24.0bcBC
16	30.7cdeBC	5	8.3bcdeBC	14	23.3bcBC
12	27.0cdeC	15	8.3bcdeBC	15	20.2cBC
13	26.7cdeC	8	5.0cdeBC	1	17.0cBC
14	25.0cdeC	2	3.1deBC	16	14.3cBC
7	20.9cdeC	1	0.0eC	11	13.0cC
4	19.2deC	3	0.0eC	6	12.7cC
10	12.5eC	4	0.0eC	2	11.9cC
F 值	4.81 **		3.87 **		2.72 **
F value					
Fpr 显著性	<0.001		<0.001		0.001
F significance					
平均 mean	45.8		23.6		30.6

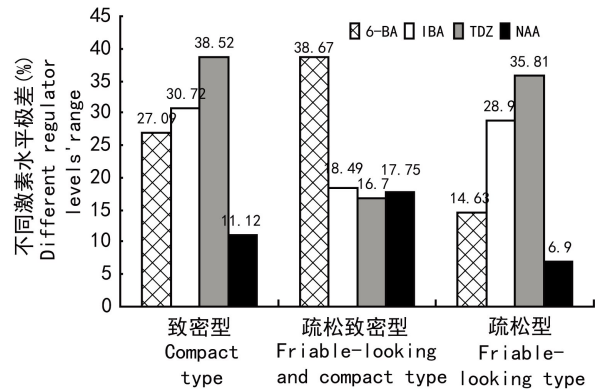


图 1 不同激素对愈伤组织质地影响的极差

Fig. 1 Range of effects of different regulators on callus types

均为 TDZ>IBA>6-BA>NAA;而对疏松致密型愈伤组织影响大小的顺序为 6-BA>IBA>NAA>TDZ。节间茎段在诱导培养基上培养 14 d 左右即从切口处长出少量不规则淡黄色愈伤组织(图 2:A),60 d 左右愈伤可达 0.5~1.5 cm<sup>3</sup>(图 2:B)。致密型愈伤其结构紧致,且呈黄绿色,部分愈伤组织表面有芽冒出(图 2:B),继代生长慢;而疏松型愈伤组织呈淡黄色(图 2:C),其在继代培养中生长速度极快,但只增大体积,外植体呈黄色,愈伤组织上无绿



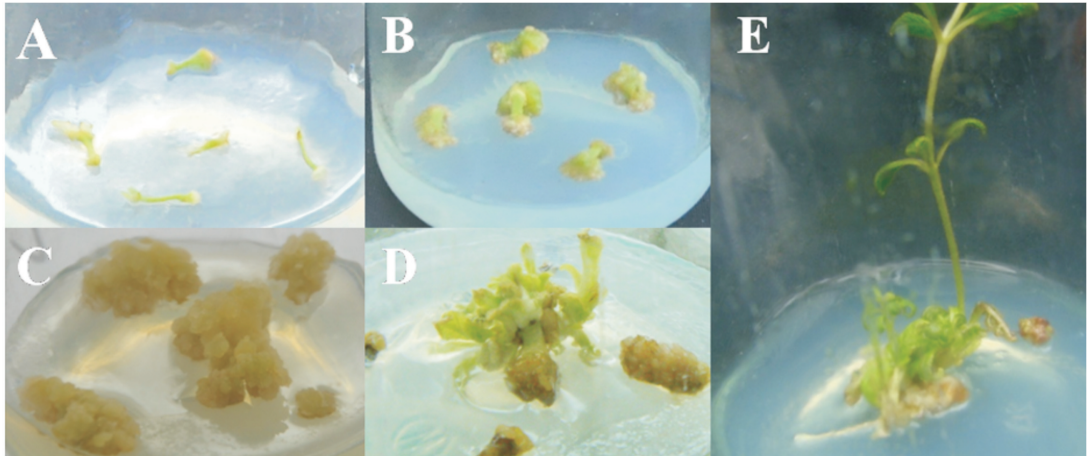


图 2 柚木愈伤组织诱导及植株再生 A,B,C. 茎段愈伤组织诱导; D,E. 愈伤组织分化。

Fig. 2 Callus induction and shoot regeneration of Teak A,B,C. Callus induced from stem; D,E. differentiation of the callus.

表 5 6-BA、IBA、TDZ、NAA 对 71-14 愈伤组织质地影响与邓肯多重比较

Table 5 Effects of different levels for 6-BA, IBA, TDZ, NAA on callus types of clone 71-14 and the Duncan's multiple comparison (0.05, 0.01)

生长调节剂 Growth regulator	水平 Level	致密型 Compact type (%)	疏松致密型 Friable- looking and compact type (%)	疏松型 Friable- looking type (%)
6-BA	0.9	65.36aA	0.02bB	34.62
	1.1	42.05bB	20.31aA	37.66
	1.3	38.84bB	33.12aA	28.06
	1.5	38.27bB	38.69aA	23.03
F 值 F value		5.01 **	11.16 **	1.39ns
Fpr 显著性 F significance		0.002	<0.001	0.248
IBA	0.04	54.31aA	15.55	30.14bB
	0.08	46.13aA	34.04	19.86bB
	0.12	57.40aA	17.99	24.61bB
	0.16	26.68bB	24.56	48.76aA
F 值 F value		5.72 **	2.59ns	5.16 **
Fpr 显著性 F significance		0.001	0.055	0.002
TDZ	0.02	58.01aA	28.96	13.04cC
	0.05	59.55aA	13.44	27.01bcBC
	0.08	45.93aA	19.60	34.46abAB
	0.11	21.03bB	30.14	48.85aA
F 值 F value		9.51 **	2.39ms	7.18 **
Fpr 显著性 F significance		<0.001	0.071	<0.001
NAA	0.8	40.26	30.65	29.10
	0.9	49.91	20.41	29.68
	1.0	42.99	28.18	28.84
	1.1	51.38	12.90	35.75
F 值 F value		0.86ns	2.45ns	0.35ns
Fpr 显著性 F significance		0.463	0.066	0.79
平均 Mean		45.8	23.6	30.6

色芽点,多次继代易褐化;前者和后者分别被称为具再生能力和不具再生能力的愈伤组织。根据愈伤组织类型继代生长情况,以愈伤组织诱导率、愈伤组织平均直径和致密型所占比例采用隶属函数法评定各处理的诱导能力,得出处理 1( $MS+0.9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} 6\text{-BA}+0.04 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ IBA}+0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ TDZ}+0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NAA}$ )的平均隶属值最大,为 0.81,随后依次是处理 11、处理 3 和处理 4,分别为 0.67、0.65、0.57。处理 1 是综合 3 项指标最适宜的生长调节剂组合,其愈伤组织诱导率、愈伤组织平均直径和致密型所占比例分别为 80.78%,1.648 cm 和 83.0%。

### 2.3 愈伤组织再生植株

选择黄绿色致密愈伤组织接入 10 个 TDZ 浓度的分化培养基上进行再生诱导,约 30 d 可见绿色芽点逐渐分化成再生植株,及时去掉无芽点的愈伤组织块,并继代 2 次后,芽点再生苗增多,茎干粗壮,颜色嫩绿,叶片开始舒展(图 2:D),部分再生苗苗高为 3~5 cm(图 2:E)。再分化培养 50 d 时,部分再生植株高而且健壮。通过不同浓度 TDZ 对愈伤组织再生率的方差分析表明,TDZ 对于不同愈伤组织的不定芽分化和植株再生系数均有显著影响。当 TDZ 浓度为 0.066~0.132  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,不定芽分化效果相对较好(表 6),分化率为 26.42%~36.54%,且分化出的不定芽大部分能正常生长,其中 TDZ 浓度为 0.132  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,愈伤状态和再生苗长势表现最好。

## 3 讨论与结论

热带林木树种植物组织培养常采用 6-BA、NAA、

表6 不同 TDZ 浓度的愈伤组织再分化率和再生系数

Table 6 Callus differentiation rate and regeneration coefficient of teak at different levels of TDZ

TDZ 浓度 TDZ concentration (mg · L <sup>-1</sup> )	愈伤分化率 Callus differentia- tion rate (%)	再生系数 Regeneration coefficient	愈伤生 长状态 Growth vigour of callus	再生植株 生长状态 Growth vigour of plantlet
0.022	26.93abcd	1.28bcd	++	++
0.044	21.93bcd	1.08bcd	++	++
0.066	36.54a	1.54bcd	+++	++
0.088	26.42abcd	1.29bcd	+++	++
0.110	32.90ab	1.67abc	++	+++
0.132	34.22a	2.23a	+++	+++
0.154	30.50abc	1.76ab	++	+++
0.176	19.43cd	0.95d	++	+
0.198	16.66d	1.08bcd	+	++
0.220	15.39d	1.00cd	+	++

注:小写字母表示 LSD 多重分析结果( $P < 0.05$ )。“+”代表愈伤组织和再生植株的长势,“+”越多,长势越好。

Note: Lowercases represent significant differences at 0.05 level with LSD multiple analysis ( $P < 0.05$ ). “+” represents the growth vigour of callus and plantlets, the more “+”, the better growth.

IBA 进行愈伤组织诱导和植株再生,如桉树(卜朝阳,2004)、相思(姬明,2006)、土沉香(汪腾跃等,2012)等,早期国外如 Noerhad *et al.*(1980), Rosilah *et al.*(2005)、Kushalkar *et al.*(1996) 柚木的组织培养研究也多采用 6-BA、NAA、IBA。近 20~30 a 一种新型植物生长调节剂 TDZ 逐渐被应用于组织培养中(裘珍飞等,2009)。对柚木愈伤组织的诱导,单一生长调节剂可能不起作用,国内郭彦彤等(2012)用 0.5~2.0 mg · L<sup>-1</sup> NAA 诱导同一 71-14 无性系,结果无法获得愈伤组织,而与 6-BA 共同作用,则诱导率达 40.0%~86.7%,6-BA 和 NAA 各水平差异极显著,它们间的交互作用也达极显著。基于这一点,本研究采用 6-BA、NAA、IBA、TDZ 设计 4 因素 4 水平的正交实验,结果显示,各个处理(组合)对 71-14 愈伤组织的诱导率为 52.27%~98.16%。对愈伤组织的诱导率影响最大的激素为 6-BA,且低浓度 6-BA 的诱导率显著高于高浓度的 6-BA,与郭彦彤结果较吻合;Baghel *et al.*(2008)和 Widiyanto *et al.*(2005)认为最具有再生能力的愈伤组织是浅黄色或浅绿色的致密型愈伤组织,且从该类型的愈伤组织获得柚木再生植株。本研究得出最适宜诱导 71-14 无性系愈伤组织的为处理 1(MS+0.9 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA+0.04 mg · L<sup>-1</sup> IBA+0.02 mg · L<sup>-1</sup> TDZ+0.8 mg · L<sup>-1</sup> NAA),可获得较高的诱导率、较大及易于分化的愈伤组织。

TDZ 对 71-14 无性系愈伤大小和致密型质地影响最大,难于再生的植物应用 TDZ 可获得体细胞胚及再生植株。如 Widiyanto *et al.*(2005)用 TDZ 和 IBA 诱导柚木愈伤组织;Akram *et al.*(2008)用 TDZ 诱导丛生芽可使诱导率达 100%。本研究采用 10 个浓度梯度的 TDZ 进行愈伤组织植株再生研究发现,TDZ 能诱导愈伤组织的不定芽分化,分化率为 15.39%~36.54%,再生系数为 0.95~2.23,处理间的差异达显著。尽管这两个指标不高,但能从愈伤组织获得再生植株,并初步选出分化率和再生系数较佳的浓度,即 MS+0.132 mg · L<sup>-1</sup> TDZ,其愈伤生长状态和再生植株苗的长势最好。

在愈伤诱导过程中,基因型不同是影响实验结果的一个重要因素。即使是来自同一种源不同个体,因基因型不同,对同一生长调节剂的敏感性不同。郭彦彤等(2012)发现柚木同一种源的两个无性系 71-5 和 71-14 诱导愈伤组织要求的浓度范围不一致。至于不同来源的外植体所建立的再生体系之间可能更难完全具备可重复性。本研究曾参考 Akram *et al.*(2009)和郭彦彤等(2012)获得的培养基配方进行试验,但效果不理想,形成的愈伤组织量少,水泽化,并在持续培养中愈伤极易褐化死亡。

柚木愈伤组织诱导及分化是再生体系建立和基因工程的前提。本研究通过激素和培养基的优化,建立柚木无性系 71-14 愈伤组织再生体系,初步解决了胚性愈伤组织诱导率低,几乎无进一步分化等难题,为后期建立高效再生体系提供技术支持,也为建立柚木遗传转化体系奠定了基础。但植株再生分化率仍较低,最高仅 36.54%,达不到直接进行转基因的条件。这是由于木本植物再生率低、难度大,无性系植株再生难度更大,其外植体与其他胚性外植体(Akram *et al.*,2008,2009)不同,建立起来的高效再生体系能直接运用于转基因研究中。因此,目前仍有许多工作需进一步研究和完善,如进一步提高愈伤分化、植株再生率和试验瓶苗的移栽等。

## 参考文献:

- Akram M, Aftab F. 2012. Effect of auxins on axillary and *de novo* shoot regeneration from in vitro shoot cultures derived from forced epicormic buds of teak (*Tectona grandis* L.)[J]. *For Stud Chin*, **14**(3):180-186
- Baghel RS, Tiwari S, Triathi MK. 2008. Comparison of morphogenic and plant regeneration ability of some explants of teak (*Tectona grandis* Linn. F)[J]. *J Agric Technol*, **4**:125-136
- Bu ZY(卜朝阳). 2004. Studies on *Eucalyptus* regeneration sys-

- tems(桉树再生系统的研究)[J]. *Southwest Chin J Agric Sci* (西南农业学报), **17**(4):500—503
- Cao YH(曹月华), Wang BS(王宝生). 1981. Study on induction of rooting and survival of transplantation of *Tectona grandis* L. f. *in vitro* (柚木培养中诱导生根和移栽成活率的研究)[J]. *J Integr Plant Biol* (植物学报 英文版), **23**(6): 434—440
- Guo YT(郭彦彤), Liang KN(梁坤南), Huang GH(黄桂华), et al. 2012. Research progress on tissue culture of teak(*Tectona grandis* L. f.) (柚木组织培养研究进展)[J]. *J Anhui Agric Sci* (安徽农业科学), **40**(3): 1 332—1 335
- Guo YT(郭彦彤), Liang KN(梁坤南), Huang GH(黄桂华), et al. 2012. Research on induction and culture of callus of teak(*Tectona grandis*) (柚木愈伤组织诱导培养研究)[J]. *J Centr South Univ For Technol* (中南林业科技大学学报), **32**(3): 53—58
- Ji M(姬明). 2006. *In vitro* culture and establishment of the regeneration system in *Acacia melanoxylon* (黑木相思离体培养与再生系统的建立)[D]. 福建: 福建农林大学
- Liang KN(梁坤南), Zhou ZZ(周再知), Ma HM(马华明), et al. 2011. Development status, countermeasures and prospects of the rare tree species teak plantations in China (我国珍贵树种柚木人工林发展现状、对策与展望)[J]. *J Fujian For Sci Technol* (福建林业科技), **38**(4): 173—178
- Liu JP(刘进平), Mo R(莫饶). 2006. Tissue Culture of Tropical Plant(热带植物组织培养)[M]. Beijing(北京): Science Press(科学出版社)
- Ma HM(马华明), Liang KN(梁坤南), Zhou ZZ(周再知). 2003. Research and development of teak in China(我国柚木的研究与发展) [J]. *For Res* (林业科学研究), **16**(6): 768—773
- Muhammad A, Faheem A. 2008. High frequency multiple shoot formation from nodal explants of teak (*Tectona grandis* L.) induced by thidiazuron[J]. *Prop Orn Plants*, **2**(8): 72—75
- Muhammad A, Faheem A. 2009. An efficient method for clonal propagation and *in vitro* establishment of softwood shoots from epicormic buds of teak (*Tectona grandis* L.) [J]. *For Stud Chin*, **11**(2): 105—110
- Noerhadri E, Wirjodarmodjo H. 1980. Vegetative propagation of *Tectona grandis* L. and *Pinus merkusii* Jungh et de Vries using tissue culture[J]. *Duta Rimba*, **6**(42): 11—15
- Payne RW(佩恩), Zheng KF(郑可锋), Sun H(张浩), et al. 2009. Genstat Statistical Methods and Data Analysis(Genstat 统计方法与数据分析)[M]. Beijing(北京): Chinese Agricultural Science Technology Press(中国农业科学技术出版社)
- Qiu ZF(裘珍飞), Zeng BS(曾炳山), Liu Y(刘英), et al. 2001. Study on large-scale transplanting of teak tube seedlings(柚木组培苗移植技术研究)[J]. *Guangdong For Sci Technol* (广东林业科技), **17**(4): 1—5
- Qiu ZF(裘珍飞), Zeng BS(曾炳山), Li XY(李湘阳), et al. 2009. Embryogenic callus induction and plant regeneration of clones GL9 of *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla* (TDZ 对巨尾桉(GL9)胚性愈伤组织诱导和再生的影响)[J]. *For Res* (林业科学研究), **22**(5): 740—743
- Rosilah AA, Kandasamy KI. 2005. Induction of pro-embryogenic structures or embryo-like-bodies (ELBs) in teak (*Tectona grandis*) [C]. Identifying Potential Commercial Collaborations: 202—205
- Wang BS(王宝生), Cao YH(曹月华), Huang LS(黄良胜). 1980. Stem tip culture of teak *in vitro* (柚木茎尖的培养)[J]. *J Integr Plant Biol* (植物学报·英文版), **22**(2): 200—201
- Wang TY(汪腾跃). 2012. Regeneration system of *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg by tissue culture techniques(土沉香组织培养再生体系的研究)[D]. Beijing(北京): Chinese Academy of Forestry(中国林业科学研究院)
- White KJ. 1991. Teak: Some Aspects of Research and Development [M]. Yangon: San Thain Kha Press: 3
- Zheng YQ(郑勇奇). 2001. Current status and development prospects of traditional tree breeding(常规林木育种研究现状与发展趋势)[J]. *World For Res* (世界林业研究), **14**(3): 10—17