

红千层愈伤组织诱导及植株再生

伍成厚^{1,2}, 冯毅敏¹, 叶振华¹, 朱纯¹, 龙丽萍¹

(1. 广州市园林科学研究所, 广东广州 510405; 2. 厦门大学 生命科学学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 以茎段、芽和叶片为材料, 探讨了红千层愈伤组织诱导及植株再生的方法。结果表明: 红千层的茎段、芽和叶片均可诱导出愈伤组织, 通过继代培养可发育成绿色和粉红色2种类型的愈伤组织, 其中绿色、致密的愈伤组织可以分化出不定芽; 培养基 1/2MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L 适宜愈伤组织不定芽的诱导, 在培养基 1/2MS + IBA 0.25 mg/L 上试管苗的生根率可达95%。

关键词: 红千层; 愈伤组织诱导; 植株再生; 组织培养

中图分类号: S685.99; Q945.52 **文献标志码:** A

Callus Induction and Plant Regeneration in *Callistemon rigidus*

WU Cheng-hou^{1,2}, FENG Yi-min¹, YE Zhen-hua¹, ZHU Chun¹, LONG Li-ping¹

(1. Guangzhou Institute of Landscape and Garden, Guangzhou 510405, Guangdong, China;

2. School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian, China)

Abstract: Taking stem segment, bud and leaf as materials, this paper made a study of callus induction and plant regeneration in *Callistemon rigidus* R. Br. The results show that callus can be induced from all types of materials and after being sub-cultured, the callus will develop to two kinds of colors that are pink and green; that the pink callus will be degenerated while the compact green one will induce adventitious buds. The optimal medium for adventitious bud inducing is 1/2 MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L and the optimal for the rooting of test-tube plantlets is 1/2 MS + IBA 0.25 mg/L on which its rate can reach 95% after being cultured for 40 days.

Key words: *Callistemon rigidus* R. Br.; callus induction; plant regeneration; tissue culture

红千层 *Callistemon rigidus* R. Br. 为桃金娘科红千层属常绿小乔木, 原产澳大利亚。其树冠为圆球形, 株高 3~5 m, 花鲜红色, 穗状花序生于近枝顶, 形似瓶刷, 盛开时红压枝头, 极为美观, 为近年来庭院观花、行道景观、小区绿化的首选树种。红千层的组织培养近年来有所报道, 并已经应用于种苗的快速繁殖^[1-5]。因此, 笔者查阅相关资料^[6-10], 通过对红千层茎段、芽和叶片培养获得愈伤组织, 实现了愈伤组织的高频率再生, 旨在为红千层的遗传转化和新品种培育提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

试验材料为广州市园林科学研究所新引进的垂枝型红千层, 开花期 1~4 月。

1.2 方 法

1.2.1 愈伤组织的诱导

4~6 月取当年生半木质化枝条, 剪除叶片(保留叶柄)后置于烧杯中, 用自来水冲洗干净, 然后用 70% 酒精

收稿日期: 2007-03-06

基金项目: 广东省科技计划项目(2004B60302006)和广州市科技计划项目(004Z3-E0361)的部分研究内容。

作者简介: 伍成厚(1968-), 男, 湖南绥宁人, 讲师, 博士, 主要从事园林植物组织培养的研究与推广应用。E-mail: wuchenghou2000@yahoo.com.cn.

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

消毒10 s,再用0.1%升汞消毒8 min,以无菌水清洗5~6遍后,将枝条切成1~2 cm长的茎段作为外植体接种到培养基上.接种后30 d统计愈伤组织的诱导率.

$$\text{愈伤组织的诱导率} = (\text{产生愈伤组织茎段数} / \text{外植体数}) \times 100\%$$

1.2.2 不定芽的诱导

愈伤组织每30 d继代培养1次.将继代2~3次的愈伤组织转至分化培养基上进行不定芽的诱导,每个培养基接种5瓶,每瓶接种愈伤组织10块,45 d后统计不定芽的诱导率和增殖倍数.

$$\text{不定芽诱导率} = (\text{形成不定芽的愈伤组织块数} / \text{接种愈伤组织块数}) \times 100\%$$

$$\text{不定芽的增殖倍数} = \text{不定芽数} / \text{接种愈伤组织块数}$$

1.2.3 试管苗的生根和移栽

将2 cm长的无根苗切下,接种到生根培养基上进行不定根诱导,25 d观察生根结果.炼苗7~10 d,用自来水冲洗干净根部的培养基后将试管苗移栽到托盘中,栽培基质为泥炭+粗河沙($m_{\text{泥炭}} : m_{\text{粗河沙}} = 1 : 1$),移栽15 d后随机抽查100株统计移栽成活率.

$$\text{移栽成活率} = (\text{成活苗数} / \text{统计苗数}) \times 100\%$$

1.2.4 培养基与培养条件

以MS、1/2MS(大量元素减半)为基本培养基,添加不同质量浓度的6-BA、NAA、IBA和椰乳(CM),所有培养基均含精制白砂糖3%、卡拉胶0.51%,pH值为5.8.培养温度为 $(26 \pm 1)^\circ\text{C}$,光强为1500 lx,光照时间为10 h/d.

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的诱导

接种10 d后,腋芽开始萌发,同时在茎段基部切口部位脱分化形成淡黄色的愈伤组织,随着培养时间的延长,其愈伤组织逐渐变成黄绿色(见图1).从表1可以看出,在MS培养基中不添加生长素时不能诱导出愈伤组织,而添加0.1~0.5 mg/L的NAA后茎段可以产生愈伤组织,在3,6,7号培养基上愈伤组织的诱导率均达100%;茎段在不添加任何生长调节物质的MS培养基上腋芽的萌发率最高,可达37.5%.将萌发的腋芽接种到4号培养基,在芽基部和接触培养基的基部叶片也可形成淡黄色至黄绿色、质地致密的愈伤组织(见图2和图3),这类愈伤组织和茎段诱导的愈伤组织在外观上没有明显差别.



图1 茎段诱导的愈伤组织

Fig. 1 Callus induced from stem segment

表1 不同培养基对红千层茎段培养的影响

Table 1 Effects of different media on culture of stem segments in *Callistemon rigidus*

序号	培养基	外植体数	产生愈伤组织茎段数	愈伤组织诱导率 /%	萌芽数	萌芽率 /%
1	MS	56	0	0	21	37.5
2	MS+ NAA0.1 mg/L	24	18	75.0	1	4.2
3	MS+ NAA0.5 mg/L	20	20	100	2	10.0
4	MS+ 6-BA1.0 mg/L+ NAA0.1 mg/L	48	42	87.5	1	2.1
5	MS+ 6-BA2.0 mg/L+ NAA0.1 mg/L	47	33	70.2	0	0
6	MS+ 6-BA0.2 mg/L+ NAA0.5 mg/L	38	38	100	4	10.5
7	MS+ 6-BA1.0 mg/L+ NAA0.5 mg/L	43	43	100	6	14.0
8	MS+ 6-BA2.0 mg/L	26	0	0	3	11.5



图2 芽基部诱导的愈伤组织

Fig. 2 Callus induced from the bottom of bud

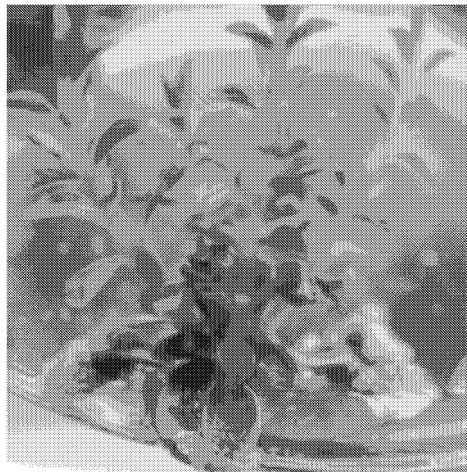


图3 基部叶片诱导的愈伤组织

Fig. 3 Callus induced from the foot leaves

2.2 植物生长调节物质对不定芽诱导的影响

愈伤组织通过继代培养,在培养基MS+ 6-BA 0.2 mg/L+ NAA 0.5 mg/L 上其愈伤组织呈黄绿色,致密,颗粒状;在培养基MS+ 6-BA 1.0 mg/L+ NAA 0.5 mg/L 上其愈伤组织为黄绿色,松软;在培养基MS+ 6-BA 2.0 mg/L+ NAA 0.5 mg/L 上其愈伤组织表面呈黄褐色,而接触培养基处逐渐变黑.在这3种培养基上愈伤组织均会形成表面湿润、光滑、颗粒状的粉红色愈伤组织(见图4),这类愈伤组织继续培养后逐渐变松软,不能诱导出不定芽.



图4 粉红色的愈伤组织

Fig. 4 Pink callus



图5 绿色的愈伤组织

Fig. 5 Green callus

在培养基MS+ 6-BA 0.3 mg/L+ NAA 0.1 mg/L 上愈伤组织为绿色,松软,少量致密,50块愈伤组织仅能诱导出1棵小植株,诱导率为2.5%;在培养基MS+ 6-BA 1.0 mg/L+ NAA 0.1 mg/L 上愈伤组织为绿色,致密,颗粒状(见图5),不定芽的诱导率为100%,增殖倍数为6.7倍(见图6),在此培养基上不定芽还可伸长生长成无根苗(见图7).



图6 愈伤组织再生的不定芽

Fig. 6 Adventitious buds induced from callus

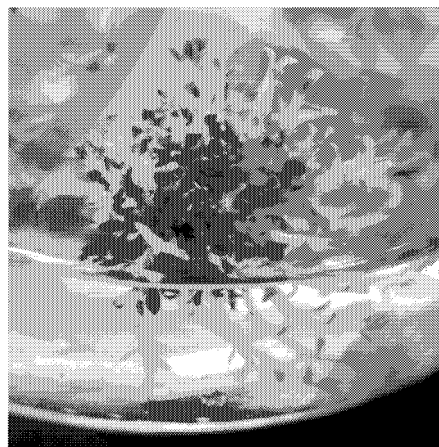


图7 伸长的不定芽丛

Fig. 7 A clump of elongated adventitious buds

2.3 大量元素和椰乳对不定芽诱导的影响

在MS+ 6-BA 1.0 mg/L+ NAA 0.1 mg/L 培养基上,愈伤组织再生的丛生芽可以正常伸长,但木质化程度低;在1/2MS+ 6-BA 1.0 mg/L+ NAA 0.1 mg/L 培养基上,愈伤组织不定芽的诱导率也可达到100%,增殖倍数为7.2倍,形成的丛生芽木质化程度较高(见图8B)。在其它条件不变的情况下,仅将CaCl₂·2H₂O的用量提高1倍即440 mg/L,愈伤组织即大量褐化,不定芽的增殖倍数仅1.7倍(见图8A),在此培养基中加入体积分数为10%的椰乳,不定芽的分化也不能明显改善(见图8C)。

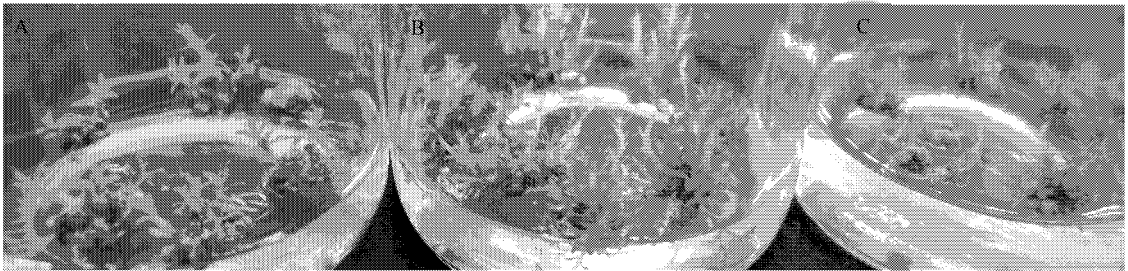


图8 大量元素和椰乳对不定芽诱导的影响

Fig. 8 The effects of macro-elements and coconut milk on the induction of adventitious buds

2.4 生根诱导与试管苗移栽

无根苗在生根培养基上培养10 d即开始长出白色的根,当MS培养基中不添加生长素时,培养25 d就有20.5%的生根率。培养基中添加生长素可以提高无根苗的生根率,但同时也无根苗的基部诱导出愈伤组织,生长素质量浓度越高,诱导的愈伤组织量也愈多。适宜生根的生长素质量浓度NAA为0.2 mg/L, IBA为0.25 mg/L,超过此质量浓度,生根率随着生长素质量浓度的提高反而下降。在生长素质量浓度相同的条件下,降低培养基中大量元素的质量浓度有利于红千层试管苗生根,其最适培养基为1/2 MS+ IBA 0.25 mg/L,培养25 d平均根数为2.9条,生根率为82.5%(见表2)。在此培养基上培养40 d后生根率在95%以上(见图9)。

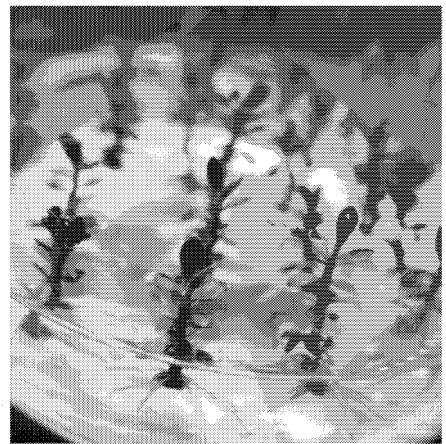


图9 生根的试管苗

Fig. 9 Test-tube plantlets

表2 不同培养基对红千层生根的影响*

Table 2 Effects of different media on the rooting of seedlings in *Callistemon rigidus*

序号	培养基	总苗数	长根数	生根率/%	平均根数	长愈数	长愈率/%
1	MS	88	18	20.5	1.3 ± 0.5	0	0
2	MS+ IBA 0.1 mg/L	103	26	25.2	1.2 ± 0.4	99	96
3	MS+ IBA 0.2 mg/L	78	24	30.8	1.6 ± 0.8	78	100
4	MS+ IBA 0.25 mg/L	94	30	31.9	1.5 ± 0.7	94	100
5	MS+ IBA 0.5 mg/L	76	20	26.3	1.7 ± 0.8	76	100
6	MS+ NAA 0.1 mg/L	81	20	24.7	1.5 ± 0.6	81	100
7	MS+ NAA 0.2 mg/L	83	26	31.3	1.4 ± 0.6	83	100
8	MS+ NAA 0.25 mg/L	83	20	24.1	1.3 ± 0.5	83	100
9	MS+ NAA 0.5 mg/L	62	5	8.1	1.4 ± 0.6	83	100
10	1/2 MS+ IBA 0.25 mg/L	80	66	82.5	2.9 ± 1.4	80	100
11	1/2 MS+ NAA 0.25 mg/L	93	32	34.4	1.4 ± 0.7	93	100

* 根长 0.2 cm 才计数。

炼苗7 d, 将试管苗从培养瓶中取出, 用自来水冲洗干净后移栽到托盘中, 保湿遮荫, 移栽植株成活率在90%以上(见图10)。

3 结论与讨论

红千层的茎段、芽和叶片均可诱导出愈伤组织, 在培养基MS+ 6-BA 0.2 mg/L + NAA 0.5 mg/L 和 MS+ 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L 上红千层愈伤组织的诱导率均可达100%, 培养基1/2MS+ 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L 较适宜愈伤组织不定芽的诱导, 在培养基1/2MS+ IBA 0.25 mg/L 上试管苗的生根率最高。

有研究报道红千层无根苗基部^[1-3]和叶片^[3,4]可以诱导出愈伤组织, 本试验表明红千层的茎段和芽基部的叶片也是很好的愈伤组织诱导材料。愈伤组织通过继代培养可以产生粉红色和绿色2种颜色的愈伤组织。在刚果12号桉 *Eucalyptus* 12A BL 组织培养中, 红色愈伤组织可以分化出不定芽^[11], 本研究中红千层的粉红色愈伤组织继续培养后逐渐变松软, 不能诱导出不定芽, 而绿色致密的愈伤组织则可诱导出大量不定芽。

有研究报道红千层的愈伤组织在 MS+ 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L 培养基上产生的丛生芽因木质化程度低, 需要经过壮苗培养才可用于生根诱导^[1,2,5], 本试验通过降低培养基中大量元素的质量浓度可以较好地解决这一难题。

试验中若 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 的质量浓度未变, 仅降低其它大量元素质量浓度反而会抑制不定芽的再生, 因此红千层愈伤组织的再分化过程中 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 的作用值得注意。在蝴蝶兰 *Phalaenopsis* 愈伤组织培养中椰乳对愈伤组织的再分化有促进作用^[12], 而在红千层愈伤组织再分化过程中椰乳却未能产生类似的效果。

商宏莉等^[4]利用秋水仙碱对红千层无根苗进行处理, 诱导出四倍体植株, 展示了红千层组培技术结合多倍体诱导育种的应用前景。其诱导的四倍体植株初期检测为纯合体, 但经过2年后再检测发现四倍体植株为四倍体和二倍体的混合体。应用本试验建立的愈伤组织再生体系进行多倍体育种, 有可能减少“嵌合体”的发生频率, 从而为红千层育种开辟一条实用的途径。

参考文献:

- [1] 龚伟, 宫渊波, 胡庭兴, 等. 红千层的组织培养与快速繁殖[J]. 四川农业大学学报, 2003, 21(4): 259-360.
- [2] 龚伟, 宫渊波, 胡庭兴, 等. 红千层离体培养和植株再生[J]. 植物生理学通讯, 2004, 40(1): 66.
- [3] 江洪如, 余发新, 刘腾云. 红千层的离体培养及快速繁殖[J]. 园艺学报, 2005, 32(3): 541-543.
- [4] 商宏莉, 汪卫星, 向素琼, 等. 利用组织培养技术进行红千层多倍体诱导[J]. 西南农业大学学报(自然科学版), 2003, 25(5): 396-399.
- [5] 瞿素萍, 熊丽, 屈云慧, 等. 红千层组培苗的工厂化生产技术[J]. 中国种业, 2004(4): 32-33.
- [6] 张立磊, 李保印, 郭巧玲, 等. 彩叶植物金叶绣线菊组织培养研究[J]. 经济林研究, 2005, 23(1): 47-49.
- [7] 王晓红, 谭晓风, 石明旺. 非洲菊 F_1 的组织培养[J]. 中南林学院学报, 2003, 23(5): 45-48.
- [8] 仇健, 谭晓风. 蒙花1、2号金银花的组织培养与快速繁殖[J]. 中南林学院学报, 2005, 25(4): 53-56.
- [9] 李小川, 张华通, 周丽华, 等. 迷迭香带芽茎段的组织培养技术[J]. 经济林研究, 2005, 23(1): 47-49.
- [10] 李际红, 周庆和, 谢会成. 驱蚊香草的组织培养技术[J]. 中南林学院学报, 2005, 25(5): 92-96.
- [11] 谭德冠, 庄南生, 黄华孙. 刚果12号桉愈伤组织的诱导与再生植株快繁体系的构建[J]. 热带作物学报, 2005, 26(3): 24-29.
- [12] Ishii Y, Takamura T, Goi M, et al. Callus induction and somatic embryogenesis of *Phalaenopsis* [J]. Plant Cell Rep., 1998, 17: 446-450.



图10 移植成活的试管苗

Fig. 10 Transplanted plantlets

组织培养中, 红色愈伤组织可以分化出

不定芽^[11], 本研究中红千层的粉红色愈伤组织继续培养后逐渐变松软, 不能诱导出不定芽, 而绿色致密的愈伤

组织则可诱导出大量不定芽。

有研究报道红千层的愈伤组织在 MS+ 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L 培养基上产生的丛生芽因木质化程度低, 需要经过壮苗培养才可用于生根诱导^[1,2,5], 本试验通过降低培养基中大量元素的质量浓度可以较好地解决这一难题。

试验中若 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 的质量浓度未变, 仅降低其它大量元素质量浓度反而会抑制不定芽的再生, 因此红千层愈伤组织的再分化过程中 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 的作用值得注意。在蝴蝶兰 *Phalaenopsis* 愈伤组织培养中椰乳对愈伤组织的再分化有促进作用^[12], 而在红千层愈伤组织再分化过程中椰乳却未能产生类似的效果。

商宏莉等^[4]利用秋水仙碱对红千层无根苗进行处理, 诱导出四倍体植株, 展示了红千层组培技术结合多倍体诱导育种的应用前景。其诱导的四倍体植株初期检测为纯合体, 但经过2年后再检测发现四倍体植株为四倍体和二倍体的混合体。应用本试验建立的愈伤组织再生体系进行多倍体育种, 有可能减少“嵌合体”的发生频率, 从而为红千层育种开辟一条实用的途径。

参考文献:

[1] 龚伟, 宫渊波, 胡庭兴, 等. 红千层的组织培养与快速繁殖[J]. 四川农业大学学报, 2003, 21(4): 259-360.

[2] 龚伟, 宫渊波, 胡庭兴, 等. 红千层离体培养和植株再生[J]. 植物生理学通讯, 2004, 40(1): 66.

[3] 江洪如, 余发新, 刘腾云. 红千层的离体培养及快速繁殖[J]. 园艺学报, 2005, 32(3): 541-543.

[4] 商宏莉, 汪卫星, 向素琼, 等. 利用组织培养技术进行红千层多倍体诱导[J]. 西南农业大学学报(自然科学版), 2003, 25(5): 396-399.

[5] 瞿素萍, 熊丽, 屈云慧, 等. 红千层组培苗的工厂化生产技术[J]. 中国种业, 2004(4): 32-33.

[6] 张立磊, 李保印, 郭巧玲, 等. 彩叶植物金叶绣线菊组织培养研究[J]. 经济林研究, 2005, 23(1): 47-49.

[7] 王晓红, 谭晓风, 石明旺. 非洲菊 F_1 的组织培养[J]. 中南林学院学报, 2003, 23(5): 45-48.

[8] 仇健, 谭晓风. 蒙花1、2号金银花的组织培养与快速繁殖[J]. 中南林学院学报, 2005, 25(4): 53-56.

[9] 李小川, 张华通, 周丽华, 等. 迷迭香带芽茎段的组织培养技术[J]. 经济林研究, 2005, 23(1): 47-49.

[10] 李际红, 周庆和, 谢会成. 驱蚊香草的组织培养技术[J]. 中南林学院学报, 2005, 25(5): 92-96.

[11] 谭德冠, 庄南生, 黄华孙. 刚果12号桉愈伤组织的诱导与再生植株快繁体系的构建[J]. 热带作物学报, 2005, 26(3): 24-29.

[12] Ishii Y, Takamura T, Goi M, et al. Callus induction and somatic embryogenesis of *Phalaenopsis* [J]. Plant Cell Rep., 1998, 17: 446-450.

[本文编校: 谢荣秀]