

花榈木胚轴愈伤组织的诱导及植株再生

高丽, 李洪林, 杨波* (中国科学院武汉植物园, 湖北武汉 430074)

摘要 [目的]通过愈伤组织诱导途径,建立快速高效的花榈木再生体系。[方法]花榈木成熟种子在MS培养基中萌发获得无菌苗,以幼苗的胚轴为外植体诱导愈伤组织,经继代后进一步诱导不定芽和生根。[结果]诱导花榈木愈伤组织的最适培养基为MS+1.0 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L KT,诱导率达96.7%;诱导愈伤组织分化不定芽的培养基为MS+0.5 mg/L NAA+0.1 mg/L TDZ,其不定芽诱导率为85.0%;平均每块愈伤产生不定芽6.2个;生根的最适培养基为1/2WPM+0.5 mg/L NAA+0.5 mg/L IBA,生根率为88.9%。炼苗移栽后,成活率可达85.0%。[结论]花榈木胚轴愈伤组织诱导途径的植株再生是一套快速高效的离体再生体系,可为花榈木种质资源保存、转基因、遗传育种等研究提供重要参考。

关键词 愈伤组织;胚轴;花榈木;植株再生

中图分类号 S722.3¹ **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)33-16271-03

Callus Induction and Plant Regeneration from the Hypocotyl of *Ormosia henryi* Prain

GAO Li et al (Wuhan Botanic Garden, Chinese Academy of Sciences, Wuhan, Hubei 430074)

Abstract [Objective] A rapid and efficient regeneration system of *Ormosia henryi* Prain was established by the approach of callus induction. [Method] Mature seeds of *O. henryi* sprouted on MS medium, callus was induced with the hypocotyl as explants. After two subcultures, shoots and roots were induced. [Result] The best results were achieved on the following media: 96.7% callus induction on MS medium supplemented with 1.0 mg/L 2,4-D and 0.5 mg/L KT; 85.0% shoot induction on MS medium supplemented with 0.5 mg/L NAA and 0.1 mg/L TDZ, and the mean number of buds per piece of callus was 6.2; 88.9% rooting on 1/2 WPM medium supplemented with 0.5 mg/L NAA and 0.5 mg/L IBA. The survival rate of the plantlets was 85.0% after being transplanted into soil. [Conclusion] Callus Induction and Plant Regeneration from the hypocotyl of *O. henryi* was a fast and efficient in vitro regeneration system, it will has important theoretical value and realistic significance for reserve of germplasm resource, studies on transgenic engineering and genetics breeding.

Key words Callus; Hypocotyl; *Ormosia henryi* Prain; Plant regeneration

花榈木(*Ormosia henryi* Prain)为豆科红豆树属植物,又名花梨木、臭桶柴、亨氏红豆、红豆树,属国家二级重点保护树种。花榈木集材用、药用、观赏、生态价值于一身。其木材质地致密,纹理均匀,是制作高档家具(红木家具)、工艺品及高级地板等的重要原材料;其根、枝、叶入药,能祛风散结、解毒去瘀,也是一种重要的药用植物;其树姿态优美,枝繁叶茂,四季翠绿,树干光洁,亦是优良的园林绿化树种;其根部具有能固氮的根瘤菌,可以改良土壤,促进与之混交的其他树种的生长,具有很好的生态价值。

由于花榈木用途广泛,其原生境已遭受严重破坏,野生资源日益减少,处于濒危状态。目前花榈木生产上大都采用种子繁殖,但其自然繁殖率低,而采用离体快速繁殖技术进行种苗的大量生产无疑是一项实用和富有成效的方法。该研究以花榈木无菌苗胚轴为外植体进行愈伤组织、不定芽诱导以及植株再生培养,建立了快速、高效的花榈木离体快繁

再生体系,以保护野生资源,实现工厂化育苗,发挥花榈木材用、药用和园林绿化等优良特性,为满足市场需求奠定技术基础,另外也为花榈木种质资源保存、转基因、遗传育种等研究提供重要参考。

1 材料与方法

1.1 材料 花榈木(*Ormosia henryi* Prain)成熟种子,采自中国科学院武汉植物园。

1.2 培养基与培养条件 以MS^[1]、1/2MS(大量元素用量减半)、1/2WPM^[2]培养基为基本培养基,以不同的激素浓度组合设计了4种愈伤组织诱导培养基M1、M2、M3和M4,1种愈伤组织增殖继代培养基M5,3种不定芽诱导培养基M6、M7和M8,3种生根培养基M9、M10和M11(表1)。所有培养基均添加6 g/L琼脂、30 g/L蔗糖,在灭菌前将pH值调为5.8,培养温度为(24±2)℃,连续光照12 h/d,光照强度为40 μmol/(m²·s)。

表1 各培养基组成

Table 1 The composition of different media

培养基 Media	组成 Composition	培养基 Media	组成 Composition
M1	MS + NAA 1.0 mg/L + KT 0.5 mg/L	M7	MS + NAA 0.5 mg/L + KT 1.5 mg/L
M2	MS + NAA 1.0 mg/L + 6-BA 0.5 mg/L	M8	MS + NAA 0.5 mg/L + TDZ 0.1 mg/L
M3	MS + 2,4-D 1.0 mg/L + 6-BA 0.5 mg/L	M9	1/2WPM + NAA 0.5 mg/L
M4	MS + 2,4-D 1.0 mg/L + KT 0.5 mg/L	M10	1/2WPM + IBA 0.5 mg/L
M5	1/2MS + 2,4-D 1.0 mg/L + 6-BA 0.5 mg/L + KT 0.5 mg/L	M11	1/2WPM + NAA 0.5 mg/L + IBA 0.5 mg/L
M6	MS + NAA 0.5 mg/L + 6-BA 1.5 mg/L		

1.3 方法

1.3.1 愈伤组织的诱导。将花榈木种子用自来水冲洗干净,剥去种皮后置超净工作台上用浓度70%乙醇处理30 s,再以浓度0.1% HgCl₂溶液中浸泡6 min,最后用无菌水冲洗4次,接种于MS培养基上。接种后于(24±2)℃暗培养5 d

基金项目 中国科学院知识创新工程重要方向性项目(KSCX2-YW-N-032)。

作者简介 高丽(1979-),女,河南南阳人,硕士,助理研究员,从事植物生物技术研究。*通讯作者,E-mail: yangbo@wbcas.cn。

收稿日期 2009-07-27

左右,取萌发无菌苗的胚轴切成 5 mm 左右的小段接种于愈伤组织诱导培养基中。每种处理接种 30 个外植体,3 次重复,20 d 后统计愈伤组织的诱导率。将获得的愈伤组织转入增殖继代培养基 M5 中进行 2 次继代培养后进行不定芽和根的诱导。

1.3.2 不定芽的诱导及植株再生。选取颜色浅绿、生长旺盛的愈伤组织转入不定芽诱导培养基中。每种处理接种 20 块愈伤组织,设置 3 次重复,培养 35 d 时分别统计不定芽的诱导率和平均芽数。当不定芽长至 2~3 cm 时,选取生长健壮的不定芽接种于生根培养基中诱导生根。每种处理接种 12 个不定芽,设置 3 次重复,培养 30 d 时分别统计生根率、平均根数和平均根长。

1.3.3 炼苗移栽。当试管苗形成健壮根系后,通过先闭瓶 3~4 d 再开瓶 2~3 d 的方式在自然光下进行炼苗。然后将组培苗从瓶中取出洗净根部附着的培养基后移栽入河沙:田园

土:泥炭=1:2:1 的基质中,35 d 后统计移栽成活率。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织诱导 外植体接种在 4 种愈伤组织诱导培养基中 3 d 左右在切口处都会膨大,7 d 后即有质地疏松、白色的愈伤组织形成,20 d 后 4 种培养基中外植体的出愈率、愈伤组织的生长情况和颜色已有明显差异(表 2)。其中以培养基 M4 诱导愈伤组织的效果最好,诱导率为 96.7%,愈伤组织的生长情况也最好,呈淡绿色,有光泽,且在 M4 培养基中外植体的出愈时间也比在其他处理中早 1~2 d(图 1a)。其次为 M3,其愈伤组织诱导率为 87.8%。M1 培养基中,愈伤组织诱导率为 78.9%,愈伤组织呈黄绿色,无光泽,生长较好。而在 M2 培养基中,愈伤组织的诱导率仅为 61.1%,且愈伤组织在培养一段时间后就逐渐褐化。

2.2 不定芽的诱导及植株再生 将获得的愈伤组织转入 M5 增殖培养基上进行继代培养,每 20 d 继代 1 次,继代 2 次

表 2 不同培养基对花榈木愈伤组织诱导的影响

Table 2 Effects of different media on callus induction of *O. henryi*

培养基 Medium	接种外植体数 No. of inoculated explants	形成愈伤组织数 Number of formed callus	诱导率//% Induction frequency of callus	颜色 Color	生长情况 Growth status
M1	90	71	78.9	黄绿色,无光泽	++
M2	90	55	61.1	黄褐色,无光泽	+
M3	90	79	87.8	浅绿色,有光泽	+++
M4	90	87	96.7	浅绿色,有光泽	++++

注:+,生长一般;++,生长较好;+++,生长好;++++,生长最好。

Note: +, generally growth; ++, good growth; +++, better growth; + + + +, the best growth.



注:a,胚轴诱导愈伤组织形成;b,愈伤组织分化不定芽;c,不定芽生根;d,试管苗移栽成活

Note:a. Callus induced by hypocotyls;b. Adventitious buds differentiation from callus;c. Rooting of shoot;d. Transplantation of test-tube seedlings.

图 1 花榈木的植株再生

Fig.1 Plantlet regeneration of *Ormosia henryi* Prain

后挑选生长旺盛的愈伤组织转入不定芽诱导培养基 M6、M7、M8 中进行培养,诱导愈伤组织的分化。接种 2 周后愈伤组织颜色加深,表面变粗糙,20 d 后长出许多小突起,最初为一小绿点,进而长成小芽点,再生长成不定芽,有单生,多为丛生。35 d 后统计不定芽的诱导情况,结果表明,3 种培养基对

不定芽的诱导有明显差异(表 3)。其中以培养基 M8 对不定芽的诱导效果最佳,35 d 时诱导率可达 85.0%,每块愈伤诱导出的平均芽数为 6.2(图 1b)。其次为 M6,诱导率为 71.7%。M7 诱导不定芽的效果最差,诱导率仅为 58.3%,且不定芽生长缓慢,有少许黄化。

表 3 不同培养基对花榈木不定芽诱导的影响

Table 3 Effects of different media on adventitious bud induction of *O. henryi*

培养基 Medium	接种愈伤组织数 Number of inoculated callus	出芽愈伤组织数 Number of callus producing shoot	不定芽诱导率//% Induction frequency of shoots	平均每个愈伤组织芽数 Number of shoots per callus
M6	60	43	71.7	5.4
M7	60	35	58.3	4.7
M8	60	51	85.0	6.2

将培养基 M8 中诱导的不定芽从基部切下转入生根培养基 M9、M10、M11 中进行不定根的诱导。在接种初期不同培养基中生根率无明显差异,随着时间的推移,生根情况呈现明显差异。表 4 表明,培养基 M10 诱导不定根的效果最好,

生根率达 88.9%,平均根数 2.4,平均根长 1.8 cm,且根系粗壮(图 1c)。而在培养基 M9 中生根率只有 75.0%,且根系细弱。

2.3 炼苗移栽 生根培养 30 d 后,将培养瓶移至室温、自然

光下先闭瓶炼苗 3~4 d,然后在相同条件下再开瓶炼苗 2~3 d。移栽时将组培苗从瓶中取出,清洗干净根部附着的培养基后栽入河沙:田园土:泥炭=1:2:1的营养钵中,注意

保持相对湿度在 90% 左右,温度以 20~25 °C 为宜,以 50%~70% 遮阴为好,置于阴凉通风处,35 d 后移栽成活率可达 85.0% (图 1d)。

表 4 不同培养基对花榈木生根培养的影响

Table 4 Effects of different media on rooting culture of *O. henryi*

培养基	接种不定芽数	生根不定芽数	生根率//%	每个外植体的平均根数	平均根长//cm
Medium	Number of inoculated adventitious bud	Number of rooted adventitious buds	Rooting rate	Average root number per explant	Average length of roots
M9	36	27	75.0	1.9	1.4
M10	36	28	77.8	2.1	1.5
M11	36	32	88.9	2.4	1.8

3 结论与讨论

植物愈伤组织诱导是培养的细胞脱分化和再分化的过程,也是细胞基因组 DNA 甲基化和各种特定基因的重新激活和表达的过程,它涉及到核酸合成和降解的平衡、DNA 的复制和转录、特定基因控制下特定蛋白的形成等,这个过程中起主要作用的就是生长素和细胞分裂素的配比^[3]。由于植物组织或细胞在离体培养条件下往往缺乏合成生长素和细胞分裂素的能力,为了细胞生长、分化和分裂,在多数情况下需要生长素和细胞分裂素 2 种生长调节剂的共同作用^[4]。该研究结果表明,生长素 NAA、2,4-D 和细胞分裂素 6-BA、KT 组合均可诱导愈伤组织的形成,但各组合对愈伤组织的诱导效果有差异。总的来说,2,4-D 的诱导效果好于 NAA,KT 的诱导效果好于 6-BA,经过反复试验筛选,最终确定 MS + 2,4-D 1.0 mg/L + KT 0.5 mg/L 为花榈木胚轴愈伤组织诱导的最佳培养基。

植物生长调节剂对植物离体培养具有非常重要的调控作用,选择合适的生长调节剂种类和浓度是愈伤组织诱导和生长的关键因素^[5]。2,4-D 对于愈伤组织的诱导和生长非常有效,但 2,4-D 对器官发生有强烈的抑制作用,不利于根和芽的启动和分化^[6]。因此在继代愈伤组织时要降低 2,4-D 的浓度,避免过量 2,4-D 积累产生毒害效应,抑制愈伤组织的器官发生。

在植物形态建成过程中,起主要作用的是培养基中植物生长调节剂组合的配比,细胞分裂素和生长素在外植体离体培养中的作用是影响植物特定基因的激活与表达,从而调节特定蛋白质的合成,使整个细胞的分裂及分化过程受到影响^[7]。培养基中加入生长调节物质可以改变和影响外植体的内源激素水平,从而导致外植体在附加不同植物生长调节剂的培养基中进行离体培养时,不定芽的诱导率差异很大。该研究结果表明,3 种细胞分裂素 6-BA、KT、TDZ 分别和 NAA 组合使用均可诱导愈伤组织分化不定芽,其中以 TDZ 的诱导效果最好,说明适量的 TDZ 有利于愈伤组织的再分化。TDZ 是一种苯基脲衍生物,具腺嘌呤类细胞分裂素的生物活性,已广泛应用于木本植物的离体再生研究中,尤其能显著促进再生难度较大的植物器官再生^[8]。Mackay 等在研究 Mexican redbud 时也发现使用 TDZ 利于出芽^[9]。据统计已有近 100 种再生困难的木本植物使用 TDZ 后都获得了成功。但是目前对 TDZ 高活性细胞激动素作用的分子机制仍不完全清楚,其如何调控基因表达等问题均需深入研究。

木本植物生根比较困难^[10]。在组织培养过程中,不定根形成的好坏直接影响到组培苗移栽的成活率,而组培苗的生根是一个复杂的生理生化过程,受多种因素的影响。诱导根源基的难易既与苗木本身的基因型和内源激素有关,也与培养条件和外源激素有关。在众多影响因素中,植物激素起着决定作用。许多研究证明生长素是试管苗诱导生根最重要的影响因子,它对不定根的分化是必需的。生长素影响酶的活性,增加了原生质透性,降低了原生质黏性,使代谢活动加快,核糖核酸合成加强,这一系列重要生理生化变化有利于不定根的发生和生长。试验表明,IBA 和 NAA 均可诱导花榈木不定根的形成,相同浓度的 IBA 比 NAA 的诱导效果好,IBA 和 NAA 配合使用的效果优于单独使用;适合花榈木不定根生成的最佳培养基为 1/2WPM + NAA 0.5 mg/L + IBA 0.5 mg/L。

参考文献

- [1] MURASHIGE T, SKOOG F A. A revised medium for rapid growth and bio-assay with tobacco tissue culture [J]. *Physiol Plantarum*, 1962, 15: 473 - 497.
- [2] MCCOWN B H, LLOYD G. Woody Plant Medium (WPM)-a mineral nutrient formulation for microculture for woody plant species [J]. *Hort Sci*, 1981, 16: 453.
- [3] 郝浩永, 尉亚辉, 王娅宁, 等. 花生愈伤组织的诱导和再生体系的建立 [J]. *武汉植物学研究*, 2007, 25(4): 410 - 412.
- [4] 崔凯荣, 刑更生, 周攻克, 等. 植物激素对体细胞胚胎发生的诱导与调节 [J]. *遗传*, 2000, 22(5): 349 - 354.
- [5] 谢从华, 柳俊. *植物细胞工程* [M]. 北京: 高等教育出版社, 2004: 24.
- [6] 沈海龙. *植物组织培养* [M]. 北京: 中国林业出版社, 2005: 79 - 82.
- [7] 赵木珍, 阮圆, 王宝山. 盐地碱蓬幼嫩花序的组织培养及植株再生 [J]. *植物学通报*, 2006(1): 52 - 55.
- [8] 黄建, 马锋旺, 樊军锋, 等. 枣树离体叶片不定芽再生体系建立的研究 [J]. *西北植物学报*, 2006, 26(5): 942 - 948.
- [9] MACKAY W A, TIPTON J L, THOMPSON G A. Micropropagation of Mexican redbud (*Ceris canadensis* var. *mexicana*) [J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 1995, 43: 295 - 299.
- [10] NAGORI R, PUROHIT S D. In vitro plantlet regeneration in *Annona squamosa* through direct shoot bud differentiation on hypocotyls [J]. *Sci Hort*, 2004, 99: 89 - 98.
- [11] ZHOU J Y, LIAO H, LI L P, et al. Determination of emodin and chrysophanol contents in callus of *cassia tora* L. Leaf [J]. *Agricultural Science & Technology*, 2008, 9(2): 60 - 62.
- [12] 高丽, 杨波, 李洪林, 等. 花榈木组培苗茎段低温胁迫培养及耐性诱导 [J]. *亚热带植物科学*, 2009, 38(2): 19 - 21.
- [13] LI Y M, JIANG Y T, SUN Z H. Polymorphism analysis of the 3' flank region of e-quine *IGF-1* gene by PCR-SSCP [J]. *Agricultural Science & Technology*, 2008, 9(6): 31 - 34.
- [14] 杨建伟, 李明军, 王红卫. 柝木三樱椒下胚轴愈伤组织的诱导及分化 [J]. *西南农业学报*, 2002, 15(1): 83 - 89.
- [15] DENG M H, WEN J F, ZOU X X. In vitro plant regeneration of pepper cytoplasmic male sterility (CMS) lines via cotyledon culture [J]. *Agricultural Science & Technology*, 2009, 10(1): 39 - 42.