

文章编号:1001-7380(2018)05-0014-03

屋久岛紫薇子叶愈伤组织诱导及植株再生技术初探

陈红,陆小清,王传永,蔡小龙,张凡,周艳威,李云龙*

(江苏省中国科学院植物研究所(南京中山植物园),江苏 南京 21004)

摘要:以屋久岛紫薇子叶为外植体,通过添加不同种类和质量浓度的生长调节剂,对屋久岛紫薇进行组织培养试验,研究不同植物生长调节剂组合及质量浓度对屋久岛紫薇愈伤组织诱导、增殖及分化的影响,从而筛选出适宜屋久岛紫薇愈伤诱导、增殖和分化的培养条件。结果显示,屋久岛紫薇子叶外植体在组织培养过程中,适宜愈伤诱导培养基组合为1/2MS+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L 2,4-D,诱导率为46.5%;愈伤组织增殖的适宜培养基为MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA,增殖系数最大,为3.1;愈伤组织分化的最适培养基为WPM+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L IBA,分化率为18.7%;移栽基质适宜为等容积的泥炭土+珍珠岩混合物,成活率为90%。

关键词:屋久岛紫薇;子叶;愈伤诱导;植株再生;移栽

中图分类号:Q943.1; S685.99

文献标志码:A

doi:10.3969/j.issn.1001-7380.2018.05.003

Callus induction and plant regeneration from the cotyledon of *Lagerstroemia fauriei* Koehne

Chen Hong, Lu Xiaoqing, Wang Chuanyong, Cai Xiaolong, Zhang Fan, Zhou Yanwei, Li Yunlong*

(Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: The present experiment was conducted to investigate regeneration from cotyledons of *Lagerstroemia fauriei* Koehne and establish its regeneration system, in order to provide a basis for its tissue culture and genetic transformation. Its cotyledons was used as explant and callus was induced by supplementation with different type and concentration of growth regulators. The results showed that the optimal culture medium for callus induction was 1/2MS+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L 2,4-D, the highest frequency of callus induction was 46.5%. The optimal culture medium for multiplication was MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA, the multiplication coefficient was up to 3.1. The optimal culture medium for callus differentiation was WPM+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L IBA, the highest frequency of callus differentiation was 18.7%. The mixture of equal volume of peat+perlite was optimum culture substrate for transplantation.

Key words: *Lagerstroemia fauriei* Koehne; Cotyledon; Callus induction; Regeneration; Transplantation

紫薇(*Lagerstroemia indica* Linn)属于千屈菜科(Lythraceae)紫薇属^[1]木本植物,原产我国,是我国传统名花之一。紫薇通常用作落叶灌木或乔木栽植,由于紫薇花开在夏季少花季节,且花期长,花色艳丽,树干光滑,树姿优美,抗污染,常作为行道树、街景树栽培,有些城市以紫薇作为市花。其中,屋久岛紫薇(*L. fauriei*)的树干呈棕红色片状剥落,在冬季棕红色树干格外醒目,且抗白粉病能力较强,

是园林育种不可多得的优良亲本。

国外在株型、花色、抗病方面,已经培育出红色花的紫薇新品种和矮化紫薇新品种。美国育种学家 Egolf 通过传统的育种技术利用屋久岛紫薇选育出抗白粉病且花色红艳的品种^[2];日本利用从我国引进的紫薇资源,选育出矮生多花品种。我国拥有丰富的紫薇种质资源,其中很多资源具有较高的经济价值,观赏价值和可利用的优异基因,应充分挖

收稿日期:2018-09-27;修回日期:2018-10-16

作者简介:陈红(1984-),女,江苏宿迁人,助理研究员,博士。主要从事观赏植物分子功能研究与育种研究。E-mail:ch198472@163.com;Tel:18251835698。

*通信作者:李云龙(1964-),男,江苏苏州人,高级实验师。主要从事园林观赏植物资源研究及其栽培技术。E-mail:liyulongcnbg@163.com。

掘紫薇的优异基因,为创制紫薇新品种做准备。由于传统的遗传育种具有较大的盲目性,选育周期长等缺点,而现代的细胞工程育种和分子育种等手段克服了这些缺点。

随着科学技术的进步,以用基因工程为核心的分子育种技术已广泛应用于花卉育种与改良^[3-5]。人们开始关注观赏植物花色基因的转化^[6],而这一转化的实现都要以组织培养技术为基础。目前绝大多数的遗传转化体系都需要建立一个稳定的植株再生体系来进行基因的转移,再生体系已被广泛用于植株遗传改良。蔡明等用紫薇1年生枝条为外植体进行组织培养与再生的研究,筛选出紫薇离体再生的最适条件^[7]。王闯等与王丹等用矮生紫薇种子萌发的新生芽为外植体,进行不同外源浓度激素处理,摸索矮生紫薇的再生条件^[8-9]。

屋久岛紫薇作为园林育种的优良材料,同时在育种工作中也得到广泛的应用。但屋久岛紫薇的再生体系的建立却鲜见报道,本研究立足于其子叶愈伤组织的诱导及其再生技术的探索,为屋久岛紫薇的遗传转化以及分子育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选取江苏省中国科学院植物研究所苗圃内,屋久岛紫薇健康母树上发育良好的种子为试验材料。

1.2 试验方法

1.2.1 材料获得及方法 采收屋久岛紫薇健康母树上发育良好的种子,人工去掉种翅,防止损伤种皮,先用自来水冲洗30 min,然后75%乙醇处理30 s,再用无菌水冲洗2—3次,紧接用1%次氯酸钠灭菌15 min,然后无菌水冲洗3—5次。消毒后播种于MS基本培养基中,获得生长健壮的实生苗。

1.2.2 愈伤组织的诱导 剪取无菌苗子叶,垂直叶片主脉方向剪3—4下,保持一侧叶缘相连,叶片正面向上接种于1/2MS+(0.5,1.0 mg/L)6-BA+(0.2,0.5,1.0 mg/L)2,4-D+30g/L蔗糖+6 g/L琼脂的培养基中,暗培养处理7 d,每瓶接种叶片3片,每种处理分别接种10瓶,重复3次。7 d后,置于光照培养箱中,培养温度23—25℃,光照度为2 000—3 000 lx,光照时间14 h/d。30 d后统计结果。诱导率(%)=(诱导出的愈伤组织数/接种材料总数)×100。

1.2.3 愈伤组织的增殖 将愈伤组织切成直径6—10 mm接种于附加不同质量浓度的6-BA(1.0,

1.5 mg/L)与NAA(0.05,0.1 mg/L)组合的MS增殖培养基,共4个组合。每瓶培养基接愈伤组织5块,暗培养温度为23—27℃,每隔20 d继代1次,60 d后观察并统计结果。

1.2.4 愈伤组织的分化 将愈伤组织接种于WPM+(1.0,2.0 mg/L)6-BA+(0.2,0.5 mg/L)IBA+30 g/L蔗糖+6 g/L琼脂的培养基中进行再分化诱导,每瓶接种愈伤组织2块,每处理分别接种15瓶,重复2次。培养温度为25℃,光照度2 000—3 000 lx,光照时间14 h/d,50 d后统计结果。

分化率(%)=(分化的愈伤组织数/接种愈伤组织总数)×100。

1.2.5 练苗与移栽 无菌生根苗开瓶练苗5—7 d后移栽到大棚苗床中,使用带孔PVC膜覆盖保湿,放在通风阴凉处培养25—30 d,培养到第15 d将PVC膜移除,换用遮光率75%—80%的遮阳网,栽培所用基质成分分别为珍珠岩、泥炭土、等容积的泥炭土+珍珠岩混合物等3种基质中。20 d后,观察植株长势,并计算其成活率。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的诱导

愈伤组织的诱导试验结果表明,随着2,4-D质量浓度的增加,愈伤组织的诱导率上升,但是愈伤组织的状态由绿色紧实状变成白色泡沫状。白色泡沫状的愈伤组织生命力弱,不能进行进一步分化,且随着培养时间的延长,最终褐化死亡。由表2可知,子叶愈伤诱导最佳培养基成分为MS+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L 2,4-D。屋久岛紫薇子叶愈伤组织的诱导情况如图1。

表1 6-BA与2,4-D处理对紫薇子叶愈伤诱导的影响

处理	6-BA	2,4-D	愈伤诱导率/%	愈伤情况
1	0.5	0.2	23.5±4.1	愈伤组织小,质地紧密,黄绿色
2	0.5	0.5	38.7±4.3	愈伤组织小,质地紧密,绿色
3	0.5	1.0	45.3±4.1	白色疏松
4	1.0	0.2	20.4±5.6	绿色愈伤组织
5	1.0	0.5	46.5±6.2	绿色愈伤组织
6	1.0	1.0	49.8±4.7	白色疏松

2.2 不同质量浓度6-BA与NAA对屋久岛紫薇愈伤组织增殖的影响

将愈伤组织进行分割后,在增殖培养基内进行培养。由表2可以看出,60 d后增殖倍数最高达3.1,且愈伤组织生长状态良好。因此,屋久岛紫薇

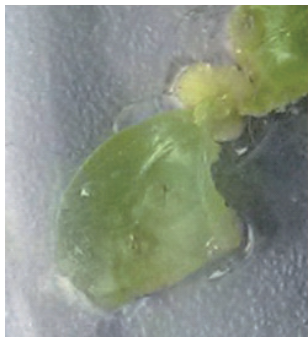


图 1 屋久岛紫薇子叶愈伤组织的诱导

愈伤组织的最佳培养基为 MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.1mg/L NAA。

表 2 不同质量浓度 6-BA 与 NAA 对屋久岛紫薇愈伤组织增殖的影响

处理	6-BA/(mg/L)	NAA/(mg/L)	增殖倍数
1	1	0.05	2
2	1	0.1	2.8
3	1.5	0.05	2.5
4	1.5	0.1	3.1

2.3 不同质量浓度 6-BA 与 IBA 对子叶愈伤分化的影响

以屋久岛紫薇诱导的愈伤组织为材料,6-BA与 IBA 的不同质量浓度组合,进行愈伤组织分化的研究。由表 3 可以看出来,6-BA 与 IBA 质量浓度分别为 1.0,0.5 mg/L条件下,愈伤组织的分化率达最高值 18.7%,愈伤组织不定芽的分化数也较高,小苗的生长状况良好,未发生玻璃化现象。因此,诱导屋久岛紫薇愈伤组织分化的最适培养基为 WPM+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L IBA,分化情况如图 2。

表 3 不同质量浓度 6-BA 与 IBA 对子叶愈伤分化的影响

处理	6-BA/(mg/L)	IBA/(mg/L)	分化率/%	平均不定芽数/个	生长状况
1	1.0	0.2	10.5±2.3	3.7±0.7	生长良好
2	1.0	0.5	18.7±3.9	5.1±1.2	生长良好
3	2.0	0.2	25.1±3.2	3.2±0.5	玻璃化
4	2.0	0.5	22.3±2.8	4.5±1.1	玻璃化

2.4 移栽基质对屋久岛紫薇组织培养苗移栽的影响

由表 4 可以看出,3 种基质中珍珠岩处理的屋久岛紫薇组织培养苗的移栽成活率仅有 52%,且生根率最低,这可能是由于纯珍珠岩基质蓬松,透水性好,容易失水,不利于组织培养苗的移栽成活;泥



图 2 屋久岛紫薇子叶愈伤组织分化情况

炭土的移栽成活率为 84%,该处理的生根率较低,可能是由于泥炭土透气性稍差;以等容积的泥炭土+珍珠岩混合物处理,屋久岛紫薇组织培养苗的移栽成活率最高达 90%,且该处理的组织培养苗长势较好,生根好,这可能是由于泥炭土与珍珠岩特性互补。因此,屋久岛紫薇组织培养苗最适的移栽基质为等容积的泥炭土+珍珠岩混合物。

表 4 基质对屋久岛紫薇组织培养苗移栽的影响

处理	基质	移栽株数/株	成活株数/株	成活率/%
1	珍珠岩	50	26	52
2	泥炭土	50	42	84
3	等容积的泥炭土+珍珠岩混合物	50	45	90

3 讨论

屋久岛紫薇组织培养的成功,与培养基,激素配比,外植体的情况都息息相关。宋平以紫薇丛生芽的叶片为外植体诱导愈伤组织,诱导率较普通紫薇材料高。植物激素在植物可塑性发育中起着很重要的作用^[10]。屋久岛紫薇在添加了较高质量浓度为 2,4-D 的诱导愈伤培养基中,愈伤组织的状态为白色疏松的状态,这种状态的愈伤组织生命力弱,不利于后续的分化步骤,这可能由于 2,4-D 对植物组织有一定的毒害作用^[11]。在组织培养试验中,细胞分裂素可以促进芽的形成与生长^[12-14],所以本试验设计了不同质量浓度的生长调节剂组合,对屋久岛紫薇愈伤组织的诱导,组织培养苗的增殖,愈伤组织的分化进行研究,结果表明,屋久岛紫薇子叶愈伤组织诱导培养基为 MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L 2,4-D,组织培养苗繁殖的最佳培养基为

(下转第 20 页)

综合各因素,绣球属不同种下品种应采用不同的扦插时间和基质才能达到最佳的扦插生根率。大花绣球的高效扦插繁育应在 5 至 9 月,基质选用草炭和珍珠岩,根据扦插季节进行调整,高温季节(7,8 月)以珍珠岩为主,其他时间可选用草炭和珍珠岩容积比为 1:1 或 3:1 的混合基质,以保证扦插基质有适当的保水性、透气性。张黎等^[10]在宁夏地区开展了八仙花(大花绣球)扦插繁殖所需的基质条件、扦插部位、扦插时期及不同质量浓度萘乙酸等方面的研究,认为最适宜的扦插条件为 6—7 月、半木质化枝条、等容积的草炭+珍珠岩基质,这些与本研究结果较一致。在上海地区进行扦插繁殖,所需的扦插时间、基质等方面选择范围更大。圆锥绣球适宜于 5 月扦插,基质选用渗透性比较好的河沙或珍珠岩,这与周余华等^[11]研究结果不同。栎叶绣球适合 9 月,基质选用渗透性比较好的河沙为宜。圆锥绣球和栎叶绣球的生根率较低,建议在扦插前进行生长调节剂处理,但是不同调节剂组合和质量浓度对栎叶绣球、圆锥绣球插穗的影响需进一步探讨,以提高其插穗的生根率。

(上接第 16 页)

MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA,愈伤组织的分化的最适培养基为 WPM+1.0 mg/L 6-BA 1.0+0.5 mg/L IBA。

随着生物技术的不断进步,分子植物育种将广泛用于观赏植物的花色、花型、香气、叶色、株型等基因的遗传改良,屋久岛紫薇组织培养再生体系的建立,为其奠定基础,丰富我国的紫薇品种。

参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会.中国植物志(第 52 卷第 2 分册)[M].北京:科学出版社,1983
- [2] EGOLF D R. 'Biloxi', 'Miami' and 'Wichita' Lagerstroemia [J]. HortScience, 1987, 22(2): 336-338.
- [3] 邵莉,李毅,杨美珠,等.查尔酮合酶基因对转基因植物花色和育性的影响[J].植物学报,1996, 28(7): 517-524.
- [4] 狄翠霞,张满效,谢忠奎,等.百合组织培养和遗传转化的研究进展[J].西北植物学报,2006, 26(4): 858-863.
- [5] 王关林,方宏筠.植物基因工程与原理技术[M].北京:科学出版社,1998.

参考文献:

- [1] 屈连伟.绣球花新品种选育——种子收获和播种[J].中国花卉园艺, 2013(8): 30-32.
- [2] 丁云峰,马艳丽.不同基质对八仙花扦插生根的影响[J].林业科技, 2005, 30(6): 26-27.
- [3] 黄作喜,王育章,陈杨利,等.基质配比及生长调节剂对八仙花扦插生根的影响[J].天津农业科学, 2005, 11(4): 10-12.
- [4] 李际红,孟凡志,张有朋,等.绣球组织培养技术的研究[J].山东林业科技, 2002, 139(2): 20-28.
- [5] 龚伟,王米力,石大兴.八仙花离体培养和植株再生[J].植物生理学通讯, 2003, 39(6): 624-625.
- [6] 殷丽青,胡永红,汤桂钧,等.优良八仙花品种的离体培养与快速繁殖[J].上海农业学报, 2010, 26(1): 38-41.
- [7] 张卫芳.八仙花的繁殖技术[J].花卉, 2005(1): 24.
- [8] 沈琪.榉树扦插繁殖与生根机理研究[D].南京:南京林业大学, 2013: 2-6.
- [9] 孙强,虞秀明,姚红军.绣球属品种资源收集及扦插生根能力比较[J].北方园艺, 2016(11): 71-73.
- [10] 张黎,王培.不同因子对盆栽八仙花扦插生根的影响[J].北方园艺, 2012(11): 73-76.
- [11] 周余华,周琴,蒋涛,等.生长调节剂及基质对圆锥绣球扦插育苗的影响[J].江苏农业科学, 2016, 44(9): 204-207.

- [6] 刘志祥,洪亚辉,莫爱华,等.观赏植物花色分子遗传学及基因工程研究进展[J].湖南农业大学学报(自然科学版), 2002, 28(6): 531-533.
- [7] 蔡明,田苗,王敏,等.紫薇离体再生体系建立的初步研究[J].中国观赏园艺研究进展, 2007, 251-255.
- [8] 王闯,刘敏,刘殿红.矮生紫薇的组织培养与再生技术研究[J].安徽农业科学, 2010, 38(8): 3914-3915.
- [9] 王丹,柴慈江,骆建霞,等.外源激素对矮生紫薇组培快繁的影响[J].北方园艺, 2009(12): 194-196.
- [10] SAUNDERS J W, BINGHAM E T. Growth regulator effects on bud initiation in callus cultures of *Medicago sativa* [J]. American Journal of Botany, 1975, 62(8): 850-855.
- [11] 李代理,康向阳.植物愈伤组织培养中内外源激素效应的研究现状与展望[J].生物技术通讯, 2007, 18(3): 546-548.
- [12] 陈建军,陆志民,章林,等.大叶山杨优树组培微繁工厂化生产技术的研究[R].长春:吉林省林业科学研究院,1999.
- [13] 吴秀燕,张鸽香.美国流苏离体胚的组织培养与快速繁殖[J].植物生理学报, 2017, 53(2): 227-233.
- [14] 曹虹,金荣荣.三倍体薄皮甜瓜未成熟胚子叶诱导不定芽的研究[J].北方园艺, 2014(13): 106-109.