

山茶‘耐冬’愈伤组织诱导与植株再生

吴斌^{1,2}, 李纪元², 范正琪^{2*}, 商宏莉^{1*}

¹四川师范大学生命科学院, 成都610101; ²中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江富阳311400

摘要: 以‘耐冬’子叶为外植体, 对其愈伤组织途径再生植株进行了研究。以MS基本培养基, 添加0.5 mg·L⁻¹ 2,4-D+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA诱导愈伤组织, 诱导率达94.5%。在添加0.1 mg·L⁻¹ NAA和2.0 mg·L⁻¹ 6-BA的继代培养基上经过2次转接继代培养后, 将愈伤组织转入MS+0.5 mg·L⁻¹ NAA+10.0 mg·L⁻¹ 6-BA或者MS+0.5 mg·L⁻¹ IBA+10.0 mg·L⁻¹ 6-BA的分化培养基中, 约45 d可获得再生不定芽, 分化率约34%。最后利用“滤纸桥生根法”获得了约33%的生根山茶植株, 从而建立了‘耐冬’愈伤组织诱导及植株再生体系。

关键词: 山茶; ‘耐冬’; 愈伤组织; 不定芽分化; 生根诱导; 植株再生

Callus Induction and Plant Regeneration of *Camellia japonica* L. ‘Naidong’

WU Bin^{1,2}, LI Ji-Yuan², FAN Zheng-Qi^{2*}, SHANG Hong-Li^{1*}

¹College of Life Sciences, Sichuan Normal University, Chengdu, 610101, China; ²Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Fuyang, Zhejiang 311400, China

Abstract: Callus induction and plantlet regeneration were studied from mature cotyledons of *Camellia japonica* L. ‘Naidong’. Up to 94.5% of the cotyledons cultured on MS medium with 0.5 mg·L⁻¹ 2,4-D and 2.0 mg·L⁻¹ 6-BA developed callus. The callus was then transferred to subculturing medium containing 0.1 mg·L⁻¹ NAA and 2.0 mg·L⁻¹ 6-BA. Adventitious buds were obtained after 45 days on the medium with 0.5 mg·L⁻¹ NAA+10.0 mg·L⁻¹ 6-BA or 0.5 mg·L⁻¹ IBA+10.0 mg·L⁻¹ 6-BA, the differentiation rate was about 34%. About 33% plantlets of *C. japonica* developed its fine root system by using “filter paper bridge rooting method”. Therefore, callus induction and regeneration system were achieved successfully.

Key words: *Camellia japonica*; ‘Naidong’; callus induction; adventitious buds differentiation; rooting induction; plantlet regeneration

山茶‘耐冬’为常绿阔叶灌木或小乔木, 山茶科山茶属植物, 主要分布于青岛崂山及长门岩等岛屿, 为我国山茶的天然分布最北端。‘耐冬’四季常青, 花色艳丽, 花型优美, 花期持久, 是青岛最重要的木本花卉, 1988年被确定为青岛市市花(图1-A)。

山茶‘耐冬’种苗目前仍以传统方式繁殖为主, 但因其分布狭窄, 种子和种苗来源严重不足, 不能满足种苗和商品苗市场的需求。植物组织培养技术是适宜于‘耐冬’大量扩繁的潜在方式。国内从20世纪80年代就开始采用山茶种子的子叶、幼龄植株的茎尖与带芽茎节、成年植株的茎尖与带芽茎节等作为外植体, 诱导体胚再到丛生芽或者“芽生芽”茎段培养, 成功获得山茶再生苗(毕方铨等2004; 李纪元等2003; 张国彬2004; 庄承纪和周建葵1997); 而由愈伤组织诱导到不定芽分化和再生植物技术却鲜有报道(蔡汉权1996), 关于‘耐冬’的

再生途径研究目前仍局限于愈伤组织的诱导(陈艳丽2006; 董慧慧等2007)。本研究的主要目的是摸索出一种通过愈伤组织途径再生植株的方法, 为该植物大规模无性繁殖和遗传转化实验提供技术支持。

材料与方法

1 材料来源及预处理

供试材料为山茶‘耐冬’(*Camellia japonica* L.)成熟果实, 9月初采自山东省青岛植物园。将果实剥去果皮, 用洗涤剂搓洗种子, 再用自来水搓洗至

收稿 2012-12-26 修定 2013-01-28

资助 国家国际科技合作项目(2011DFA30490)和国家十二五科技支撑课题(2012BAD01B07)。

* 共同通讯作者(E-mail: fzzq_76@126.com; Tel: 0571-63105093; E-mail: honglishang0507@163.com; Tel: 133-88190639)。

无泡沫,置于培养瓶中,加入75%酒精进行第1次消毒浸泡10 s左右,然后纯净水清洗2遍,沥干水分,盖上瓶盖,置于无菌超净台备用。

2 种子处理及愈伤组织诱导

使用75%的酒精表面消毒30 s,接着用0.1%的 HgCl_2 浸泡8 min,无菌水冲洗5~6遍,清洗完将种子铺在放有滤纸的培养皿里吹干水分,备用。

剥去种子的内外种皮,去除胚芽,将子叶从中间横切一分为二,接种于愈伤组织诱导培养基上;培养温度为 $(25\pm 2)^\circ\text{C}$,光照强度为 $2\ 500\sim 3\ 000\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,光照时间为 $12\ \text{h}\cdot\text{d}^{-1}$ 。每瓶接种5块材料,共8瓶,重复2次。

愈伤组织诱导采用MS基本培养基,添加 $0.5\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\ 2,4\text{-D}+2.0\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\ 6\text{-BA}$ (董慧慧等2007)。培养基中蔗糖含量为3%,琼脂0.70%,灭菌前将pH调至5.8, 121°C 高温高压灭菌20 min。

3 愈伤组织的继代和不定芽分化

将愈伤组织连同子叶一并转接至培养基 $\text{MS}+0.5\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\ 2,4\text{-D}+2.0\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\ 6\text{-BA}$ 或者 $\text{MS}+0.1\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{NAA}+2.0\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\ 6\text{-BA}$ 进行继代培养,每50 d转接1次。待培养一段时间后,将愈伤组织转移至分化不定芽培养基 $\text{MS}+0.5\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{NAA}+10.0\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\ 6\text{-BA}$ 或者 $\text{MS}+0.5\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{IBA}+10.0\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\ 6\text{-BA}$ 内,培养条件同上。

4 不定芽的诱导生根

在不定芽分化培养基中培养诱导出的绿色芽点渐渐分化出小芽,待其成型并长至 $1.5\sim 3\ \text{cm}$ 的粗壮芽条后切取单芽,基部用 $500\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的IBA浸没处理20 min,然后转到添加蔗糖 $20\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 液体MW培养基的纸桥上,在弱光下诱导生根。

5 再生植株的驯化和移栽

当再生植株的幼根长至 $2\sim 3\ \text{cm}$ 时,即可进行炼苗移栽。将瓶盖逐步打开,炼苗3~5 d之后,将出瓶的幼苗用水清洗之后再用1 000倍多菌灵溶液浸泡10 min,移栽至以蛭石为主,辅以珍珠岩、泥土,pH值为6~6.5的混合基质中。

实验结果

1 山茶‘耐冬’愈伤组织的诱导

在光照条件下培养大约10 d,可以看到子叶表面有白色的凹凸,说明愈伤组织诱导已经开始启动;再经过15 d左右,就可以看到淡黄色、透亮细密的愈伤组织生长于子叶与培养基接触的外围或者那些凹凸不平的部位(图1-B);接种45 d左右,愈伤基本上全覆盖式生长在子叶表面,淡黄色或者淡黄绿色,少量材料愈伤组织表面会微泛红。

于3月8日与4月2日进行了2次耐冬子叶愈伤诱导试验,接种30 d之后,就对外植体愈伤组织诱

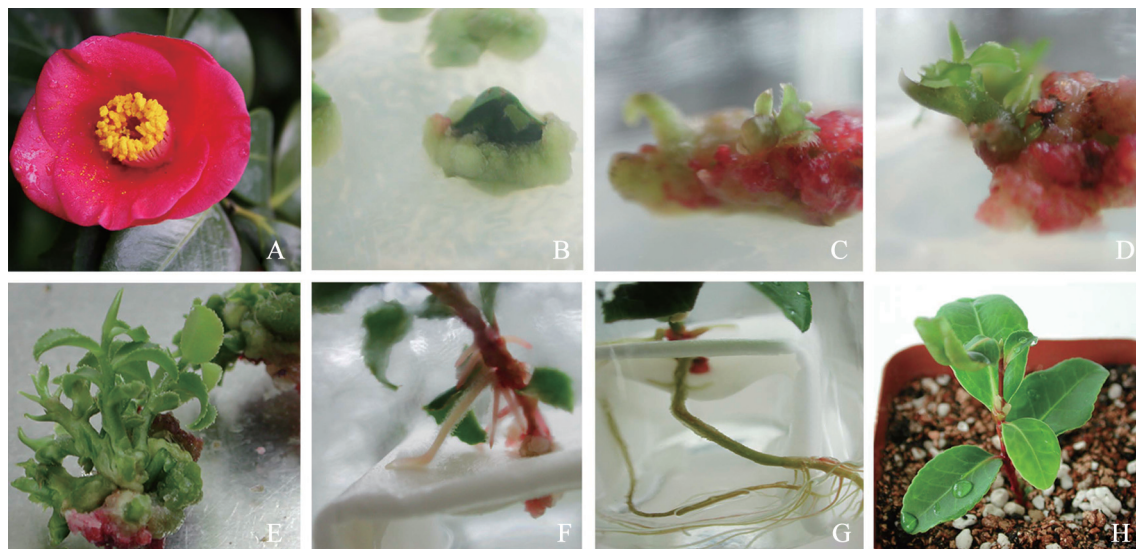


图1 山茶‘耐冬’愈伤组织诱导与植株再生

Fig.1 Callus induction and plant regeneration of *C. japonica* ‘Naidong’

A: ‘耐冬’植株开花; B: 愈伤组织诱导; C: 不定芽分化; D: 不定芽分化; E: 生根诱导前的丛生芽; F: 生根诱导前期; G: 生根诱导后期; H: 再生苗驯化移栽。

导情况进行统计, 其结果分别为3月8日的诱导率是88.89%, 4月2日的诱导率是100%, 其平均诱导率为94.45%。

2 山茶‘耐冬’愈伤组织的继代培养

将愈伤组织置于两种不同的培养基内进行继代培养, 30 d之后发现, 在愈伤诱导培养基MS+0.5 mg·L⁻¹ 2,4-D+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA内继代培养的愈伤组织很多, 质地更加坚硬致密, 表面有不少白色细颗粒, 有的甚至表面已呈绵白糖质地, 少量致密愈伤组织外侧长出淡黄色、肥厚肉质的体胚。而在含0.1 mg·L⁻¹ NAA+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA基内培养的愈伤组织大部分保持着淡黄色、黄绿色结构紧致或较为疏松的细颗粒并泛有水润光泽的良好状态, 少量愈伤组织泛有微红。

3 山茶‘耐冬’不定芽的分化

部分愈伤组织经2次转接继代培养之后, 转移至不定芽分化培养基内。15 d之后, 大多数细颗粒的愈伤组织表面会略有泛红, 有的透亮且富有水润光泽。经过1个多月的培养, 可见部分黄色愈伤组织变为黄绿色中透着红色的细颗粒愈伤组织, 表面略微粗糙但组织内部透亮; 之后从透着红色的愈伤组织中长出绿色的小颗粒, 逐步变为黄绿色透亮的小颗粒; 再培养一段时间, 可分化为黄绿色透亮的小芽, 略带绒毛(图1-C)。小芽不断发育成型(图1-D), 其基部会有更多的小芽分化出来, 之后发育为大小不等的丛生芽(图1-E)。45 d之后对不定芽数量进行统计, 其分化率为34%左右。

4 山茶‘耐冬’生根诱导与生长

山茶是一种较难生根的木本花卉。通过前期的试验, 我们采用了“滤纸桥生根法”(庄承纪和周建葵1997), 进行诱导生根, 取得了较为满意的结果。该阶段采用MW液体生根培养基, 添加蔗糖20 g·L⁻¹。

长至1.5~3 cm成型的芽条可以进行生根诱导。经20 d左右的弱光培养之后, 可以观察到部分

芽条基部或者茎段某些部位略微膨大, 变红, 并伴有透明的细小愈伤组织颗粒长出; 再培养2~3 d, 愈伤组织增多, 有些芽条开始有透明的幼根从其膨大的红色部位长出; 一旦透亮微泛红的幼根长出之后, 其伸长速度加快, 不到1周, 伸长至1.5 cm左右, 表面略带白色绒毛(图1-F); 再培养1周左右, 幼根逐渐木质化, 且变绿; 3个月之后, 主根上面也长出了不少须根(图1-G)。此时对生根苗进行统计, 约33%的芽条长出幼根。

5 再生植株驯化移栽

待主根木质化且长出一定数量的须根之后, 采取逐步开盖炼苗来提高存活率(李纪元等2003)。刚开始炼苗时, 瓶盖敞开一小部分, 避免水分蒸发过快; 经过1~2 d后, 将瓶盖再开一部分, 让再生苗逐渐适应外界环境, 直至完全打开瓶盖。

炼苗3~5 d后, 进行移栽。移栽前期置于光照培养箱内进行, 空气湿度要保持在90%以上, 遮光率为50%, 环境温度控制在25~32 °C (图1-H)。用纯水或者低浓度的营养液进行喷洒, 保持叶面湿润。经过一段时间之后, 移栽苗置于大棚进行正常管理。

讨 论

1 生长素在愈伤组织继代与不定芽诱导中的作用

在继代培养过程中, 我们采用了两种方法, 一种是愈伤组织置于新鲜的诱导培养基内继续培养, 另一种是以0.1 mg·L⁻¹ NAA取代2,4-D进行继代培养。经过30 d左右的培养, 得到了生长状态截然不同的愈伤组织(表1)。

之后将前者愈伤组织置于不定芽分化培养基内生长, 其致密的状态亦很难再调整好, 不利于芽点的分化。而在含NAA的培养基内进行继代培养的愈伤组织, 其大多数保持着黄绿色或绿色细密的状态, 即使在多次转接继代之后仍然可保持良好的生长状态, 且适合不定芽的分化诱导试验。

表1 山茶的继代和诱导不定芽分化的生长情况

Table 1 The subculture and induced adventitious buds of *C. japonica*

继代培养	不定芽分化	不定芽分化率/%	生长状况
0.5 mg·L ⁻¹ 2,4-D+2.0 mg·L ⁻¹ 6-BA	0.5 mg·L ⁻¹ NAA/IBA+10.0 mg·L ⁻¹ 6-BA	0	白色致密, 干燥, 呈绵白糖质地
0.1 mg·L ⁻¹ NAA+2.0 mg·L ⁻¹ 6-BA		34	黄绿色或绿色细密, 水润光泽

据此得出结论,在‘耐冬’愈伤组织培养过程中,较低浓度的NAA生长素比2,4-D更利于继代增殖和下一步不定芽分化。

2 不定芽分化过程中的思考

关于‘耐冬’组培的研究尚未涉及愈伤组织在整个生长过程中颜色的变化及生理生化的研究,而本研究中只对其颜色变化做了较为详尽的描述。

在转接过程中,愈伤组织被切开后,色素会很明显地残留于滤纸上。这种泛红的组织在愈伤组织诱导阶段极少存在,但其通体变红则主要发生在不定芽分化的过程中。这种红色的愈伤组织中可能含有花色苷等黄酮类物质,且伴随着愈伤组织的生长,黄酮类物质也会不断累积,这就能解释泛红的愈伤组织会越来越红。而这种红色愈伤组织多出现在诱导不定芽分化阶段的情况与山茶组织培养的中山茶总黄酮含量变化规律基本一致(张国彬2004)。我们可以通过红色愈伤组织的多少或者颜色的深浅来初步判断其中黄酮类物质含量的

高低,并借此来获悉愈伤组织处于哪个生长阶段以便更为有效地对愈伤组织进行分化诱导。

‘耐冬’愈伤组织在各个生长阶段的生理生化研究可以在不定芽分化试验中对于激素的配比及继代周期等起到一定的指导作用,而这方面有待做进一步的研究。

参考文献

- 毕方铖,谭晓风,张智俊,陈永忠,杨伟(2004).油茶离体培养诱导再生植株的研究.经济林研究,22(2):5~9
- 蔡汉权(1996).山茶芽培养诱导愈伤组织及植株再生.韩山师范学院学报,3:105~108
- 陈艳丽(2006).耐冬山茶组织培养再生体系的研究[硕士论文].山东:莱阳农学院,1~52
- 董慧慧,王奎玲,薛秋华,刘庆华(2007).耐冬山茶愈伤组织诱导研究.福建林业科技,34(3):135~139
- 李纪元,范正琪,杨志玲,田敏(2003).长瓣短柱茶未成熟胚子叶体细胞胚状体形成和植株再生.中国茶花,4(1):45~47
- 张国彬(2004).山茶组织培养的初步研究[硕士论文].湖北:华中师范大学,1~38
- 庄承纪,周建葵(1997).云南山茶花茎尖培养中多芽体的形成和生根的研究.实验生物学报,30(1):1~11