

石竹愈伤组织诱导及植株再生

黄 莺, 范燕萍, 王文生, 蒋莉华

(华南农业大学 园艺学院, 广东 广州 510642)

摘要: 通过诱导愈伤组织再分化和直接诱导不定芽这两种途径获得了石竹的再生植株. 比较了不同植物生长调节剂配比在离体培养中的效应, 认为 6-BA 是诱导长期培养的愈伤组织再分化最有效的外源激素, 适宜的质量浓度范围在 0.5~2.0 mg/L 之间, 当 6-BA 为 1.0 mg/L, NAA 为 0.3 mg/L 时, 愈伤组织不定芽分化频率最高, 小苗生长状况也最好; 将 6-BA 与 NAA、IBA、Ad 等生长调节剂混合使用可提高诱导效果. 增殖继代培养基中 6-BA 的质量浓度在 0.1~0.3 mg/L 之间为宜, 浓度过大, 虽然芽增殖数量增多, 但苗的畸形化和愈伤化现象严重.

关键词: 石竹; 离体培养; 愈伤组织; 芽分化

中图分类号: S681.99

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2003)01-0050-03

石竹(*Dianthus chinensis*)是石竹科石竹属的重要观赏花卉, 世界各地广为栽培, 品种繁多, 但由我国自行培育的优良品种却很少. 在石竹的离体培养中, 多采用茎尖、茎段作为外植体^[1], 近年来, 也有人成功利用叶片培养获得再生植株^[2,3], 但利用子叶、下胚轴再生植株的报道却很少见. 为了提高突变频率, 减少嵌合体的发生并方便抗性细胞的筛选, 笔者选取了幼龄植株的叶片、子叶和下胚轴作为外植体进行离体培养, 通过诱导愈伤组织再分化的途径获得了再生植株. 笔者试图利用愈伤组织培养结合辐射诱变的方法进行耐热、抗病突变体的筛选, 希望选育出适合我国南方地区栽植的新品种. 为此, 对石竹离体培养再生体系的建立进行了探索研究.

1 材料与方法

材料为五彩石竹. 种子用双层纱布包住, 在超净工作台上用 $\varphi=75\%$ 酒精浸泡 1 min, 再用 1 g/L 升汞溶液灭菌 8 min, 无菌水冲洗 4~6 次, 播种于 1/2MS 培养基上. 萌芽后, 分别取幼苗的叶片、子叶和下胚轴接种到诱导培养基上培养.

基本培养基为 MS, 附加不同质量浓度及配比的 2,4-D、6-BA、Ad、KT、NAA、IAA、IBA 等生长调节剂, 培养基内琼脂质量浓度均为 7 g/L, 蔗糖质量浓度为 20~40 g/L, pH 5.8~6.0. 培养条件为室温, 光照 12 h/d, 日光灯光源, 光照度 2 000 lx.

2 结果与分析

2.1 不同植物生长调节剂比对植株再生的影响

2.1.1 愈伤组织的诱导 为了诱导愈伤组织, 在基本培养基中分别附加(I)2,4-D 1.0 mg/L+KT 0.1 mg/L; (II)2,4-D 1.5 mg/L+KT 0.1 mg/L; (III)2,4-D 0.3 mg/L+KT 1.0 mg/L; (IV)6-BA 2.0 mg/L+IAA 1.0 mg/L; (V)6-BA 0.5 mg/L+IAA 1.0 mg/L.

(I)、(II)号培养基在接种幼苗子叶和叶片 10 d 后可诱导出乳白至淡黄色的愈伤组织, 诱导率达 100%. 愈伤组织质地较为疏松, 由表面光滑、呈半透明的球状体组成, 具有胚性愈伤的外观特征^[4]. 稍后 (III)、(IV)号培养基也能诱导出愈伤组织, 但 (V)号培养基始终未能诱导愈伤产生, 也未见不定芽分化.

2.1.2 愈伤组织再分化 由 2,4-D 诱导出的愈伤组织, 难以自行分化成芽, 需要转移到不含 2,4-D 成分的培养基上进行芽的诱导. 这一诱导过程需要的培养时间较长, 而且芽的诱导分化率较低, 笔者选用了多种不同激素配比的培养基进行比较. 实验表明, 6-BA 是诱导长期培养的愈伤组织再分化最有效的外源激素, 适宜的质量浓度范围在 0.5~2.0 mg/L 之间. 当 6-BA 为 1.0 mg/L, NAA 为 0.3 mg/L 时, 愈伤组织不定芽分化频率最高, 小苗生长状况也最好; 为了提高诱导效果, 可将 6-BA 与 NAA、IBA、Ad 等生长调节剂混合使用, KT 和 IAA 诱导出芽的效应较差, GA 抑制芽的形成, 对愈伤组织的生长也不利, 结果见表 1.

表 1 不同配比植物生长调节剂诱导愈伤组织再分化的效应比较

Tab. 1 Effect of combinations of plant regulators on the redifferentiation of callus												
ρ (植物生长调节剂 plant regulators) / (mg $^{\circ}$ L $^{-1}$)					愈伤 生长 of callus	芽分化率 percentage of bud differen- tiation/ %	ρ (植物生长调节剂 plant regulators) / (mg $^{\circ}$ L $^{-1}$)				愈伤 生长 of callus	芽分化率 percentage of bud differen- tiation/ %
6-BA	KT	IAA	NAA	Ad			6-BA	NAA	IBA	GA		
1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	好	8.0	1.0	0.0	0.2	0.0	好	10.0
1.0	0.0	0.5	0.0	0.0	较好	0.0	1.0	0.1	0.0	0.0	很好	8.5
0.3	0.0	0.5	0.0	0.0	较好	0.0	1.0	0.2	0.0	0.0	较好	12.5
0.5	0.0	0.3	0.0	0.0	很好	0.0	1.0	0.3	0.0	0.0	很好	12.0
1.0	0.1	0.0	0.2	0.0	很好	0.0	0.3	0.1	0.0	0.0	较好	0.0
2.0	0.5	0.0	0.2	0.0	较好	0.0	0.5	0.1	0.0	0.0	较差	2.5
0.5	0.0	0.0	0.1	4.0	很好	28.6	0.5	0.2	0.0	0.0	较好	15.0
0.5	1.0	0.5	0.0	4.0	较差	2.5	2.0	0.2	0.0	0.0	较好	0.0
0.0	1.0	0.0	0.5	8.0	差	0.0	1.0	0.1	0.0	2.0	很差	0.0
0.0	0.5	0.3	0.0	0.0	差	0.0	1.0	0.1	0.0	2.0	差	0.0
0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	差	0.0	0.0	0.1	0.0	10.0	很差	0.0

2.1.3 直接诱导不定芽 调整激素配比, 将 6-BA 与 NAA 在一定质量浓度范围内组合使用, 可诱导叶片、子叶和下胚轴等外植体在接种 7~15 d 后产生浅绿至深绿色愈伤组织, 组织质地较为致密, 表面粗糙, 呈块状. 不用更换培养基, 这种愈伤组织随后可直接分化出不定芽, 逐渐长成小芽丛.

有报道^[2,5]认为 NAA 在 0.2~0.3 mg/L 左右最适宜诱导石竹不定芽发生, 实验中将 NAA 分别稳定

在这 2 个水平上, 调节 6-BA 的质量浓度, 探索最佳诱导培养基(表 2). 接种 30 d 后调查发现, 在 6-BA 为 1.0 mg/L, NAA 为 0.3 mg/L 时, 不定芽分化频率最高, 小苗生长状况也最好; 当 6-BA 质量浓度低于 0.5 mg/L 时, 诱导出的不定芽容易发生玻璃化; 而 6-BA 质量浓度达到 2.0 mg/L 时, 虽然每外植体平均芽数有所增加, 但能诱导形成不定芽的外植体数量有所减少, 而且诱导出的幼苗较为矮缩.

表 2 6-BA 和 NAA 对芽诱导的影响

Tab. 2 Effect of 6-BA and NAA on induction of adventitious bud						
ρ (6-BA)/ ($\text{mg}^\circ\text{L}^{-1}$)	ρ (NAA)/ ($\text{mg}^\circ\text{L}^{-1}$)	接种数	分化数	分化率	每外植体芽数	
		no. of explant inoculated	no. of differentiated explants	percentage of differentiation/ %	no. of buds of each explant	
0.1	0.3	40	8	20.0	6~7	
0.3	0.3	40	9	25.0	6~7	
0.5	0.3	80	34	42.5	4~5	
1.0	0.3	80	37	46.3	3~4	
1.5	0.3	40	16	40.0	5~6	
2.0	0.3	80	28	35.0	7~8	
0.5	0.2	40	7	17.5	3~4	
1.0	0.2	120	32	26.7	2~3	
2.0	0.2	40	4	10.0	2~3	

2.2 不同外植体再生植株的差异

将石竹幼苗的叶片、子叶和下胚轴作为外植体进行实验, 比较它们分化产生再生植株的能力. 芽的诱导形成率以下胚轴最高, 子叶次之, 叶片最低. 诱导成芽所需的时间也是下胚轴最短, 叶片最长. 另外, 下胚轴和子叶诱导形成的芽成苗后玻璃化程度

明显低于叶片, 每个外植体形成芽的平均数也要比叶片多出 2 个左右. 但是, 下胚轴诱导形成的芽较易形成畸形苗, 叶片外形特别宽大, 略带卷曲, 呈丛生状, 茎节分化不明显. 3 种外植体中, 子叶诱导形成的芽长势最好, 诱导率也较高, 是诱导分化再生植株的最佳材料, 但偶尔也会形成叶片特别细长、纤弱的畸

形苗. 用叶片为外植体材料的芽诱导率最低, 出现玻璃苗的频率最高, 但是叶片在数量上、取材的方便性上又大大优于子叶和下胚轴.

2.3 再生植株的增殖继代

由表3可看出, 继代培养基中 6-BA 的质量浓度在 0.1~0.3 mg/L 为宜. 超过这个质量浓度时, 虽然芽增殖数量增多, 但并不利于幼苗生长, 甚至容易引起畸形化和愈伤化现象产生.

表3 6-BA 对再生苗继代增殖的影响

Tab.3 Effect of 6-BA on propagation of regenerated seedlings

$\rho(6-BA)/$ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	$\rho(\text{NAA})/$ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	增殖系数 propagation coefficient
0.1	0.1	4
0.3	0.1	6
0.5	0.1	6
1.0	0.1	8

诱导培养基中激素含量对继代后石竹幼苗的生长有较大影响. 在相同的继代培养基上, 高质量浓度激素诱导形成的芽可增殖产生大量继代苗, 但生长势较弱, 玻璃化程度较高; 低质量浓度激素诱导形成的芽增殖系数较低, 但生长势更好, 苗更健壮, 茎节分化更明显.

2.4 根的诱导

选取 1/2MS 附加 IBA 1.0 mg/L 和 NAA 0.01 mg/L 的培养基, 生根率达 95% 以上, 可形成十余条 2 cm 以上的根.

3 讨论

诱导培养基中的激素质量浓度很高, 不利于分化芽形成后的生长, 若不及时继代转瓶, 容易产生畸形苗, 如叶片过长、过细, 茎节分化不明显, 植株过度含水化, 或者长势太弱、不够健壮等. 因此, 要及时将分化芽转移到激素质量浓度较低的继代增殖培养基中.

在石竹的离体培养中, 多采用茎尖、茎段做为外植体^[1], 也有人利用叶片培养获得再生植株^[2,3], 但利用子叶、下胚轴再生植株的报道却很少见. 笔者的实验结果为进一步的人工诱变和遗传转化操作提供了技术基础和参考依据. 另外, 虽然愈伤组织再分化成植株的效率比较低, 不能达到迅速扩繁的效果, 但是却能提高体细胞的突变频率和抗性细胞的筛选效率, 对于花卉的育种研究工作来说更具意义.

参考文献:

[1] 加古舜治. 园艺植物的器官与组织培养[M]. 郑州: 河南科技出版社, 1987. 108—138.
[2] 陈以俊, 沈惠娟. 石竹花芽发生与内源多胺含量的关系[J]. 园艺学报, 1999, 26(5): 341—342.
[3] 王长泉, 宋 恒, 王希峰, 等. 常夏石竹抗盐突变体的筛选[J]. 园艺学报, 2001, 28(5): 469—471.
[4] 奚元龄, 颜昌敬. 植物细胞培养手册[M]. 北京: 中国农业出版社, 1992. 26—30.
[5] 韦三立. 花卉组织培养[M]. 北京: 中国林业出版社, 2001. 128—129.

The Induction of Callus and Plantlet Regeneration in *Dianthus chinensis*

HUANG Ying, FAN Yan-ping, WANG Wen-sheng, JIANG Li-hua
(College of Horticulture, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: The regenerated plantlets in *Dianthus chinensis* were obtained by two methods; through the redifferentiation of the callus and the adventitious buds induced directly from the explant. The effects of plant regulator compositions on the differentiation of callus and the induction of adventitious buds *in vitro* culture were studied. The propagation of the regenerated plants and the induction of the roots were also discussed in this report.

Key words: *Dianthus chinensis*; *in vitro* culture; callus; bud differentiation

【责任编辑 柴 焰】