

金叶日本冬青愈伤组织诱导及分化的研究

朱志国 (芜湖职业技术学院园林园艺系, 安徽芜湖 241000)

摘要 以金叶日本冬青新梢茎段为外植体, 探讨不同部位新梢、不同激素组合、糖源以及培养基 pH 值对其愈伤组织诱导及分化的影响。结果表明, 采用相同处理, 取中上部新梢茎段作外植体较好, 其消毒成活率、愈伤萌动率、分化成苗率均较高; MS + KT 1.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L 培养基对愈伤组织诱导分化最佳; 蔗糖浓度为 30 g/L 时效果最好, 愈伤诱导率为 100%; 培养基 pH 值以 6.0 较适宜。

关键词 金叶日本冬青; 组织培养; 愈伤组织; 诱导

中图分类号 Q943.1 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)09-02569-02

Investigation of Callus Induction and Differentiation of *Ilex crenata*

ZHU Zhi-guo (Department of Garden Horticulture, Wuhu Institute of Technology, Wuhu, Anhui 241000)

Abstract In this experiment the effect of hormone combination, sugar source and pH on callus induction and differentiation was investigated. The results indicated that new stem-tip at upper part was optimum explant, with high survival rate after sterilization and the sprouting rate of its callus were relatively high. MS medium supplemented with KT 1.0 mg/L, and NAA 0.2 mg/L was the best one for callus induction and differentiation. When the density of sugar was 30 g/L, the rate of callus induction was 100%. In addition, the optimum medium pH was 6.0.

Key words *Ilex crenata*; Tissue culture; Callus; Induction

1 材料与试验方法

1.1 试验材料 采用带芽的新梢茎段作为外植体。

1.2 试验方法

1.2.1 取材部位及消毒时间。分别从植株基部和中上部取长约 5~10 cm 的新梢, 洗净后用 75% 乙醇消毒 40 s, 0.1% 升汞消毒 1~5 min 后接种, 光照 12~14 h/d, 温度 25 °C, 比较不同消毒时间对外植体污染和不同部位新梢的影响。基部茎段和中上部茎段均每处理 30 瓶, 每瓶接 1 个外植体, 3 次重复。

1.2.2 激素配比。切取茎段分别接种到 9 种不同激素配比的培养基上 (mg/L): ① 1/2MS; ② MS; ③ MS + 6-BA 0.5 + NAA 0.1; ④ MS + 6-BA 1.0 + NAA 0.1; ⑤ MS + 6-BA 2.0 + NAA 0.2; ⑥ MS + KT 0.5 + NAA 0.1; ⑦ MS + KT 1.0 + NAA 0.2; ⑧ MS + KT 0.5 + 6-BA 0.5 + NAA 0.1; ⑨ MS + KT 0.5 + 6-BA 0.5 + NAA 0.2。在 25 °C 条件下, 光照 12~14 h/d, 比较不同培养基对愈伤组织诱导及分化成苗的影响。基本培养基中添加 3% 的蔗糖、6.0 g/L 琼脂。每处理 30 瓶, 每瓶接 1 个外植体, 3 次重复。

1.2.3 糖源。比较蔗糖、葡萄糖、麦芽糖在 20、30 和 40 g/L 条件下愈伤的诱导分化效果。每处理 30 瓶, 每瓶 1 个外植体。在 25 °C 条件下, 光照 12~14 h/d, 观察愈伤组织生长及分化情况, 统计愈伤诱导率。

1.2.4 培养基 pH 值。培养基灭菌前, 设 pH 值: 4.5、5.0、5.5、6.0 和 6.5。每个处理 20 瓶, 选用 MS 基本培养基, 添加蔗糖 30 g/L, 在 25 °C 条件下, 光照 12~14 h/d, 观察愈伤组织生长及分化情况, 统计愈伤诱导率。

2 结果与分析

2.1 不同消毒时间对茎段培养及分化的影响 由表 2 可见, 0.1% HgCl₂ 处理 3 min, 外植体污染率、死亡率均较低, 分别为 12% 和 15.3%, 成活率、分化率较高, 分别为 72.7% 和 81.6%; 处理 5 min, 污染率降至 7.8%, 但死亡率却高达 68.2%, 分化率下降为 66.7%; 处理 1 min, 污染率达 76.4%

成活率 11.5%, 分化率仅 62.5%。说明处理时间过长或过短对外植体消毒都不利, 消毒时间过短时灭菌不彻底, 消毒时间太长, HgCl₂ 对外植体有一定的毒害作用。

表 1 0.1% HgCl₂ 不同处理时间对外植体的影响

处理时间 min	污染率 %	死亡率 %	成活率 %	分化率 %
1	76.4	12.1	11.5	62.5
2	26.7	14.9	58.4	73.4
3	12.0	15.3	72.7	81.6
4	9.5	40.6	49.9	70.3
5	7.8	68.2	24.0	66.7

注: 外植体均为茎段, 接种数均为 30 个。

2.2 外植体不同部位对愈伤组织诱导分化的影响 由表 2 可见, 采用相同处理, 接种 40 d 后, 基部新梢的消毒成活率明显比中上部新梢低, 愈伤的诱导率中上部新梢茎段较基部新梢茎段好。在接种 45 d 后, 中上部新梢诱导出的愈伤组织长满并包围切段, 60 d 开始有不定芽分化, 分化率 81.3%, 并形成无根苗。基部新梢愈伤组织的出现比中上部新梢迟 2 周左右, 大多数愈伤组织先从基部一端切口形成, 然后从另一端切口再长出愈伤组织, 且长势缓慢, 愈伤分化成苗率不高, 仅 76.1%。

表 2 外植体不同部位对愈伤组织诱导分化的影响 %

部位	消毒成活率	愈伤诱导率	分化率
中上部	36.89	51.37	81.3
基部	18.16	49.36	76.1

2.3 不同激素组合对愈伤组织诱导及分化的影响 表 3 显示, 添加 KT 的培养基, 愈伤诱导率较高, 当 KT 浓度由 0.5 mg/L 上升为 1.0 mg/L 时诱导率从 54.03% 上升为 74.69%; 经过一段时间后, 愈伤组织分化成芽, 分化率由 71.67% 上升为 84.33%。在不添加任何激素的 MS 培养基上, 愈伤组织萌动最晚, 没有芽的分化。在添加 6-BA 浓度为 0.5 和 1.0 mg/L 或添加 6-BA 与 KT 混合的培养基上, 愈伤组织诱导率都偏低, 但都有芽的分化。结果表明, 激素组合 MS + KT 1.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L 的愈伤组织诱导率、分化成苗率最高。

作者简介 朱志国(1976-), 男, 安徽肥西人, 讲师, 从事观赏植物繁育与栽培方面的教研工作。

收稿日期 2006-01-01

表3 不同激素处理对愈伤组织诱导的影响

基本培养基及激素组合 mg/L	愈伤组织 诱导率//%	分化率 %
MS	38.76	0
MS+6-BA 0.5+NAA 0.1	50.01	70.01
MS+6-BA 1.0+NAA 0.1	35.43	64.32
MS+6-BA 2.0+NAA 0.2	55.26	73.24
MS+KT 0.5+NAA 0.1	54.03	71.67
MS+KT 1.0+NAA 0.2	74.69	84.33
MS+KT 0.5+6-BA 0.5+NAA 0.1	44.37	68.72
MS+KT 0.5+6-BA 0.5+NAA 0.2	33.53	62.48

注:接种数均为30个。

2.4 不同糖源对愈伤组织诱导及分化的影响 表4显示,不同糖源对金叶日本冬青愈伤诱导率、诱导系数有明显影响,蔗糖较葡萄糖、麦芽糖效果好;蔗糖浓度30 g/L效果最好,诱导率100%,愈伤组织分化率较高,为83.5%;糖源浓度不宜过高,这样不仅可保证一定的诱导率,还可节约成本。

表4 不同糖源对金叶日本冬青愈伤组织诱导的影响

糖源	浓度	诱导率	诱导	分化率
	g/L	%	系数	%
蔗糖	20	82	3.48	76.1
	30	100	5.65	83.5
	40	90	5.19	82.6
葡萄糖	20	78	2.56	71.6
	30	81	3.49	76.4
	40	74	3.18	74.9
麦芽糖	20	90	2.88	73.5
	30	82	3.00	74.3
	40	70	2.84	72.0

2.5 培养基 pH 值对愈伤组织诱导及分化的影响 表5显示,不同 pH 值虽然对愈伤组织诱导率的影响不大,但对愈伤组织生长量有较明显影响。pH 值 6.0 时愈伤组织块直径为

pH 值 4.5 的 3 倍以上,愈伤组织生长最好,芽分化较早,分化率最高,且这些芽能抽叶展茎成苗。pH 值 6.5 时,愈伤组织生长受到抑制,分化率下降。故金叶日本冬青愈伤组织诱导及分化成苗的培养基 pH 值以 6.0 较为合适。

表5 不同 pH 值对愈伤组织诱导的影响

培养基 pH 值	出愈率//%	愈伤组织生长情况	分化率//%
4.5	100.0	生长一般	60.2
5.0	93.2	生长较好	77.0
5.5	95.6	生长好	80.6
6.0	100.0	生长最好	85.3
6.5	93.5	生长较好	77.4

注:接种外植体数均为20个。

3 小结

(1)中上部新梢茎段作外植体较好,其消毒成活率、愈伤诱导率均较高,不定芽分化较早,并形成无根苗。茎段最佳消毒时间为0.1%升汞3 min。

(2)以茎段作外植体,MS+KT 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L的激素组合对外植体愈伤组织诱导效果最佳,愈伤组织分化成苗率较高。

(3)蔗糖浓度以30 g/L效果最好,诱导率为100%,愈伤组织分化率较高。

(4)不同 pH 值对金叶日本冬青愈伤组织诱导率的影响差异不大,但在愈伤组织生长量及分化上差异较明显,以 pH 值 6.0 较为合适。

参考文献

- [1] 陈正华. 木本植物组织培养及其应用[M]. 北京: 高等教育出版社, 1986.
- [2] 潘瑞炽. 植物组织培养[M]. 广州: 广东高等教育出版社, 2003.
- [3] 谭文澄, 戴策刚. 观赏植物组织培养技术[M]. 北京: 中国林业出版社, 1991.
- [4] 沈孝善, 万觉珍, 骆伟仪. 影响硬毛猕猴桃叶分化不定芽的因素[J]. 植物生理学通讯, 1990(6): 29-31.
- [5] Publishers, 2000: 206-214.
- [6] 裴东. 苹果基因转化及叶片离体再生的研究[D]. 保定: 河北农业大学, 1992.
- [7] MERKULOV S M, BARTISH I V, DOLGOV S V, et al. The genetic transformation of the pear *pyrus communis* L. mediated by *agrobacterium tumefaciens* [J]. *Russian J, Genet*, 1998, 34: 289-293.
- [8] KANEYOSHI, WABIKO H, KOBAYASHI S, et al. *Agrobacterium tumefaciens* AKE10-mediated transformation of an Asian pear, *pyrus betulaefolia* bunge: host specificity of bacterial strains[J]. *Plant Cell Report*, 2001, 20: 622-628.
- [9] CHEVREAU E, MOURGUES F, NEVEU M, et al. Effect of gelling agents and antibiotics on adventitious bud regeneration from in vitro leaves of pear[J]. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 1997, 33(3): 173-179.
- [10] LEBEDEV V G, DOLGOV S V. The effect of selective agents and plant introns on transformation efficiency and expression of heterologous genes in *Pyrus communis* L[J]. *Genetia Moskva*, 2000, 36(6): 792-798.
- [11] POWELL ALT, KAN J, HAVE A, et al. Transgenic expression of pear PGIP in tomato limits fungal colonization[J]. *Mol-plant-microb-interact*, 2000, 13: 942-950.
- [12] SASSA H, USHIJIMA K, HIRANO H. A pistil-specific thaumatin/PR5 like protein gene of Japanese pear (*Pyrus serotina*): Sequence and promoter activity of the 5' region in transgenic tobacco[J]. *Plant Molecular Biology*, 2002, 50(3): 371-377.

(上接第 2522 页)

- [39] MOURGUES F, CHEVREAU E, LAMBERT C, et al. Efficient *agrobacterium* mediated transformation and recovery of transgenic plants from pear (*Pyrus communis* L.) [J]. *Plant Cell Report*, 1996, 16: 215-219.
- [40] REYNIORD J P, MOURGUES F, NORELLI J, et al. First evident for difference in fire blight resistance among transgenic pear clones expression *attacin E* gene from *hyalophora cecropia* [J]. *Plant Sic*, 1999, 149: 23-31.
- [41] MOURGUES F, BRISSET M N, CHEVREAU E, et al. Activity of different antibacterial peptides on *erwinia amylovora* growth, and evaluation of the phyto-toxicity and stability of cecropins [J]. *Plant Sic*, 1998, 139: 83-91.
- [42] PUTERKA G J, BOCCHETTI C, DANG P, et al. Pear transformed with a lytic peptide gene for disease control affects nontarget organism, pear psylla (*Homoptera: Psyllidae*) [J]. *J Econ Entomol*, 2002, 95: 797-802.
- [43] BELL R L, SCORA R, SRINIVASAN C, et al. Transformation of 'Beurre Bosc' pear with the *rolC* gene [J]. *J Amer Soc Hort Sci*, 1999, 124(6): 570-574.
- [44] ZHU L H, WELANDER M. Adventitious shoot regeneration from leaves of two dwarfing pear rootstocks and the development of transformation protocol [J]. *J Hort Sci & Biotech*, 2000, 75(6): 745-452.
- [45] BOMMINENI V R, MATSUMURA W, CLENDENNEN W, et al. Genetic engineering of fruit and vegetables with the ethylene control gene encoding S-adenosylmethionine hydrolase (SAMase) [C]// AREBUCUBA A D. *Plant genetic engineering: towards the third millennium*. Netherlands: Elsevier Science