

车轮梅茎段高效再生体系的建立

刘娟旭^{1,2}, 刘玲¹, 余义勋^{1*}, 王静¹, 黄现宝¹

(¹华南农业大学园艺学院, 广州 510642; ² University of Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences, Apopka, FL 32703-8504, USA)

摘要: 以车轮梅 (*Raphiolepis indica* Lindl.) 茎段为外植体, 探讨基本培养基种类、植物生长调节剂组合、蔗糖浓度和 AgNO_3 等对茎段器官发生和植株再生的影响。结果表明: MS + 6-BA $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + AgNO_3 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 蔗糖 $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基最适合不定芽的分化和增殖, 不定芽分化率达 90% 以上, 平均每外植体分化不定芽数达 5.38 个。不定芽可在 1/2MS 培养基中有效伸长, 适宜的生根培养基为 1/2MS + NAA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 生根率达到 100%。

关键词: 车轮梅; 茎段; 植物生长调节剂; 不定芽再生

中图分类号: S 685.12 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2008) 06-0895-04

Establishment of A Highly Efficient System of Shoot Regeneration from Stem Segment Explants of *Raphiolepis indica* Lindl

LIU Juan-xu^{1,2}, LIU Ling¹, YU Yi-xun^{1*}, WANG Jing¹, and HUANG Xian-bao¹

(¹ College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; ² University of Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences, Apopka, FL 32703-8504, USA)

Abstract: An efficient plant regeneration protocol for *Raphiolepis indica* Lindl. was achieved via organogenesis direct formation on stem segment explants *in vitro*. Several factors affecting *in vitro* regeneration of *R. indica*, such as basic medium, different hormones combination, concentrations of sucrose and AgNO_3 , were examined. The optimum medium for shoot regeneration was MS medium containing $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA, $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA, $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ AgNO_3 and $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose. 90% of adventitious shoot regeneration frequency with 5.38 shoots per explant was obtained. Excised shoots were effectively elongated in 1/2 MS medium. Elongated shoots of 3.0 cm rooted when they were transferred to 1/2MS medium containing $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA after 40 days and developed into healthy plantlets, which resulted in a rooting rate of 100%.

Key words: *Raphiolepis indica* Lindl.; stem segment; plant growth regulator; shoot regeneration

车轮梅 (*Raphiolepis indica* Lindl.) 为蔷薇科 (Rosaceae) 石斑木属的一种优良野生花灌木。车轮梅树高 1~4 m, 枝叶繁茂, 春夏满树白花, 花朵中心为淡红色或橙红色, 花形奇特, 秋季紫黑色球果缀满枝头, 极具观赏价值, 开发前景广阔。车轮梅多以种子繁殖, 也可以扦插繁殖 (代色平等, 2007)。车轮梅开花虽盛, 但开花时间较短, 花色还不够丰富。本研究建立起车轮梅高效再生体系, 有可能为利用现代生物技术改良其品质打下基础。

1 材料与方法

1.1 无菌苗的获得

车轮梅种子于 2004 年 12 月采于华南农业大学校园。用自来水洗去种子表面灰尘, 70% 酒精消毒

收稿日期: 2007-12-17; 修回日期: 2008-02-27

基金项目: 霍英东教育基金项目 (104031); 广东省自然科学基金项目 (05300848)

*通讯作者 Author for correspondence (E-mail: yuyixun106@sohu.com)

30 s, 再用 0.1%升汞溶液消毒 8~10 min, 无菌水冲洗 4 次, 再用刀轻微刻伤种皮, 接种到 1/2MS 培养基中, 5 d 后种子膨大发芽, 2 周后第 1 片真叶长出。35 d 后可切取茎段用于再生培养。

1.2 不定芽再生

1.2.1 基本培养基筛选 切取无菌苗茎段 0.5~1.0 cm, 平接于不同种类的基本培养基中。以 MS、1/2MS、WPM 和 B₅ 为基本培养基, 附加 6-BA 2.0 mg·L⁻¹、NAA 0.5 mg·L⁻¹、AgNO₃ 1.0 mg·L⁻¹、琼脂粉 7 g·L⁻¹ 和蔗糖 30 g·L⁻¹, 用 0.1 mol·L⁻¹ NaOH 将 pH 值调至 5.8~6.0, 121 °C 高压 (1.2 kg·cm⁻²) 灭菌 20 min。其中 AgNO₃ 为过滤灭菌。

接种外植体后置于 24~26 °C, 光照强度 3 000 lx, 光照时间 12~14 h·d⁻¹ 条件下培养。每培养瓶接种 5 个外植体, 每处理 8 瓶。35 d 后统计每个处理再生不定芽数和每个外植体再生的芽数, 计算不定芽分化率、每个外植体平均再生芽数, 确定再生最适培养基。不定芽分化率 (%) = 再生不定芽外植体数 / 接种外植体数 × 100; 平均再生不定芽数 = 再生不定芽总数 / 能再生的外植体数。

1.2.2 NAA 和 6-BA 配比 以 MS 为基本培养基, 添加不同浓度的 6-BA 和 NAA, 另加 AgNO₃ 1.0 mg·L⁻¹。将材料切割成 0.5~1.0 cm 的茎段接种于不同诱导培养基上, 35 d 后统计再生不定芽数。

1.2.3 蔗糖浓度 试验设 5 个蔗糖浓度: 10、20、30、40、50 g·L⁻¹, 以茎段为外植体, 基本培养基与培养条件同上。

1.2.4 AgNO₃ 设 6 个 AgNO₃ 浓度: 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mg·L⁻¹, 试验材料、基本培养基与培养条件同上。

1.3 不定芽增殖

增殖培养以 MS 为基本培养基, 附加 2.0 mg·L⁻¹ 6-BA 和 1.0 mg·L⁻¹ AgNO₃, 另 NAA 浓度设置 3 个处理: 0.1、0.5 和 1.0 mg·L⁻¹。经过 1~2 次继代后小丛芽逐渐分化出不定芽, 每个处理接种 40 个外植体, 继代时间 40 d, 继代 3 次后统计增殖倍数。

1.4 生根和移栽

将再生不定芽接种到不添加任何植物生长调节剂的 1/2MS 培养基中伸长生长。不定芽伸长至 3.0 cm 时, 接种到 1/2MS 生根培养基附加 NAA (0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mg·L⁻¹) 及蔗糖 30 g·L⁻¹ 和琼脂粉 7 g·L⁻¹。每个生根处理包含 30 个外植体, 3 次重复。50 d 后统计生根情况, 记录每个外植体的生根数, 计算生根率。

邓肯氏新复极差法进行数据差异显著性测验。

2 结果与分析

2.1 不定芽的分化

2.1.1 培养基种类的影响 切取车轮梅无菌苗茎段 0.5~1.0 cm 平接于不同种类的基本培养基中, 2 周后车轮梅茎段上部伤口处开始直接分化出浅绿色球形不定芽 (图版, A~C)。少数外植体基部伤口处也可分化不定芽, 不过数量较少。从表 1 可以看出, 车轮梅茎段在 1/2MS、MS、WPM 和 B₅ 等 4 种不同基本培养基中均可以分化出不定芽, 但不定芽分化率有显著差异, MS 培养基中不定芽分化率最高, 达到 93.3%。表 1 还表明: 基本培养基不仅影响不定芽分化率而且影响每个外植体分化不定芽的个数。平均每个外植体再生芽数最高的 (5.22 个) 也发生在 MS 培养基上, 说明 MS 为车轮梅茎段不定芽诱导的最适培养基。

2.1.2 NAA 和 6-BA 配比的影响 从表 2 可以看出, 6-BA 对车轮梅不定芽分化影响很大, 最适浓度为 2.0 mg·L⁻¹。单独使用 NAA 时芽分化率为 0, 单独使用 6-BA, 芽分化率较低, 最佳组合是 6-BA 2.0 mg·L⁻¹ + NAA 0.5 mg·L⁻¹, 此时不定芽分化率可达 92.5%。

表 1 基本培养基对车轮梅茎段不定芽分化的影响

Table 1 Effects of basic medium on shoots differentiation of <i>Raphiolepis indica</i> stem segment		
基本培养基 Basic medium	不定芽分化率 / % Shoots differentiation rate	平均不定芽数 Number of shoots per explant
1/2MS	71.7 c	2.86 c
MS	93.3 a	5.22 a
WPM	81.4 b	3.79 b
B ₅	54.7 d	3.81 b

表 2 NAA 和 6-BA 对比对车轮梅茎段不定芽分化的影响

Table 2 Effects of NAA and 6-BA combination on shoots differentiation frequency of <i>R. indica</i> stem segment / %				
NAA / (mg · L ⁻¹)	6-BA / (mg · L ⁻¹)			
	0	1.0	2.0	3.0
0	0	40.0	57.5	47.5
0.2	0	62.5	77.5	72.5
0.5	0	70.0	92.5	75.0
1.0	0	60.0	82.5	55.0

2.1.3 蔗糖浓度的影响 蔗糖浓度对车轮梅茎段离体不定芽形成有明显的影 响 (表 3)。当蔗糖浓度达到 40 g · L⁻¹ 时, 不定芽再生率和平均芽数达到最大, 分别为 91.3% 和 5.08 个。10 g · L⁻¹ 蔗糖处理中产生的芽生长缓慢, 这可能与后期生长过程中碳源不足有关, 而含 50 g · L⁻¹ 的蔗糖培养基渗透压过高, 也不利于不定芽的形成。

2.1.4 AgNO₃ 浓度的影响 从表 4 可以看出, 适宜浓度的 AgNO₃ 对车轮梅茎段离体不定芽分化有明显促进作用。1.0 mg · L⁻¹ AgNO₃ 处理 35 d 后不定芽再生率和平均芽数分别是 92.4% 和 5.38 个。但随着 AgNO₃ 浓度的增加, 不定芽再生率和平均芽数都降低。受伤的外植体特别是伤口处易产生较多的乙烯, 使培养物的生长分化受到影响。

在培养基中添加乙烯抑制剂 (如 AgNO₃ 等) 促进外植体再生已引起人们的注意 (Chi et al, 1990)。AgNO₃ 可以促进愈伤组织的器官发生与体细胞胚胎发生, 促进一些再生困难芽的产生 (张鹏等, 1997), Radke 等 (1992) 报道, 分化培养基中添加 AgNO₃ 可以促进芽原基的产生和伸长。林良斌等 (1999) 也认为 AgNO₃ 能够提高甘蓝型油菜的植株再生。

表 3 蔗糖浓度对车轮梅茎段不定芽分化的影响

Table 3 Effects of different concentrations of sucrose on shoots differentiation of <i>R. indica</i> stem segment			
蔗糖 / (g · L ⁻¹) Sucrose	外植体数 Number of explants	不定芽分化率 / % Shoots differentiation rate	平均不定芽数 Number of shoots per explant
10	40	68.1 d	3.19 c
20	40	72.9 cd	3.48 c
30	40	79.2 b	4.03 b
40	40	91.3 a	5.08 a
50	40	76.8 c	4.16 b

表 4 AgNO₃ 浓度对车轮梅茎段不定芽分化的影响

Table 4 Effects of AgNO ₃ concentrations on shoots differentiation from stem segment of <i>R. indica</i> stem segment			
AgNO ₃ / (mg · L ⁻¹)	外植体数 Number of explants	不定芽分化率 / % Shoots differentiation rate	平均不定芽数 Number of shoots per explant
0	40	81.4 c	3.72 c
0.5	40	83.1 bc	3.85 bc
1.0	40	92.4 a	5.38 a
1.5	40	84.3 b	3.91 b
2.0	40	71.4 d	4.18 b
2.5	40	66.5 d	3.04 d

综合以上优化结果, 茎段不定芽分化的最佳培养基为 MS + 6-BA 2.0 mg · L⁻¹ + NAA 0.5 mg · L⁻¹ + AgNO₃ 1.0 mg · L⁻¹ + 蔗糖 40 g · L⁻¹。

2.2 不定芽增殖

将获得的小丛芽转入不同增殖培养基中进行丛生苗诱导。接种的不定芽在设计的几种培养基上均能增殖, 其中以最佳分化培养基 MS + 6-BA 2.0 mg · L⁻¹ + NAA 0.5 mg · L⁻¹ + AgNO₃ 1.0 mg · L⁻¹ 中增殖倍数最高, 达到 3.41 (图版, D)。从第 3 次增殖培养开始, 丛生苗的增殖倍数逐渐减少。

2.3 不定芽的伸长、生根及移栽

将再生不定芽接到无植物生长调节剂的 1/2MS 培养基中, 3 周后可伸长至 3.0 cm (图版, E),

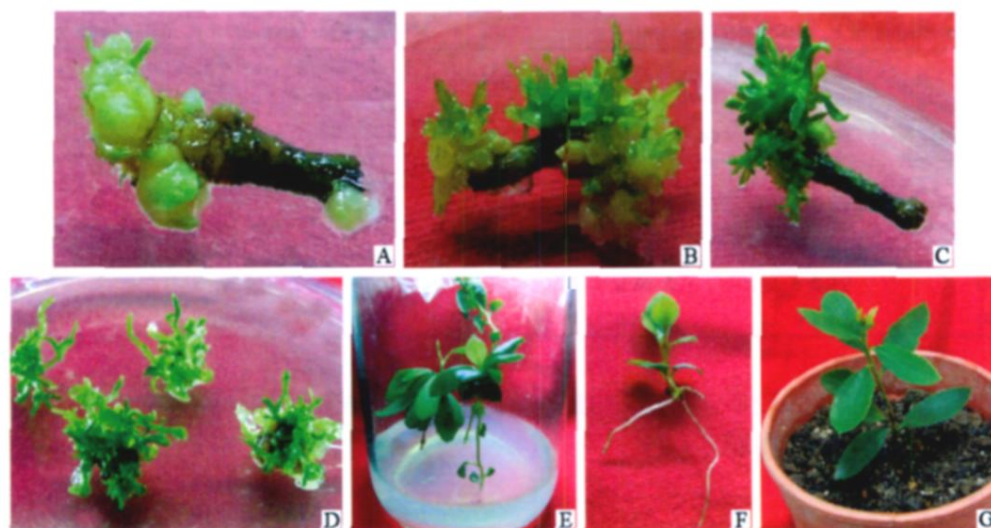
多数在 20 ~ 25 d 时开始有不定根突起, 35 ~ 40 d 每株长出 3 ~ 4 条粗细均匀的根。由表 5 可知最佳生根培养基为 1/2MS + NAA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 生根率达 100% (图版, F)。根长至 3 cm 左右时炼苗 2 ~ 3 d, 用流水洗去根上的培养基, 移栽到经过消毒处理的园土和泥炭土等体积混合的基质中, 每周浇水 2 次, 2 周后长出新的小叶, 成活率可达 90% 以上 (图版, G)。

表 5 NAA 浓度对车轮梅茎段不定芽生根的影响
Table 5 Effects of NAA concentrations on shoots rooting

of <i>R. indica</i> stem segment		
NAA / ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	外植体数 Number of explants	生根率 / % Rooting rate
0.5	90	68.9 d
1.0	90	100.0 a
1.5	90	91.6 b
2.0	90	84.7 c
2.5	90	82.4 c

References

- Chi G L, Barfield D G, Sin G E, Pua E C. 1990. Effect of AgNO_3 and aminoethoxyvinylglycine on *in vitro* shoot and root organogenesis from seedling explants of recalcitrant *B. brassica* genotype. *Plant Cell Reports*, 9 (4): 195 - 198.
- Dai Seping, Jiang Jian-you, You Ming-kai, Zhu Chun, He Man-mei. 2007. Study on cutting propagation of two wild flowers. *Chinese Wild Plant Resources*, 26 (1): 58 - 60. (in Chinese)
- 代色平, 蒋建友, 游铭凯, 朱 纯, 贺漫媚. 2007. 两种野生花卉的扦插繁殖研究. *中国野生植物资源*, 26 (1): 58 - 60.
- Lin Liang-bin, Guan Chun-yun, Li Xun, Zhou Xiao-yun, Chen Xin-bo. 1999. Transgenic plants obtained by introducing Bt toxic protein gene into *B. brassica napus*. *Journal of Hunan Agricultural University: Natural Science Edition*, 25 (5): 357 - 360. (in Chinese)
- 林良斌, 官春云, 李 旭, 周小云, 陈信波. 1999. Bt 毒蛋白基因导入甘蓝型油菜获得转基因植株. *湖南农业大学学报: 自然科学版*, 25 (5): 357 - 360.
- Radke S E, Tumer J C, Facciotti D. 1992. Transformation and regeneration of *B. brassica napus* using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports*, 11 (10): 499 - 505.
- Zhang Peng, Fu Ai-gen, Wang Ai-guo. 1997. Role and possible mechanism of AgNO_3 in plant culture *in vitro*. *Plant Physiology Communications*, 33 (5): 376 - 379. (in Chinese)
- 张 鹏, 傅爱根, 王爱国. 1997. AgNO_3 在植物离体培养中的作用及可能机制. *植物生理学通讯*, 33 (5): 376 - 379.



图版说明: A. 茎段伤口分化不定芽初期; B. 茎段两端分化不定芽; C. 仅茎段上端分化出不定芽; D. 不定芽切下后增殖; E. 不定芽伸长; F. 不定芽生根; G. 移栽成活。

Explanation of plates: A. Shoots differentiation from stem segment cuts at initial stage; B. Multiple shoots formation from top and basal cuts of stem segment; C. Multiple shoots formation only from top cuts of stem segment; D. Micropropagation of adventitious shoots; E. Elongated shoots in elongation medium; F. Rooting seedlings; G. Survived *in vitro* plantlets transplanted in flower pots