

文章编号:1000-5471(2011)03-0128-04

杜鹃红山茶花药愈伤组织的诱导^①

刘敦菊, 张霞, 王晶, 李名扬, 李先源

西南大学园艺园林学院, 重庆 400716

摘要: 杜鹃红山茶花蕾经 4℃ 低温预处理 5~15 d 后, 用不同消毒剂进行表面消毒. 以花药为外植体, MS 为基本培养基, 研究低温预处理下, 花蕾表面消毒方法以及 2,4-D 与 KT、NAA 浓度组合对杜鹃红山茶花药愈伤组织诱导的影响. 结果表明: 4℃ 低温预处理花蕾的最佳时间为 5 d, 花蕾的最佳消毒方法为 75% 乙醇浸洗 30 s 后, 用 0.1% 升汞消毒 10 min; 诱导花药愈伤组织的适宜培养基为 MS+1.0 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L KT 和 MS+0.5 mg/L 2,4-D+0.4 mg/L NAA, 于 23~25℃ 暗培养 30 d, 愈伤组织诱导率分别达 34.44% 和 35.33%.

关键词: 杜鹃红山茶; 花药; 组织培养; 植物生长调节剂

中图分类号: Q949.758.4

文献标志码: A

杜鹃红山茶(*Camellia changii*), 又名杜鹃茶、杜鹃叶山茶、四季茶和假大头茶等, 为山茶科山茶属常绿灌木, 四季开花, 具有很高的观赏价值, 在园林园艺上具有较为广阔的应用前景. 杜鹃红山茶仅在我国广东省阳春县鹅凰嶂自然保护区发现过, 野外物种现只剩近千株, 已被《中国物种红色名录》列为极危种^[1]. 因此, 保护和开发该物种资源有重要的理论与实际意义.

杜鹃红山茶在生产上一般用扦插或嫁接繁殖, 所需枝条和接穗必须取于母树, 既伤害植株, 又影响其种群生存. 采用植物组织培养技术对其进行无性繁殖是保存和利用该物种资源的重要途径, 且繁殖周期短、效率高. 花药培养可产生来源于花粉的单倍体植株, 在作物育种上具有重要价值. 不仅纯合速度快, 可选择效率高, 而且可提高育种效率, 克服远缘杂交不育, 创造新种质等^[2]. 迄今, 有关杜鹃红山茶的组织培养研究未见报道. 本试验通过低温预处理和不同植物生长调节剂浓度配比等试验, 以较高的诱导率获得了花药愈伤组织, 为实现杜鹃红山茶的离体快速繁殖和细胞工程育种奠定了基础.

1 材料与方法

1.1 试验材料及其预处理

试验材料为杜鹃红山茶花蕾, 于晴天午后采集于西南大学花卉研究所引种的杜鹃红山茶嫁接苗, 并在 4℃ 冰箱中分别预处理 5~15 d^[3-4].

1.2 材料的表面消毒与外植体培养

剥去预处理花蕾的表面几层花瓣, 在含洗衣粉的自来水中浸洗 30 min, 然后转移到超净工作台上, 晾干, 经 75% 乙醇消毒 30 s, 无菌水中冲洗一遍, 然后分别用饱和次氯酸钙消毒 5~25 min 和 0.1% 升汞消毒 5~15 min, 无菌水冲洗 6 次, 放在无菌滤纸上吸干表面水分. 剥去花瓣, 用镊子轻轻取下花药(不带花丝, 不伤及花药), 作为外植体接种到含 2,4-D 等植物生长调节剂的愈伤组织诱导培养基上, 并于 23~25℃, 黑暗培养. 每处理接种 3 瓶(每瓶 30 粒), 重复 3 次. 基本培养基为 MS 培养基, 含 35 g/L 蔗糖, 7 g/L 琼脂, pH=5.6~5.8. 培养 10 d 后, 统计污染率、褐化率, 培养 30 d 后观察外植体生长情况并统计愈伤组织诱导率. 以下试验中均采用筛选出的最佳花蕾消毒方法和最佳低温预处理天数.

① 收稿日期: 2011-01-22

作者简介: 刘敦菊(1984-), 女, 山东临沂人, 硕士研究生, 主要从事种质资源与遗传育种研究.

通信作者: 李先源, 副教授.

2 结果与分析

2.1 杜鹃红山茶花蕾表面消毒方法的筛选

不同时间的饱和次氯酸钙和0.1%升汞处理杜鹃红山茶花药,消毒效果存在显著差异,处理时间越长,污染率越低(表1)。在本试验中,饱和次氯酸钙消毒25 min和0.1%升汞消毒15 min,污染率最低,污染率均为4.44%,且与其他处理差异显著;其次是0.1%升汞消毒10 min,污染率为7.78%。

表1 不同消毒剂对杜鹃红山茶花药污染率的影响

消毒液	消毒时间/min	污染率/%	消毒液	消毒时间/min	污染率/%
饱和次氯酸钙	5	93.33 a	0.1%升汞	5	88.89 b
	15	17.78 c		10	7.78 d
	25	4.44 d		15	4.44 d

0.1%升汞消毒15 min与0.1%升汞消毒10 min、饱和次氯酸钙消毒25 min之间,污染率无显著差异。而经后两种消毒处理的花蕾,部分花药在培养过程中褐化死亡,最终成活率较低。因此,在本试验中,杜鹃红山茶花蕾的最佳表面消毒方法为:经75%乙醇浸洗30 s后,用0.1%升汞消毒10 min。

2.2 低温预处理对杜鹃红山茶花药愈伤组织诱导的影响

经4℃低温预处理5~15 d,杜鹃红山茶花药愈伤组织诱导率显著提高,而褐化率显著降低(表2)。其中,预处理5 d,其诱导率最高(29.78%),褐化率最低(2.09%),且与预处理10 d和15 d存在显著差异。因此,为了提高花药愈伤组织诱导率,降低褐化率,在本试验中,杜鹃红山茶花蕾4℃低温预处理的最佳时间为5 d。

表2 低温预处理对杜鹃红山茶花药愈伤组织诱导的影响

预处理时间/d	诱导率/%	褐化率/%	预处理时间/d	诱导率/%	褐化率/%
0	0.78 d	60.46 a	10	26.68 b	19.91 b
5	29.78 a	2.09 c	15	20.12 c	20.49 b

2.3 2,4-D与KT浓度组合对杜鹃红山茶花药愈伤组织诱导率的影响

2,4-D与KT不同浓度组合时,杜鹃红山茶花药愈伤组织的诱导率差异较大(表3)。KT浓度较低时(0.4 mg/L),愈伤组织诱导率随2,4-D浓度增加而增加;浓度较高(0.5 mg/L)时,诱导率随2,4-D浓度增加而先增加后降低。表明2,4-D与KT在杜鹃红山茶花药愈伤组织的诱导中,需要二者适宜的浓度配比(二者存在交互作用)。在参试的8个浓度组合中,第6号处理的愈伤组织诱导率最高(34.44%),其次为第5号处理(28.89%),且二者间差异显著,故有必要对2,4-D因子进行水平间差异显著性分析(表4)。从表中可以看出2,4-D 1.0 mg/L水平的处理显著高于2,4-D 2.0 mg/L水平的处理,其余水平间的愈伤组织诱导率差异不显著。因此,在本试验中,2,4-D与KT诱导杜鹃红山茶花药愈伤组织的最佳浓度组合为1.0 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L KT。

表3 2,4-D、KT对杜鹃红山茶花药愈伤组织诱导的影响

处 理	2,4-D /mg·L ⁻¹	KT /mg·L ⁻¹	平均诱导率 /%	处 理	2,4-D /mg·L ⁻¹	KT /mg·L ⁻¹	平均诱导率 /%
6	1.0	0.5	34.44 a	3	1.5	0.4	14.44 de
5	0.5	0.5	28.89 b	2	1.0	0.4	12.22 e
7	1.5	0.5	23.33 c	1	0.5	0.4	7.78 f
4	2.0	0.4	15.56 d	8	2.0	0.5	5.56 f

表4 2,4-D四水平多重比较结果

2,4-D水平	平均诱导率/%	差异显著性
1.0	46.66	aA
1.5	37.77	abA
0.5	36.67	abA
2.0	21.12	bA

2.4 2,4-D与NAA浓度组合对杜鹃红山茶花药愈伤组织诱导率的影响

2,4-D与NAA不同浓度组合时,杜鹃红山茶花药愈伤组织的诱导率同样存在差异(表5)。当NAA

浓度一定(0.2~0.6 mg/L)时,愈伤组织诱导率在 2,4-D 为 0.05~0.5 mg/L 浓度范围内随 2,4-D 浓度增加而增加,但当 2,4-D 浓度达 1.0 mg/L 时,愈伤组织诱导率则随 NAA 浓度增加而下降.在参试的 12 个浓度组合中,第 7 号处理的愈伤组织诱导率最高(35.33%),其次为第 10 号处理(30.67%),且二者间差异不显著,故 7 号和 10 号培养基均可对杜鹃红山茶花药进行愈伤组织诱导.因此,本试验中 2,4-D 与 NAA 诱导杜鹃红山茶花药愈伤组织的最佳浓度组合为 2,4-D 0.5 mg/L+NAA 0.4 mg/L,其次是 2,4-D 0.1 mg/L+NAA 0.6 mg/L.

表 5 2,4-D、NAA 对杜鹃红山茶花药愈伤组织诱导的影响

处 理	2,4-D /mg·L ⁻¹	NAA /mg·L ⁻¹	平均诱导率 /%	处 理	2,4-D /mg·L ⁻¹	NAA /mg·L ⁻¹	平均诱导率 /%
7	0.5	0.4	35.33 a	9	0.05	0.6	27.00 bc
10	0.1	0.6	30.67 ab	8	1.0	0.4	25.00 bcd
3	0.5	0.2	28.33 bc	5	0.05	0.4	25.00 bcd
6	0.1	0.4	27.67 bc	2	0.1	0.2	24.33 bcd
4	1.0	0.2	27.33 bc	1	0.05	0.2	24.00 cd
11	0.5	0.6	27.33 bc	12	1.0	0.6	20.33 d

结果表明,在本试验中,4℃低温预处理的最佳时间为 5 d,用于花药外植体取材的花蕾的最佳消毒方法为 75%乙醇浸洗 30 s 后,用 0.1%升汞消毒 10 min;诱导杜鹃红山茶花药愈伤组织的适宜培养基为 MS+1.0 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L KT 和 MS+2,4-D 0.5 mg/L+NAA 0.4 mg/L,愈伤组织诱导率达 34.44%~35.33%.

2.5 杜鹃红山茶花药愈伤组织的发生与生长

培养 1 d 后可见褐化的花药;3 d 后,部分花药开始污染;15 d 后,花药明显膨大;25 d 后花药从花丝着生部位陆续出现愈伤组织,较疏松,生长较快,呈淡黄色或绿色;35 d 后在花药裂缝处开始出现愈伤组织,较致密,外形不规则,生长较缓慢,颗粒较小,呈淡绿色或浅红色(图 1).张日清等在低温预处理对油茶花药愈伤组织诱导的影响研究中,将疏松型愈伤组织初步判断为体细胞愈伤组织,致密型愈伤组织为花粉小孢子发育而来的愈伤组织^[5].



图 1 杜鹃红山茶花药愈伤组织的发生与生长

3 讨 论

在多数植物的花药培养中,低温预处理能提高愈伤组织诱导率.原因是低温预处理可延缓药壁组织衰老和花粉生活力降低.低温预处理对于雄核发育的影响涉及花药内部一系列复杂结构及生理生化变化^[6].低温处理可改变纺锤丝的轴向,破坏纺锤丝的微管蛋白而阻止纺锤丝形成,使正常有丝分裂过程被打破,从而导致分化过程的发生;低温还可在一定程度上抑制离体花药小孢子的衰败,延长存活时间,从而使更多小孢子启动雄核发育^[7].

无菌培养是植物组织培养的基本要素.消毒效果较好的消毒液,通常对植物材料的毒性也较大.基本要求是最大限度地杀灭材料所带真菌和细菌,而对植物外植体伤害最小.通过对比试验,获得了较好的对杜鹃红山茶花蕾的消毒方法,其污染率仅为 7.78%.

许多研究结果证明,愈伤组织的诱导形成生长素是必需的,其中 2,4-D 应用较多^[8],附加一定浓度的

细胞分裂素效果更好。2,4-D可以使花粉改变原来的正常发育途径,与染色质的组蛋白结合,使其脱离DNA链,从而活化了DNA链,导致大量的DNA复制,使细胞连续进行分裂,形成愈伤组织^[9]。目前,关于山茶属植物花药培养和单倍体育种的报道较少^[10-12]。李建安等在广宁油茶和小果油茶的花药培养中发现,在MS+0.6 mg/L 2,4-D+0.4 mg/L NAA和B5+1.2 mg/L 2,4-D+0.4 mg/L 6-BA培养基中,广宁油茶愈伤组织诱导率分别达94.67%和91%,小果油茶分别为8%和3.34%^[10];闻丽等在油茶花药培养中发现,在MS+0.5 mg/L 2,4-D+0.2 mg/L 6-BA培养基中,愈伤组织诱导为42.74%^[11]。在本试验中,杜鹃红山茶花药愈伤组织的诱导率达34.44%~35.33%,在同属植物中较高。为了进一步提高其诱导率,有待筛选更好的培养基,从而实现杜鹃红山茶的离体再生和为其生物技术育种奠定基础。

参考文献:

- [1] 汪松,解焱. 中国物种红色名录[M]. 北京:高等教育出版社,2004:362.
- [2] 李建安,胡芳名,谭晓风,等. 花药(花粉)培养及其在经济林品种改良中的应用[J]. 经济林研究,2002,20(4):68-70.
- [3] 张洁,张学英,葛会波. 果树花药培养研究概况[J]. 河北农业大学学报,2002,25(增刊):95-97.
- [4] 陈振光. 诱导柑桔花粉植株的研究[J]. 园艺学报,1983,10(2):73-78.
- [5] 张日清,闻丽,刘友全,等. 低温预处理对油茶花药愈伤组织诱导的影响[J]. 中南林学院学报,2005,25(6):24-28.
- [6] 刘国民. 花药离体培养中若干问题的研究进展[J]. 海南大学学报:自然科学版,1994,12(3):253-259.
- [7] 滕海涛,鲁守平,赵邦青,等. 植物花药培养预处理及其生理生化变化规律[J]. 河北农业科学,2008,12(10):46-49,59.
- [8] 黄丽,皮伟,李名扬. 观赏草—紫粟紫威愈伤组织诱导及其再生体系的建立[J]. 西南大学学报:自然科学版,2010,32(6):79-82.
- [9] 许智宏. 植物生物技术[M]. 上海:上海科学技术出版社,1998:29-30.
- [10] 李建安,张日清,石明旺,等. 油茶两物种花药培养愈伤组织诱导试验[J]. 经济林研究,2003,21(3):36-38.
- [11] 闻丽,张日清,李典军. 不同激素对比对油茶花药愈伤组织形成的影响[J]. 经济林研究,2005,23(4):21-23.
- [12] 陈振光,廖惠华. 茶树花药培养诱导单倍体植株的研究[J]. 福建农学院学报,1988,17(3):185-190.

Induction of Calli from the Anther of *Camellia changii*

LIU Dun-ju, ZHANG Xia, WANG Jing,
LI Ming-yang, LI Xian-yuan

School of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400716, China

Abstract: The alabastrums of *Camellia changii* were sterilized with deferent disinfectants after pretreatment at low temperature (4 °C) for 5-15 days. Then the anthers were used as explants to induce calli on MS medium supplied with different combinations of 2,4-D, KT and NAA, and the influences of low temperature pretreatment, sterilization methods and the concentration combinations of plant growth regulators on callus induction were studied. The results showed that the best time of low temperature pretreatment of alabastrums was 5 days, the best sterilization method was soaking in 75% alcohol for 30 seconds, followed by sterilization with 0.1% corrosive sublimate for 10 minutes, and the optimum media for callus induction were MS+1.0 mg · L⁻¹ 2,4-D+0.5 mg · L⁻¹ KT and MS+0.5 mg · L⁻¹ 2,4-D+0.4 mg · L⁻¹ NAA, the callus induction rate being 34.44% and 35.33%, respectively, on the two media after culture at 23~25 °C for 30 d in the dark.

Key words: *Camellia changii*; anther; tissue culture; plant growth regulator