

刚果 12 号桉胚乳愈伤组织诱导和三倍体植株再生研究

李守岭^{1,2}, 庄南生^{1*}, 王 英¹, 林 锋¹, 邱海燕¹

(1. 海南大学 农学院, 海南 儋州 571737; 2. 云南德宏热带农业科学研究所, 云南 瑞丽 678600)

摘 要:以刚果 12 号桉授粉 13~16 d 的胚珠为外植体, 消毒处理后对胚珠进行离体培养。结果表明:最佳诱导愈伤组织的培养基为 MS+1.5 mg·L⁻¹ 6-BA + 1.0 mg·L⁻¹ IAA, 诱导频率 32.5%; 将红色紧密的愈伤组织转至 MS+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+1.0 mg·L⁻¹ NAA 的培养基上, 经连续继代后形成不定芽, 根据多倍体的形态特征, 对再生植株进行分离培养, 生根后取根尖染色体显微观察, 染色体数目均为 33。

关键词:刚果 12 号桉; 胚乳培养; 植株再生

中图分类号:S792.390.4

文献标识码:A

文章编号:1001-7461(2008)03-0101-04

Callus Induction and Plant Regeneration from Endosperm Culture of *Eucalyptus* 12ABL

LI Shou-ling^{1,2}, ZHUANG Nan-sheng¹, WANG Ying¹, LIN Feng¹, QIU Hai-yan¹

(1. Agriculture School, Hainan University, Danzhou, Hainan 571737, China;

2. Dehong Tropical Agriculture Research Institute of Yunnan, Ruili, Yunnan 678600, China)

Abstract: Taking ovules pollinated 13~16 d of eucalyptus 12ABL as materials, the endosperm development was at vigorous stage, suitable for culture in vitro at this moment. The experiments showed that endosperm inoculated on MS medium supplemented with 1.5 mg·L⁻¹ 6-BA and 1.0 mg·L⁻¹ IAA, gave the highest callus induction rate (32.5%). Endosperm callus cultured in medium MS containing 1.0 mg·L⁻¹ 6-BA and 1.0 mg·L⁻¹ NAA, could regenerate more shoots than those in any other media. Many endosperm derived plantlets were obtained and were proved to be triploid plants by observing the chromosomes under microscope.

Key words: *Eucalyptus* 12ABL; endosperm culture; plant regeneration

桉树是异花授粉的多年生木本植物, 属桃金娘科(Myrtaceae)桉属(*Eucalyptus*), 原产大洋洲和印度尼西亚及其附近岛屿, 有 602 种, 其中重要经济用材树种约 100 种。桉树是速生人工林树种之一, 具有抗逆性强、速生丰产等优点, 是美化环境、造林绿化的先锋树种, 同时又是一种经济价值高的经济用材树种, 其木材是造纸、家具、人造板、建材的主要原材料, 从叶子中提取的桉叶油是药用、香料、食品的重要工业原料。我国引种桉树已有 100 多年的历史, 人工林面积 154 万 hm², 仅次于巴西, 居世界第二位^[1-3]。

大多数被子植物的胚乳为三倍体组织。三倍体

植株具有生长快、抗逆性强等特性。人们试图通过胚乳培养获得三倍体植株, 进而培育出优良品种。桉树胚乳组织培养至今未见报道, 通过对桉树胚乳愈伤组织诱导、愈伤组织不定芽分化等研究, 为桉树优良品种的培育提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为刚果 12 号桉(*Eucalyptus* 12 ABL)授粉 13~16 d 的胚珠, 来源于华南热带农业大学九队附近生长良好的母树。

收稿日期: 2007-08-24 修回日期: 2007-10-22

基金项目: 华南热带农业大学科技基金; 海南省教育厅高校科研资助项目(HJKJ200625); 华南热带农业大学大学生创新基金项目

作者简介: 李守岭(1977), 男, 黑龙江塔河人, 硕士研究生, 主要从事作物遗传育种研究。

* 通讯作者: 庄南生。E-mail: zhuangns@163.com。

1.2 方法

1.2.1 接种 将采摘的幼果用纱布包扎,置自来水下冲洗 1 h 左右→75%的酒精浸泡 10 min→0.1% HgCl_2 消毒 10 min→无菌水清洗 3 次→无菌条件下剥开幼果,取出胚珠,进行培养。

1.2.2 愈伤组织诱导 以 MS 为基本培养基,设计 2,4-D 和 BA、BA 和 NAA、BA 和 IAA 3 个组合共 8 种不同激素配比。所有培养基都以 $7.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂固化, pH 5.8, 培养温度 $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 暗培养。

1.2.3 愈伤组织分化 以 MS 为基本培养基,设计 BA 和 NAA 不同激素配比。所有培养基都以 $7.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂固化, pH 5.8, 培养温度 $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 每天光照 6 h。

1.2.4 生根培养 切取高 1.5 cm 左右、具有 5~8 片叶的无根苗,进行生根培养。基本培养基为 1/2 MS, 附加蔗糖 ($30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 和琼脂粉 ($7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 以 NAA 和 IAA 不同浓度进行生根试验。每处理接种 25 株无根苗, 40 d 后进行生根率统计。

1.2.5 再生植株的倍性检测 (1) 外部形态特征鉴定。取生根培养 40 d 的再生植株 10 株, 选择有代表性的部位, 每株分别采集生长健壮的叶片 3 片, 测量其长度与宽度, 并以生根培养 40 d 正常二倍体植株相同部位的叶片为对照。

(2) 气孔鉴定。选取生根培养 40 d 的再生植株 10 株, 选择有代表性的部位, 每株分别采集生长健壮的叶片 1 片, 用醋酸浸泡, 待叶片退色后, 以碘-碘化钾 (碘 0.3 g、碘化钾 1.3 g、蒸馏水 100 mL) 染色, 然后放上盖玻片进行镜检, 每片叶随机观察 3

个视野, 统计其气孔数目, 同时随机选 3 个气孔, 用微尺测量气孔长度和宽度, 以生根培养 40 d 的正常二倍体植株相同部位的叶片作为对照。

(3) 细胞学鉴定。取再生植株的根尖, 采用酶解去壁低渗法^[4]进行细胞学鉴定。

2 结果与分析

2.1 植物生长调节剂对愈伤组织形成的影响

外植体接种 2 周后, 开始肿胀, 在胚珠表面长出愈伤组织, 愈伤组织有 2 种类型, 一种是白色疏松型, 大多数愈伤组织都与培养基粘在一起, 结构疏松, 这种愈伤组织生长较快; 另一种是红色紧密型, 愈伤组织为颗粒状, 表面湿润并且光滑, 愈伤组织结构十分紧密, 生长较慢。不发生愈伤组织的胚珠逐渐变成褐色, 最后死亡。

由表 1 知, 在 2,4-D 与 BA 的组合诱导中, 愈伤组织诱导率随着 2,4-D 浓度的提高而增大, 当 2,4-D 浓度为 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 愈伤组织的诱导率为 26.1%, 但获得的愈伤组织表面白色、质地疏松、生长较快, 这种类型的愈伤组织分化能力较弱。BA 与 NAA 组合的愈伤组织诱导率随着 BA 浓度的降低而减小, 当 BA 浓度为 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 愈伤组织的诱导率最高, 达到 39.0%, 诱导效果同 2,4-D 与 BA 的组合相似, 获得的均是表面白色、生长较快的愈伤组织。BA 与 IAA 组合中, 有一部分愈伤组织表面湿润、光滑、红色, 呈颗粒状, 即胚性愈伤组织, 这种愈伤组织的诱导率随着 BA 浓度的降低而减少。

表 1 植物生长调节剂组合对诱导愈伤组织的影响^①

Table 1 Effects of growth regulators on callus induction from endosperm of *Eucalyptus* 12ABL

激素组合 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	外植体 /个	形成愈伤组织 数量/块	愈伤组织诱导率 /%	红色紧密型愈伤组织 数量/块	红色紧密型愈伤组织 诱导率/%
2,4-D0.5+BA1.0	400	75	18.7	0	0.0
2,4-D1.0+BA1.0	420	90	21.4	0	0.0
2,4-D2.0+BA1.0	420	110	26.1	0	0.0
BA1.5+NAA1.0	420	164	39.0	0	0.0
BA1.0+NAA1.0	410	144	35.1	0	0.0
BA0.5+NAA1.0	400	132	31.4	0	0.0
BA1.5+IAA1.0	400	130	32.5	40	30.8
BA1.0+IAA1.0	420	156	37.1	16	10.3

①愈伤组织诱导率=发生愈伤组织的外植体数/无菌外植体数 $\times 100\%$; 红色紧密型愈伤组织诱导率=红色紧密型愈伤组织数/发生愈伤组织的外植体数 $\times 100\%$ 。

可以看出, 在诱导刚果 12 号桉胚珠愈伤组织的培养基中含有 2,4-D 时, 虽然诱导率高, 但不能形成红色紧密型愈伤组织, 只有 BA 与 IAA 的组合才能获得红色紧密型愈伤组织, 但诱导率很低。在试验的所有组合中, 诱导愈伤组织较适培养基是 MS+ $6-1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA + $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA + 蔗糖 40 g

$\cdot \text{L}^{-1}$ + 琼脂粉 $7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.2 植物生长调节剂对诱导不定芽的影响

将初代愈伤组织接种在分化培养基中, 培养 20 d 左右, 愈伤组织表面开始分化出芽点。由表 2 可知, 白色疏松型愈伤组织不具有分化的能力, 但在激素配比适宜的情况下, 白色疏松型愈伤组织会转变为红色

紧密型愈伤组织,再继续培养才有可能分化不定芽;红色紧密型愈伤组织具有较强的分化能力,当 IBA 浓度为 0.5、1.0、2.0、3.0 mg · L⁻¹ 时,不定芽诱导率分别为 65%、75%、55% 和 40%,诱导不定芽以 IBA 浓度为 1.0 mg · L⁻¹ 效果最好。因此,诱导不定芽最适培养基为 MS+BA1.0 mg · L⁻¹ + NAA0.1 mg · L⁻¹ + 蔗糖 40 g · L⁻¹ + 琼脂 7 g · L⁻¹。

将已分化出不定芽的愈伤组织转入 MS + BA1.0 mg · L⁻¹ + NAA0.1 mg · L⁻¹ + 蔗糖 40 g · L⁻¹ + 琼脂粉 7 g · L⁻¹ 培养基中进行培养,愈伤组织会变大,经过 3 次继代培养后,愈伤组织表面上逐渐形成丛生芽。

表 2 不同植物生长调节剂组合对诱导不定芽的影响
Table 2 Effects of growth regulators on adventitious bud induction from endosperm of *Eucalyptus* 12ABL

愈伤组织类型	激素配比/(mg · L ⁻¹)	接种愈伤组织数/块	不定芽发生数/块	不定芽诱导率/%
疏松型	BA0.5+NAA0.1	40	0	0
疏松型	BA1.0+NAA0.1	40	1	2.5
疏松型	BA2.0+NAA0.1	40	0	0
疏松型	BA3.0+NAA0.1	40	0	0
紧密型	BA0.5+NAA0.1	40	26	65.0
紧密型	BA1.0+NAA0.1	40	30	75.0
紧密型	BA2.0+NAA0.1	40	22	55.0
紧密型	BA3.0+NAA0.1	40	16	40.0

2.3 生根培养

生根培养 15 d 后,切口处开始分化出根系,由表 3 知,在不含有任何激素的 1/2MS 培养基上可以生根,但生根率较低且根纤细;当附加一定浓度的生长素后,芽苗生根效果较好,激素浓度为 0.5 mg · L⁻¹ 时,IBA 和 NAA 均能取得较好的生根效果,均在 90% 以上,而且植株生长正常。但 NAA 诱导的芽苗基部产生较多的愈伤组织,随后自愈伤组织上分化出短而粗的不定根。因此,从促进芽生根的效果看,IBA 优于 NAA。

表 3 NAA 和 IBA 对诱导生根的影响
Table 3 Effects of NAA and IBA on root formation from endosperm of *Eucalyptus* 12ABL

生长素	浓度/(mg · L ⁻¹)	接种芽数/个	生根率/%
对照	0	25	31
NAA	0.5	25	91
NAA	1.0	25	90
NAA	2.0	25	78
IBA	0.5	25	93
IBA	1.0	25	91
IBA	2.0	25	86
IBA	3.0	25	80

2.4 再生植株的形态学鉴定

由图 1 可知,再生植株与正常二倍体植株相比,叶片较宽大,茎秆较粗壮,生长略缓慢。

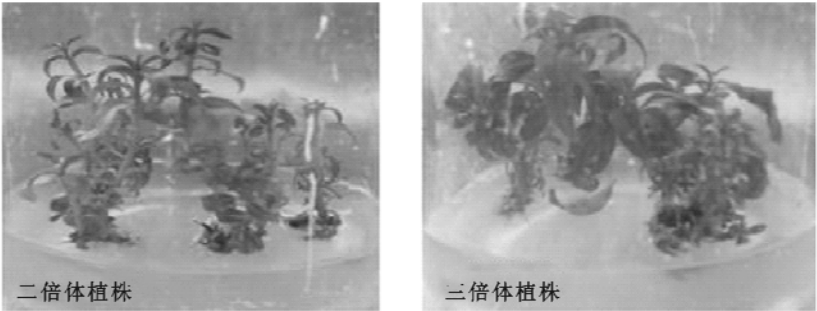


图 1 二倍体植株与再生植株的外部形态特征

Fig. 1 The shape characteristic of diploid and regeneration plants

表 4 及图 2 表明,再生植株的叶片长度与二倍体植株没有显著差异,但再生植株的叶片宽度极显著大于二倍体植株叶片,再生植株的叶形指数极显著小于二倍体植株,表明再生植株的叶片长度与二倍体接近,但叶片宽度明显大于二倍体植株,叶形指

数也较小。

由表 4 可知,再生植株的气孔的宽、长均极显著大于二倍体植株(图 3),而单位面积的气孔数则极显著少于二倍体植株,说明再生植株气孔较大、密度较小。

表 4 二倍体植株与再生植株叶片及气孔比较^①

Table 4 Comparison of leave and stoma between diploid and regeneration plants

植株类型	叶片宽/cm (X + SD)	叶片长/cm (X + SD)	叶形指数(长/宽) (X + SD)	气孔宽/μm (X + SD)	气孔长/μm (X + SD)	密度/(个 · mm ⁻²) (X + SD)
二倍体植株	0.18 ± 0.01	0.89 ± 0.12	4.94 ± 0.46	16.86 ± 1.93	19.40 ± 1.99	518 ± 16
三倍体植株	0.26 ± 0.06 **	0.94 ± 0.11	3.61 ± 0.33 **	18.4 ± 2.42 **	22.2 ± 2.11 **	452 ± 15 **

① ** 表示 P < 0.01 极显著水平; * 表示 P < 0.05 显著水平。气孔的宽与长均指保卫细胞的宽与长。



图2 二倍体植株与再生植株的叶片
Fig. 2 The leaves of diploid and regeneration plants

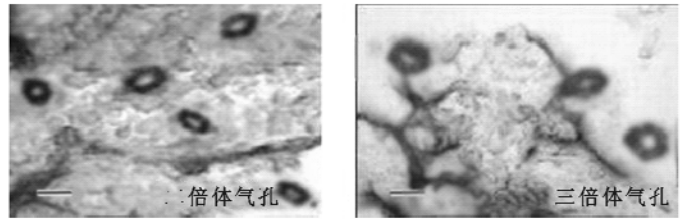
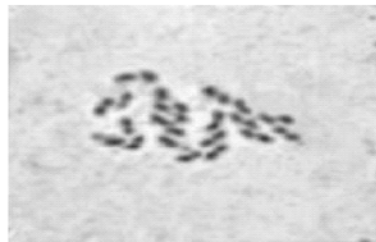


图3 二倍体植株与再生植株的气孔
Fig. 3 The stoma of diploid and regeneration plants

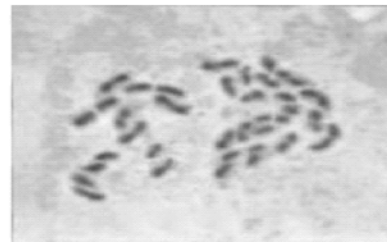
2.5 再生植株的细胞学鉴定

二倍体植株染色体数目均为 $2n=22$; 对形态学上确认为多倍体的 10 株再生植株进行了染色体计

数, 染色体数目均为 $3n=33$, 确定再生植株为三倍体(图 4)。



2n=22



2n=33

图4 不同倍性植株的染色体

Fig. 4 The chromosome of diploid and regeneration plants

3 结论与讨论

3.1 原位胚在胚乳愈伤组织诱导过程中的影响

在胚乳愈伤组织诱导过程中, 是否必须有原位胚的参与或以 GA_3 代之, 主要取决于接种当时胚乳的年龄或生理状态。处在旺盛生长阶段的未成熟胚乳, 只要培养条件合适, 无须胚的参与就能脱分化而形成愈伤组织, 这已在苹果^[5]、猕猴桃^[6,7]、橙^[8,9]等的胚乳培养中得到证实。Bajaj^[10]在水稻成熟胚乳培养中虽然既未带胚培养, 也未进行 GA_3 处理, 但在接种之前整个种子曾经水浸 24 h, 因此可以认为是通过胚的活化而活化了胚乳。如果接种时胚乳的生理状态介于上述二者之间, 在无胚存在时可以形成愈伤组织, 在有胚存在时则可显著提高愈伤组织的诱导率^[11]。研究表明, 成熟胚乳细胞活化之后, 无需“胚因子”的继续存在, 可在适宜的培养基上进行增殖。本研究中, 由于彻底分离胚和胚乳较困难, 所以胚乳培养过程中均有胚的存在。

3.2 胚乳培养的意义

三倍体育种, 以往的常规方法是用四倍体品种与二倍体品种杂交。此法需先诱导四倍体植株, 待其开花后再与二倍体品种杂交, 不仅时间长, 而且易

出现生育不良的非整倍体植株及遗传性状不良的个体, 即便采取幼胚培养的方法加以挽救, 但三倍体得率仍很低, 仅占 10%^[12]。另外, 二倍体品种间杂交, 因为产生的不减数配子与正常配子结合, 也可能形成三倍体后代, 但三倍体小种子得率较低, 仅 14.5%, 而且收获时期难以掌握。个别极小的种子因贮藏养分少, 萌发的根、芽短小, 生长速度慢, 难以存活^[13]。近年来, 体配融合的成功, 经培养也可获得三倍体^[14], 虽然大大提高了育种效率, 但这一技术要求高, 难度大。通过胚乳培养获得三倍体植株, 改良品种, 克服上述方法的缺点, 省去诱导四倍体, 杂交的步骤、技术要求不高, 因此, 胚乳培养是一种高效的育种途径。

参考文献:

- [1] 祁述雄. 中国桉树[M]. 北京: 中国林业出版社, 1989; 21-35.
- [2] 罗晓宁. 海南桉树现状与发展趋势[J]. 热带林业, 2001, 29(1): 33-37.
- [3] 庞正发. 林学会组团参加桉树在亚洲的国际学术会议[J]. 广西林业, 2003(3): 21.
- [4] 陈瑞刚, 宋文芹, 李秀兰. 植物有丝分裂染色体标本制作的新方法[J]. 植物学报, 1979, 21(3): 297-298.
- [5] 母锡金, 刘淑琼, 周月坤, 等. 苹果胚乳愈伤组织的诱导和植株的分化[J]. 中国科学, 1977(4): 355-359.

(下转第 113 页)