

一品红愈伤组织的诱导与分化

马 林

(西南科技大学生命科学与工程学院 四川绵阳 621010)

摘要:以一品红的茎段、叶片、苞片及叶柄作外植体接种于MS附加不同激素的培养基中,研究愈伤组织的诱导效果以及不同激素组合对愈伤组织分化出芽的影响。结果表明,在起始培养中以MS + BA 0.1 mg/L + NAA 0.1 mg/L + 2,4-D 2 mg/L的效果最好,最易诱导出愈伤组织,其中苞片的诱导效果优于其它外植体。在BA与NAA不同浓度组合中,茎段的诱导效果最好,其次是叶柄和苞片,叶片的诱导效果较差。愈伤组织分化产生芽的频率较低,继代培养中易出现各种颜色的次生代谢物。

关键词:一品红 组织培养 愈伤组织 诱导 分化

中图分类号:S685.23 **文献标识码:**A **文章编号:**1671-8755(2006)01-0109-04

Induction and Differentiation of Callus in *Euphorbia Pulcherrima*

Ma Lin

(School of Life Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology,
Mianyang 621010, Sichuan, China)

Abstract: The stem, leaf, bracteal leaf and petiole of the *Euphorbia pulcherrima* were used as explants to inoculate at the culture medium which were the combinations of MS added different concentration of BA, NAA and 2,4-D. The results suggested that the medium of MS + BA 0.1 mg/L + NAA 0.1 mg/L + 2,4-D 2 mg/L had the best induction effects, especially in the bracteal leaf during the primary culture. In MS medium supplemented different concentration BA and NAA, the best induction effect of callus was the stem, the next was the petiole and the bracteal leaf, and the lowest was the leaf. The differentiation rate of adventitious buds from callus was low in all experimental media. During subculture of callus, secondary metabolism products with different colors would produce from the callus easily.

Key words: *Euphorbia pulcherrima*; tissue culture; callus; induction; differentiation

一品红(*Euphorbia pulcherrima*)属大戟科大戟属常绿或半常绿灌木,又名圣诞红、猩猩木,为著名的盆栽花卉,原产于墨西哥和中美洲,喜高温多湿,抗寒力较低,不耐霜冻,我国除南方少数几个省份可露地栽培外,其它地方均作温室栽培^[1]。一品红的自然开花期在元旦和圣诞节前夕,以其独特娇艳的色泽成为大众喜爱的冬季装饰花卉。由于一品红少有结籽或基本无结籽能力,生产上主要靠扦插繁殖,成活率极低,加上一些优良品种枝条少,引种初期繁殖数量有限,因此,通过离体培养快速繁殖优良的一品红品种具有一定的经济价值和意义。

一品红的离体快繁已有一定的文献报道^[2-7],但关于愈伤组织诱导与分化方面的报道较少。本研究以一品红的茎段、叶片、叶柄、苞片和花瓣作外植体,比较了各种外植体材料在不同培养基配方中的愈伤组织诱

收稿日期:2005-11-03

作者简介:马林(1964-),男,副教授,在读博士,研究方向:植物组织细胞培养及植物天然产物。

导和分化效果。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料购自绵阳市花卉市场,品种为矮生一品红,产自云南。

1.2 外植体灭菌处理

取材时间为秋末至次年春季。剪下健全无病虫的绿色叶片、红色苞片、叶柄、茎段和花,先用自来水冲洗,再用洗衣粉溶液浸泡 15 min,在自来水下反复冲洗干净。用 70% 的酒精浸泡 10 s,再用 0.1% HgCl_2 溶液灭菌处理 10 min,然后用无菌水冲洗 4~6 次。将茎段和叶柄切成 0.5~0.8 cm 的切段,将叶片和苞片切成 5 mm×5 mm 左右的小方块,在无菌条件下接种,每只试管接种 1 个外植体。

1.3 培养基及培养条件

以 MS 为基本培养基,附加不同浓度的 BA、NAA、IBA 和 2,4-D,配制 1 L 培养基加入 8 g 琼脂和 30 g 蔗糖,调 pH 值为 5.8~6.0。将培养基分装到 1.5 cm×12 cm 的平底试管中,在 121 ℃ 下高压灭菌 15 min。培养温度为 25±2 ℃,光照强度 1000~1500 lx,每天光照时间 12 h。

2 结果与分析

2.1 不同浓度 2,4-D 对愈伤组织诱导的影响

以 MS 为基本培养基,附加 BA 和 NAA 的浓度均为 0.1 mg/L,附加 2,4-D 设 4 个浓度处理,分别为 0.5、1.0、2.0 和 4.0 mg/L,分别接种叶片、叶柄、茎段、苞片和花瓣。培养 40 d 后的结果见表 1。

表 1 不同浓度 2,4-D 对愈伤组织诱导的影响

2,4-D 浓度 /mg·L ⁻¹	叶 片		叶 柄		茎 段		苞 片		花 瓣	
	接种数 /个	诱导率 /%	接种数 /个	诱导率 /%	接种数 /个	诱导率 /%	接种数 /个	诱导率 /%	接种数 /个	诱导率 /%
0.5	40	7.5	28	28.6	17	35.3	38	44.7	15	26.7
1.0	38	18.4	29	34.5	16	56.3	39	71.8	16	18.8
2.0	40	27.5	30	46.7	15	73.3	44	93.2	14	28.6
4.0	37	13.5	30	36.7	15	46.7	41	46.2	15	20.0

由表 1 可见,同一浓度 2,4-D 处理,苞片的愈伤组织诱导率最高,然后依次是茎段、叶柄和花瓣,叶片的诱导率最低。同一外植体比较,当 2,4-D 浓度在 4.0 mg/L 以下时,除花瓣在 2.0 mg/L 的 2,4-D 处理比 1.0 mg/L 处理的诱导率低外,发现随 2,4-D 浓度的增大,愈伤组织诱导率逐渐增高,在 2.0 mg/L 的 2,4-D 处理,叶柄、茎段、苞片和花瓣 4 种外植体的诱导率均达到最高,其中以苞片和茎段的诱导效果较好,诱导率分别达到 93.2% 和 73.3%,但当 2,4-D 浓度为 4 mg/L 时,愈伤组织诱导率反而下降,说明高浓度 2,4-D 处理对愈伤组织诱导反而不利。

培养中发现,不同外植体诱导的愈伤组织存在颜色的差异,从茎段、叶片和叶柄诱导的愈伤组织呈绿色或白色,从花瓣诱导的愈伤组织为白色,而从苞片诱导的愈伤组织除绿色和白色外,还有不同程度的红色。绿色愈伤组织较为致密,红色及白色愈伤组织较疏松。在愈伤组织的形成时间上,最早出现的是茎段,约在接种后 10 d,但茎段愈伤组织在形成高峰期后褐变程度较严重;苞片的愈伤组织形成较茎段要慢 5~10 d,但其后的生长速度较快,在接种 25~35 d 后,愈伤组织形成达到高峰期,此后会减慢或停止增殖。

2.2 BA 与 NAA 组合对愈伤组织诱导的影响

设 BA 与 NAA 不同浓度组合共 12 个配方处理(编号 1~12),分别接种不同的外植体,培养 40 d 后统计愈伤组织的诱导结果(见表 2)。

从表 2 可以看出,在未使用 2,4-D 的情况下,愈伤组织的诱导效果以茎段为最佳,其次为苞片,叶柄仅在部分培养基具有较好的诱导率,叶片的诱导效果最差。茎段除在 BA1.0 + NAA 0.5 组合(1、2 号培养基)

稍差外,其余的诱导率均在50%以上,在5种配方组合上的诱导率达到100%,有少数还发现茎段上的腋芽被直接诱导萌发;苞片在各个配方均有一定的诱导率,但最高仅为51.5%,比较不同BA浓度处理的组合,发现当BA浓度为1 mg/L和2 mg/L时,诱导率相对较接近,当BA浓度为4 mg/L时,诱导率呈现下降的趋势;叶柄在BA浓度较高时的诱导效果较好;叶片仅在7、8号培养基表现了较好的诱导效果,在大部分培养基中诱导率很低,这与其接种后大部分材料发生褐变以及失水干枯有关。

试验中观察到,在没有添加2,4-D的情况下,各外植体诱导愈伤组织的速度普遍缓慢,只有在3、4、5和8号培养基上接种茎段的愈伤组织能较快地诱导出来,接种10 d后几乎全部长出愈伤组织。总的看来,7号和8号培养基对各外植体均表现出了较好的诱导效应。

对比表2和表1,发现MS附加BA与NAA的培养基组合对茎段的诱导效果较好,其次为苞片,这与表1中苞片的诱导效果优于茎段的结果相反,说明不同外植体对不同种类生长素的反应存在差异。

表2 BA与NAA不同浓度组合对愈伤组织诱导的影响

编号	激素浓度/mg·L ⁻¹		茎 段		叶 柄		叶 片		苞 片	
	BA	NAA	接种数	诱导率/%	接种数	诱导率/%	接种数	诱导率/%	接种数	诱导率/%
1	1.0	0.1	18	50.0	25	12.0	37	5.4	37	40.5
2	1.0	0.5	15	20.0	24	0	37	0	35	34.3
3	1.0	1.0	16	100.0	27	0	31	0	39	38.5
4	1.0	2.0	16	100.0	29	0	38	5.3	39	43.6
5	2.0	0.1	15	100.0	25	44.0	35	0	31	25.8
6	2.0	0.5	18	66.7	25	60.0	32	0	33	51.5
7	2.0	1.0	18	77.8	27	55.6	31	51.6	36	38.9
8	2.0	2.0	18	100.0	30	60.0	34	73.5	38	47.4
9	4.0	0.1	16	75.0	30	20.0	30	0	39	25.6
10	4.0	0.5	18	100.0	31	54.8	33	0	31	32.3
11	4.0	1.0	15	80.0	32	50.0	30	0	37	29.7
12	4.0	2.0	18	66.7	26	50.0	33	0	33	27.3

2.3 愈伤组织的分化

以BA和NAA不同浓度组合共设计10个诱导愈伤组织分化的培养基(编号13~22),以来源于茎段的绿色愈伤组织为分化的接种材料,接种后观察芽的分化和愈伤组织的生长变化情况,培养30 d后的结果见表3。

表3 愈伤组织的分化效果

编号	激素组合/mg·L ⁻¹		接种数/块	褐变数/块	芽的分化			次生代谢物
	BA	NAA			出芽数/个	出芽率/%	芽点产生/个	
13	1.0	0.1	17	1	0	0	1	++
14	1.0	0.2	19	7	1	5.3	3	+
15	1.0	0.5	21	7	1	4.8	2	++
16	1.0	1.0	21	6	1	4.8	3	无
17	2.0	0	19	2	0	0	0	无
18	2.0	0.005	19	0	0	0	0	+
19	2.0	0.01	21	13	3	14.3	5	+
20	2.0	0.05	21	11	3	14.3	4	+
21	2.0	0.1	23	16	4	17.3	2	+++
22	2.0	0.2	28	4	0	0	0	无

注: +号的多少表示产生次生代谢物的不同程度。

由表3可见,愈伤组织在各培养基配方中分化出芽均很少,出芽率最高仅为17.3%,但却发现有程度不等的芽点产生。出芽率低可能与愈伤组织培养中次生代谢物质分泌旺盛有极大的关系,培养中观察到除

16、17 和 22 号培养基未见有次生代谢物质产生外,其余培养基均可见程度不等的代谢物产生,这些代谢物颜色有乳白色、金黄色和红色,在愈伤组织块周围呈现水浸状、斑点状及扩散状。但次生代谢物产生的多少在各处理间未见有明显的规律。

2.4 芽的继代培养

将从茎段诱导和从愈伤组织分化的不定芽转接到 MS + BA 0.5 mg/L + IBA 0.1 mg/L 的培养基上,培养 10 d 后,发现部分芽体可见明显的生长,但随后在芽体基部大多出现乳白色次生代谢物,再后来芽体则基本停止生长,可见在培养过程中产生的次生代谢物质对芽的生长有抑制作用。

对继代培养中没出现代谢物的芽体一般培养至 20 d 后转接,对培养 10 d 以上通常在第 15 d 前后出现代谢物的芽体,在发现后即及时转接,对于代谢物太多的芽体则弃之不用。通过多次反复继代培养,可得到大量的芽苗,可进一步用于壮苗和生根培养,从而达到植株再生的目的。

3 讨论

叶片诱导愈伤组织的频率最低,培养中易发生褐变及失水,可能是因为叶片组织与其它组织相比较柔嫩,在清洗、消毒和切割过程中易损伤细胞组织,在培养后期往往提早衰亡或坏死。而红色苞片则厚实饱满,较容易诱导出愈伤组织,但在继代培养中产生次生代谢物的频率也较高,估计是与红色苞片组织内含有花青素有关^[8],我们观察到的次生代谢物有红色、粉红色、乳白色和金黄色等,在苞片、叶柄和茎段外植体的培养中均有较高的发生频率,由于是在继代培养后期产生,可以排除是污染所致,这一现象在已发表的一品红组织培养文献中还未见提到过,如何防止其产生,需要作进一步的研究。

在 MS 附加一定浓度的 BA 和 NAA 的培养基中,茎段产生愈伤组织的速度和频率是所试验外植体中最高的,10 d 过后在切口处就能观察到愈伤组织的出现,但在 MS + BA 0.1 mg/L + NAA 0.1 mg/L 的培养基中添加 2,4-D 后,苞片的愈伤组织诱导率则超过茎段,这可能是苞片对 2,4-D 更为敏感的原因。

对内外植体产生的愈伤组织进行观察比较后发现,绿色的愈伤组织结构较紧密,不定芽的芽点也是从绿色愈伤组织开始产生,这种相对容易再分化产生芽的愈伤组织主要来源于茎段和苞片,叶柄也能产生绿色愈伤组织,但很快就老化变成浅褐色,并且组织松软呈水浸状,这种组织转接过后容易衰老、死亡,不会增殖也不会出现芽点,此外还有深红色、浅红色、米白色的愈伤组织,但它们最终都没有诱导出芽。出现不同颜色的愈伤组织表明外植体诱导分化处于不同的阶段,李艳等^[5]也报道了不同颜色的愈伤组织具有明显不同的分化效果。

参考文献

- 1 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. 314~317
- 2 钟士传,王侠礼,宋仪农,等. 一品红茎段离体快速繁殖研究简报[J]. 中国农学通报,1999,15(3):74~75
- 3 蔚承祥,王庆武,李文金,等. 矮生一品红的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2000,36(3):234~235
- 4 任凝辉,武荣花,王献,等. 矮生一品红苞片外植体组织培养技术研究[J]. 河南农业大学学报,2001,35(3):239~240,248
- 5 刘金郎. 矮生一品红试管快速繁殖技术研究[J]. 生物技术,2003,13(1):31~32
- 6 李军,李力艺,李晓霞. 一品红的组织培养与快速繁殖[J]. 山西农业大学学报,2004,24(4):420~422
- 7 焦海华,周吉源. 植物生长调节物质对一品红组织培养中器官分化的效应[J]. 华中师范大学学报(自然科学版),2002,36(2):225~228
- 8 孔令义,闵知大. 一品红茎叶化学成分的研究[J]. 中草药,1996,27(8):453~456
- 9 李艳,方宏筠,张新. 一品红叶片组织培养及再生植株形成的研究[J]. 鞍山师范学院学报,1999,1(3):104~106