

紫薇幼胚培养及植株再生初探

唐兴国^{1,2}, 周全², 范莹² (1. 台州市农业科学研究院, 浙江临海 317000; 2. 武汉生物工程学院, 湖北武汉 430415)

摘要 [目的]对紫薇幼胚培养进行尝试性研究,探讨其适宜的生长分化条件。[方法]以紫薇(*Lagerstroemia indica*)幼胚为外植体,诱导其萌发并建立无菌系。在此基础上探讨了不同激素水平和培养方式对紫薇幼胚培养的影响。[结果]紫薇幼胚去种皮后易于萌发,其萌发率可达100%;启动培养基为MS + BA_{0.5} + NAA_{0.5} + sucrose3.0% + agar0.7%;丛生芽诱导培养基为MS + BA_{0.5} + NAA_{0.1} + sucrose3.0% + agar0.7% + 椰乳10%;生根培养基为MS + BA_{0.5} + IBA_{0.1} + sucrose3.0% + agar0.7% + 椰乳10%。[结论]该研究可为紫薇的后续优化育种提供技术参考。

关键词 紫薇;幼胚;组织培养

中图分类号 S603.6;Q813.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)36-13177-02

A Preliminary Study on Immature Embryo Culture and Plant Regeneration of *Lagerstroemia indica*

TANG Xing-guo^{1,2}, ZHOU Quan², FAN Ying² (1. Taizhou Academy of Agricultural Sciences, Linhai, Zhejiang 317000; 2. Wuhan Institute of Bioengineering, Wuhan, Hubei 430415)

Abstract [Objective] This study aimed to explore immature embryo culture of *Lagerstroemia indica* and investigate the appropriate conditions for growth and differentiation. [Method] Immature embryos of *L. indica* were employed as the explants for germination induction to establish aseptic lines. Based on that, the effects of different hormone levels and culture conditions on immature embryo culture of *L. indica* were analyzed. [Result] Peeled immature embryos of *L. indica* were easy to germinate, leading to a germination rate of 100%. The optimal initial medium was MS + BA_{0.5} + NAA_{0.1} + sucrose3.0% + agar0.7%; the optimal shoot induction medium was MS + BA_{0.5} + NAA_{0.1} + sucrose3.0% + agar0.7% + coconut milk 10%; the optimal rooting medium was MS + BA_{0.5} + IBA_{0.1} + sucrose3.0% + agar0.7% + coconut milk 10%. [Conclusion] This study provided technical reference for subsequent optimized breeding of *L. indica*.

Key words *Lagerstroemia indica*; Immature embryo; Tissue culture

紫薇(*Lagerstroemia indica*)为千屈菜科紫薇属木本花卉,原产于中国^[1],是我国传统名花之一,花开在夏季少花季节,是优良的园林观赏花木,亦是良好的树桩盆景植物^[2]。紫薇的病害较多,最常见的有白粉病、褐斑病、煤污病等,主要为真菌性病害^[3],病害直接影响紫薇的植株生长态势和观赏效果,因此培育无病或抗病紫薇植株一直是园艺工作者的夙愿^[4]。前人研究表明,通过组织培养方式培育紫薇幼株,可在一定程度上解决紫薇感染病害的问题,并可进行批量繁殖^[5]。目前已报道文献中,紫薇组织培养取材以幼嫩茎段为主^[6-8],而以幼胚作为外植体进行离体培养方式目前尚未见报道。通过幼胚离体培养,可以进一步提高紫薇的抗病性,同时具有克服杂种胚败育、获得稀有品种、缩短育种周期等优点。该试验对紫薇幼胚培养进行尝试性研究,目的在于探讨其适宜的生长分化条件,为后续的优化育种提供技术参考。

1 材料与方 法

1.1 试验材料 紫薇未成熟果实,挑选生长状况良好、叶片舒展无白色粉状霉层覆盖的植株上的果实,于10月中旬采集于武汉生物工程学院校园内。

1.2 试验方法

1.2.1 紫薇果实的消毒。去除果实上的萼片,加少量洗洁精清洗干净,然后置于水龙头下流水冲洗15 min,在无菌条件下用75%酒精消毒1 min,无菌水冲洗2次,0.1% HgCl₂溶液浸泡消毒15 min,无菌水冲洗5次^[9]。

1.2.2 紫薇幼胚的剥离。在无菌条件下,剪开果实,剥离2

mm左右长度、略显黄色的幼胚,并小心去除种皮,避免划伤幼胚,迅速接种到初代培养基上。

1.2.3 培养方法。以下各种培养基均加入蔗糖3.0%、琼脂0.7%、调pH至5.8,芽诱导培养基和生根培养基中均加入椰乳10%。培养条件为温度25℃,光照强度2 000~3 000 lx,光照时间9 h/d^[10]。

(1)初代培养。在MS培养基上添加BA 0.5 mg/L, NAA 0.1 mg/L,将幼胚以带种皮和不带种皮分为2组进行培养。

(2)芽诱导培养。在初代培养基基础上,配制NAA浓度分别为0.1、0.2和0.4 mg/L的培养基,依次编号为A1、A2、A3。将10日龄左右的已萌发幼芽分别转接到这3种培养基中培养,观察芽诱导情况,然后用同种培养基重复继代观察芽增殖情况。

(3)生根培养。以MS为基本培养基,添加BA 0.5 mg/L, IBA(0.1、0.2、0.4 mg/L),依次编号为B1、B2、B3。将前期培养的无菌紫薇苗切成长度2 cm左右的带叶茎段,分别接种到B1、B2、B3 3个培养基中培养,统计生根情况。

2 结果与分析

2.1 种皮对芽萌发的影响 幼胚接入培养基10 d后统计胚萌发情况,结果记入表1。观察发现,带种皮的幼胚接入培养基中3 d即产生褐色物质,培养基局部或全部变褐色,仅有少数幼胚可以萌发;而去种皮的幼胚在接入培养基5 d左右便可萌发,萌发率可达100%,且新芽生长健壮,未发生褐变现象,培养基干净清澈。由表1可看出,紫薇幼胚培养时宜去除种皮。

2.2 激素浓度对幼胚生长及芽分化的影响 将10日龄萌发幼胚接入芽诱导培养基培养14 d,统计芽诱导情况,结果记入表2。表2显示,NAA浓度最低的a1组出芽率最高,生

表1 种皮对芽萌发的影响

幼胚类型	样本数	萌发数	萌发率//%
带种皮	141	31	22
去种皮	133	133	100

根率最低。而 NAA 浓度最高的 a3 组出芽率最低,生根率最高。此外,试验还发现,幼胚萌发长成幼苗的速度较快,但长出真叶后生长速度变慢,一些幼苗可直接生根,但生根率较低。在基部产生愈伤组织的幼苗几乎不能形成完整的不定根,仅有部分气生根出现,而基部无愈伤组织的幼苗则有根的分化。一些未能分化的芽直接形成了愈伤组织,出现该现象主要是因为剥离幼胚时将幼胚划伤而导致了愈伤化。

表2 激素浓度对幼胚生长及分化的影响

代号	BA 浓度	NAA 浓度	样本数 个	出芽率 %	出芽指数
	mg/L	mg/L			
a1	0.5	0.1	68	66.2	1.69
a2	0.5	0.2	65	60.0	1.51
a3	0.5	0.4	55	58.2	1.56

注:出芽率指萌发的外植体数占总样本个数的比例;出芽指数为发生芽的外植体上的平均出芽数。下同。

2.3 激素浓度对芽增殖的影响 取培养 14 d 获得的幼苗,切除顶芽和基部,接种到相同培养基上进行继代。培养 14 d 左右开始形成明显的愈伤组织,随后发生不定芽,并形成丛芽,分化出丛生芽的植株每棵从基部的愈伤组织中长出 2~4 个丛生芽,其中 A1 组中的丛生芽茎较粗壮,叶片饱满,无萎缩、变黄现象。28 d 后统计芽增殖情况,结果记入表 3。表 3 表明,3 组培养基中,A1 组的出芽率和出芽指数最高,这说明,培养基中较高的分裂素配比有利于紫薇芽的诱导及增殖。

表3 激素浓度对芽增殖的影响

代号	BA 浓度	NAA 浓度	样本数 个	出芽率 %	出芽指数
	mg/L	mg/L			
A1	0.5	0.1	58	65.5	5.42
A2	0.5	0.2	50	54.0	4.63
A3	0.5	0.4	53	35.8	5.05

2.4 激素浓度对生根的影响 将在初代培养基上长至 4~5 cm 的幼苗去掉基部,切成 2 cm 左右的带叶茎段插入到 B1、B2、B3 3 种培养基中培养,15 d 左右有根长出,30 d 后统计根诱导结果(表 4)。试验中发现,B3 组的试管苗根系更发达,苗粗壮,单株生根数也较多,明显优于 B1 组。这说明较高水平的生长素有利于紫薇无根试管苗根系发育。

表4 激素浓度对生根的影响

代号	BA 浓度	IBA 浓度	样本数 个	生根率 %
	mg/L	mg/L		
B1	0.5	0.1	39	43.6
B2	0.5	0.2	40	57.5
B3	0.5	0.4	43	60.5

3 小结与讨论

该试验以紫薇幼胚作为外植体,诱导胚的萌发,并对紫

薇从幼胚到植株再生的影响因素做了初步研究,结果表明,紫薇幼胚的培养宜去除种皮,去种皮后培养萌发率可达 100%;紫薇丛生芽诱导适宜培养基为 MS + BA_{0.5} + NAA_{0.1} + 蔗糖 3.0% + 琼脂 0.7% + 椰乳 10%;紫薇生根适宜培养基为 MS + BA_{0.5} + IBA_{0.1} + 蔗糖 3.0% + 琼脂 0.7% + 椰乳 10%。

带种皮幼胚萌发困难的原因是多方面的,带种皮幼胚在培养基上发生褐变是否对幼胚的萌发有直接抑制作用目前尚未得到证实,有待进一步研究。试验中选出的培养基并未进一步优化,但该试验表明,在丛生芽诱导阶段较高的细胞分裂素配比有利于芽诱导和分化,而在生根阶段较高的生长素配比有利于根系发育。这也符合 Skoog 和 Miller 所确立的离体培养条件下植物生长及器官发生的激素调控原理^[11]。而王丽等在香雪兰的离体胚培养中发现,高浓度的生长素和较低浓度的细胞分裂素反而有利于芽的分化^[12]。这说明随着物种和基因型的不同,离体培养过程中对外源激素的需求有较大差异,需要在实践中加以重视。该试验发现,试管苗根部形成愈伤组织后会产生气生根,干扰根系的正常诱导和发育,正如袁王俊曾指出的:试管苗生根时加入细胞分裂素,不仅不能促进试管苗的生根,反而不利于试管苗的生根,主要原因是基部愈伤组织的生成会对不定根发生造成干扰^[13]。紫薇最初几次继代(1~3 代)侧芽的发生数量只有 2~4 个,而经过 6~7 次连续继代培养后可以形成每丛 20~50 个丛生芽^[8]。利用茎尖、茎段培养可建立稳定的快速繁殖体系,对紫薇优良单株的繁殖和推广具有实用价值。而对紫薇幼胚的离体培养研究则可为紫薇的遗传改良、抗性育种及远缘杂交等创造一条可靠途径。

该试验未能对紫薇幼胚的胚龄进行统计和分类处理,同时由于紫薇果皮较硬,幼胚的剥离难度大,操作时间长,染菌几率高,并且由于分批次进行剥离接种,在紫薇幼胚培养时间统计上存在一定误差,因此所得结论有一定片面性。由于笔者水平所限,文中难免有疏漏和不足之处,敬请各位同行批评指正。

参考文献

- [1] 张洁,王亮生,张晶晶,等.紫薇属植物研究进展[J].园艺学报,2007,34(1):251-256.
- [2] 王敏,宋平,任翔翔,等.紫薇资源与育种研究进展[J].山东林业科技,2008(2):66-68.
- [3] 桑景拴.紫薇常见病虫害的发生与防治[J].植物医生,2008,21(1):24-26.
- [4] 刘兴芝,王运忠,王红梅.紫薇常见病虫害的发生与防治[J].现代农业科技,2011(6):181-182.
- [5] 杨彦伶,杨柳,张亚东.紫薇组织培养技术[J].林业科技开发,2005,19(2):50-52.
- [6] 蔡明,田苗,王敏,等.紫薇离体再生体系建立的初步研究[J].中国观赏园艺研究进展,2007(3):251-255.
- [7] 姜旭红,宋刚,张虎,等.日本紫薇的组织培养与快速繁殖[J].植物生理学通讯,2004,40(6):707-708.
- [8] 黄钦才.紫薇腋芽培养[J].植物生理学通讯,1984(3):44.
- [9] 梁茂厂,刘友全.桂花幼胚培养及愈伤组织增殖诱导[J].经济林研究,2007,25(3):43-46.
- [10] 周健,成浩,王丽鹭.茶树幼胚培养萌发率与再生途径影响因素研究[J].西南农业学报,2008,21(2):440-443.

极显著地促进了 Ti × Cm 组合的地径,同时极显著地抑制了 Ti × Qf 组合的地径。B12 极显著地促进了 Ti + Qf 的地径,但极显著地抑制了 Ta + Qf 的地径。

2.7 有用菌株的挑选 由表 4 可知,在供试的 6 种细菌中,苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)可以极显著地促进 Ti × Qf 菌根苗的菌根数量和地径,球形节杆菌极显著地促进 Tm × Cm 菌根苗的菌根数量。这 2 种细菌可以应用于实验大棚接种。

表 4 块菌接种时可利用的菌根促栖菌

指标	B1: <i>Bacillus thuringiensis</i>	B12: <i>Arthrobacter globiformis</i>
	Ti + Qf	Tm + Cm
菌根数量	+**	+**
株高	+	+
地径	+**	+

注:**表示差异在 0.01 水平显著。

3 结论

(1) 细菌对于不同的菌根组合形成的菌根数量具有真菌特异性。它会促进某些菌根组合的形成,但会抑制另外一些真菌形成菌根。块菌子囊果内土著细菌对于菌根的形成有显著促进作用。

(2) 细菌对于不同组合的菌根苗株高也具有真菌特异性。它会促进某些组合的菌根苗株高,但会抑制另外一些组合的菌根苗株高。块菌子囊果内土著细菌对于不同组合菌根苗株高的影响不一致。

(3) 细菌对于不同组合的菌根苗地径也具有真菌特异性。它会促进某些组合的菌根苗地径,但会抑制另外一些组合的菌根苗地径。块菌子囊果内土著细菌对于不同组合菌根苗地径的影响不一致。

参考文献

- [1] MOLINA R, MASSICOTTE H, TRAPPE J M. Specificity phenomena in mycorrhizal symbiosis: community-ecological consequences and practical implications [M]// ALLEN M. Mycorrhizal functioning: an integrative plant-fungal process. Chapman and Hall London, UK, 1992; 357-423.
- [2] SLANKIS V. Soil factors influencing formation of mycorrhizae [J]. Ann Rev Phytopath, 1974, 12: 437-457.
- [3] POOLE E J, BENDING G D, WHIPPS J M, et al. Bacteria associated with *Pinus sylvestris*-*Lactarius rufus* ectomycorrhizas and their effects on mycorrhiza formation *in vitro* [J]. New Phytol, 2001, 151: 743-751.
- [4] BECKER D M, BAGLEY S T, PODILA G K. Effects of mycorrhizal-associated *Streptomyces* on growth of *Laccaria bicolor*, *Cenococcum geophilum*, and *Armillaria species* and on gene expression in *Laccaria bicolor* [J]. Mycologia, 1999, 91: 33-40.
- [5] DUPONNOIS R, GARBAYE J. Mycorrhization helper bacteria associated with the Douglas fir-*Laccaria laccata* symbiosis: effects in aseptic and in glasshouse conditions [J]. Ann Sci For, 1991, 48: 239-251.
- [6] GARBAYE J, DUPONNOIS R. Application des BAM (Bactéries Auxiliaires de la Mycorrhization) à l'inoculation du Douglas par *Laccaria laccata* S238 en pépinière forestière [J]. Rev For F, 1992, 44: 491-500.
- [7] DUNSTAN W A, MALAJCZUK N, DELL B. Effects of bacteria on mycorrhizal development and growth of container grown *Eucalyptus diversicolor* F. Muell. seedlings [J]. Plant Soil, 1998, 201: 241-249.
- [8] SBRANA C, BAGNOLI G, BEDINI S, et al. Adhesion to hyphal matrix and antifungal activity of *Pseudomonas strains* isolated from *Tuber borchii* ascocarps [J]. Can J Microbiol, 2000, 46: 259-268.
- [9] GAZZANELLI G, MALATESTA M, PIANETTI A, et al. Bacteria associated to fruit bodies of the ectomycorrhizal fungus *Tuber borchii* Vittad. [J]. Symbiosis, 1999, 26: 211-222.
- [10] BARBIERI E, POTENZA L, STOCCHI V. Molecular characterization of cellulolytic -chitinolytic bacteria associated with fruitbodies of the ectomycorrhizal fungus *Tuber borchii* Vittad. [J]. Symbiosis, 2001, 30: 123-139.
- [11] CITTERIO B, MALATESTA M, BATTISTELLI S, et al. Possible involvement of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillaceae* in structural modification of *Tuber borchii* fruit bodies [J]. Can J Microbiol, 2001, 47: 264-268.
- [12] BARBIERI E, GUIDI C, BERTAUX J, et al. Occurrence and diversity of bacterial communities in *Tuber magnatum* during truffle maturation [J]. Environ Microbiol, 2007, 9: 2234-2246.
- [12] 王丽, 邹明谦, 王晓光. 香雪兰种子胚的组织培养和植株再生 [J]. 园艺学报, 1996, 23(3): 281-284.
- [13] 袁王俊, 董美芳, 尚富德. 桂花胚的离体培养 [J]. 园艺学报, 2005, 32(6): 1136-1139.

(上接第 13178 页)

[11] SKOOG F, MILLER C O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultivated *in vitro* [J]. Substances Symp Soc Exp Biol, 1957(11): 118-131.