

正交实验法优选橡胶树花药愈伤组织诱导的研究

黄凤翔, 管 艳, 桂明春, 梁国平, 李 玲, 田 海

(云南省热带作物科学研究所, 云南 景洪 666100)

摘 要:以橡胶树品种 RRH105 花药为外植体, 研究了不同浓度 2,4-D、KT、NAA 及 TDZ 组合对橡胶树花药愈伤组织诱导的影响。结果表明:最适合诱导橡胶树花药愈伤组织的培养基配方为 MS+0.8 mg/L 2,4-D+0.8 mg/L KT+1.2 mg/L NAA+0.0 mg/L TDZ+60 g/L 蔗糖+5 g/L 琼脂, 诱导率达 94.00%, 出胚率为 14.25%。

关键词:正交实验; 橡胶树; 花药; 愈伤组织

中图分类号:S 794.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)18-0109-03

在植物组织培养中, 激素是影响植株再生的决定性因素, 培养基中植物生长调节剂的种类、浓度和配比的差异直接影响到植株的再生率。在橡胶树花药离体培养报道中常常使用不同浓度的 2,4-D、KT、NAA 进行组合诱导产生胚性愈伤组织^[1-2], 而鲜见使用噻二唑苯基脲(TDZ)的报道。TDZ 是一种具有很强细胞分裂素活性的苯基脲类衍生物, 目前它作为一种特殊的植物生长调节剂普遍用于植物组织培养中^[3-5], 与其它激素相比, 极低浓度的 TDZ 能使多种植物再生体系中产生的愈伤组织生长速度增加数十倍^[6]。

该试验以橡胶树品种 RRH105 花药为外植体, 采用正交实验设计, 研究 2,4-D、KT、NAA 和 TDZ 这 4 种激素对橡胶树花药愈伤组织诱导的影响, 筛选出花药愈伤组织诱导的最佳培养基配方, 以为橡胶树花药再生植株的培育提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为橡胶树品种 RRH105 未成熟的春花, 于 2013 年 3 月 28 日采集于云南省热带作物科学研究所试验基地。选取花粉发育时期为单核期和少数进入双核期的雄花为外植体(颜色为黄绿色)。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的处理 在超净工作台上, 将已选取的雄花置于体积分数为 75% 乙醇中浸泡 30 s, 无菌水清洗 1 次, 再用 0.1% 升汞灭菌 10 min, 期间不时摇动, 最后用无菌水清洗 5~6 次后置于玻片上, 用医用解剖针将雄花剥离, 取其雄蕊接种于盛有愈伤组织诱导培养基的培养瓶中。

第一作者简介:黄凤翔(1962-), 女, 农艺师, 现主要从事植物组织培养等研究工作。E-mail: 782205527@qq.com.

基金项目:国家科技支撑计划资助项目(2011BAD30B01); 云南省产业重大关键技术开发专项计划资助项目(云发改[2008]1657号); 云南省应用基础研究自筹经费资助项目(2013FZ169); 2014 云南省热带作物科技创新体系建设资金资助项目(RF2014); 云南省科研院所技术开发研究专项资助项目(2013DC013)。

收稿日期:2014-04-21

Research on *in vitro* Tissue Culture of Pear Rootstocks OH×F51

SONG Jian-kun, HUANG Man-na, WANG Ran

(College of Horticulture, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109)

Abstract: Taking pear rootstock OH×F51 as material, the shoot tips tissue culture and leaf callus induction of OH×F51 were studied, in order to gain the optimum way of *in vitro* culture. The results showed that the suitable medium for shoot tips culture was MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L+sugar 30 g/L+agar 6 g/L, with a higher rate of seedling. The optimum medium for leaf callus induction of OH×F51 was NN69+TDZ 3.0 mg/L+IBA 1.0 mg/L+sugar 30 g/L+agar 6 g/L. The placing manner of leaf had a certain influence on the callus induction. The leaves which abaxial surface touched the medium had a higher rate of callus.

Keywords: pear rootstock; OH×F51; shoot tips; leaves; *in vitro* tissue culture

1.2.2 正交实验设计 基础培养基为 MS+60 g/L 蔗糖+5 g/L 琼脂,以 2,4-D、KT、NAA 和 TDZ 为试验因素,按 $L_9(3^4)$ 正交实验表进行,各因素水平及浓度配比见表 1、2。每种处理接 10 瓶,每瓶接 10 个雄蕊,50 d 后统计愈伤组织的诱导率,并测量其直径,3 次重复。

表 1 $L_9(3^4)$ 正交实验的因素和水平

Table 1 Factors and levels of the orthogonal experiment $L_9(3^4)$

水平 Level	因素 Factor			
	2,4-D	KT	NAA	TDZ
1	0.4	0.4	0.4	0.0
2	0.8	0.8	0.8	0.2
3	1.2	1.2	1.2	0.6

表 2 $L_9(3^4)$ 正交实验培养基激素浓度配比

Table 2 The concentration ratio of plant growth regulators of the orthogonal experiment $L_9(3^4)$

培养基 Medium	2,4-D	KT	NAA	TDZ
F1	0.4	0.4	0.4	0.0
F2	0.4	0.8	0.8	0.2
F3	0.4	1.2	1.2	0.6
F4	0.8	0.4	0.8	0.6
F5	0.8	0.8	1.2	0.0
F6	0.8	1.2	0.4	0.2
F7	1.2	0.4	1.2	0.2
F8	1.2	0.8	0.4	0.6
F9	1.2	1.2	0.8	0.0

1.2.3 愈伤组织出胚率的比较 将上述 9 种培养基中诱导出的愈伤组织分别转至同一种体细胞胚分化培养基上进行体细胞胚的分化,80 d 后统计愈伤组织的出胚率。愈伤组织出胚率(%)=体细胞胚总个数/接种愈伤组织总块数 $\times 100\%$ 。

1.3 数据分析

试验数据采用 Excel 2003 软件处理,用 DPS v 7.05 软件进行方差分析,其中诱导率及出胚率先转换成反正弦平方根再进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 不同激素种类对愈伤组织诱导的影响

培养至 20~30 d,9 个处理均有花药开始脱分化形成浅黄、疏松的愈伤组织,培养至 50 d 时统计各处理愈伤组织的诱导率,并测量其直径。

由表 3 可知,2,4-D、KT、NAA 及 TDZ 对橡胶树花药愈伤组织诱导率及其直径的影响均达差异极显著水平。

表 4 表明,4 种激素浓度的改变,花药愈伤组织诱导率的变化存在一定差异,TDZ 及 NAA 浓度增加,愈伤组织的诱导率亦增加,而 2,4-D 及 KT 浓度增加,愈伤组织的诱导率先增加后降低趋势;愈伤组织的直径在不同激素组合间存在显著差异,直径大的可达 6.26 mm,小

表 3 方差分析结果

Table 3 Results of analysis of variance

变异来源 Variance	诱导率 Rate of induction		直径 Diameter	
	自由度 DOF	F 值 F value	自由度 DOF	F 值 F value
2,4-D	2	2 447.23 **	2	146.40 **
KT	2	1 588.96 **	2	19.64 **
NAA	2	1 866.51 **	2	93.01 **
TDZ	2	2 657.31 **	2	945.89 **
误差 Error	18		18	

注:**表示在 0.01 水平上差异显著。

Note:** show significant difference at 0.01 level.

表 4 正交实验愈伤组织诱导结果分析

Table 4 The results of callus induction of anther in orthogonal experiment

培养基 Medium	2,4-D	KT	NAA	TDZ	诱导率 Rate of induction/%	直径 Diameter/mm
F1	1	1	1	1	2.96	0.75
F2	1	2	2	2	93.33	5.27
F3	1	3	3	3	93.67	5.23
F4	2	1	2	3	98.00	6.26
F5	2	2	3	1	94.00	3.20
F6	2	3	1	2	96.67	5.44
F7	3	1	3	2	95.33	5.78
F8	3	2	1	3	94.67	5.59
F9	3	3	2	1	90.67	3.47
k1	63.32	65.43	64.76	62.54		
k2	96.22	94.00	94.00	95.11		
k3	93.55	93.67	94.33	95.44		
R1	32.90	28.56	29.56	32.90		
k1'	3.75	4.26	3.93	2.50		
k2'	4.99	4.71	5.00	5.50		
k3'	4.95	4.71	4.76	5.69		
R1'	1.24	0.45	1.07	3.19		

注:k1~k3 为极差 R1 为花药愈伤组织诱导率的直观分析,k1'~k3'为极差 R1'为愈伤组织直径的直观分析。

Note:k1~k3,range R1 were the visual analysis results of inductive rate of callus;k1'~k3',range R1' were the visual analysis results of diameter of callus.

的仅为 0.75 mm,相差 8 倍多。同时,4 种激素对花药愈伤组织诱导率及其直径的影响不相同,诱导率的影响极差 R 值大小的顺序为 2,4-D=TDZ>NAA>KT,这充分说明在 4 种激素中,2,4-D 和 TDZ 对花药脱分化的影响最大,NAA 次之,KT 最小,最优组合为 $A_2B_2C_3D_3$,即 0.8 mg/L 2,4-D+0.8 mg/L KT+1.2 mg/L NAA+0.6 mg/L TDZ;直径影响极差 R 值大小的顺序为 TDZ>2,4-D>NAA>KT,这表明 TDZ 对愈伤组织生长的影响最大,2,4-D 及 NAA 次之,KT 最小,最优组合为 $A_2B_2C_2D_3$,各因素的最优水平为 0.8 mg/L 2,4-D,0.8 (或 1.2)mg/L KT,0.8 mg/L NAA,0.6 mg/L TDZ。

2.2 愈伤组织出胚率的比较

培养至 30 d,仅在 F5 及 F9 培养基上诱导出的愈伤组织表面有白色球形原胚形成,其它各处理诱导出的愈伤组织开始变褐,无胚状体形成。培养至 80 d,除 F1、F5

及 F9 培养基上诱导出的愈伤组织有胚状体形成外,其它处理诱导出的愈伤组织始终不仅无胚状体形成,且大部分褐化死亡。此时统计愈伤组织的出胚率,对其进行方差分析表明 4 种激素对出胚率影响的差异达极显著水平($P<0.01$)。由表 5 多重比较分析可知,不同种类激素组合所诱导出的愈伤组织的出胚率存在显著差异,出胚率的影响极差 R 值大小的顺序为 $TDZ>2,4-D=KT=NAA$,这表明 TDZ 对愈伤组织出胚率的影响最大,2,4-D、KT 及 NAA 次之,各因素的最优水平为 0.8 mg/L 2,4-D,0.8 mg/L KT,1.2 mg/L NAA,0.0 mg/L TDZ,这表明在橡胶树花药愈伤组织诱导中,无需附加 TDZ。

表 5 愈伤组织出胚率的比较结果

Table 5 The results of embryoid induction of callus

编号 No.	2,4-D	因素 Factor KT	NAA	TDZ	出胚率 Rate of embryoid/%
F1	1	1	1	1	8.89
F2	1	2	2	2	0.00
F3	1	3	3	3	0.00
F4	2	1	2	3	0.00
F5	2	2	3	1	14.25
F6	2	3	1	2	0.00
F7	3	1	3	2	0.00
F8	3	2	1	3	0.00
F9	3	3	2	1	11.64
k1	2.96	2.96	2.96	11.59	
k2	4.75	4.75	3.88	0.00	
k3	3.88	3.88	4.75	0.00	
R	1.78	1.78	1.78	11.59	

综合表 4、5 可知,分别以橡胶树花药愈伤组织的诱导率、直径及出胚率筛选出的花药愈伤组织诱导最适激素组合不同。考虑到试验中不同激素组合中除 F1 培养基外诱导率均在 90.0%以上,且在后续研究中发现愈伤组织直径与出胚率及植株再生率无严格相关性,因此,以出胚率为考核指标筛选出的最优激素组合作为橡胶树

花药愈伤组织诱导的最优激素组合,即 0.8 mg/L 2,4-D+0.8 mg/L KT+1.2 mg/L NAA+0.0 mg/L DTZ,诱导率为 94.00%,出胚率为 14.25%。

3 讨论

TDZ 是具有细胞分裂素活性的苯基脲衍生物,其活性比细胞分裂素高,黄群声^[4]研究表明在愈伤组织诱导上,TDZ 比 6-BA 具有更强的诱导外植体脱分化活性,该试验结果亦说明,TDZ 能促进橡胶树花药脱分化产生愈伤组织,这与张毅华等^[3]在花药愈伤组织诱导试验中得到的结果基本一致。同时,TDZ 还能使愈伤组织快速生长,且在试验所设浓度范围内,愈伤组织的直径随其浓度的增加而增加,与于娅等^[6]研究的结果比较一致。

该研究中发现 TDZ 对橡胶树花药愈伤组织再分化具有抑制作用,在附加 TDZ 处理中诱导出的愈伤组织无体细胞胚形成,且随着培养时间的推移,大部分愈伤组织褐化死亡,这一结果与王丽等^[5]在小麦成熟胚培养试验中得到的结果不一致,这可能是由于物种不同造成的。

(该文作者还有王亚,单位同第一作者。)

参考文献

- [1] 孙爱花,李哲,黄天带. 橡胶树花药的培养[J]. 植物生理学通讯, 2006,42(4):786.
- [2] 谭德冠,孙雪飘,张家明. 巴西橡胶树的组织培养[J]. 植物生理学通讯, 2005,41(5):675.
- [3] 张毅华,唐丽,谷艾素,等. 硝酸铵和植物生长调节剂对花药愈伤组织诱导和植株再生的影响[J]. 河南农业科学, 2013,42(4):125-129.
- [4] 黄群声. TDZ 和 CPPU 对红掌快速繁殖的影响[J]. 亚热带植物学报, 2004,33(3):39-41.
- [5] 王丽,陈耀锋,张月琴,等. 低温与植物生长调节剂预处理对小麦成熟胚培养特性的影响[J]. 西北植物学报, 2013,33(5):1041-1046.
- [6] 于娅,于亚萍,段威. 不同激素对青花菜下胚轴不定芽分化的影响[J]. 北方园艺, 2013(24):96-99.

Study on the Callus from the Anther of *Hevea brasiliensis* Mull. Arg by Orthogonal Experiment

HUANG Feng-xiang, GUAN Yan, GUI Ming-chun, LIANG Guo-ping, LI Ling, TIAN Hai, WANG Ya
(Yunnan Institute of Tropical Crops, Jinghong, Yunnan 666100)

Abstract: Taking anther of *Hevea brasiliensis* clone RR1105 as explants, the influence of different concentrations of plant growth regulators (2,4-D, KT, NAA, TDZ) on callus induction of anther were studied. The results showed that the best medium was MS+0.8 mg/L 2,4-D+0.8 mg/L KT+1.2 mg/L NAA+0.0 mg/L TDZ+60 g/L sucrose+5 g/L agar. The inductive rate of callus was 94.00%, the inductive rate of embryoid was 14.25%.

Keywords: orthogonal experiment; *Hevea brasiliensis*; anther; callus