

任豆叶片的愈伤组织诱导和植株再生

周宇晴¹, 张俊杰¹, 韦雪芬¹, 李景剑¹, 李培¹, 陈晓阳^{1,2,*}

华南农业大学广东省森林植物种质创新与利用重点实验室,²林学与风景园林学院, 广州510642

摘要: 为建立任豆(*Zenia insignis*)无菌苗培养体系, 以种子作为实验材料, 采用不同消毒方法对其灭菌效果进行比较。并以无菌苗叶片为外植体, 以MS为基本培养基, 研究不同配比的植物生长调节剂对愈伤组织诱导、不定芽诱导和生根培养的影响。结果表明: 种子用0.1%升汞消毒10 min, 无菌苗获得率最高。诱导愈伤组织的最佳培养基配比为MS+2 mg·L⁻¹ 6-BA+0.01 mg·L⁻¹ IBA+0.01 mg·L⁻¹ 2,4-D, 诱导率为82.88%。6-BA在不定芽诱导中起着关键作用, 诱导不定芽最佳培养基为MS+0.01 mg·L⁻¹ IBA+3.2 mg·L⁻¹ 6-BA。生长素对任豆的生根有重要影响, MS+0.1 mg·L⁻¹ NAA为生根培养基可获得98.23%的生根率。

关键词: 任豆; 愈伤组织; 再生体系

任豆是苏木科(Caesalpiniaceae)翅荚属速生落叶大乔木, 又名翅荚木、任树、砍头树。任豆为我国珍稀树种, 属国家二级保护野生植物(郑万钧1985), 主要分布在热带、亚热带国家和地区, 我国主要在湘、粤、桂、滇、黔等省有分布(吴征镒1991; 方小平等1996)。

任豆萌芽更新能力强, 生长迅速, 而且成林成材早, 其木材材质优良, 可用作薪; 其根系发达, 抗性强, 花繁叶茂, 适应性广, 是优良的绿化树种(唐兰芳1998; 覃尚民等1982); 叶片富含蛋白质, 易腐烂, 即可做饲料肥料, 也可改良土壤, 保持水土(范霁萱等1995; Kim等1999)。另外, 有研究表明任豆由于能在贫瘠土壤中快速生长且其根瘤特点, 从而具有较高的综合金属富集能力, 特别是富集锌、镉潜力大(李霞员等2014; Zhao等2014), 已被认为是替代超富集草本植物的潜在极少数乔木树种之一(Pulford和Watson 2003; Puschenreiter等2010)。可见, 任豆是一种多用途树种, 既是薪炭林树种, 又是生态树种。因此, 其具有一定的发展空间。

任豆繁殖率不高, 结果有大小年之分, 同时任豆扦插生根难, 插条繁殖率不高。目前, 虽然任豆种子育苗和引种造林技术已趋成熟(黄志玲等2011; 柳新红等2007; 陈昆和陈秀莺2011; 陈永密和成诗敦1986), 木材综合利用研究也取得一定进展(李本贵等2003; 覃勇荣等2008), 有关任豆组织培养研究国内也有所报导。张天宇和姚湘明(2009)以次生种源任豆为对象, 进行了愈伤组织诱导体系建立的研究。结果表明, 茎段为外植体诱导愈伤组织效果最佳, 诱导率为97%, 叶片诱导率为86%, 其基本培养基为MS+1 mg·L⁻¹ 6-BA+0.5 mg·L⁻¹ IBA+

3%蔗糖。袁德义等(2010)则是以任豆的腋芽以及幼苗嫩茎为外植体, 研究表明任豆幼苗的嫩茎和当年生枝条的腋芽在培养基MS+0.5~1.5 mg·L⁻¹ 6-BA+0.05~0.10 mg·L⁻¹ IBA的芽诱导率最高为83.3%。邱运亮等(2002)发现试管苗在1/2MS、1/2MS+0.01~1.5 mg·L⁻¹ IBA、1/2MS+0.5~2.5 mg·L⁻¹ ABT(生根粉10号)培养基中均生根, 在不加激素的1/2MS培养基中, IBA促进了苗的生长; 但生根率随所添加的IBA浓度增大而降低, 再添加ABT可提高根的诱导率, 却明显抑制苗的生长(邱运亮2002; 邱运亮和阚文靖1992)。

本实验以任豆叶片为材料, 对愈伤组织诱导和植株再生进行初步研究, 旨在提高任豆再生能力, 建立高效的再生体系, 为之后种质资源保护和基因工程研究提供有效的参考价值。

材料与方 法

1 实验材料

采用广西壮族自治区百色市德保县任豆(*Zenia insignis* Chun)采集的一年生种子, 进行无菌处理后所得的无菌苗叶子为外植体进行实验。

2 实验方法

2.1 种子消毒实验

将采集的任豆种子在90℃水浴浸泡10 min, 后把种子平铺有湿润滤纸的培养皿上; 放置24 h后, 挑选健康且膨大的种子进行消毒实验。在无

收稿 2017-04-20 修定 2017-08-16

资助 国家“863”科技项目团队课题(2011AA10020203)。

* 通讯作者(E-mail: xychen@scau.edu.cn)。

菌超净台上,用75%酒精灭菌30 s,无菌水冲洗1次后,分别设计8个处理(5%次氯酸钠消毒5、10、15和20 min; 0.1%升汞消毒5、10、15和20 min),将消毒后的种子播种于空白(不含任何激素)的MS培养基中培养。每个处理30瓶,每瓶接种3个种子,实验重复3次。10 d之后,统计污染率(污染率=污染的外植体数/接种的外植体总数 \times 100%)、死亡率(死亡率=死亡的外植体数/接种的外植体总数 \times 100%)、萌发率(萌发率=发芽的外植体数/接种的外植体总数 \times 100%),筛选出任豆种子最适灭菌试剂的最佳灭菌时间。

2.2 愈伤组织诱导

灭菌实验所得的无菌苗,取其完全伸展的真叶为外植体,将小叶切割成0.5 cm \times 0.5 cm左右的小块,叶片远轴面朝上接种到愈伤组织诱导培养基中。基本培养基为MS,添加不同的生长调节剂,定期观察,3~4周继代1次。统计愈伤组织诱导率(愈伤组织诱导率=形成愈伤组织的外植体数/接种的外植体总数 \times 100%),筛选最适愈伤组织诱导培养基。

2.3 不定芽的诱导和增殖

将能够在继代培养基上正常生长的愈伤组织切成1 cm \times 1 cm左右的小块,接种于附加不同配比植物生长调节剂的培养基中,进行不定芽诱导,接种到愈伤组织分化培养基中。培养30 d后观察愈伤组织的分化情况并统计其分化率(愈伤组织诱导率=形成愈伤组织的外植体数/接种的外植体总数 \times 100%)。

2.4 生根诱导

将高3~4 cm且长势良好的再生苗分别移植到

MS空白培养基,添加NAA浓度分别为0、0.05、0.1和0.2 mg \cdot L⁻¹,分别进行诱导生根,计算生根率(生根率=生根数/接种数 \times 100%),确定最适生根培养基。

2.5 移栽与炼苗

生根培养15 d后选择生长状态良好的带根无菌组培苗,在温室中炼苗3~5 d后取出,用蒸馏水洗净根部黏连的培养基,用滤纸吸干根部的表面水分,最后将生根苗移至基质中。基质选择3:1的泥炭土和珍珠岩混合。移栽后浇透一次水,定期观察小苗的生长状况。

3 实验条件

诱导愈伤组织和不定芽均以MS培养基为基础培养基(含30 g \cdot L⁻¹蔗糖和6.0 g \cdot L⁻¹琼脂, pH 5.8),分别添加不同配比的6-BA、IBA、2,4-D和NAA等植物调节物质并于121 $^{\circ}$ C高压蒸汽灭菌20 min。培养条件为培养温度(25 \pm 2) $^{\circ}$ C,光照强度31.25 μ mol \cdot m⁻² \cdot s⁻¹,光照时间12 h \cdot d⁻¹。

4 数据统计分析

每种培养基设置3个重复,每瓶培养基中接种3块外植体,实验重复3次。所得数据采用Excel 2007整理,采用SAS 9.3统计软件分别进行统计学分析(黄少伟和谢维辉2001)。

实验结果

1 不同消毒处理对任豆种子灭菌效果的影响

不同处理的种子萌发起始时间无明显差异,5~7 d开始陆续萌芽。在8种消毒处理中(表1),0.1%升汞消毒时间10 min的消毒效果最显著,发芽率达到处理中最大萌发率,为82.88%,污染率6.35%,死

表1 不同消毒处理对任豆种子灭菌效果的影响

Table 1 Effects of different disinfection methods on seedsterilization of *Z. insignis*

处理	处理时间/min	污染率/%	萌发率/%	死亡率/%
0.1%升汞	5	7.67 \pm 2.24 ^d	70.23 \pm 1.83 ^b	24.10 \pm 1.29 ^{cd}
	10	6.35 \pm 0.23 ^d	82.88 \pm 0.56 ^a	10.77 \pm 0.21 ^d
	15	5.97 \pm 0.12 ^d	50.71 \pm 1.02 ^c	43.71 \pm 0.23 ^c
	20	5.58 \pm 0.35 ^d	0 ^e	94.423 \pm 0.88 ^a
5%次氯酸钠	5	40.00 \pm 0.16 ^a	23.37 \pm 0.67 ^d	36.63 \pm 1.68 ^c
	10	22.24 \pm 0.55 ^{bc}	5.92 \pm 1.48 ^{de}	71.84 \pm 0.87 ^b
	15	23.57 \pm 0.18 ^{bc}	0 ^e	76.43 \pm 1.14 ^b
	20	13.34 \pm 1.33 ^c	0 ^e	86.66 \pm 0.52 ^{ab}

表中不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。下表同此。

亡率10.77%。虽然0.1%升汞消毒5 min的萌发率也较高,为70.23%,但其消毒效果不彻底,死亡率达到23.10%,出现幼苗后期发霉。0.1%升汞消毒处理下,随着消毒时间的增加,污染率也随着下降,但是在10 min后,萌发率呈直线下降,到20 min为0。

5%次氯酸钠消毒处理总体上比0.1%升汞消毒效果要差,4个时间处理中萌发率最高为23.37%,但其污染率在处理中最高,为40.00%。5%次氯酸钠消毒不彻底,污染率普遍较高,最低的污染率也达到13.34%,不同时间处理消毒效果不显著,死亡率高。因此,0.1%升汞消毒10 min为本实验最理想的消毒时间,其次为0.1%升汞消毒5 min。

2 不同植物生长调节剂对任豆愈伤组织诱导的影响

对多数植物来说,单独使用生长素无法诱导愈伤愈伤组织,利用适当配比的细胞分裂素与生长素组合是愈伤组织发生的关键因素(Attree和Fowke 1993)。本实验以任豆无菌苗叶片为外植体,在附加不同配比的2,4-D、NAA和6-BA的愈伤组织诱导培养基上培养。培养7 d,有叶片边缘开始膨大;培养15 d,膨大的叶片边缘上开始有愈伤组织出现,大部分为淡青色。

从表2可知,6-BA+2,4-D组合整体效果较好,最大诱导率为88.56%,愈伤组织量多,但质地疏松,在之后的继代增殖中增殖的芽较少;6-BA+IBA组

表2 不同植物生长调节剂对任豆愈伤组织诱导的影响

Table 2 Effects of different plant growth regulators on callus induction of *Z. insignis*

培养基编号	IBA浓度/mg·L ⁻¹	2,4-D浓度/mg·L ⁻¹	6-BA浓度/mg·L ⁻¹	诱导率/%
1	0.01	0	1	62.66±0.20 ^d
2	0.01	0	2	70.25±0.57 ^c
3	0.01	0	3	63.44±0.28 ^d
4	0	0.01	1	68.67±0.11 ^{cd}
5	0	0.01	2	88.56±0.32 ^{ab}
6	0	0.01	3	80.87±0.26 ^b
7	0.01	0.01	1	92.78±0.15 ^a
8	0.01	0.01	2	96.67±0.36 ^a
9	0.01	0.01	3	53.33±0.38 ^{de}
10	0.01	0.04	1	57.26±0.25 ^{de}
11	0.01	0.04	2	26.97±0.53 ^e
12	0.01	0.04	3	20.00±0.17 ^e

合诱导率最大达70.25%,愈伤组织在边缘形成后呈白绿色,易褐化(图1-A)。

培养基(8)和(7)的诱导率最高,分别为96.67%和92.78%,且其愈伤组织程度较高,呈青绿色,质地紧密(图1-B和C)。特别是培养基(8)诱导的愈伤组织,芽点密集,在之后继代增殖中,芽增殖效率高,且生长粗壮,愈伤组织质量明显优于培养基(5),由此看出,2,4-D和IBA与6-BA综合使用效果显著。培养基(9)中,6-BA浓度增加至3 mg·L⁻¹时,则诱导率下降到53.33%,叶子膨大程度大但愈伤组织数量少,且颜色较深。添加高浓度6-BA的培养基(3)和培养基(6)也表现出相应的趋势,诱导率分别下降到63.44%和80.87%,且愈伤组织总体上呈现出含水量低的状态,不利于再分化。培养基(10)、(11)和(12)的2,4-D增加到0.04 mg·L⁻¹时,诱导率明

显低于培养基(7)~(9),最低达到20.00%;且随着6-BA浓度的增加,其诱导率也随着下降,愈伤程度总体较低,愈伤组织量少,呈水渍发泡状,颜色偏黄芽点少,表现出易褐化的现象(图1-D)。

综上所述,本实验愈伤组织诱导最适培养基为MS+2 mg·L⁻¹ 6-BA+0.01 mg·L⁻¹ IBA+0.01 mg·L⁻¹ 2,4-D。

3 不同浓度6-BA对任豆愈伤组织分化的影响

由表3可以看出,6-BA浓度为1.6 mg·L⁻¹时,分化率最大,为24.48%,分化芽的状态较好,芽粗壮呈绿色(图2-F);随着6-BA浓度的增加,分化率随着下降,到6-BA浓度为12.8 mg·L⁻¹时,分化率仅有2.9%,分化苗出现明显的水渍化现象,且叶易卷曲。6-BA浓度为3.2 mg·L⁻¹时,其分化率也较高,为20.52%,但是其分化的芽在增殖培养中难抽长,

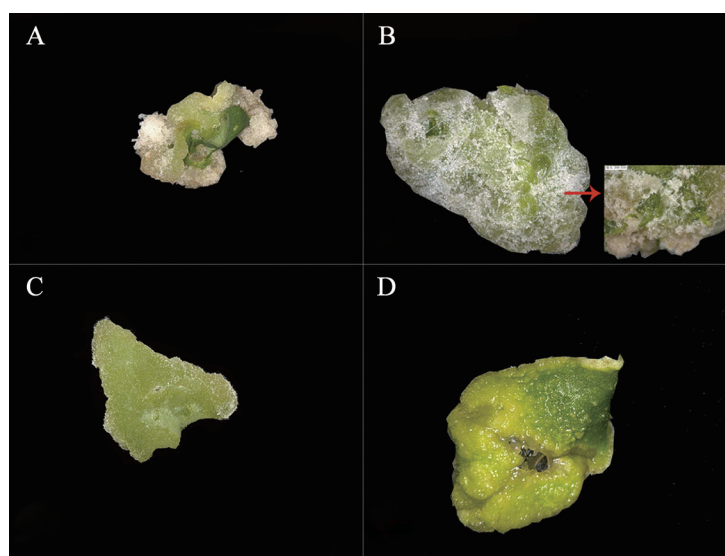


图1 不同培养基的任豆愈伤组织诱导
Fig.1 Callus induction of *Z. insignis* in different media
A: 培养基(3); B: 培养基(8); C: 培养基(7); D: 培养基(11)。

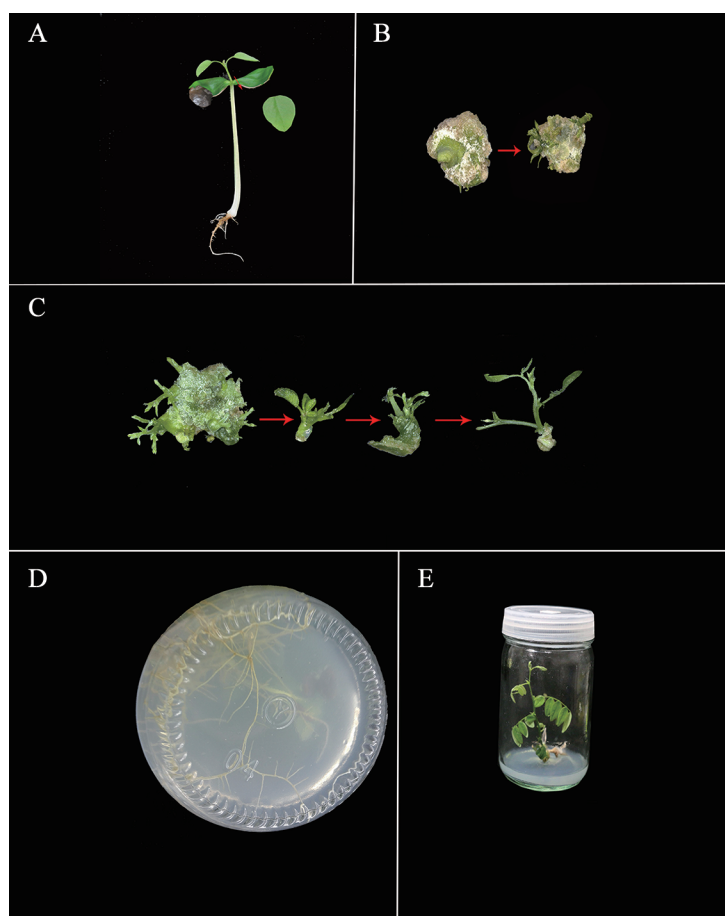


图2 任豆叶片的愈伤组织诱导和植株再生
Fig.2 Callus induction and plantlet regeneration of *Z. insignis*
A: 种子苗; B: 愈伤组织诱导后进行增殖继代培养; C: 诱导产生不定芽, 芽继续生长壮大; D: 诱导生根; E: 完整任豆植株。

表3 不同浓度6-BA对任豆愈伤组织分化的影响

Table 3 Effects of different concentrations of 6-BA on callus differentiation of *Z. insignis*

IBA浓度/mg·L ⁻¹	6-BA浓度/mg·L ⁻¹	分化率/%	生长状况
0.01	0.8	13.26±0.92 ^b	芽苗较少, 分化时间长
0.01	1.6	24.48±0.12 ^a	分化出芽苗多, 无褐化现象, 分化时间短
0.01	3.2	20.52±0.47 ^a	分化出芽苗多, 无褐化现象, 苗细小
0.01	6.4	5.83±0.63 ^b	分化出芽较少, 分化苗呈黄绿色
0.01	12.8	2.9±1.03 ^c	芽苗较少, 苗状态较差, 褐化严重

分化时间较长。综上所述, 本实验适合愈伤组织芽分化的最适培养基为MS+0.01 mg·L⁻¹ IBA+3.2 mg·L⁻¹ 6-BA。

4 任豆的生根培养

由表3看出, 生根率普遍较高, 其中含0.1 mg·L⁻¹ NAA培养基的为最高(98.23%), 其生根数达到5.13。MS空白培养基和0.05 mg·L⁻¹ NAA的生根率也较高, 分别达96.50%和96.43%, 但其根生长状态较细, 且生根数较少, 不利于随后的移栽炼苗阶段。因此, 本实验采用的最适生根培养基为MS+NAA 0.1 mg·L⁻¹。

表4 不同浓度NAA对任豆生根的影响

Table 4 Effects of different concentrations of NAA on rooting of *Z. insignis*

NAA浓度/mg·L ⁻¹	生根率/%	生根数/条
0	96.43±1.22 ^a	3.18±0.89 ^b
0.05	96.50±2.57 ^a	3.15±0.19 ^b
0.10	98.23±0.15 ^a	5.13±0.28 ^a
0.20	86.72±0.87 ^b	1.29±0.34 ^b

讨 论

目前对任豆的组织培养主要集中在利用任豆无菌苗的下胚轴、幼苗嫩茎以及一年生枝条的诱导培养, 对于其他部位以及各个无性系的组织培养尚未有研究报道, 也尚未建立起成熟高效的再生体系。良种选育等方面的工作也尚未开展, 其生理生态特性研究甚少, 分子生物学水平尚未见报道, 遗传信息匮乏。本研究通过组织培养建立任豆植株一整套成熟高效的再生体系, 除了在短期内能获得大量表现一致的植物材料, 便于进行种质资源保存及扩繁, 为以后快速繁殖苗木, 满足生产需要提供有效途径; 也可以在未来对任豆子

代遗传测定、低温胁迫的研究以及利用基因工程等生物技术提高任豆良种的耐寒性等研究提供基础, 具有一定的指导意义。

在任豆愈伤组织诱导中, 研究表明高浓度2,4-D反而降低诱导率, 且愈伤组织多表现为水渍化。可能由于2,4-D是一种较强的诱变剂, 可以同时诱导和抑制体细胞胚的发生, 在愈伤组织的诱导过程中会导致细胞的变异, 从而影响分化再生频率(周俊彦和郭扶兴1996; Tokuji和Kuriyama 2003; Tisserat和Murashige 1977)。李克勤等(1991)对陆地棉, 李文静等(2012)对芥菜以及陶铭(2001)对组织培养中畸形胚状体及超度含水态苗进行了研究, 他们的结果都表明使用过高浓度的2,4-D在后续的培养过程中愈伤组织易褐化, 对再生过程产生不利的影响。本实验所得结论与其相一致。

本研究任豆生根率最高达到98.23%, 生根率较高。邱运亮(1992)在1/2MS基本培养基中添加0.01~0.1 mg·L⁻¹ IBA, 可使每株任豆试管苗生根数增加0.19~0.69条。本实验在其基础上生根效率明显提高, 生根数也达到5.13条。

参考文献

- Attree SM, Fowke LC (1993). Embryogeny of gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 35: 1-35
- Chen K, Chen XY (2011). Bean cultivation of timber trees of any of the key technologies. *Beijing Agr.* (12): 31-32 (in Chinese with English abstract) [陈昆, 陈秀莺(2011). 任豆树用材林培育关键技术探讨. *北京农业*, (12): 31-32]
- Chen YM, Cheng SG (1986). Introduction and afforestation of rare species of *Viburnum*. *Hunan Fore Sci and Tech*, (02): 31-32 (in Chinese) [陈永密, 成诗敦(1986). 珍稀树种翅荚木引种造林试验. *湖南林业科技*, (02): 31-32]
- Fan XX, Liang ZY, Song XX (1995). A kind of woody fodder worthy of development and utilization—*Zenia insignis* Chun. *Guangxi J Animal Husbandry Veterinary Med*, (02): 20-23 (in Chinese) [范霭萱, 梁兆彦, 宋喜宣(1995). 值得开发利用的木本饲料——

- 任豆树. 广西畜牧兽医, (02): 20–23]
- Fang XP, Xu LY, Yang CH (1996). Rare and endangered plant - *Zenia insignis* Chun. Guizhou Fore Sci Tech, 24 (2): 56–58 (in Chinese) [方小平, 徐联英, 杨成华(1996). 珍稀濒危植物-翅荚木. 贵州林业科技, 24 (2): 56–58]
- Huang SW, Xie WH (2001). Practical SAS programming and data analysis of FstExp. Guangzhou: South China University of Technology Press [黄少伟, 谢维辉(2001). 实用SAS编程与林业试验数据分析. 广州: 华南理工大学出版社]
- Huang ZL, Pang SL, Hao HK, Peng YH, Wei XJ (2011). Study on seedling growth rhythm of *Zenia insignis* as valuable fast-growing native tree species in Guangxi. J Southwest Fore Coll, (6): 6–9 (in Chinese with English abstract) [黄志玲, 庞世龙, 郝海坤, 彭玉华, 韦晓娟(2011). 广西珍贵乡土速生树种任豆苗木节律研究. 西南林业大学学报, (6): 6–9]
- Kim SE, Kim HS, Hong S, Kim YC, Lee JJ (1999). Sesquiterpene esters from *Celastrus orbiculatus* and their structure-activity relationship on the modulation of multidrug resistance. J Nat Prod, 62 (5): 697–700
- Li BG, Yu YS, Wang JX (2003). Baidu standard for drying wood. Hunan Fore Sci Technol, (1): 51–52 (in Chinese) [李本贵, 喻云水, 王建峡(2003). 百度法制定翅荚木干燥基准. 湖南林业科技, (1): 51–52]
- Li KQ, Wang JZ, Zhang DL, Guo DZ, Hao LF, Zhang SF, Shen ZG (1991). Study on tissue culture of *Gossypium*. Acta Bot Boreali-Occident Sin, 11 (02): 144–153 (in Chinese with English abstract) [李克勤, 王喆之, 张大力, 郭德志, 郝联芳, 张苏峰, 沈志刚(1991). 陆地棉组织细胞培养的研究. 西北植物学报, 11 (02): 144–153]
- Li WJ, Li XQ, Jia MM, Tang HM, Song QJ, Lian SY (2012). Effects of 6-BA, NAA and 2,4-D on callus induction, growth and plantlet regeneration of shepherd's purse [*Capsella bursa-pastoris* (L.) Medic]. J Plant Physiol, 48: 141–146 (in Chinese with English abstract) [李文静, 李学强, 贾毛毛, 唐洪梅, 宋乾江, 连少英(2012). 6-BA、NAA和2,4-D不同配比对荠菜愈伤组织诱导、生长及植株再生的影响. 植物生理学报, 48: 141–146]
- Li XY, Peng XW, Wu SL, Li ZR, Feng HM, Jiang ZP (2014). Effect of arbuscular mycorrhizae on growth, heavy metal uptake and accumulation of *Zenia insignis* Chun seedlings. Environ Sci, 35 (8): 3142–3148 (in Chinese with English abstract) [李霞员, 彭霞薇, 伍松林, 李志茹, 冯红梅, 袁江泽(2014). 丛枝菌根对翅荚木生长及吸收累积重金属的影响. 环境科学, 35 (8): 3142–3148]
- Liu XH, Ge YJ, Wang JF, He L, Lian FL, Lei Z (2007). Geographical variation of growth characters of *Zenia insignis* Chun in provenances and its nonage selection. Acta Agric Univ Jiangxiensis, (1): 61–65 (in Chinese with English abstract) [柳新红, 葛永金, 王军峰, 何林, 练发良, 雷珍(2007). 翅荚木种源苗期性状地理变异及早期选择研究. 江西农业大学学报, (1): 61–65]
- Pulford ID, Watson C (2003). Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees—a review. Environ Int, 29: 529–540
- Puschenreiter M, Türktas M, Sommer P, Wieshammer G, Laaha G, Wenzel WW, Hauser MT (2010). Differentiation of metallicolous and non-metallicolous *Salix caprea* populations based on phenotypic characteristics and nuclear microsatellite (SSR) markers. Plant Cell Environ, 33 (10): 1641–1655
- Qiu YL (2002). Study on rapid propagation of *Zenia insignis* in vitro. China For Sci Technol, (06): 14–16(in Chinese) [邱运亮(2002). 翅荚木试管苗快速繁殖技术的研究. 林业科技开发, (06): 14–16]
- Qiu YL, Kan WJ (1992). Tissue culture of *Zenia insignis*. Plant Physiol Comm, (06): 434–435 (in Chinese) [邱运亮, 阚文靖(1992). 翅荚木的组织培养. 植物生理学通讯, (06): 434–435]
- Tan SM, Chen LB, Meng JH (1982). The excellent tree species of mountain stone-*Zenia insignis* Chun. Guangxi For Sci Technol Mat, (01): 22–27 (in Chinese) [覃尚民, 陈乐榜, 蒙金甫(1982). 石山绿化优良树种——任豆树. 广西林业科技资料, (01): 22–27]
- Tan YR, Jiang GM, Cen ZY, Chen YS, Lan CJ (2008). Study on seed germination characteristics of pioneer tree species in Karst. Seed, (12): 15–21 (in Chinese) [覃勇荣, 蒋光敏, 岑忠用, 陈燕师, 蓝崇钰(2008). 喀斯特地区造林先锋树种任豆种子萌发特性的比较研究. 种子, (12): 15–21]
- Tang LF (1998). *Zenia insignis* Chun—a good tree species for planting and planting in limestone area. Guangdong Fore Sci Technol, 14 (3): 34–37 (in Chinese) [唐兰芳(1998). 任豆——石灰岩地区造林绿化好树种. 广东林业科技, 14 (3): 34–37]
- Tao M (2001). Studies on the abnormal embryoid and hypophydris shoot in tissue culture. Acta Bot Boreali-Occident Sin, 21: 1048–1058 (in Chinese with English abstract) [陶铭(2001). 组织培养中畸形胚状体及超度含水态苗的研究. 西北植物学报, 21: 1048–1058]
- Tisserat B, Murashige T (1977). Effects of ethephon, ethylene and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on asexual embryogenesis in vitro. Plant Physiol, 60: 437–439
- Tokuji Y, Kuriyama K (2003). Involvement of gibberellin and cytokinin in the formation of embryogenic cell clumps in carrot (*Daucus carota*). Plant Physiol, 160: 133–141
- Wu ZY (1991). The areal-types of Chinese genera of seed plants. Acta Bot Yunnanica, 13 (S4): 1–3 (in Chinese with English abstract) [吴征镒(1991). 中国种子植物属的分布区类型. 云南植物研究, 13 (S4): 1–3]
- Yuan DY, Zhou F, He XY, Shuai B, Long HX (2010). Study on tissue culture and rapid propagation in *Zenia insignis*. J Ctr South Univ Forest & Tech, (06): 60–63 (in Chinese with English abstract) [袁德义, 邹锋, 何小勇, 帅波, 龙洪旭(2010). 翅荚木组培快繁技术的研究. 中南林业科技大学学报, (06): 60–63]
- Zhang TY, Yao XM (2009). Study on callus induction of *Zenia insignis*. Forest Invest Design, (02): 78–81 (in Chinese) [张天宇, 姚湘明(2009). 翅荚木愈伤组织的诱导研究. 林业勘察设计, (02): 78–81]
- Zhao X, Liu J, Xia X, Chu J, Wei Y, Shi S, Chang E, Yin W, Jiang Z (2014). The evaluation of heavy metal accumulation and application of a comprehensive bio-concentration index for woody species on contaminated sites in Hunan, China. Environ Sci Pollut Res Int, 21 (7): 5076–5085
- Zheng WJ (1985). Chinese Journal of Tree. 2nd ed. Beijing: China Forestry Publishing House, 15–16 (in Chinese) [郑万钧(1985).

中国树木志. 第2版. 北京: 中国林业出版社, 15–16]
Zhou JY, Guo FX (1996). Actions of cytokinins and cytokinin-like substances in somatic embryogenesis of plant. *Plant Physiol*

Comm, 32: 247–253 (in Chinese) [周俊彦, 郭扶兴(1996). 细胞分裂素类物质在植物体细胞胚发生中的作用. *植物生理学通讯*, 32: 247–253]

Callus induction and plant regeneration from the leaf of *Zenia insignis*

ZHOU Yu-Qing¹, ZHANG Jun-Jie¹, WEI Xue-Fen¹, LI Jing-Jiang¹, LI Pei¹, CHEN Xiao-Yang^{1,2,*}

¹Guangdong Key Laboratory for Innovative Development and Utilization of Forest Plant Germplasm, ²College of Forestry and Landscape Architecture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

Abstract: In order to establish the regeneration system of *Zenia insignis*, the seeds were selected as experimental materials, and the sterilization effects were compared by different disinfection methods. The effects of different ratio of plant growth regulators on callus induction, adventitious bud induction and rooting culture were studied with leaves as explants and MS as media. The results showed that seeds with 1% mercuric chloride for 10 min, obtained the highest rate of aseptic seedling. The optimum medium proportion of callus induction was MS+2 mg·L⁻¹ 6-BA+0.01 mg·L⁻¹ IBA+0.01 mg·L⁻¹ 2,4-D, and the induction rate was 82.88%. 6-BA plays a key role in the adventitious bud induction and the best medium for adventitious bud induction was MS+0.01 mg·L⁻¹ IBA+3.2 mg·L⁻¹ 6-BA. Auxin has an important effect on the rooting, the medium of MS+0.1 mg·L⁻¹ NAA for rooting could get the rooting rate of 98.23%.

Key words: *Zenia insignis*; callus; regeneration system

Received 2017-04-20 Accepted 2017-08-16

This work was supported by the “863” Program of the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 2011AA10020203).

*Corresponding author (E-mail: xychen@scau.edu.cn).