

国槐植株再生技术研究

袁秀云, 张仙云, 马杰, 桑慧敏 (郑州师范高等专科学校生物技术研究, 河南郑州 450044)

摘要 [目的] 筛选国槐组织培养的最佳培养基, 建立国槐植株再生体系。[方法] 将灭过菌的国槐种子分别接种到 4 种无菌苗诱导培养基上, 待苗长出 2~4 片真叶时, 将叶、下胚轴、子叶分别接种于 4 种愈伤组织诱导培养基上, 然后将子叶产生的愈伤组织分别接种在 2 种芽分化培养基中, 再将继代培养获得的有效苗转入生根培养基, 对国槐种子进行无菌苗萌发和植株再生的研究。[结果] 培养基的激素配比对种子萌发的影响不大; 6-BA 能促进愈伤组织的产生; 最适宜的胚状体诱导培养基为 MS+2.0 mg/L 6-BA +0.2 mg/L NAA +0.5 mg/L KT; 芽诱导培养基 MS+6-1.0 mg/L BA+0.1 mg/L NAA; 生根培养基为 1/2 MS+0.3 mg/L NAA, 活性炭不利于国槐的生根培养。[结论] 种子的萌发率与国槐的种子质量有关, 与培养基的种类关系不大。子叶最适合诱导愈伤组织。

关键词 国槐; 组织培养; 愈伤组织

中图分类号 Q813.72 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2007)35-11418-02

Research on Tissue Culture and Regeneration Technology of *Sophora japonica*

YUAN Xiu-yun et al (Institute of Biology Technology, Zhengzhou Teacher's College, Zhengzhou, Henan 450044)

Abstract [Objective] The study aimed to screen out the optimum media for the tissue culture of *Sophora japonica* and set up its plant regeneration system. [Method] The sterilized *S. japonica* seeds were inoculated resp. on 4 kinds of induction media for inducing asepsis seedling, till the seedlings grew out 2~4 leaves, the leaves, hypocotyl and cotyledon were inoculated resp. on 4 kinds of induction media for inducing callus, then the callus grown out from cotyledon were inoculated resp. on 2 kinds of bud differentiation media, finally the effective seedlings obtained through subculture were transplanted into rooting media so as to study the asepsis seedlings germination and plant regeneration of *S. japonica* seeds. [Result] The hormone matching of media had little influence on seed germination. 6-BA could promote the production of callus. The most suitable induction media was MS+2.0 mg/L 6-BA +0.2 mg/L NAA +0.5 mg/L KT for somatic embryo, and MS+6-1.0 mg/L BA +0.1 mg/L NAA for bud. The rooting media was 1/2 MS+0.3 mg/L NAA. Active carbon went against the rooting culture of *S. japonica*. [Conclusion] The seed germination rate relates to seed quality of *S. japonica* and has little correlation with the kinds of media. Cotyledon was most suitable for inducing callus.

Key words *Sophora japonica*; Tissue culture; Callus

国槐(*Sophora japonica* L.)是蝶形花科(Papilionoideae)槐属(*Sophora*)植物, 别名家槐、中国槐。国槐经济价值高, 是我国北方城市广泛应用的行道树和庭荫树, 也是目前嫁接龙爪槐、金枝槐等观赏品种的唯一砧木树种, 应用前景十分广阔。但国槐容易受槐蚜、朱砂叶螨、槐尺蛾、锈色粒肩天牛等病虫害危害, 常用的防治方法是人工防治和化学药剂防治, 但浪费大量的人力和物力, 并且易造成环境污染。因此, 利用生物工程技术培养抗虫国槐是很必要的。利用生物技术研究抗虫国槐的前提是国槐的组织培养和植物再生体系的建立, 而目前关于国槐组织培养和植株再生的研究还未见报道, 为此, 笔者对此进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料 2005 年 11 月采集郑州市大学路行道树国槐的种子。

1.2 方法

1.2.1 材料处理。将采到的国槐果实泡软将种子剥出, 用流水冲洗种子数小时, 备用。

1.2.2 培养基及培养条件。所有培养基均加入蔗糖 3.0%, 琼脂 7.5%。培养基类型见表 1, pH 值 5.8~6.0, 培养温度 (25±2)℃, 光照度 2 000 lx, 每天光照 12 h。

1.2.3 无菌苗诱导。将洗净的种子在超净工作台上, 用无菌水漂洗 2~3 次, 用浓度 75.0% 酒精浸泡 30 s, 用无菌水漂洗 2~3 次, 再用浓度 0.1% 升汞灭菌 10 min, 用无菌水漂洗 2~3 次。然后将灭过菌的种子分别播入 1、2、3 和 4 号培养基上进行培养。

1.2.4 愈伤分化诱导。待苗长出 2~4 片真叶时, 分别将叶、

作者简介 袁秀云(1970-), 女, 河南许昌人, 在读博士, 副教授, 从事植物学教学和植物生物技术研究。

收稿日期 2007-07-24

表 1 培养基的类型介绍

名称	序号	组成
无菌苗诱导培养基	1	MS+ 6-BA 5.0 mg/L +NAA 0.5 mg/L
	2	MS+6-BA 3.0 mg/L +NAA 2.0 mg/L
	3	1/4 MS+6-BA 5.0 mg/L +NAA 0.5 mg/L
	4	1/4 MS+6-BA 3.0 mg/L +NAA 2.0 mg/L
愈伤分化培养基	5	MS+6-BA 1.0 mg/L +NAA 0.2 mg/L
	6	MS+6-BA 1.0 mg/L +NAA 0.2 mg/L + KT 0.5 mg/L
	7	MS+6-BA 2.0 mg/L +NAA 0.2 mg/L
	8	MS+6-BA 2.0 mg/L +NAA 0.2 mg/L + KT 0.5 mg/L
芽分化培养基	9	MS+6-BA 1.0 mg/L +NAA 0.1 mg/L
	10	MS+6-BA 2.0 mg/L +NAA 0.2 mg/L
生根培养基	11	1/2 MS+NAA 0.3 mg/L
	12	1/2 MS+NAA 0.3 mg/L + AC(活性炭) 0.5 %

下胚轴、子叶分别切割接种于 5、6、7 和 8 号培养基上。

1.2.5 芽的诱导。将子叶产生的愈伤组织切割分别接种在 9、10 号培养基中进行培养进行培养。

1.2.6 生根培养。将继代培养获得的长 2 cm 以上的有效苗在超净工作台上无菌操作, 切割下来转入 11、12 号生根培养基上培养, 30 d 后统计生根率。

2 结果与分析

2.1 不同培养基对无菌苗诱导的影响 国槐种子在 4 种培养基上均能萌发, 萌发率均超过 40%, 培养 30 d 苗高 3~6 cm, 植株较壮, 颜色青绿(表 2)。通过观察分析可知, 不萌发的种子往往较小, 干瘪, 将其剖开, 发现胚的发育不良, 子叶很小, 经过 30 d 的培养, 子叶并未展开, 因此推测国槐在不同培养基上的萌发状况与种子的质量有关, 而与培养基关系不大。

表 2 不同培养基对国槐萌发的影响

培养基	发芽率/%	苗高/cm	真叶/片
1 号	45	2~4	4
2 号	50	3~6	4
3 号	40	2~4	3
4 号	42	2~4	3

2.2 不同培养基对国槐器官愈伤组织诱导的影响 在 7、8 号培养基上,国槐的子叶在 7 d 时开始出现愈伤组织,在 22 d 时,有 75 %以上出现愈伤组织,愈伤组织致密,色绿;而叶和下胚轴在 15 d 时出现愈伤组织,但愈伤组织疏松,色黄,30 d 时黄白色或死亡。在 5、6 号培养基上,各种器官出现愈伤组织较晚,子叶、下胚轴和叶的愈伤组织与前二者相同(表 3)。由此可知,就器官而言,子叶最适合诱导愈伤组织,叶和下胚轴均不适合;就激素配比对愈伤组织诱导的影响来说,6-BA 能促进愈伤组织的产生,KT 对愈伤组织的诱导影响不及 6-BA。

表 3 不同培养基对国槐器官愈伤组织诱导的影响		
培养基	器官	愈伤组织诱导结果
5 号	子叶	10 d 有 50 %出现愈伤组织,22 d 有 75 %出现愈伤组织,愈伤组织直径约 1.5 cm,较密,色绿
	叶	20 d 出现愈伤组织,色绿,30 d 时愈伤组织没有生长
	下胚轴	10 d 出现愈伤组织,疏松,色黄,30 d 愈伤组织死亡
6 号	子叶	10 d 有 50 %出现愈伤组织,22 d 有 75 %出现愈伤组织,愈伤组织直径约 1.0 cm,较密,色绿
	叶	15 d 出现愈伤组织,色绿,30 d 时愈伤组织没有生长
	下胚轴	7 d 出现愈伤组织,疏松,色黄,30 d 愈伤组织黄白色
7 号	子叶	7 d 出现愈伤组织,22 d 有 90 %出现愈伤组织,愈伤组织直径约 1.5 cm,较密,色绿
	叶	15 d 出现愈伤组织,色绿,30 d 时愈伤组织没有生长
	下胚轴	7 d 出现愈伤组织,疏松,色黄,30 d 时愈伤组织黄白色
8 号	子叶	7 d 出现愈伤组织,22 d 有 100 %出现愈伤组织,愈伤组织直径约 1.5 cm,致密,色绿
	叶	15 d 出现愈伤组织,色绿,30 d 时愈伤组织没有生长
	下胚轴	7 d 出现愈伤组织,疏松,色黄,30 d 时愈伤组织黄白色

2.3 不同培养基对国槐愈伤组织继代培养及胚状体芽诱导的影响 由于下胚轴的愈伤组织疏松,色黄,在 30 d 时愈伤组织死亡;叶的愈伤组织诱导比较慢,且生长缓慢,所以在愈伤诱导 30 d 时将子叶获得的愈伤组织分别接种在 5、6、7、8 号培养基上进行继代培养及胚状体诱导,在各种培养基上,培养 28 d 时愈伤组织均出现胚状体,胚状体的诱导率分别为 4.0 %、4.4 %、8.0 %、8.3 %,7、8 号培养基上的胚状体稍多,且 36 d 时有些胚状体已经长出小芽(表 4)。可见子叶的愈伤组织很容易产生胚状体及芽的分化,且 6-BA

和 KT 均能促进胚状体的产生。

表 4 不同培养基对国槐愈伤组织胚状体诱导率的影响			
培养基	接种数//块	诱导数//个	诱导率//%
5 号	5	20	4.0
6 号	5	22	4.4
7 号	6	48	8.0
8 号	6	50	8.3

2.4 不同培养基对国槐幼苗生长的影响 将国槐高约 1.0 cm 的诱导芽移入 9、10 号培养基上进行培养,在 9 号培养基上芽生长较快,35 d 时形成高约 4.5 cm 的无根苗,50 d 时苗高约 6.0 cm;而在 10 号培养基上的芽生长缓慢,35 d 时约 1.5 cm。这说明 6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L 的配比比较适合国槐芽的生长,而 6-BA 和 NAA 含量高时反而不利于芽的生长;9、10 号培养基均不诱导生根。

2.5 不同培养基对国槐生根的影响 将国槐无根苗分别接种在 11、12 号培养基上,30 d 时观察发现两种培养基均能促使国槐无根幼苗生根,生根率分别为 60 %和 33 %,活性炭对生根有一定的抑制作用(表 5)。

表 5 不同培养基对国槐生根的影响			
培养基	接种数//棵	生根数//棵	生根率//%
11 号	10	6	60
12 号	12	4	33

3 结论与讨论

该试验结果表明,种子的萌发率与国槐的种子质量有关,而与培养基的种类关系不大。一般而言,在适宜的条件下,国槐种子通过水培就能发芽,在培养基条件下,各种激素可能起到促进种子萌发的作用;子叶最适宜产生愈伤组织,而叶、下胚轴不适合进行愈伤组织的诱导;MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L 的激素配比比较适合对国槐子叶进行愈伤组织的诱导,加 0.5 mg/L 的 KT 效果更好;活性炭对防止植株褐变具有一定作用^[1],但在该试验中活性炭不利于国槐幼苗的生根。

参考文献

[1] 郑文静,赵海岩,杨国立.植物组织培养操作过程中的常见问题及其解决办法[J].辽宁农业科技,2001(2):49-51.

长抑制的研究[J].莱阳农学院学报:自然科学版,2006,23(4):326-329.

[23] DOWD P F,ZUO W N,GILLIKIN JW,et al.Enhanced resistance to Helicoverpa zea in tobacco expressing an activated form of maize ribosome-inactivating protein[J].J Agric Food Chem,2003,51(12):3568-3574.

[24] KIM J K,JANG I C,WU R,et al.Co-expression of a modified Maize ribosome inactivating protein and a rice basic chitinase gene in transgenic rice plants confers enhanced resistance to sheath blight[J].Transgenic Res,2003,12(4):475-484.

(上接第 11417 页)

L.][J].Plant physiol,1995,107(2):661-662.

[19] HEY T D,HARTLEY M,WALSH T A.Maize ribosome-inactivating protein(b-32)[J].Plant physiol,1995,107:1323-1332.

[20] BASS H W,WEBSTER C,OBRIAN G R,et al.A Maize ribosome-inactivating protein is controlled by the transcriptional activator Opaque-2[J].Plant cell,1992(4):225-234.

[21] 范琦,高晓蓉,李文利,等.玉米核糖体失活蛋白基因的克隆及序列分析[J].生物工程学报,2000,16(4):457-460.

[22] 郭燕郊,王静云,王林华,等.玉米核糖体失活蛋白对 3 种微生物生

GB/T 7714-2005

专利文献著录格式

专利申请者或所有者.专利题名:专利国别,专利号[文献类型标志].公告日期或公开日期[引用日期].获取和访问路径.

示例:

[1] 姜锡洲.一种温热外敷制备方案:中国,88105607.3[P].1989-07-26.

[2] 西安电子科技大学.光折变自适应光外差探测方法:中国,01128777.2[P/OL].2002-03-06[2002-05-28].<http://211.152.9.47/sipoasp/zljs/hyjs-yx-new.asp?recid=01128777.2&leixin=0>.

[3] TACHIBANA R,SHIMIZU S,KOBAYASHI S,et al. Electronic watermarking method and system:US,6,915,001[P/OL]. 2002-04-25[2002-05-28]. [http://patft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser? Sect1=PTO2&Sect2=HITOFF&p=1&u=/netahrml/search-bool.html &r=1&f=G&l=50&col=AND&d=ptxt&sl='Electronic+watermarking+method+system'. TTL&OS=TTL](http://patft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect1=PTO2&Sect2=HITOFF&p=1&u=/netahrml/search-bool.html&r=1&f=G&l=50&col=AND&d=ptxt&sl='Electronic+watermarking+method+system'. TTL&OS=TTL).