

香花槐的组织培养研究

王秋竹¹, 杨国会²

(1. 吉林农业科技学院生物工程学院, 吉林 132101; 2. 吉林农业科技学院教务处, 吉林 132101)

摘要:对香花槐进行组织培养试验, 结果显示: 外植体诱导培养基采用 MS + BA1.0 mg/L + NAA0.05 mg/L, 可获得 70% 的萌发率; 继代培养基采用 MS + BA0.5 mg/L + NAA0.04mg/L, 增殖系数和生长系数都较高; 生根培养基为大量元素减半的 MS + NAA0.5mg/L, 其中蔗糖 15g/L, 生根率达 100%。

关键词:香花槐; 组织培养; 快速繁殖

中图分类号:Q949.751 **文献标识码:**A

Research on the Tissue Culture of *Robinia pseudoacacia cv. idaho*

WAGN Qiuzhu¹, YANG Guohui²

(1. Jilin Agricultural Science and Technology College Department of Bioengineering, Jilin 132101, China;

2. Jilin Agricultural Science and Technology College Department of Teaching Administration, Jilin 132101, China)

Abstract: By test on the tissue culture of *Robinia Pseudoacacia cv. idaho*, The result shows: The suitable culture medium for the initiation of explants is MS + BA1.0 mg/L + NAA0.05 mg/L, and through which can get 70% germination rate; The suitable continue culture medium is MS + BA0.5 mg/L + NAA0.04mg/L, and through which the breeding coefficient and growing coefficient are all high; The suitable rooting medium is 1/2MS + NAA0.5mg/L, with sugar 15g/L, and can get 100% germination rate.

Key words: *Robinia pseudoacacia cv. idaho*; tissue culture; rapid propagation

香花槐 (*Robinia pseudoacacia cv. idaho*) 为豆科落叶乔木, 原产于西班牙, 是一种由中国林业科学院引入我国的园林绿化香花树种。其树态苍劲挺拔, 叶片绿色美观对称, 花粉红色, 有浓郁芳香, 花量大, 在东北每年五月、七月两次开花, 黄河以南三次开花, 长江以南春夏秋连续开花, 是城乡园林、道路、风景区等各种园林绿地的绿化珍品^[1]。但该树种无荚果不结种子, 一般常用剪切根段进行无性繁殖, 这种繁殖方法扩繁速度慢, 受季节限制, 产苗数量有限, 效率低, 远远不能满足市场的需求。如采用植物组织培养技术进行繁殖, 可大大提高苗木的繁殖速度。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以香花槐带芽茎段为外植体。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的处理 首先将采来的枝条用洗衣粉水刷洗干净, 将其截成带芽茎段, 再用流水冲洗 20min, 然后置于超净工作台上进行表面消毒, 即 70% 的酒精漂洗 30s, 无菌蒸馏水冲洗 2-3 次, 再用 0.1% 的升汞浸洗 8min, 最后无菌蒸馏水冲洗 3 次。

1.2.2 启动培养 经过表面消毒的外植体, 要用镊子剥去鳞片和部分幼叶, 再用手术刀切取含生长点的部分, 接入启动培养基中。启动培养基为 MS + BA0.5 - 1.0mg/L (单位下同) + NAA0.05 - 0.1, 蔗糖 3%, 琼脂 0.4%, pH = 5.8。培养室温度保持 25℃, 光照 12h/d, 光照强度 2 000lx (培养条件下同)。30d 后统计萌发情况。

1.2.3 继代培养 对香花槐试管苗茎段作继代培养, 25d 继代一次 (培养条件同上)。统计指标有: ①愈伤组织大小; ②增殖系数 = 增殖后的丛生芽数/原

收稿日期: 2008-04-07

作者简介: 王秋竹 (1978-), 女, 汉族, 吉林省长春市人, 助教, 沈阳农业大学在读研究生, 从事遗传育种教学工作。

接种丛生芽数;③生长系数 = 生长平均总量/原接种茎段平均长度。培养基设计:以 MS 培养基为基本培养基,蔗糖 3%,琼脂 0.4%,pH = 5.8,①MS + BA0.5 + IAA0.02 - 0.06;②MS + BA0.5 + NAA0.02 - 0.06。

1.2.4 生根与移栽 取具有一定粗度和高度的香花槐茎段或嫩梢,多保留一些叶片,进行生根培养,比较不同培养基对生根的影响。待根长 1cm 左右,具有 4、5 条根时,先进行 2~3d 的瓶内炼苗,然后从瓶中取出生根小苗,洗去其根部附着的培养基。洗净后将小苗移栽至 0.1% 高锰酸钾消过毒的蛭石 + 珍珠岩(二者比例 1:1)介质内,温度 20~

25℃,湿度 100%,遮荫。一周后,逐渐见光、放风,20d 后移至土壤栽培。

生根培养基:

E 为大量元素减半的 MS + N AA0.5,蔗糖 3%,琼脂 0.4%,pH = 5.8;

F 为大量元素减半的 MS + N AA 0.5,蔗糖 1.5%,琼脂 0.4%,pH = 5.8;

G 为 1/2MS + NAA 0.5,蔗糖 1.5%,琼脂 0.4%,pH = 5.8。

2 结果与分析

2.1 启动培养 见表 1。

表 1 不同启动培养基的诱导情况

培养基 序号	MS 培养基 +		萌发率 (%)	诱导情况
	BA	NAA		
A	0.5	0.05	62	少量愈伤组织形成,从基部萌发较多芽点
B	0.5	0.1	56	有较多愈伤组织形成,产生少量芽点
C	1.0	0.05	70	少量愈伤组织形成,从基部萌发较多芽点
D	1.0	0.1	43	较多愈伤组织形成,产生少量芽点

由表 1 可以看出,培养基 C 的诱导率最高,为最佳启动培养基。在试验观察中发现,NAA 含量较高的培养基中,培养物上生长的愈伤组织块也较大,不利于芽的诱导和生长,而且控制愈伤组织的量可以防止培养物发生变异。

2.2 愈伤组织的生长

将香花槐试管苗茎段移入新培养基中,5d 后可见其基部形成一薄层愈伤组织,之后愈伤组织生长速度加快,培养三个星期后小苗与愈伤组织的生长势均下降,部分苗开始黄萎落叶。在继代 20d 时按愈伤组织面积大小分组,并统计各组次数,见表 2。

表 2 不同继代培养基对香花槐愈伤组织生长的影响

培养基 序号	MS 培养基 +			20d 时愈伤组织面积的相对次数 (%)		
	BA	IAA	NAA	大	中	小
1	0.5			30	45	25
2	0.5	0.02		57	43	0
3	0.5	0.04		53	47	0
4	0.5	0.06		51	49	0
5	0.5		0.02	39	51	10
6	0.5		0.04	40	56	4
7	0.5		0.06	46	49	5

注:愈伤组织面积大:1.4cm(单位下同) × 1.4 以上,中:0.7 × 0.7 ~ 1.4 × 1.4,小:0.7 × 0.7 以下。

从表 2 可以看出,香花槐的愈伤组织生长旺盛,几乎所有植株都形成大块的愈伤组织,生长素可以促进香花槐愈伤组织的生成和增大。在 IAA 和 NAA 两种生长素中,IAA 的促进作用更为明显。试验中发现中等大小的愈伤组织分化丛生芽的能力最强,愈伤组织过大或过小都会影响丛生芽的

分化。过大时由于本身吸收大量营养而减少芽对养分的吸收,导致增殖系数降低;过小时会阻断苗对养分的吸收,导致苗老化。因此,继代培养时要选用适当种类的生长素及适宜的浓度,这里 6 号组合较适宜。

2.3 嫩茎的生长系数

由于香花槐嫩茎从基部产生丛生芽的能力较弱,单靠丛生芽繁殖无法满足生产的需要,但经培养的香花槐小植株有一定高度,所以可截取香花

槐茎段用于扩繁培养。取无分枝、高度相近的香花槐嫩梢进行培养,第 20d 时测量嫩梢高度,见表 3。

表 3 不同继代培养基对香花槐生长系数的影响

培养基 序号	MS 培养基 +		生长平均总量 (cm)	原平均长度 (cm)	生长 系数
	BA	NAA			
5	0.5	0.02	4.9	2.1	2.33
6	0.5	0.04	5.8	1.9	3.05
7	0.5	0.06	4.2	2.0	2.10

注:植株高度以培养基以上部分计算。

由表 2 可见,在 6 号培养基上茎段生长系数最大,而 7 号最小。用茎段繁殖时较高的植株可多截几段,通常 2~3 段。这里 6 号培养基生长系数较高。

2.4 嫩茎的增殖系数

选择无分枝、粗度相近的香花槐嫩茎继代培养,每 6d 进行一次生长点(含基部丛生芽和腋芽)计数,见表 4。

表 4 不同激素组合对香花槐增殖系数的影响

培养基 序号	MS 培养基 + BA0.5 +		增殖系数		
	IAA	NAA	12d	18d	24d
1			1.7	3.0	3.4
2	0.02		2.7	4.0	4.3
3	0.04		2.0	3.9	4.4
5		0.02	2.5	3.5	4.0
6		0.04	2.4	3.6	4.3

转接后第 6d 观察,嫩梢已经开始生长,少数植株有基部丛生芽产生。总体看来 3 号培养基的增殖效果很好,但基部丛生芽较少,腋芽较多。由于腋芽小而细弱,增殖率低,所以继代培养时不宜采用 3 号组合。2 号和 6 号培养基的增殖效果相

近。但上面提过 IAA 促进愈伤组织生长而降低了植株对养分的吸收,因此,选择加 NAA 的 6 号组合更好。

2.5 香花槐的生根 见表 5。

表 5 不同生根培养基对香花槐生根的作用

培养基 序号	基本培养基	NAA (mg/L)	蔗糖 (g/L)	生根株数		生根率 (%)	生根量 (条)
				10d	15d		
E	大量元素减半的 MS	0.5	30	3	13	46	1~2
F	大量元素减半的 MS	0.5	15	22	28	100	3~6
G	1/2MS	0.5	15	16	24	86	2~4

由表 5 可知,F 培养基的生根效果最好,生根率高,生根早,根量多;E 培养基效果最差。培养基中蔗糖的量对香花槐生根影响很大。蔗糖量大时,渗透压较高,抑制根系形成;蔗糖量减半后,渗透压降低,根系易于形成。

3 结论与讨论

3.1 无根苗的形成

综上所述,香花槐最适宜的培养基为:(1)启动培养基 MS + BA1.0 + NAA0.05,可获得 70% 的萌发率;(2)继代培养基 MS + BA0.5 + NAA0.04,增殖系数和生长系数都较高;继代培养中,细胞分裂素和生长素配比不当会造成小苗不生长,同时还会出现大量松软的愈伤组织。如适当降低激素浓度,特别是 IAA 的浓度,对愈伤组织的控制以及

无根苗的生长均有良好作用^[3]。

3.2 玻璃苗问题

试管植物的玻璃化现象是普遍存在的, 现已有数百种植物的试管苗出现玻璃化现象。香花槐玻璃苗植株矮小, 颜色淡绿, 叶厚卷曲, 水晶透明或半透明, 水浸状, 组织极易破碎, 整株肿胀, 基部愈伤组织膨大, 肥厚, 结构疏松。Bottcher 等认为培养容器中的相对湿度是引起玻璃化的主要原因。本实验也证实了这一点, 湿度过大、水分过多是造成香花槐玻璃苗产生的主要因素。培养中如用塑料膜封瓶口, 瓶内湿度极大, 玻璃化现象严重; 而用棉塞的三角瓶中, 仅个别植株出现玻璃化现象。因此培养时需尽量降低瓶内湿度, 如使用透气膜或棉塞。此外避免过高的培养温度, 适当降低细胞分裂素的浓度, 减少继代培养次数等也可以降低香花槐产生玻璃苗的比率^[4]。

3.3 试管苗的生根

生根是木本植物组织培养成败的关键环节^[5]。将香花槐的无根幼芽转接到大量元素减半的 MS + NAA0.5 的生根培养基中, 其中蔗糖 15g/L, 7 ~ 8d 可

以观察到茎段基部的愈伤组织上有白色突起, 随后长成白色可见的根, 生根率 100%。据文献报道, 一些木本植物不定根发生在外部形态有两种形式, 一种是直接从茎的基部伸出, 另一种是愈伤组织生根。赵蓬晖认为愈伤组织生根形式由于不定根的维管组织未能和茎的维管系统沟通, 导致移栽成活率低^[6]。香花槐在培养中愈伤组织发生过多, 其不定根在突破茎皮层之前, 维管组织是否与茎的维管系统相连接, 有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 梁山. 香花槐的经济价值及发展前景[J]. 林业科技, 2001(5): 52 ~ 53.
- [2] 相彦广. 园林绿化好树种香花槐[J]. 中国林业, 2006(15): 35.
- [3] 李世承. 香花槐组织培养及快速无性繁殖[J]. 辽宁大学学报, 2002, 29(2): 159 ~ 163.
- [4] 赵蓬晖等. 植物组织培养中的几个常见问题与对策[J]. 河南林业科技, 2001, 21(2): 67 ~ 68.
- [5] 任东岁等. 毛刺槐试管无性系的建立[J]. 塔里木农垦大学学报, 2000, 12(1): 82 ~ 84.
- [6] 廖康. 葡萄试管苗不定根发生发育的组织学和细胞学研究[J]. 新疆大学学报, 1997(3): 37 ~ 41.

(上接第 11 页)

3.1.2 退火温度 退火温度同样也影响扩增结果, 当退火温度较低时, 引物会与模板上的其它相似区域相结合, 导致多条扩增带出现; 而退火温度越高越容易获得产物的特异性。本实验分别选用了 48℃、50℃、52℃ 为退火温度进行扩增, 最终得出最佳退火温度为 50℃。

3.2 质粒 DNA 提取的注意事项

3.2.1 活化菌液至对数晚期, 本实验活化 15h, 时间过长菌株浓度变小。而且摇菌时, LB 液体培养基占容器的体积不要超过 2/3, 液体太多, 活化效果不好。

3.2.2 提质粒用的溶液 I 4℃ 保存, 溶液 II、溶液 III 均应 -20℃ 保存, 而且加入溶液 III 后切忌剧烈振荡, 防止质粒 DNA 断裂。

3.2.3 本实验过程中多次静止放置选用室温, 主要是防止盐沉淀, 因为大量提取质粒, 盐离子杂质对所提质粒质量影响很大。

3.2.4 用无水乙醇沉淀 DNA 时, 加入 2 倍体积的

无水乙醇, 沉淀效果不是很好, 可提高至 2.5 倍体积。而且沉淀时间不宜过长, 时间太久相应的杂质也会增加, 一般沉淀 1 ~ 2h。

3.2.5 在去除 RNA 的步骤中, 加入 RNase A (终浓度为 2μL/mg), 未彻底去除 RNA, 故在酶切质粒时, 体系中须加入适量 RNase A 纯化质粒, 为进一步连接做准备。

3.3 连接体系的调整

连接体系最关键, 一般体系中加入载体 DNA 和目的片段的比例为 1:3 ~ 10。本实验中, 由于获得的目的片段浓度很高, 加入 4μL 目的片段和 1μL 载体 DNA。

参考文献:

- [1] Yuri T. Yamamoto, Christopher G. Taylor, Chi - Lien Cheng, and Mark A. Conkling(1991). Characterization of cis - Acting Sequences Regulating Root - Specific Gene Expression in Tobacco[J]. The Plant Cell, 1991(3): 371 ~ 382.