维普资讯 http://www.cqvip.com

香花槐花器官的组织培养及植株再生研究

王玲仙[1]，谢吉容[2]，付　坚[1]，殷富有[1]，黄兴奇[1]

(1.云南省农业科学院 生物技术与种质资源研究所，云南 昆明 650223；2.重庆文理学院 生命科学系，四川 重庆 402168)

摘　要：采用香花槐的花器官做外植体，进行组织培养和植株再生系统的研究。结果表明：2,4-D对于香花槐愈伤诱导的启动是必需的，而多种激素配比会使诱导率提高；选择浓度为0.3～0.5 mg/L的BA和浓度为0.1 mg/L的NAA配合使用，能使花药愈伤达到较高分化率；1/2MS+IBA 0.05 mg/L和1/2MS+IBA 1.0 mg/L的诱导组培苗生根效果较好。

关键词：香花槐；花药培养；再生植株；愈伤组织

中图分类号：S 685.03　**文献标识码**：A　**文章编号**：1001－0009(2008)01－0191－03

香花槐(*Robinia idaho*)又名富贵树，蝶形花科，刺槐属的落叶小乔木，奇数羽状复叶，小叶互生，全缘，每年开花2次，花为粉红色，有香味，较抗寒，具抗病虫害、抗污染等优点，根系发达，固氮能力强，能在较贫瘠的土壤上生长，是目前城市、山区绿化、美化及净化环境和改善生态环境的优良树种。香花槐无种子，繁殖多用扦插或埋根法，此法速度慢，效率低。而香花槐的组织培养，通常采用香花槐茎段、腋芽、幼叶、茎尖等为外植体建立植株再生系统[1-6]。虽然在毛刺槐花药培养上有初步研究[7-8]，但关于香花槐用花器官培养方面的研究尚未见报道。此研究用香花槐的花器官作为外植体进行比较，探讨了不同激素诱导花器官愈伤组织和再生植株的形成，的影响[7-8]，试验发现不同外植体对培养条件的反应不一致。

第一作者简介：王玲仙(1964-)，女，云南昆明人，助理研究员，主要从事花卉基因工程研究。E-mail：wanglingxian2001@yahoo.com。

通讯作者：黄兴奇。E-mail：xingqih@hotmail.com。

基金项目：云南省农业科技攻关资助项目(2006NG34)。

收稿日期：2007－08－23

参考文献

[1] Hiei Y, Ohta S, Toriyama K, et al. Efficient transformation of rice mediated by Agrobacterium and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA [J]. Plant J, 1994(6): 271-282.

[2] Aldemita R R, Hodges T K. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of Japanica and indica rice varieties[J]. Planta, 1996, 199: 612-617.

[3] Rashid H, Yoka S, Toriyama K et al. Transgenic plant production mediated by Agrobacterium in indica rice[J]. Plant Cell Rep. 1996, 15: 727-730.

[4] Hidaka T, Omura M, Ugaki M, et al. Agrobacterium-mediated transformation and regeneration of itrus spp. From suspension cells[J]. Japan J Breed, 1990, 40: 199-207.

[5] 郭卫东，沈向，李嘉瑞，等. 利用Lfy cDNA转化猕猴桃的研究[J]. 园艺学报，1999，26(2)：116-117.

[6] 毕静华，高月，刘永立，等. 阔叶猕猴桃抗生素敏感性及遗传转化的研究[J]. 核农学报，2006，20(4)：287-291.

[7] 王进茂，郑均宝，高秀丽，等. 花烛组织培养的研究[J]. 河北林果研究，2000(15)：69-74.

[8] Khalil S M, Cheah K T, Perez E A, et al. Regeneration of banana via secondary somatic embryogenesis[J]. Plant Cell Reports, 2002, 20(12): 1128-1134.

参考文献

Study on the Transformation System of *Actinidia* by *hpt* as Selection Gene

CHEN Xiao-ling[1], QIN Huan-ming[2], ZHOU Ling-yan[1], PAN Shao-ying[1], LUO Cui-huan[1], LIANG Hong[1]

(1. Zhongkai University of Agricultural and Technology, Guangdong, Guangzhou 510225, China; 2. College of Science and Technology, Jinan University, Guangdong, Guangzhou 510264, China)

Abstract: The leaf, petiole and stem of *Actinidia* was transformed by *Agrobacterium*-mediated which carry plasmid with *hpt* gene and the transformed plants were obtained. The results showed the optimal selective concentration of Hyg was 2 mg/L; light was suitable for pre-culture of leaf and it was no significant difference for petiole and stem to pre-culture under light and dark; the transformation efficiency of stem was significantly higher than leaf and petiole; most of transformation was proved to be positive by PCR.

Key words: *hpt*; Selection gene; *Actinidia*; Transformation

维普资讯 http://www.cqvip.com

为香花槐单倍体育种奠定了基础。

1　材料与方法

1.1　材料

3月下旬采摘东川公园的香花槐花蕾4℃短暂保存,用醋酸洋红染色检查花粉发育时期,选用花粉发育单核中期或晚期的花蕾作为供试材料。

1.2　方法

1.2.1　外植体消毒处理　将采摘的新鲜花蕾用自来水冲洗,吸干,70%乙醇洗5 s,放入0.1%$HgCl_2$ 7min,无菌水洗6遍,用滤纸充分吸干备用。

1.2.2　愈伤诱导　将花托、花瓣、子房、花药、花丝分别剥取接于①MS+6-BA 8 mg/L,②MS+6-BA 8 mg/L+NAA 0.1 mg/L,③MS+2,4-D 3 mg/L,④MS+2,4-D 3 mg/L+NAA 0.1 mg/L,⑤MS+2,4-D 2 mg/L+KT 0.5 mg/L,⑥MS+2,4-D 2 mg/L+KT 0.5 mg/L+6-BA 2 mg/L的培养基上诱导,置于光照培养箱中27℃,光强为1 000～2 000 lx,光照时间为10 h,观察愈伤组织的形成。

1.2.3　愈伤分化培养　将已诱导出的愈伤组织转接到不同浓度的细胞分裂素和生长素的培养基上进行丛生芽分化与增殖。需继代1次至MS+6-BA 0.3 mg/L+NAA 0.1 mg/L分化培养基中分化增殖。

1.2.4　小苗生根培养　20 d后丛生芽长至3～4 cm时,将单苗切下,转接到1/2MS+BA+NAA不同浓度配比的培养基上生根,其余丛生芽愈伤再接于分化培养基中分化。

2　结果与分析

2.1　不同激素浓度配比对花器官诱导愈伤组织的影响

在不同激素配比的MS培养基中诱导香花槐花不同部位的结果见表1:花托、花瓣在6种激素配比中均未诱导出愈伤,花药、花丝、子房在MS+6-BA 8 mg/L和MS+6-BA 8 mg/L+NAA 0.1 mg/L 2种激素配比中未诱导出愈伤,而在MS+2,4-D 3 mg/L+NAA 0.1 mg/L、MS+2,4-D 2 mg/L+KT 0.5 mg/L、MS+2,4-D 2 mg/L+KT 0.5 mg/L+6-BA 2 mg/L 3种加有2,4-D和其他激素的MS培养基中有少量愈伤。其中花丝在加有2,4-D的MS培养基中17d萌发出白点,愈伤诱导率在4%～5.5%之间;子房在加2,4-D的MS培养基中11d就有愈伤长出,诱导率在1%～17.5%之间;花药萌发率较低,在加2,4-D的培养基中18～25 d萌发,诱导率分别为5%～22.5%(图1)。另外,单一的2,4-D愈伤诱导率不高,2,4-D结合KT使愈伤诱导率增高,2,4-D、KT和BA 3种激素联合使用时,愈伤诱导率最高。由此可见,2,4-D对于香花槐愈伤诱导的启动是必需的,而多种激素配比会使诱导率提高。

表1　不同激素浓度配比对香花槐不同花器官诱导愈伤组织的影响

激素配比	花托/个		花瓣/个		花药/个		花丝/根		子房/个	
(mg·L^{-1})	接种数量	诱导率/%	接种数量	诱导率/%	接种数量	诱导率/%	接种数量	诱导率/%	接种数量	诱导率/%
6-BA 8	200	0	240	0	350	0	99	0	60	0
6-BA 8 + NAA 0.1	150	0	180	0	350	0	70	0	90	0
2,4-D 3	150	0	180	0	532	5	210	4	120	1
2,4-D 3 + NAA 0.1	200	0	120	0	480	11	210	4.3	120	2.5
2,4-D 2 + KT 0.5	150	0	180	0	240	16.6	360	5.1	240	9
2,4-D 2 + KT 0.5 + 6-BA 2	150	0	180	0	400	21.5	360	5.4	180	17.4

表2　激素对香花槐丛生芽分化与增殖的影响

组别	激素浓度 /mg·L^{-1}	接种愈伤数/个	分化苗/株	分化率/%
1	BA 8 + NAA 2.0	64	44	68.75
2	BA 5 + NAA 1.5	65	44	67.69
3	BA 2 + NAA 0.5	70	46	65
4	BA 1 + NAA 0.25	52	12	23
5	BA 0.5 + NAA 0.1	50	50	100
6	BA 0.3 + NAA 0.1	50	50	100

2.2　不同激素浓度对诱导丛生芽的分化与增殖

从表2可以看出,将3组花药愈伤组织分别接种于表2所示的1、2、3号培养基上,25 d时分化出不定芽,分化率平均达到67.38%,但在35 d后玻璃化苗严重;将另一组花药接种于4号培养基上,25 d时分化出不定芽,分化率达到80.76%,35 d后长成独立苗,但苗太弱;将另2组花药接种到5、6号培养基上,相同时间观察,苗分化率达到100%,不仅形成独立小苗,并且分化苗比较健壮(图1)。由此可以看出,激素浓度过高易形成玻璃苗,激素浓度太低不易形成丛生芽或需要太长时间,选择浓度为0.3～0.5 mg/L的BA和浓度为0.1 mg/L的NAA配合使用,能使花药愈伤达到较高分化率,既形成丛生芽,又分化出独立健壮小苗,分化的同时又不断地长出新的愈伤,愈伤蓬松、透明。继代1次,当小苗长至3～4 cm时将基部切下,待生根,余下的丛芽,愈伤继续置于继代培养基上分化增殖。

表3　不同浓度NAA、IBA对香花槐组培苗生根的影响

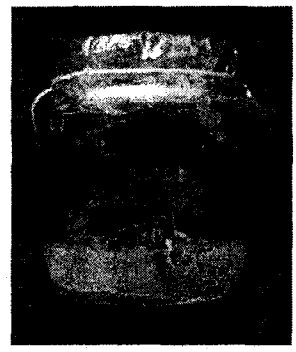
生长素	浓度/mg·L^{-1}	生根率/%	平均根长/cm	平均生根数/条
NAA	0	5.50	0.06	0.30
	0.05	31.25	0.15	1.50
	0.10	80.00	0.24	2.12
	0.50	16.43	0.38	0.70
	1.00	20.80	0.73	1.42
IBA	0.05	85.20	0.19	0.53
	0.20	71.40	0.3	1.31
	0.50	28.50	0.28	2.00
	1.00	90.10	0.23	1.75

维普资讯 http://www.cqvip.com

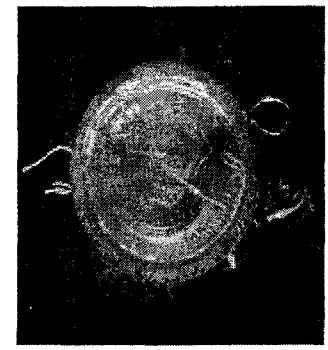
2.3 不同浓度NAA、IBA对香花槐生根的影响

1.3~1.8 cm的健壮分化香花槐单苗,置于含不同激素浓度配比的生根培养基上生根(表3),在1/2MS+NAA培养基上15 d后有根芽萌出,与NAA 0浓度相比在1/2MS+NAA 0.1 mg/L上的生根率为80%,在1/2MS+NAA 0. mg/L生根率次之,在1/2MS+NAA 0.5 mg/L和1/2MS+NAA 1.00 mg/L上的生根率太低。20 d后在1/2MS+IBA也有白芽萌出,与不加激素对比1/2MS+IBA 0.05 mg/L和1/2MS+IBA 0.2 mg/L生根率分别为85.2%和71.4%,1/2MS+IBA 1.0 mg/L生根率达到90.1%,从1/2MS+IBA的浓度梯度来看并没有什么规律,从1/2MS+NAA和1/2MS+IBA 2种激素的培养基配比得到的结果来分析,1/2MS+IBA 0.05 mg/L和1/2MS+IBA 1.0 mg/L的生根率较好,1/2MS+NAA 0.1 mg/L次之(图1)。这与曹小燕[7]等在槐树生根实验中的结果一致。

香花槐花药诱导愈伤



香花槐花药愈伤分化苗



香花槐组培苗生根

图1 香花槐花器官愈伤诱导、分化和生根培养

3 结论

采用香花槐的花器官做外植体,进行组织培养和植株再生系统的研究。结果发现花托和花瓣部分不适合用于愈伤诱导,花丝、花药和子房在2,4-D启动下能诱导出愈伤,而添加KT和IBA会使诱导率提高;选择浓度为0.3~0.5 mg/L的BA和浓度为0.1 mg/L的NAA配合使用,能使花药愈伤达到较高分化率;1/2MS+IBA 0.05 mg/L和1/2MS+IBA 1.0 mg/L的诱导花药组培苗生根效果较好。此研究不但为快速繁殖香花槐建立了技术体系,也为以后单倍体育种奠定了基础。

参考文献

[1] 刘丹梅. 香花槐的组织培养及快速繁殖[J]. 植物生理学通讯 2003,39(5):464.

[2] 孙书伟. 香花槐组织培养的初步研究[J]. 丹东纺专学报,2002,9(3):34-35.

[3] 朱振波,王淑美,李路文,等. 香花槐的组织培养和快繁研究[J]. 山东林业科技, 2004,150(1):18-19.

[4] 刘昀,李凤霞,郑易之,等. 香花槐的组培苗快繁体系建立及工厂化育苗的主要影响因素[J]. 应用与环境生物学报,2004,10(2):162-165.

[5] 李世承,宁涛,田亚军,等. 香花槐的组织培养及快速无性繁殖[J]. 辽宁大学学报(自然科学版)2002,29(2):159-163.

[6] 关林,刘秀梅,方宏筠,等. 蝶形花亚科8种槐树的组织培养及再生能力的基因型效应[J]. 园艺学报,2005,32(5):844-848.

[7] 曹晓燕,王拮之,赵银萍. 毛刺槐花药培养及再生植株的获得[J]. 西北植物学报 2003,23(3):456-459.

[8] 王丽娟,李峰,杨建雄. 培养槐米花药、花柱愈伤组织获取黄酮类化合物[J]. 西安交通大学学报,2002,36(3):328-330.

Study on Flower Tissue Culture and Plant Regeneration of *Robinia idaho*

WANG Ling-Xian[1], XIE Ji-rong[2], FU Jian[1], YIN Fu-you[1], HUANG Xing-Qi[1]

(1. Biotechnology and Germplasm Resources Research Institute of Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming, 6502232, China; 2. Department of Life Science, Chongqing University of Arts and Sciences, Chongqing, 402168, China)

Abstract: *Robinia idaho* regeneration system and its tissue culture has been studied with explant of different part of its flower. The results show that 2,4-D is indispensable for callus induction of anther, ovary and filament while receptacles and petals cannot be induced in this experiment. Combination of 0.3-0.5 mg/L BA and 0.1 mg/L NAA are effective to differentiate anther callus. 1/2MS medium supplemented with IBA 0.05mg/L and 1/2MS+IBA 1.0mg/L can well promote seedings to take roots.

Key words: *Robinia idaho*, Anther culture; Plant regeneration; Ballus introduction