

二乔刺槐组织培养及其体外植株再生技术研究

曹艳春¹, 翟晓巧², 赵振利¹, 范国强¹

(1. 河南农业大学, 郑州 450002; 2. 河南省林业科学研究院, 郑州 450008)

摘要: 以二乔刺槐叶片为试验材料, 进行组织培养及其体外植株再生技术研究。结果表明, 二乔刺槐幼嫩叶片进行组织培养的适宜基本培养基为 WPM, 芽诱导最适培养基为 WPM + IBA $0.25\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + BA $5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + GA₃ $0.05\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 根诱导最适培养基为 WPM + IBA $0.3\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。该结果为二乔刺槐的细胞工程和基因工程操作及其新品种的快速繁殖奠定了基础。

关键词: 二乔刺槐; 组织培养; 培养基; 植物生长调节剂

中图分类号: S 722.3⁺7 **文献标识码:** A

二乔刺槐(*Robinia pseudoacacia* L.)为豆科刺槐属落叶乔木, 原产于荷兰, 具有耐干旱、耐盐碱的优良特性。二乔刺槐干形通直, 冠幅可达 10 米左右, 特别是其 1 年 2 次开花及花色鲜艳的特点, 倍受人们的喜爱, 可广泛应用于城市行道树和园林绿化中, 是一种潜在的优良园林绿化树种。我国引进这一优良新品种的时间不长, 资源较少, 难以满足城市园林绿化的要求。组织培养技术自从报道以来, 以其快速、简便及有效的特点迅速成为实验室培育苗木的主要手段之一, 研究人员已成功地在许多树种上利用此方法获得了大量组培苗。然而, 目前国内外还未见有通过组织培养技术大量繁育二乔刺槐苗木的报道。本文拟通过对二乔刺槐进行组织培养研究, 建立其高效的体外植株再生体系, 为其快速繁殖奠定良好基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料及无菌苗培养

试验材料为 3 年生二乔刺槐苗木顶端幼嫩枝条。将采集的幼嫩枝条用自来水冲洗干净后, 在超净工作台下先用 70% 的酒精浸泡 10s, 立即转入 0.1% 的 HgCl₂ 溶液中浸泡 10min, 然后用无菌水冲洗 4~5 次, 最后用无菌滤纸吸干。将枝条切成 2cm 左右的茎段接种于不含任何激素的 MS 培养基上。MS 培养基中含 3% 的蔗糖, 0.6% 的琼脂, 0.1% 的 PVP, pH 值 5.2。在培养温度 $(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$, 光照时间 $16\text{h}\cdot\text{d}^{-1}$, 光照强度 2500lx 的条件下培养, 40d 后, 取茎段上萌发的无菌叶片作为外植体。

1.2 试验方法

1.2.1 二乔刺槐叶片组织培养基本培养基的筛选 将上面培养的二乔刺槐叶片叶缘剪去, 切成约 $0.5\text{cm}\times 1.0\text{cm}$ 的小块(外植体), 分别放入盛有 100ml 的 1/2MS、MS、B₅、N₆ 和 WPM 5 种基本培养基中, 每种培养基分别附加 $0.2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA(吲哚丁酸)、 $4\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA(6-苄基嘌呤)(以下简称为 BA, 单位为 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 下同)、2.5% 蔗糖、0.6% 琼脂。每种培养基培养 30 个外植体, 先在温度为 $(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 的培养箱内黑暗诱导培养一周, 然后移至光照时间为 $16\text{h}\cdot\text{d}^{-1}$ 、光照强度为 2500lx 、温度为 $(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 的培养室内继续培养(培养条件下同)。每隔 5d 观察记录 1 次愈伤组织诱导情况, 并统计第 20d 时叶片愈伤组织的诱导率。根据诱导率的大小, 确定叶片愈伤组织诱导的最适基本培养基。

1.2.2 芽诱导培养基的选择 将二乔刺槐叶片愈伤组织接种到由植物生长调节物质生长素 IBA、细胞分裂素 BA 和赤霉素 GA₃ 组成的 5 种浓度组合的芽诱导培养基上(表 1)。每

表 1 二乔刺槐叶片芽诱导培养基不同处理组合
Table 1 Different media of the shoot induction of the leaves

处理编号	生长调节物质/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)		
	IBA	BA	GA ₃
(1)	0.25	3	0.05
(2)	0.25	4	0.05
(3)	0.25	5	0.05
(4)	0.25	6	0.05
(5)	0.25	7	0.05

收稿日期: 2005-12-03

基金项目: 河南省高校杰出科研人才创新基金项目(2002KYCX003)

作者简介: 曹艳春(1980-), 女, 河南商丘人, 河南农业大学硕士研究生, 研究方向: 林木生物技术。

通讯作者: 范国强(1964-), 男, 河南禹州人, 河南农业大学教授, 博士。

组合接种 15 瓶,每瓶放 3 个外植体,在培养室内培养.每隔 5d 观察一次,共观察 6 次,30d 时观察统计芽诱导率.

1.2.3 根诱导培养基的选择 当诱导出的幼芽长到 3cm 左右时,从茎基部切下,放入 (6)WPM、(7)WPM+IBA0.1mg·L⁻¹、(8)WPM+IBA0.2mg·L⁻¹、(9)WPM+IBA0.3mg·L⁻¹、(10)WPM+IBA0.4mg·L⁻¹、(11)WPM+IBA0.5mg·L⁻¹ 6 种培养基上进行根的诱导.每种组合接种 15 瓶,每瓶放 1 个幼芽,在培养室内培养.每隔 5d 统计一次,且统计 30d 时根的长度(统计 0.5cm 以上所有根的长度,取 15 瓶苗根长的平均值).

1.2.4 愈伤组织诱导率、芽诱导率及生根率的计算

愈伤组织诱导率(%)= 诱导愈伤组织的外植体个数/外植体总数× 100%

芽诱导率(%)= 诱导芽的外植体个数/外植体总数× 100%

根诱导率(%)=诱导出根的幼芽数/接种幼芽总数× 100%

2 结果与分析

2.1 二乔刺槐叶片组织培养基本培养基的筛选

从二乔刺槐叶片在 5 种基本培养基上愈伤组织的诱导结果(表 2)可以看出,在 1/2MS、MS、B₅、N₆ 和 WPM 5 种培养基上都有一定量的愈伤组织形成,但诱导率随培养基种类不同而表现出一定的差异.二乔刺槐叶片在 WPM 培养基上的愈伤组织诱导率高达 76.7%,其次是 MS 培养基上诱导率 53.3%,在 B₅ 培养基上,为 43.3%,在 1/2MS 培养基上最低,为 30.0%.这可能是因为 5 种培养基所含的成分在数量和种类上存在的差异,二乔刺槐叶片在相同的培养条件下对其反应不同,从而表现在诱导率的大小不同上.根据愈伤组织诱导率的大小,确定 WPM 为二乔刺槐叶片诱导愈伤组织和组织培养的最适基本培养基.

2.2 植物生长调节物质对二乔刺槐叶片芽诱导的影响

不同植物生长调节物质的浓度组合对二乔刺槐叶片芽诱导的影响从表 3 可以看出,叶片在 5 种培养基上的反应不同.接种 5d 后,(2)、(3)和(4)培养基上外植体切口处开始膨大,(1)和(5)培养基上没有明显变化.10d 后,在培养基(2)和(3)上有绿色的愈伤组织颗粒形成,随着培养时间的延长,愈伤组织逐渐增多且上面形成许多小突起.20d 后,可以看出在小突起的地方形成了许多绿色芽点,25d 后形成芽丛,从芽丛形成数量和生长速度看,在培养基(3)上长的快且量多.二乔刺槐叶片的芽诱导率因生长调节物质浓度的不同而存在很大的差异,芽诱导率随着 BA 浓度的增加呈现先上升后下降的趋势.其中,组合(3)培养基上芽诱导率最高可达 93.3%,其次是组合(4)和组合(2),分别为 75.6%和 60.0%.因此,二乔刺槐叶片芽的诱导率最高组合为(3)组合,选择其为二乔刺槐叶片芽诱导的最适培养基.二乔刺槐叶片芽诱导情况如图 1-A.

表 2 不同基本培养基对二乔刺槐叶片愈伤组织诱导的影响

Table 2 The effect of different media on ratio of callus induction of *Robinia pseudoacacia*

培养基	放置外植体数	诱导愈伤组织外植体数	愈伤组织诱导率(%)
1/2MS	30	9	30.0
MS	30	16	53.3
B ₅	30	13	43.3
N ₆	30	12	40.0
WPM	30	23	76.7

表 3 不同植物生长调节物质对二乔刺槐芽诱导的影响

Table 3 The effect of different plant growth regulator on ratio of shoot induction of *R. pseudoacacia*

处理组合	不同天数幼芽诱导情况					芽诱导块数	芽诱导率/%
	5	10	15	20	25		
(1)	不膨大	膨大	黄绿色愈伤颗粒	愈伤增大	芽点	9	20.0
(2)	膨大	绿色愈伤颗粒	愈伤增大并形成小突起	绿色芽点	芽丛	27	60.0
(3)	膨大	绿色愈伤颗粒	愈伤增大并形成小突起	绿色芽点	芽丛	42	93.3
(4)	膨大	膨大	黄绿色愈伤颗粒	愈伤增大	芽点	34	75.6
(5)	不膨大	膨大	黄绿色愈伤颗粒	愈伤增大	芽点	16	35.6

2.3 植物生长调节物质对二乔刺槐幼芽生根的影响

不同培养基组合对二乔刺槐幼芽生根率影响的结果(表 4)表明,各处理组合的幼芽生根率均随着培养时间的延长而增加.且 15d 后随着植物生长调节物质 IBA 浓度的提高,生根率整体上呈现先上升后下降或保持不变的趋势.此外,幼芽接种 10d 后,可以看到在 5 种培养基上茎下部切口处均有小突起形成,但无根生成,15d 后,在(9)、(10)和(11)培养基上能看出有根形成.20 d 后各组合培养基上均有根生成,但在(6)、

(7)和(8)培养基上仅有少量的根系形成,生根率分别为 6.7%、13.3%和 26.7%。(9)培养基在 25d 时生根率高达 86.7%,并在 30d 时达到 100%,幼根长 4.1 cm;同时,在 30d,(10)和(11)两培养基上分别形成了 3.9cm 和 4.2cm 长、生长健壮的根系,且生根率同时达到 93.3%,差异不明显。因此,选择生根快、长势好的生根培养基以 (9)、(10)和 (11)为优,生根率均可达到 90%以上,但考虑到培养成本,选用 (9)培养基为宜。二乔刺槐幼芽根诱导情况如图 1-B。

表 4 植物生长调节物质对二乔刺槐幼芽生根的影响							
Table 4 The effect of different plant growth regulator on rooting of the shootings							
处理组合	不同时间幼芽的生根率(%)						根的长度 (cm)
	5	10	15	20	25	30	
(6)	0	0	0	6.7	20.0	60.0	3.7
(7)	0	0	0	13.3	53.3	73.3	3.5
(8)	0	0	0	26.7	60.0	73.3	4.0
(9)	0	0	20.0	66.7	86.7	100	4.1
(10)	0	0	20.0	73.3	80.0	93.3	3.9
(11)	0	0	13.3	60.0	80.0	93.3	4.2

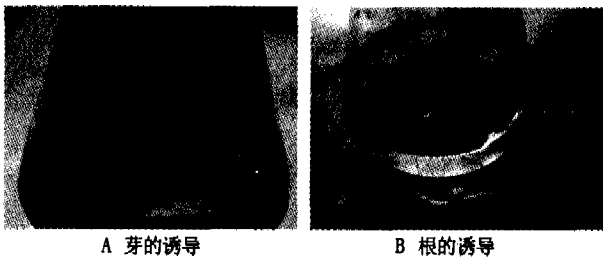


图 1 刺槐体外植株再生

Fig.1 In vitro plantlet regeneration of *R. pseudoacacia*

3 结论

通过二乔刺槐组织培养及其体外植株再生研究,可得如下结论:二乔刺槐幼嫩叶片愈伤组织诱导的适宜基本培养基为 WPM,芽诱导最适培养基为 WPM+IBA 0.25mg·L⁻¹+BA 5mg·L⁻¹+GA₃0.05mg·L⁻¹,根诱导最适培养基为 WPM+IBA0.3mg·L⁻¹。

参考文献:

[1] 栾庆书,罗凤霞. 刺槐组织培养研究现状[J]. 辽宁林业科技,2001,(5):28 -31.

[2] 黄茶英,刘青林. 激素、通气和 pH 值对四倍体刺槐和二乔刺槐离体生长的影响[J]. 中南林学院学报,2003,23(5):34 -41.

[3] 王树芝,田砚亭,李云,等. 四倍体刺槐组织培养中的外植体选择和消毒研究[J].西北林学院学报,2002,17(1):15-18.

[4] 范国强,翟晓巧,蒋建平,等. 不同种泡桐叶片愈伤组织诱导及其植株再生[J]. 林业科学,2002,38(1):29-35.

[5] 翟晓巧,范国强,贺窑青,等. 金丝楸茎段的组织培养及植株再生技术[J]. 河南农业大学学报,2002,36(4):319-322.

[6] Shauna M Uselman, Robert C Qualls, Richard B Thomas. Effects of increased atmospheric CO₂, temperature, and soil N availability on root exudation of dissolved organic carbon by a N-fixing tree (*Robinia pseudoacacia* L.)[J]. Plant and Soil, 2000,222(1-2):191 -202.

[7] Swamy S L, Puri S, Kanwar K. Propagation of *Robinia pseudoacacia* Linn. and *Grewia optiva* Drummond from rooted stem cuttings[J]. Agroforestry Systems, 2002,55(3):231-237.

[8] Swamy SL.,Puri S, Singh AK. Effect of auxins (IBA and NAA) and season on rooting of juvenile and mature hardwood cuttings of *Robinia pseudoacacia* and *Grewia optiva*[J]. New Forests, 2002,23(2):143-157.

Tissue Culture and in Vitro Plantlet Regeneration of *Robinia Pseudoacacia*

CAO Yan-chun¹, ZHAI Xiao-qiao², ZHAO Zhen-li¹, FAN Guo-qiang¹

(1. Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; 2. Henan Academy of Forestry, Zhengzhou 450008, China)

Abstract: A study was conducted on the technology of tissue culture and in vitro plantlet regeneration of *Robinia pseudoacacia* leaves as material. The results showed that media for the shoot induction from leaves and the rooting from shootings were WPM+IBA 0.25mg·L⁻¹+BA 5mg·L⁻¹+GA₃ 0.05mg·L⁻¹ and WPM+IBA 0.3mg·L⁻¹ respectively. These results might provide references to the cell engineering and gene engineering studies on *Robinia pseudoacacia* quick propagation of its new species.

Key words: *Robinia pseudoacacia*; tissue culture; medium; plant growth regulator