

## 饲料型四倍体刺槐花器解剖构件组 培特性差异研究初报

姜金仲, 李 云, 沈峻岭

(北京林业大学生物科学与技术学院, 林木花卉遗传育种教育部重点实验室, 北京 100083)

**摘要:** 饲料型四倍体刺槐的花器可以解剖为若干构件, 这些构件分别有不同的特化细胞构成, 因而其组织培养特性可能有所不同。通过把这些不同解剖构件接种到不同激素浓度的 MS 培养基上进行培养, 得出了初步的趋势性结论, 这些花器构件按组织培养特性可分为两组: 一组包括花萼及位于其外的解剖构件, 其脱分化较易, 但污染率较高; 另一组包括位于花萼以内的所有解剖构件, 其脱分化较难, 但污染率较低。

**关键词:** 饲料型四倍体刺槐, 组织培养, 花器解剖构件

**中图分类号:** S792.270.4 **文献标识码:** A

### Primary Study on The difference among Tissue Cultures of the Components from Anatomizing Flower of Tetraploidy *Robinia pseudoacacia* for Fodder

Jiang Jinzhong, Li Yun, Shen Junling

(College of Biological Science and Biotechnology, Beijing For. Univ., Key Lab. of Genetics and Breeding of Forest tree and Ornamental Plant, MOE, Beijing 100083)

**Abstract:** The flower of Tetraploidy *Robinia pseudoacacia* for fodder can be anatomized into many Components that consist of specialized cells that may lead the Components to be different from each other in tissue culture. By inoculating the Components on the culture medium (MS) with different Concentration of hormone the following primary trends are found out: the whole Components can be divided into two groups according to their traits in culture; group 1, including all Components from outside calyx and calyx, differentiate relatively easily but have a high contamination rate; group 2, involving all Components from inside calyx, differentiate relatively difficultly but own a low contamination rate.

**Key words:** Tetraploidy *Robinia pseudoacacia* for Fodder, Tissue culture, Components from Anatomizing Flower

饲料型四倍体刺槐 (Tetraploidy Black Locust For Fodder) 是北京林业大学于 1997 年从韩国引入到中国的刺槐 (*Robinia pseudoacacia*) 优良无性系, 是由人工诱导二倍体刺槐 (2n) 体细胞加倍 (4n) 而育成。其叶片宽大肥厚、蛋白质含量高、柔嫩多汁、适口性好, 属优良饲料树种<sup>[1]</sup>。其耐干旱脊薄、适应性强、生物量大、萌蘖性强、根系发达、根瘤可固氮, 是水土保持、防风固沙、改良土壤、营造饲料型灌木林的优良树种; 发展饲料型四

倍体刺槐对加快中国林业生态建设、促进畜牧业及饲料加工业的发展具有现实意义。

因而, 自饲料型四倍体刺槐引入中国以来, 国内学者对其经济性状、造林育苗技术、组织培养技术和遗传转化<sup>[2-13]</sup>等方面进行了广泛的研究, 其中特别是组培技术研究<sup>[2-13]</sup>方面做了大量工作, 但这些工作主要集中在茎尖、侧芽及叶片等器官的组培技术上, 未见有关于花器不同解剖构件组培特性差异研究的报道。

**基金项目:** 科技部资助项目 (003EFN216700307); 国家林业局资助项目 (2003-5-2)。

**第一作者简介:** 姜金仲, 男, 1958 年出生, 高级讲师。研究方向专业方向: 遗传育种, 生物技术。E-mail: jjz9911@sohu.com。

**通讯作者:** 李云, 博士, 教授, E-mail: yunli@bjfu.edu.cn, Tel: 010-62336094。

**收稿日期:** 2005-11-11, **修回日期:** 2005-11-21。

花器是植物的一个特殊器官,含有多个解剖构件,比如花瓣、花柱、子房、花药、花托、花柄等。这些解剖构件的细胞生长发育特性与植物体其它部分有着极大的区别,特别是花瓣、花丝、柱头等,其细胞已处于高度特化状态,是否仍具有细胞全能性或是否还能进行脱分化和再分化尚不为人知;所以,探索性地对花器解剖构件组培特性差异的研究具有一定的理论意义。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

试验材料为北京林业大学饲料型四倍刺槐试验地中 5 年生的饲料型四倍刺槐当年生幼花,2005 年春季花刚露白、花粉处于单核期时及时采集,采后将幼花随即放入 4℃ 冰箱内冷藏 3d。试验完成于北京林业大学教育部林木花卉遗传育种重点实验室。

### 1.2 方 法

将冷藏 3 d 的花蕾用自来水冲洗干净,滤纸吸干后,无菌条件下,70% 的酒精浸泡 30s,0.1% 的  $HgCl_2$  常规灭菌 10min,无菌水冲洗 4 次,然后将花蕾解剖为不同构件:花药、花瓣、花基、花柄、花轴、雄蕊、花蕾、无头柱、混柱、纯柱及柱头等,然后将这些构件分别接种在含不同激素配比的 MS 培养基上(见图 1~8),蔗糖 3%,琼脂 0.6%,pH6.5,观察不同解剖构件对所提供组培条件的反应。培养室温度  $26 \pm 1^\circ C$ ,光强 3000Lx,每天光照  $10 \pm 1h$ ,15 d 后转入暗培养,每 20 d 继代 1 次。

花瓣——花中白色的部分;花药——花丝顶端

第一组:既有反应又有愈伤组织

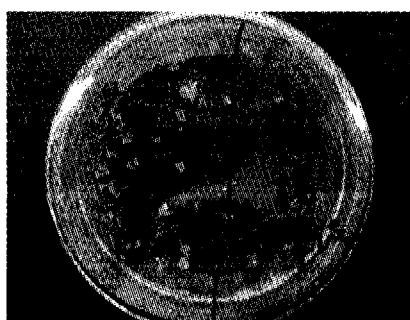


图 1 花轴、花柄愈伤组织



图 2 花基愈伤组织

第二组:有反应但无愈伤组织

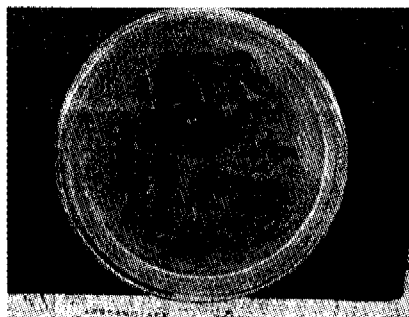


图 3 纯柱

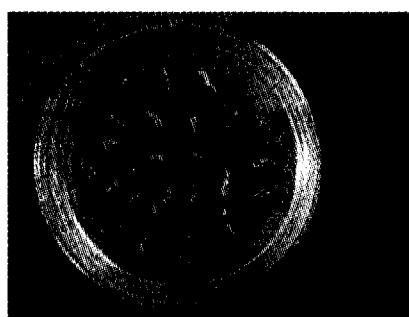


图 4 混柱

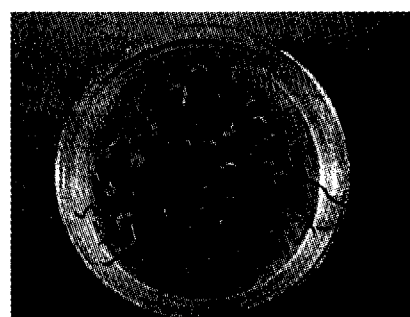


图 5 无头柱、柱头

小球;花基——从花柄着生处向上 0.3cm 处截下的部分;花柄——小花的柄;花轴——着生小花的总花叶柄;混柱——有雄蕊包裹的花柱整体;花蕾——刚露白的幼花;纯柱——没有雄蕊包裹的完整花柱;无头柱——截去柱头的纯柱;柱头——从花柱顶端 0.3cm 处切下的部分;雄蕊——花药、分离花丝和连体花丝的整体。

## 2 试验结果

将花器的不同解剖构件分别接种在不同激素配比的培养基上,1 周后除了花药外,花瓣、花基(花托)、花柄、花轴、雄蕊、花蕾、无头花柱、混柱、纯柱及柱头十种构件均有明显的培养反应,表现为体态有所丰满,表面幼嫩发亮(见图 1~8)。培养 2 周后,花轴、花基、花蕾、花柄四种解剖构件分别已有个别个体有愈伤组织小点出现,但其余的 7 种解剖构件仍停留在原来的状态,推测是否暗培养会改变这种状态,于是,及时把全部 11 种解剖构件转入了暗培养。20 d 时统计污染率,60 d 时统计每种解剖构件形成愈伤组织的数量及愈伤组织诱导率,结果如表 1 所示。由表 1 可知,花轴、花柄、花基及花蕾在 6 号和 8 号培养基上均得到了愈伤组织(见图 1~2),其诱导率分别为 46.94%、44.00%、44.28%、26.66%,但污染率也较高,平均分别为 3.50%、4.2%、25.36%、18.62%;另外 7 种解剖构件均无有一点愈伤组织出现(见图 3~8),但污染率较低,平均为 0.42%。

图版:

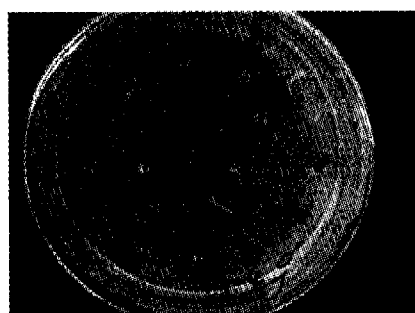


图 6 雄蕊

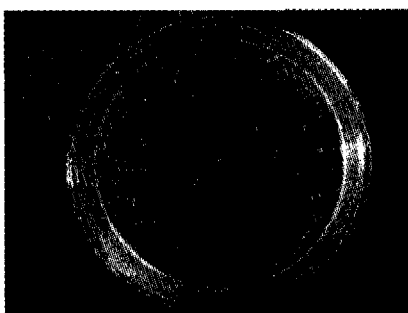


图 7 花药管

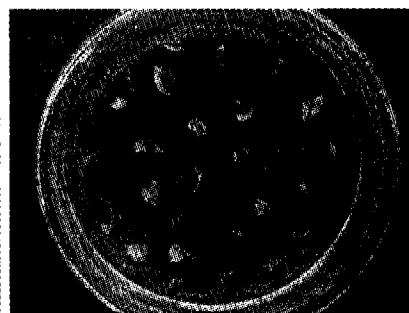


图 8 花瓣

### 3 结论与讨论

讨论的前提条件:从表 1 的试验结果可以看出,在不同激素含量培养基上接种的花器解剖构件种类不同,彼此不相重复,无法利用统计方法将解剖构件种类和激素水平两种因素对培养结果的影响区分开来(不可否认,激素浓度对培养结果肯定是有影响的),所以,下面的所有讨论只有建立在这两种因素作用效果并存的基础之上了。

虽然在两种因素并存情况下不能精确说出两种因素对培养结果的影响,但是,培养结果还是反映出了一些趋势性的结论:

第一、这些解剖构件根据其组培特性不同可归为两组,第一组:花柄、花轴、花蕾及花基,第二组:花瓣、雄蕊、花药、无头柱、混柱、纯柱及柱头。第一组在有接种的 6 号和 8 号培养基上均得到了愈伤组织,但花蕾和花基的愈伤组织均是起源于花萼;这说明花蕾、花基与花轴、花柄的同质性在于其都有花萼,而不在于其它解剖构件;从已有的文献资料看<sup>[10-12]</sup>,花轴、花柄及花萼的组培特性更接近幼茎和小叶,其细胞特化程度相对较低,较易脱分化和再分化,因而培养起来也相对容易些;至于这些解剖构件的愈伤组织的进一步分化诱导问题,已不属此研究关注之列,因已有的文献中已有

表 1 不同花器解剖构件的培养结果

激素浓度	花器解剖构件名称	接种的构件数(个)	形成愈伤组织数(个)	愈伤组织诱导率(%)	污染率(%)
5	花药	250	0	0.00	0.00
	雄蕊	68	0	0.00	0.00
	混柱	42	0	0.00	0.00
	纯柱	41	0	0.00	0.25
6	花轴	49	23	46.94	3.50
	花柄	25	11	44.00	4.20
	花瓣	22	0	0.00	1.25
	混柱	13	0	0.00	0.13
8	花基	70	31	44.28	25.36
	雄蕊	25	0	0.00	0.00
	混柱	82	0	0.00	0.00
	花蕾	15	4	26.66	18.62
	花瓣	20	0	0.00	0.86
	雄蕊	22	0	0.00	0.00
	纯柱	37	0	0.00	0.25
9	雄蕊	46	0	0.00	0.00
	纯柱	23	0	0.00	0.00
	混柱	81	0	0.00	0.36
	无头柱	61	0	0.00	1.26
	柱头	44	0	0.00	0.59
	花瓣	48	0	0.00	2.37
	雄蕊	22	0	0.00	0.59
花药	300	0	0.00	0.00	

注:激素浓度 5、6、8、9 分别为:5、2,4-D<sub>0.1</sub>+BA1.0; 6、2,4-D<sub>0.1</sub>+BA3.0; 8、2,4-D<sub>1.0</sub>+BA5.0; 9、2,4-D<sub>5.0</sub>+BA1.0。

了将其诱导分化为苗的成熟方法<sup>[5,6,9]</sup>。

第二组解剖构件在所有的培养基上均未得到愈伤组织,这些解剖构件所覆盖的培养基种类比第一组多两种,理论上其出现愈伤组织的可能性应大一些,而实际结果却相反,说明这些构件的细胞特化程度较高、很难脱分化和再分化,或则说其对培养条件的要求与所提供的相去甚远,因而这组构件的培养难度相对要大

得多。

综合两组培养的结果可以看出,细胞特化程度不同,解剖构件的组培特性具有明显差异,突出表现在:(1)对培养条件的要求不同;(2)脱分化和再分化的能力不同。由此可以看出,即使是遗传基础相同的培养材料、如果其发育阶段不同、或则是在植物体上着生位置不同,其对培养条件反应也会表现出极大差异。

从外部形态上看,花瓣、花丝及花药与较易培养的小小叶柄、花轴或花柄有较大区别,其难培养是预料之中的;而花柱及柱头则与小小叶柄等无明显差异,其难以培养的原因值得深究,这些貌似小小叶柄的解剖构件与小小叶柄是有本质区别的,其区别点是难以简单用着生位置来解释的。

第二、同样灭菌处理的不同构件的污染率相差很大,外部构件的污染率明显大于内部构件,说明构件所处位置不同、同样的灭菌措施会因产生不同的灭菌效果。从试验结果看,构件本身的污染程度比灭菌处理强度更重要。内部构件虽然接受的处理强度较小,但因其被外部构件包被而自身污染程度较低,其灭菌效果仍然较好;外部构件虽然接受了较大的处理强度,但终因其污染较重而灭菌效果较差。所以,当以外部构件为主要培养对象时,需要改进此项研究的灭菌措施。

总之,同一朵花中不同解剖构件的组织培养特性是不同的,这种差异和造成这种差异的原因值得进一步研究。

#### 参考文献

- 1 李云,姜金仲.饲料型四倍体刺槐引种现状[J].东北林业大学学报,2005,32(sup):137~139
- 2 曹善东.四倍体刺槐组培快繁技术研究[J].山东林业科技,2003,144(1):11~12
- 3 曹丽芬,刑世海,张宗勤.四倍体刺槐优良无性系间组织培养比较[J].西北林学院学报,2003,18(4):41~43
- 4 郭军战,舒庆艳,王丽玲,等.四倍体刺槐离体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
- 5 李云,田砚亭,钱永强,等.NAA 和 IBN 对四倍体刺槐试管苗生根影响及不定根发育过程解剖观察[J].林业科学,2004,40(3):75~79
- 6 李云,王树芝,田砚燕亭,等.四倍体刺槐离体培养及其不定根发育和叶片解剖观察[J].中国水土保持科学,2003,1(1):91~94
- 7 司守霞,彭正峰,周青.刺槐离体快繁技术[J].河南林业科技,2004,24(2):17~18
- 8 王树芝,田砚亭,李云.四倍体刺槐无性系组织培养的研究[J].核农学报,2002,16(1):40~44
- 9 王树芝,等.刺槐宽叶四倍体无性系的组织培养[J].植物生理学通讯,1999,35(3):204~205
- 10 王侠礼,钟士传,曹帮华,等.饲料型刺槐微体快繁技术的研究[J].中国农学通报,2003,19(3):51~53
- 11 王莉,李春燕,邢震,等.培养基激素配比及琼脂用量对四倍体刺槐组织培养苗生根的影响[J].林业科技,2004,29(2):1~2
- 12 王莉,李春燕.无机盐质量浓度及激素比对四倍体刺槐组织培养苗生根的影响[J].江苏林业科技,2003,30(6):23~25
- 13 叶景丰,姜总灏.四倍体刺槐组培瓶苗生根培养及生根苗移栽研究[J].辽宁林业科技,2004,(1):15~16[14] 夏阳.四倍体刺槐转甜菜碱醛脱氢酶基因的研究 [J]. 中国农业科学. 2004. 37 (8): 1208-1211

(责任编辑:秦守亮)