

合欢离体培养及高效再生体系的建立

张先云¹, 秦喜庆², 袁秀云¹, 马 杰¹

(1. 郑州师范高等专科学校 生物技术研究所, 河南 郑州 450044; 2. 河南安阳林业局 河南 安阳 455000)

摘 要:以合欢种子和当年生枝条为材料, 研究了合欢离体培养及再生体系, 探讨了不同激素组合对合欢愈伤组织的产生、分化及生根的影响, 筛选出高效产生愈伤组织培养基为 MS+BA 2 mg/L+KT 0.5 mg/L+NAA 0.3 mg/L; 分化培养基为 MS+BA 1 mg/L+NAA 0.1 mg/L; 有利于生根的培养基为 1/2MS+NAA 0.5 mg/L, 以上培养基均加 30 g/L 蔗糖、8 g/L 琼脂。

关键词:合欢; 离体培养; 再生体系

中图分类号:S 685.99 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)02-0169-03

合欢(*Albizia julibrissin* Durazz.)又名绒花树, 是豆科落叶乔木, 高达 16 m, 树冠开展, 姿态优美, 头状花序, 伞房状排列, 花粉红色如绒簇, 色香迷人, 叶昼展夜合, 它是绿化、美化、香化和净化环境的极佳树种。同时该植物的皮、花均能入药, 有安神、活血、止痛之效^[1]。纤维可制人造棉, 种子含油 10%, 此项研究既有绿化意义, 也有经济意义, 又为豆科树木转基因受体系统的建立奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

外植体:2007 年 11 月、2008 年 4 月分别采于郑州郑通路行道树种子和当年枝条。培养基: A: MS; B₁: MS+BA 1 mg/L(以下单位相同)+NAA 0.1; B₂: MS+BA 1+KT 0.3+NAA 0.3; B₃: MS+BA 2+KT 0.3+NAA 0.1; B₄: MS+BA 2+KT 0.5+NAA 0.3; C₁: 1/2MS+NAA 0.5; C₂: 1/2MS+IBA 0.5; C₃: 1/2MS+NAA 0.5+IBA 0.5。

1.2 试验方法

1.2.1 无菌芽的获得 取枝条顶端下 3~5 节, 流水冲洗, 种子用自来水浸泡 24 h, 然后将处理过的枝条和种子先用 75% 的酒精表面灭菌 30~40 s, 再用 0.1% 氯化汞溶液枝条表面灭菌 6 min, 种子灭菌 10 min, 每次灭菌后用无菌水冲洗 5~6 次, 把枝条两端消毒时受伤变色的部分剪去和种子同接种在 A、B₁ 培养基上, 然后置于温度为 26℃ 恒温培养箱中进行培养, 枝条接种 10 d、种子接种 30 d 后发芽。

1.2.2 不同激素浓度组合对合欢愈伤组织的形成、分化

第一作者简介: 张先云(1957—), 女, 本科, 副教授, 现主要从事植物资源及生物技术研究工作。E-mail: zszxianyun@126.com。

基金项目: 河南省科技攻关资助项目(0524050005)。

收稿日期: 2009-09-20

及无菌芽增殖的影响 将无菌芽的下胚轴、带有小叶柄的复叶切成 0.5~1 cm 小段, 然后用刀将叶片划出伤痕; 子叶切成 0.3~0.5 cm 大小的块, 将切好的外植体接种到 B₁~B₄ 培养基上, 10~15 d 后开始产生愈伤组织(图 1~2)。当愈伤组织长到 25~30 d 时切成 0.5 cm 大小的块重新接种在 B₁~B₄ 培养基中, 15 d 后开始分化(图 3~4)。当小苗长到 2~3 cm 时, 将其切下重新接种到 B₁ 中, 15 d 小苗基部可产生愈伤组织和丛生芽, 将产生的愈伤组织和丛生芽反复接种到 B₁ 中, 可以达到增殖效果。

1.2.3 生根与移栽 将 3~4.0 cm 左右的丛生芽自基部切下, 移至生根培养基 C₁~C₃ 中, 当瓶苗培养 30~40 d, 小苗长至 5 cm 以上时, 转移至温室自然光下练苗 2~5 d, 然后将其从玻璃瓶中取出, 洗净根部粘连的培养基后, 移入温棚泥炭土和蛭石(2:1)为基质的营养钵中, 适当遮荫, 经常喷水, 保持温度 18~25℃, 空气湿度 70%~90%, 光照强度 3 000~6 000 lx, 1 个月后统计移栽成活率。

1.2.4 结果统计 发芽率=发芽的种子(或发芽的枝条)数/接种总数×100%; 增殖倍数=转接数/接种数×100%; 分化率=已分化的愈伤组织数/接种的总愈伤组织数×100%; 生根率=生根苗数/培养苗数×100%; 成活率=成活苗数/移栽苗数×100%。

1.3 培养条件

基本培养基为 MS, 所有培养基均附加蔗糖 30 g/L、琼脂 8 g/L, pH 5.8~5.9, 120℃ 灭菌 25 min, 所有的培养温度均为 (24±2)℃, 光照 2 500~3 000 lx, 光照时间 12 h/d。

2 结果与分析

2.1 不同培养基对无菌苗诱导的影响

无菌苗的获得来源一种是无菌播种, 另一种是用当年枝条。种子在 A 培养基中发芽率相对较高为 4%, 长

势壮,在B1培养基中发芽率只有2%,A培养基即MS培养基较适合种子的发芽;枝条在B1培养基中发芽率高达82.3%,生长健壮,在A培养基中发芽率为70.5%,长势相对较弱,B1培养基即MS+BA 1 mg/L+NAA 0.1 mg/L较适合枝条发芽(表1)。用枝条可以获得较多的无菌苗,但用枝条获得的无菌苗茎段和叶片来诱导愈伤组织和分化的速度较胚轴诱导愈伤组织和分化的速度慢。

表1 不同培养基对无菌苗诱导的影响

外植体 处理号	种子		枝条	
	发芽率/%	长势	发芽率/%	长势
A	4	壮	70.5	较弱
B1	2	较弱	82.3	壮

2.2 不同激素浓度组合、不同外植体对合欢愈伤组织形成的影响

在诱导愈伤组织试验中,不同激素的浓度组合、不同的外植体形成的愈伤组织颜色、质地和增殖倍数有所

表2 不同激素的浓度组合对愈伤组织形成的影响

处理号	子叶愈伤组织状态			胚轴愈伤组织状态			叶片愈伤组织状态			茎愈伤组织状态		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
B1	黄绿	较密	1	翠绿	较密	5.1	深绿	较密	4.7	深绿	密	3.6
B2	黄褐	较密	死	翠绿	较密	4.3	深绿	较密	4.5	深绿	密	3.9
B3	黄褐	较密	死	翠绿	较密	5.3	深绿	较密	4.7	深绿	密	3.8
B4	黄绿	较密	1.5	翠绿	较密	6.4	深绿	较密	5.8	深绿	密	4.7

注:1代表愈伤组织的颜色 2代表愈伤组织的质地 3代表增殖倍数。

2.3 不同激素浓度组合对不同来源愈伤组织分化影响

在分化试验中,只有子叶形成的愈伤组织没有分化,最后褐化死亡,其余3种外植体形成的愈伤组织20 d后在B1~B4培养基中都能100%分化。3种外植体形成的愈伤组织在B1培养基中分化效果最好,特别是胚轴形成的愈伤组织不用转接就能分化(图3),每块愈伤组织平均分化出6.6棵小苗,且生长健壮;叶片愈伤组织分化出的苗数最少,为4.6棵(图4),3种外植体形成的

表3 不同激素的浓度组合对不同来源愈伤组织分化的影响

处理号	子叶愈伤组织分化			胚轴愈伤组织分化			叶片愈伤组织分化			化茎愈伤组织分化		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
B1	0.2	0	0	100%	6.6	壮	100%	4.6	壮	100%	5.4	壮
B2	0	0	0	100%	3.1	较弱	100%	2.6	较弱	100%	2.6	较弱
B3	0	0	0	100%	3.0	壮	100%	2.5	较弱	100%	2.7	较弱
B4	0	0	0	100%	2.9	壮	100%	2.3	较弱	100%	2.2	较弱

注:1代表愈伤组织的分化率,2代表每块愈伤组织分化出的平均芽数,3代表苗势。

2.4 不同培养基对再生芽生根的影响

待不定芽伸长至3~4 cm时,将其自基部切下,转移至C1~C3生根培养基上生根。生根培养基以1/2 MS为基本培养基,附加不同浓度的NAA、IBA及其组合。15 d后C1即有不定根生成,不定根诱导率达95%以上,平均生根数为6.3条,根短粗,移栽成活率高达90.4%(图5);以C2培养基中小苗生根率、平均根数、移栽后成活率最低(表4)。结果表明,NAA有利于合欢小

不同(表2)。在B1~B4培养基中,4种外植体都能形成愈伤组织,且4种外植体形成的愈伤组织都在B4培养基中最好,但胚轴形成愈伤组织速度最快,6 d胚轴两端开始膨大(图1),15 d整个胚轴膨大形成愈伤组织,愈伤组织颜色翠绿、质地较密、25 d平均增殖6.4倍;其次是叶片形成的愈伤组织,10 d开始出现愈伤组织,颜色深绿,表面白色,质地较密(图2),25 d增殖5.8倍;子叶形成的愈伤组织最差,颜色发黄,部分最后褐化死亡,增殖只有1.5倍。由此可知,就激素对比对愈伤组织诱导的影响而言,以B4培养基为各种外植体诱导愈伤组织较适宜的培养基,其激素浓度组合为MS+BA 2 mg/L+KT 0.5 mg/L+NAA 0.3 mg/L;就激素对愈伤组织诱导的影响而言,KT对愈伤组织的形成影响较大;就外植体对愈伤组织诱导的影响而言,胚轴最适宜,茎段、叶片较适合。

愈伤组织在B4培养基中分化最差(表3)。由此可知,就激素对愈伤组织分化而言,低浓度的BA有利于愈伤组织的分化,KT和较高浓度的BA、NAA不利于分化;就激素对比对诱导愈伤组织诱导的分化而言,以B1培养基即MS+BA 1 mg/L+NAA 0.1 mg/L为各种愈伤组织分化较适宜的培养基。就外植体而言,胚轴形成的愈伤组织最适合分化出小苗,茎段、叶片形成的愈伤组织较适合分化,子叶愈伤组织不适合分化。

苗生根,IBA不利于生根,以C1培养基即1/2MS+NAA 0.5 mg/L为合欢最适宜生根培养基。

表4 不同激素的浓度组合对合欢不定芽生根的影响

处理号	生根率/%	平均根数	根长势	成活率/%
C1	95	6.3	短、粗、壮	90.4
C2	30.4	3.1	长、细、弱	20.1
C3	53.2	5.4	较短、较粗	70.7

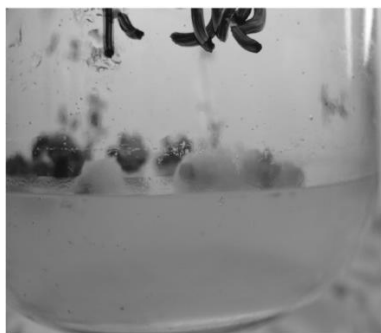


图1 胚轴形成的愈伤组织



图2 叶片形成的愈伤组织



图3 胚轴愈伤组织分化



图4 叶片愈伤组织分化



图5 生根

3 结论与讨论

适合无菌播种的培养基为 MS; 适合以枝条诱导无菌芽和各种外植体形成的愈伤组织分化的培养基为 B1 即 MS+BA 1 mg/L+NAA 0.1 mg/L; B4 培养基即 MS+BA 2 mg/L+KT 0.5 mg/L+NAA 0.3 mg/L 有利于各种外植体形成愈伤组织; 有利于生根的培养基为 1/2MS+NAA 0.5 mg/L。无论那种外植体获得的再生小苗在继代和生根中表现相同。

由于合欢种皮较厚, 用种子获得无菌苗较难, 但用种子发芽获得的胚轴很容易诱导愈伤组织并且容易分化; 用枝条来获得无菌芽容易, 材料易得, 但用枝条获得

的无菌芽来诱导愈伤组织相对较慢, 分化率略低, 用种子和枝条作为外植体各有利弊。B4 培养基即 MS+BA 2 mg/L+KT 0.5 mg/L+NAA 0.3 mg/L 有利于各种外植体形成愈伤组织, 但将其转接到分化培养基 B1 中, 分化率和分化出的平均苗数远低于 B1 形成的愈伤组织转接入 B1 培养基中的分化率和平均苗数, 如果从节省人力、物力考虑, 以 B1 培养基作为诱导愈伤组织和分化的培养基较为合适。

参考文献

- [1] 崔波, 李服, 马杰. 郑州植物志上册 [M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2008: 438-439.

Isolated Culture and Establishment of Regeneration System of *Albizia julibrissin* in Higher Efficiency

ZHANG Xian-yun¹, QIN Xi-qing², YUAN Xi-yun¹, MA Jie¹

(1. Institute of Biology Technology, Zhengzhou Teacher's College, Zhengzhou, Henan 450044; 2. Forestry Bureau of Anyang County, Anyang, Henan 455000)

Abstract: Studied the isolated culture and regeneration system of *Albizia julibrissin*, and discussed the effects of different hormone combination on callus, differentiation and rooting. The results showed MB+BA 2 mg/L+KT 0.5 mg/L+NAA 0.3 mg/L+30 g/L sucrose+8 g/L agar was optimum medium for callus; MB+BA 1 mg/L+NAA 0.1 mg/L+30 g/L sucrose+8 g/L agar was optimum medium for differentiation; 1/2MS+NAA 0.5 mg/L+30 g/L sucrose+8 g/L agar was the optimum medium for growing root.

Key words: *Albizia julibrissin*; isolated culture; regeneration system