

# 香花槐组织培养研究现状

曹 羽

(北京林业大学 生物科学与技术学院, 北京 100083)

**摘要:**香花槐是一种耐旱树种,在生产中存在受季节限制、繁殖效率低的问题,采用组织培养可克服这些缺点。为优化培养体系,综述各阶段研究方法和实验现状,重点分析组织培养过程中无菌体系的建立、继代培养、生根成苗、试管苗移栽主要问题和影响因素。

**关键词:**香花槐;快速繁殖;组织培养

**中图分类号:**S722.3<sup>+</sup>7

**文献标识码:**A

**文章编号:**1002-2767(2012)04-0142-04

香花槐(*Robinia pseudoacacia* 'Idaho')属蝶形花科落叶乔木,花为紫红色,密生成总状花序,具有芳香气味,每年5月、7月开花,花期长且花型美,无荚果,不结种子<sup>[1]</sup>。香花槐原产西班牙,20世纪90年代自韩国引入我国<sup>[2]</sup>,该树种喜沙质土壤,能在较贫瘠的土壤上生长,具有抗旱、耐寒、速生、根系发达等特点,是美化和改善生态环境的优良树种<sup>[3]</sup>,由于上述优点,市场对香花槐需求较大。香花槐花而不实,无种子可供繁殖,常规繁殖多采用埋根、扦插、嫁接三类方法,这些方法受季节限制,占用大量土地,效率低,不能满足大规模繁殖树种的要求,而采用组织培养的方法可克服这些缺点,大大提高苗木的繁殖速度,为优化培养体系,该文综述分析各阶段研究方法和试验现状,为香花槐组织培养深入研究提供参考,也为分子育种提供体细胞再生植株的研究基础。

## 1 无菌体系的建立

### 1.1 外植体的选择

植物细胞具有发育成一个完整植株的全部遗传信息,从理论上讲植物的任何细胞都具有再生完整植株的能力,但在实际研究工作中,香花槐组织的再生能力受生理状态、年龄和器官部位多种因素的影响<sup>[4]</sup>。成熟外植体组织再分化能力较低,幼嫩外植体组织(如与茎尖分生组织相连接的组织)具有较强的再分化能力<sup>[5]</sup>。因此,在香花槐组织培养中,多选用幼嫩的茎段、茎尖、腋芽、幼叶

和花等,以消除成熟效应和位置效应。Shu等<sup>[6]</sup>用水培香花槐嫩芽为材料,成活率比木质化枝条高52%,且相较于嫩枝的中部和底部,顶芽部分生长比较缓慢。

### 1.2 外植体消毒

进行外植体消毒的常用方法是先用洗衣粉或其它表面活性剂清理外植体表面,再用乙醇和消毒剂进行处理,若材料过于细嫩,则可不用70%乙醇。目前,常用的消毒剂有升汞、次氯酸钠、溴水和过氧化氢等,最常采用的消毒剂为升汞,但由于升汞有剧毒,有的研究者开始选用其它消毒剂。郭军战等<sup>[7]</sup>选用0.1%  $\text{HgCl}_2$ 、2%次氯酸钠、10%过氧化氢、0.5%新洁尔敏、0.1%  $\text{HgCl}_2$  + 70%乙醇为消毒剂,结果表明,NaClO是消毒效果仅次于 $\text{HgCl}_2$ 的消毒剂。张仪等<sup>[8]</sup>使用有效氯含量为0.5% NaClO溶液灭菌4~5 min,成活率可达90%。

### 1.3 培养基配制

基本培养基是植物组织培养成功的重要因素之一,培养基的种类和成分对培养材料的生长发育有直接影响,由于MS培养基无机盐和离子浓度较高,是较稳定的离子平衡溶液,且硝酸根、铵离子、钾离子含量高,养分的比例和数量合适,能满足细胞的营养和生理需要,香花槐的组织培养多选用MS培养基,除基本培养基以外,为促进组织和器官的生长,通常还必须在培养基中加入一定比例生长调节物质,如生长素和细胞分裂素。段鹏慧<sup>[9]</sup>采用启动培养基MS+6-BA 0.3  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + NAA 0.1  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,7~10 d后,腋芽开始萌动。宋杰等<sup>[10]</sup>研究表明,组培苗在加有IAA的启动培养基中生长最好,且在愈伤组织大的情况下,添加

收稿日期:2012-02-15

作者简介:曹羽(1986-),女,四川省重庆市人,在读硕士,从事植物生物技术研究。E-mail:caoyucy0812@163.com。

GA 可使愈伤组织变小。王秋竹等<sup>[11]</sup>试验结果表明,在 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。

## 2 不定芽增殖和继代培养

建立无菌培养体系后,植物组织培养用于快速繁殖的关键是材料的继代培养。香花槐组织培养最常用的方法是器官发生途径,它可分为直接和间接两种形成试管苗的过程。此过程通常受外植体的部位、外源激素浓度与配比、糖浓度等因素的影响。

### 2.1 直接器官发生

直接器官发生是指直接从外植体诱导产生不定芽,这是木本植物植株再生的主要途径,由此途径再生的植株在遗传上比较稳定,组培苗相对高大健壮。因此,在继代培养中,多采用直接器官发生,常选用的材料是茎段和丛生芽,外源激素浓度与配比对组培苗增殖和分化对此有明显影响,生长素与细胞分裂素搭配使用的增殖效果明显优于单独使用,且生长素浓度不宜过高,生长素浓度过高会使茎段切口处产生大量愈伤组织,阻碍腋芽萌发。刘丹梅<sup>[12]</sup>将茎段接入培养基 MS+NAA 0.05 mg·L<sup>-1</sup>+6-BA 0.5 mg·L<sup>-1</sup>,可保持组培苗有良好的增殖,且长势健壮。Hosseini-nasr<sup>[13]</sup>等在继代培养中,采用新型的细胞分裂素 TDZ(噻苯隆),试验结果表明,与 6-BA 相比,TDZ 对芽的诱导能力更强,且相较于高浓度(1.0 μmol·L<sup>-1</sup>)的 TDZ,较低浓度(0.1 μmol·L<sup>-1</sup>)的 TDZ 更有利于诱导不定芽的增殖。为促进组培苗快速生长,可在培养基中加入 GA,Guo<sup>[14]</sup>等将组培苗接入伸长培养基 MS+6-BA(0.35~0.50 mg·L<sup>-1</sup>)+NAA(0.05~0.08 mg·L<sup>-1</sup>)+GA(0.07~0.10 mg·L<sup>-1</sup>),21~28 d 后组培苗可长高至 7 cm。糖浓度对增殖也有显著影响,这是由糖被植物细胞利用时的代谢特性所决定的,同时也与其改变培养基的渗透压密切相关,但糖浓度过高不易于试管苗形成自养功能,会抑制其进行光合作用<sup>[15]</sup>,王侠礼<sup>[16]</sup>研究发现在增殖过程中蔗糖浓度为 3%~4% 时对提高新梢数量、嫩梢长都有利,但浓度超过 4% 时,愈伤组织增大。

### 2.2 间接器官发生

间接形成试管苗的过程多是以离体器官为材

料,首先诱导出愈伤组织,再诱导不定芽,采用此种再生途径得到的组培苗是由多细胞组成的嵌合体,获得的再生植株无性系存在一定的变异性,但在分子育种建立转化体系过程中,必须先建立再生体系,因此研究间接器官发生有重要的意义,此过程主要以茎基、叶片和花药为材料。

2.2.1 茎基愈伤组织增殖 茎段基部可形成愈伤组织,将其接种到诱导培养基上诱导丛生芽,一段时间后,丛生芽生长形成嫩茎。再分化过程主要取决于培养基中细胞分裂素和生长素的浓度,适当降低生长素浓度,可抑制愈伤组织生长,有助于不定芽的诱导<sup>[17]</sup>;适当提高细胞分裂素浓度,可提高发芽率,且诱导出的腋芽生长迅速,但细胞分裂素浓度过高反而会使出芽率降低,有研究<sup>[18]</sup>认为这是由于激素浓度过高,会产生过多的愈伤组织,影响了其吸收培养基中的养分。细胞分裂素浓度过高还会使组培苗出现畸形,表现为茎部增粗,叶片变厚、变大。朱振波等<sup>[19]</sup>使茎段在含有 BA 0.2 mg·L<sup>-1</sup>+NAA 0.1 mg·L<sup>-1</sup> 的 MS 培养基上得到内层部分呈淡绿色,结构紧密的愈伤组织,再将愈伤组织接到诱导培养基 MS+NAA 0.4 mg·L<sup>-1</sup>+6-BA 0.4 mg·L<sup>-1</sup>,抽枝率和发芽率较好。

2.2.2 叶片离体培养 叶片离体培养分化为丛生苗的效果不如茎尖或茎段,但由于在香花槐分子育种过程中,有研究采用叶盘法转化质粒,因此研究此过程有重要意义,较低浓度的生长激素有利于愈伤组织的诱导,浓度较高时,愈伤组织的生长受到抑制。叶片可诱导出 3 类愈伤组织,第一类为浅绿色,表面带有白色绒毛,多从叶片中下部产生,第二类为浅褐色,水浸状,多在外植体靠近培养基部位产生,第三类为白色絮状,略带粘性,多在叶柄处产生。再分化时,应选择绿色愈伤组织块转至分化培养基中。胡海英等<sup>[20]</sup>试验表明用 NAA 0.5 mg·L<sup>-1</sup>+6-BA 0.5 mg·L<sup>-1</sup> 激素配比可从叶片诱导出色泽鲜亮且质地疏松的愈伤组织。Kanwar<sup>[20]</sup>研究发现 0.5 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D 可诱导出愈伤组织,再将浅绿色愈伤组织接入培养基 MS+NAA 0.05 mg·L<sup>-1</sup>+BA 0.6 mg·L<sup>-1</sup> 中,分化率较高。

2.2.3 花药离体培养 将植物花药培养成单倍体植株,再经过染色体加倍,能很快得到纯合的二倍体,可在一两年内完成自然生长中难以完成的

树种纯化,从而缩短育种年限,提高育种效率,并有利于对其遗传特性等基础问题进行研究。在诱导愈伤组织过程中,2,4-D对于愈伤诱导的启动是必需的,同时,多种激素配比会使诱导率提高。王灵仙等<sup>[21]</sup>将花药接种于愈伤诱导培养基MS+2,4-D 2 mg·L<sup>-1</sup>+KT 0.5 mg·L<sup>-1</sup>+6-BA 2 mg·L<sup>-1</sup>,诱导率为21.5%,在分化过程中,BA含量为0.3~0.5 mg·L<sup>-1</sup>,NAA含量为0.1 mg·L<sup>-1</sup>时,既形成丛生芽,又分化出独立健壮的小苗。蔗糖浓度也是诱导花粉植株再生的一个重要因素,高糖浓度会抑制花丝和药壁形成愈伤组织。这可能是由于花药内的部分花药细胞由于其胞质较浓,可耐受较高渗透压,因此可被诱导形成愈伤组织。曹晓燕等<sup>[22]</sup>研究发现,蔗糖浓度为9%和12%时,得到的愈伤组织来源于花粉细胞。

在长期的增殖培养过程中,由于营养丰富,湿度大,温度高,在组培苗中存在一部分弱苗和玻璃化苗,为获得高大健壮的组培苗,可采取措施进行壮苗。邓小梅等<sup>[23]</sup>通过提高培养基中凝胶浓度,使用组培专用封口膜以改善通气情况,减少了组培苗的玻璃化现象。张玉翠<sup>[24]</sup>在继代培养基中加入0.1 mg·L<sup>-1</sup>多效唑,组培苗叶片增厚,叶片保卫细胞增多,嫩梢健壮,提高了生根率及移栽成活率。

### 3 生根成苗

离体繁殖产生的组培苗需进一步诱导生根才能得到完整的植株,这是能否进行大量生产和实际应用的重要环节。基本培养基的组成和植物生长调节剂对诱导生根至关重要,降低培养基的无机盐浓度有利于根的形成,在香花槐的组织培养中多采用1/2或1/4MS为基本培养基,另有研究<sup>[25]</sup>采用SH培养基,生根率可达90%,除此,还应加入适量浓度生长素,如IAA、IBA、NAA等。有研究<sup>[26]</sup>认为IAA和IBA诱导形成的根属节水型根,移栽成活率高;而NAA诱导形成的根从愈伤组织中长,不与茎紧密联系,移栽成活率低。同时,生长素浓度也是重要影响因素,生长素浓度过高易产生愈伤组织,不易生根,即使生根,也处于愈伤组织的外围,由于其根未与维管束直接相通,移栽后成活率较低;生长素浓度过低,组培苗不生根或生根数量少,且生根速度慢,严重影响组培苗生产速度。刘昀等<sup>[26]</sup>将试管苗接入生根培养基1/4

MS+IBA (0.1~0.5) mg·L<sup>-1</sup>+IAA (1.7~2.5)mg·L<sup>-1</sup>,生根率在90%以上,还有研究发现<sup>[12]</sup>生根过程NAA浓度最佳范围在0.04~0.08 mg·L<sup>-1</sup>。Kanwar<sup>[20]</sup>将组培苗浸泡在2.0 μmol·L<sup>-1</sup> IBA溶液中,暗培养24 h,再接入培养基1/2MS+活性炭0.5%中,生根率为85%~90%。还有研究<sup>[27]</sup>从活性炭、培养条件、碳源方面讨论了影响香花槐生根的因素,认为活性炭有利于根的正常生长发育,无琼脂的液体培养基生根明显快于固体培养基且降低炼苗时对根部的伤害<sup>[28]</sup>蔗糖浓度对生根率无影响,但影响小苗根段生长发育。

### 4 试管苗炼苗和出瓶移栽

由于组培苗一直在较适宜的环境下生长,长势弱于大田生长的植株,叶片角质层、蜡质层不发达,表皮毛极少,且在移栽初期组培苗根系供水缓慢,直接移栽难以成活,必须经历分步炼苗,这既保证了生根苗有足够的时间来适应外部环境,又避免植株因过度失水而死亡。采用的一般方法是先封口炼苗,再打开瓶口,在室内散射光下炼苗,同时逐渐降低瓶内湿度,使组培苗与外界逐渐接触,以提高适应能力,除此之外,还应选择合适的基质。刘存平<sup>[29]</sup>选择泥炭2份加珍珠岩1份的混合基质,并在移栽前期将湿度保持在90%左右,其成活率可达到90%。丁元春<sup>[30]</sup>将组培苗移栽至珍珠岩和河沙混合基质中,成活率达90%。为进一步提高成活率,刘光福<sup>[31]</sup>在移栽前3 d将浓度为4.0 mg·L<sup>-1</sup>的多效唑加入培养瓶中,处理3 d后,移栽到蛭石,成活率比对照移栽成活率提高14个百分点。

综上所述,香花槐组织培养是一种快速繁殖方式,在保存种质资源和分子育种中有着极为重要的作用。首先,种质资源不足或急需大量繁殖时,组织培养可克服季节限制,在短时间内大量快速繁殖。其次,利用组织培养可以在较小的空间中保存种质资源,在很大程度上减少土地的使用量。除此之外,在通过分子育种来改良树种的研究中,组织培养具有重要地位,是研究的基础。因此,在今后的研究中应继续优化培养体系,为扩大香花槐的生产应用,从而为改善生存环境做出更大的贡献。

## 参考文献:

- [1] 王治金. 香花槐育苗及栽植技术[J]. 山西林业, 2010(3): 25-26.
- [2] 胡海英, 赵亚美, 王华芳, 等. 香花槐愈伤组织的诱导与细胞悬浮培养技术[J]. 北京林业大学学报, 2007, 29(5): 26-30.
- [3] 昌艳萍, 王晓茹, 王宇, 等. 香花槐各组织总 RNA 提取方法的改良和优化[J]. 河北大学学报: 自然科学版, 2012, 32(1): 75-80.
- [4] 尹伟伦, 王华芳. 林业生物技术[M]. 北京: 科学出版社, 2009.
- [5] Regner F, Roman H. Regeneration of grapevine by means of organogenesis [J]. Mitteilungen Klostemeuburg, 1994, 44(5): 168-174.
- [6] Shu Q Y, Liu G S, Qi D M, et al. An effective method for axillary bud culture and RAPD analysis of cloned plants in tetraploid black locust [J]. Plant Cell Report, 2003, 22: 175-180.
- [7] 郭军战, 舒庆艳, 王丽玲, 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.
- [8] 张仪, 张俊琦, 罗晓芳, 等. 四倍体刺槐无性系 K2 和 K3 的组织培养[J]. 植物资源与环境学报, 2009, 18(4): 82-84.
- [9] 段鹏慧. 香花槐无性繁殖技术[J]. 山西林业科技, 2007(2): 52-53.
- [10] 宋杰, 曹琳, 张继武. 香花槐组织快繁技术[J]. 内蒙古林业科技, 2006, 32(4): 16-17.
- [11] 王秋竹, 杨国会. 香花槐的组织培养研究[J]. 吉林农业科技学院学报, 2008, 17(3): 12-14.
- [12] 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.
- [13] Hosseini-Nasr M, Rashid A. Thidiazuron-induced high-frequency shoot regeneration from root region of *Robinia pseudoacacia* L. seedlings[J]. Biologia Plantarum, 2003, 47(4): 593-596.
- [14] Guo Wanli, Li Yidan, Gong Lei, et al. Efficient micropropagation of *Robinia ambigua* var. *idahoensis* (Idaho Locust) and detection of genomic variation by ISSR markers[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2006, 84: 343-351.
- [15] 尹伟伦, 王华芳. 林业生物技术[M]. 北京: 科学出版社, 2009.
- [16] 王侯礼. 糖和激素对香花槐微体快繁的影响[J]. 山东林业科技, 2004(5): 15-16.
- [17] 李世承, 宁涛, 田亚军, 等. 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.
- [18] 田成利, 傅玉兰, 张作梅, 等. 香花槐的组织培养与快速繁殖[J]. 中国农学通报, 2008, 24(4): 162-164.
- [19] 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(1): 18-19.
- [20] Kanwar K, Kaushal B, Abrol S, et al. Plant regeneration in *Robinia pseudoacacia* from cell suspension cultures[J]. Biologia Plantarum, 2008, 52(1): 187-190.
- [21] 王玲仙, 谢吉容, 付坚, 等. 香花槐花器官的组织培养及植株再生研究[J]. 北方园艺, 2008(1): 191-193.
- [22] 曹晓燕, 王喆之, 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.
- [23] 邓小梅, 王明麻, 黄敏仁, 等. 香花槐组培工厂化育苗技术研究[J]. 江西农业大学学报, 2003, 25(1): 69-72.
- [24] 张玉翠. 多效唑对香花槐组培苗生长的影响[J]. 林业实用技术, 2011(3): 60-61.
- [25] Zaragozá C, Muñoz-Bertomeu J, Arrillaga I. Regeneration of herbicide-tolerant black locust transgenic plants by SAAT[J]. Plant Cell Report, 2004(22): 832-838.
- [26] 刘昉, 李凤霞, 郑易之, 等. 香花槐组培苗快繁体系的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.
- [27] 孙书伟. 影响香花槐生根的几个因素[J]. 甘肃农业, 2006(1): 206.
- [28] 彭彪. 香花槐试管苗水培、蛭石生根及矮化松柏扦插繁殖技术[J]. 林业勘察设计, 2006(1): 79-83.
- [29] 刘存平. 香花槐试管苗的继代培养和生根移栽条件研究[J]. 山西大学学报: 自然科学版, 2006, 28(2): 202-204.
- [30] 丁元春. 香花槐引种驯化及组培快繁技术研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2008.
- [31] 刘光福, 崔平, 朱超. 多效唑对香花槐试管苗生长及移栽的影响[J]. 安徽农业科学, 2008, 35(18): 5456-5458.

## Research Advance in Tissue Culture of *Robinia pseudoacacia* ‘Idaho’

CAO Yu

(Biological Sciences and Biotechnology College of Beijing Forestry University, Beijing 100083)

**Abstract:** *Robinia pseudoacacia* ‘Idaho’ was a kind of drought tolerance species. There were some problems in season restriction and low propagation efficiency, and tissue culture could solve these problems. In order to optimize culture system, the research methods and experimental situation of tissue culture were reviewed, focusing on the problems and effects of the aseptic system establishment, subculture system, rooting, hardening-seedling and transplanting.

**Key words:** *Robinia pseudoacacia* ‘Idaho’; fast propagation; tissue culture