

文章编号: 100F-1498(2002)04-0474-05

塔拉组培技术研究

李志国, 吴昊, 杨文云, 夏定久

(中国林业科学研究院资源昆虫研究所, 云南昆明 650216)

摘要: 用塔拉嫩茎、茎尖、叶片、叶柄作外植体容易诱导形成愈伤组织, 在 MS+ BA $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 蔗糖 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ + 琼脂 $5.7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基上芽苗分化率为 50%。分别以 1/2MS+ BA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 蔗糖 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ + 琼脂 $5.7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 MS+ BA $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + IAA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 干酪素 $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ + 蔗糖 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ + 琼脂 $5.7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 作培养基, 用胚轴诱导芽苗, 愈伤组织块上的芽苗分化率 79%。芽苗培育约 20 d 后, 用 1/2MS+ NAA $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + IAA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + KT $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 蔗糖 $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ + 琼脂 $5.7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 作生根培养基培养约 15 d, 生根率为 76%。培养条件为: 光照 2 000-2 500 lx, 温度 25-29 ℃。

关键词: 塔拉; 组织培养; 诱导生根

中图分类号: S722.3⁺7

文献标识码: A

塔拉(tara)又名刺云实(*Caesalpinia spinosa* Kuntze), 原产南美洲安第斯山西北部靠近太平洋沿岸的山谷和沟谷地区, 以秘鲁的卡哈马卡、特鲁希略和阿亚库乔为主产地, 智利、玻利维亚、厄瓜多尔、哥伦比亚等国也有少量分布。塔拉的豆壳含塔拉单宁 50%-61%, 可用于生产塔拉单宁酸、没食子酸、焦性没食子酸和抗菌素增效剂(TMP)等多种化工、医药产品。塔拉种子即塔拉豆, 含半乳糖甘露聚糖 22%-34%, 用其生产的塔拉多糖(tara polysaccharide)在食品、医药和造纸等行业上有重要用途。塔拉豆无毒、可食, 种胚含蛋白质约 40.6%, 脂肪 14.3%, 含 16 种氨基酸和多种微量元素与微生素, 是一种较好的木本豆类资源^[1-7]。塔拉栽种后 3 a 即开花结实, 4-5 a 后逐步进入盛产期, 6 a 生单株豆荚产量最高达 8 kg。塔拉耐干热、速生、常绿、四季开花, 是干热河谷地区集经济、社会、生态三大效益为一体的珍贵树种之一。

在国外, 塔拉多系野生, 它的苗木培育与栽培技术研究较少。塔拉自 1991 年引入云南的干热、半干热河谷地区栽种获得成功, 笔者先后对其生态生物学、实生苗木培育技术、栽培管理技术等作了报道^[8-11]。经过近几年的努力, 塔拉组织培养首次获得成功, 为优良品种的选育、保存以及苗木的扩大繁殖等提供了一种新方法。

1 材料与方法

1.1 愈伤组织的诱导培养

用种子培育盆苗, 取叶片、叶柄、嫩茎、茎尖作外植体, 用无菌水反复冲洗, 吸水纸吸去表面水后, 在 0.1% 的升汞液中消毒 5-7 min, 取出用无菌水反复冲洗, 将升汞洗净, 置垫有无菌吸

收稿日期: 2001-11-09

基金项目: 云南省“九五”攻关项目(95A5-1)和国家林业局“948”引进项目(96-4-14)部分内容

作者简介: 李志国(1965), 男, 云南洱源人, 副研究员。

水纸的培养皿内切成小块,接种于诱导愈伤组织的培养基上培养。培养时间:15~20 d。

以MS培养基为基础培养基^[12],配置成5种配方:(1)MS+ NAA $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + 蔗糖 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ + 琼脂 $7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$;(2)MS+ 2.4-D $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + 蔗糖 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ + 琼脂 $7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$;(3)MS+ 2.4-D $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + KT $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + 蔗糖 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ + 琼脂 $7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$;(4)MS+ 2.4-D $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + BA $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + 蔗糖 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ + 琼脂 $7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$;(5)MS+ BA $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + 蔗糖 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ + 琼脂 $7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,以筛选出最佳培养基。

1.2 诱导愈伤组织分化芽苗

培养基配方:(6)MS+ BA $1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + 蔗糖 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ + 琼脂 $5.7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$;(7)MS+ BA $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + 蔗糖 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ + 琼脂 $5.7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$;(8)MS+ NAA $0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + KT $0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + BA $0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + 椰汁 $50\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$;(9)MS+ NAA $0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + KT $0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + BA $0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + 椰汁 $10\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ 。培养时间约40 d。

1.3 用胚轴诱导产生不定芽

用种子培育无菌苗,培养基配方:(10)1/2MS+ BA $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + 蔗糖 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ + 琼脂 $5.7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$;(11)MS+ BA $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + 蔗糖 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ + 琼脂 $5.7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$;(12)MS+ NAA $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + 蔗糖 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ + 琼脂 $5.7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。培养时间约10 d。

诱导胚轴产生芽苗的培养基:(13)MS+ BA $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + IAA $0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + 蔗糖 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ + 琼脂 $7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$;(14)MS+ BA $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + IAA $0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + 蔗糖 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ + 琼脂 $7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$;(15)MS+ BA $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + NAA $0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + 蔗糖 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ + 琼脂 $7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$;(16)MS+ BA $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + NAA $0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + 蔗糖 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ + 琼脂 $7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$;(17)MS+ BA $1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + IAA $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + 干酪素 $1.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ + 蔗糖 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ + 琼脂 $7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。培养时间约20 d。

1.4 诱导不定芽生根

剪取2~4 cm长粗壮芽苗于生根培养基上诱导生根。诱导生根培养基:(18)1/4MS+ NAA $1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + IBA $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + 蔗糖 $15\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ + 琼脂 $4.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$;(19)1/4MS+ NAA $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + IBA $1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + 蔗糖 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ + 琼脂 $4.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$;(20)1/2MS+ NAA $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + IBA $1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + 蔗糖 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ + 琼脂 $4.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$;(21)1/2MS+ NAA $1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + IBA $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + 蔗糖 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ + 琼脂 $4.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$;(22)1/2MS+ IBA $2.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + 蔗糖 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ + 琼脂 $4.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$;(23)1/2MS+ NAA $3.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + IAA $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + KT $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + 蔗糖 $15\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ + 琼脂 $5.7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。培养时间约15 d。组培条件:光照2000~2500 lx,温度25~29℃。

1.5 炼苗与袋苗的培育

沙壤土和腐殖土1:1混合,用0.2%的高锰酸钾消毒后装入普通广口玻璃罐头瓶内,装土量约为瓶的1/2。用清水洗净试管苗上的培养基后植于瓶内土中培养,光照保持3000~4000 lx。初期10 d内,瓶口酌情盖上玻片,适时喷水以保湿。苗高约8~10 cm时移植到营养袋内培育袋苗,苗高30 cm左右时定植,并与实生苗生长量进行对比观测。

2 结果与讨论

塔拉的外植体富含单宁,组培难度较大。通过反复试验,塔拉组培获得了成功。因接种的外植体和培养基均易氧化变黑影响诱导、培养效果,因此,接种后外植体或培养基发现变色时应及时进行转接。

2.1 愈伤组织的诱导

用茎尖、嫩茎、叶片、叶柄诱导培养, (1) (5)号培养基均能较好地诱导产生愈伤组织,但以第(5)号MS+ BA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 蔗糖 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ + 琼脂 $7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基为好,如表1。

2.2 诱导愈伤组织分化芽苗

用茎尖、嫩茎、叶片、叶柄诱导形成的愈伤组织块接种到分化培养基上,诱导培养产生芽苗比较困难。相比之下以(6)号:MS+ BA $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 蔗糖 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ + 琼脂 $5.7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 为好,芽苗分化率为50%,如表2。培养30~40 d后,芽苗可长至2~4 cm(见图1)。

2.3 用胚轴诱导产生不定芽

2.3.1 种子培养无菌苗 用种子培养无菌苗的培养基筛选结果以第(10)号:1/2MS+ BA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 蔗糖 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ + 琼脂 $5.7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 为好,种子发芽率可达100%。

2.3.2 诱导胚轴产生愈伤组织、分化芽苗

将无菌苗的上、下胚轴切成小段分别接种到(13) (17)号培养基上,诱导培养产生愈伤组织,然后再诱导其芽苗的分化,结果以(17)号MS+ BA $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + IAA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 干酪素 $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ + 蔗糖 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ + 琼脂 $7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 为好,有79%的愈伤组织块分化形成不定芽,如表3。培养20 d后,芽苗可长约2~4 cm(见图2)。

2.3.3 生根培养基筛选 诱导芽苗生根的培养基筛选结果以(20)号培养基生根率最低,仅达20%,以(23)号培养基,即:1/2MS+ NAA $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + IAA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + KT $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 蔗糖 $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ + 琼脂 $5.7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 芽苗生根率最高,达76%,如表4。从试验观察看,根是从愈伤组织团上分化形成的。芽苗诱导培养15 d,每1株芽苗可长出3~6条根(见图3)。

2.4 炼苗与袋苗的培育

试管苗十分娇嫩,不能直接移植到营养袋内培育袋苗。当试管苗根长到1.0~2 cm时,经室内瓶中炼苗约30~40 d,再经室外营养袋内培育至高30 cm左右定植,成活率可达90%以上。但从其生长状况看,组培苗生长速度较为缓慢,定植后1 a,高生长量仅为实生苗的50%左右。

表1 诱导愈伤组织培养基的筛选

培养基编号	接种外植体瓶数 (每瓶接10块)/瓶	培养时间/d	形成愈伤组织块百分率/%
(1)	10	20	83
(2)	10	20	89
(3)	10	20	81
(4)	10	20	86
(5)	10	20	92

表2 诱导愈伤组织分化芽苗培养基筛选

培养基编号	接种愈伤组织块瓶数 (每瓶接5块)	培养时间/d	形成芽苗百分率/%
(6)	10	20	50
(7)	10	20	26
(8)	10	20	18
(9)	10	20	10

表3 诱导胚轴产生不定芽培养基筛选

培养基编号	接种胚轴愈伤组织块瓶数 (每瓶接10块)/瓶	培养时间/d	愈伤组织块发芽率/%
(13)	10	20	37
(14)	10	20	33
(15)	10	20	42
(16)	10	20	51
(17)	10	20	79

表4 生根培养基筛选

培养基编号	接种不定芽瓶数 (每瓶接5株)/瓶	培养时间/d	生根的芽苗数/个	生根率/%
(18)	10	15	28	56
(19)	10	15	19	38
(20)	10	15	10	20
(21)	10	15	18	36
(22)	10	15	22	44
(23)	10	15	38	76

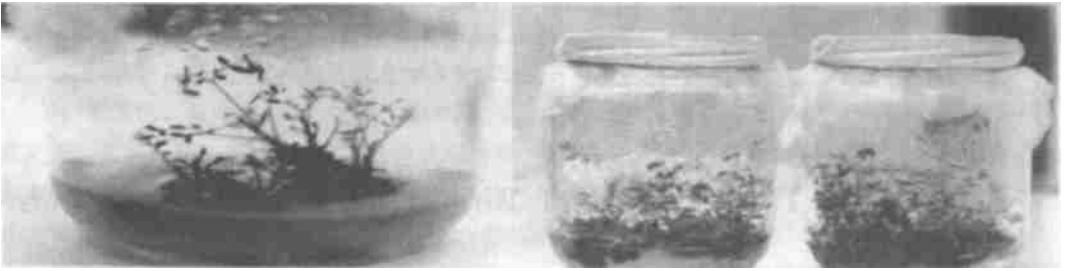


图1 塔拉愈伤组织诱导分化的芽苗

图2 塔拉胚轴诱导愈伤组织、分化的芽苗



图3 塔拉芽苗诱导产生的根系

3 结 论

(1) 塔拉的外植体富含单宁, 组培十分困难, 通过反复试验, 成功地突破了塔拉的组织培养技术。用嫩茎、茎尖、叶片、叶柄比较容易诱导形成愈伤组织, 但芽苗分化难。在 $MS + BA 1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{蔗糖 } 30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + \text{琼脂 } 5.7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 上芽苗分化率也仅为 50%。

(2) 用种子在 $1/2MS + BA 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{蔗糖 } 20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + \text{琼脂 } 5.7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基上培养无菌苗约 10 d, 在 $MS + BA 1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + IAA 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{干酪素 } 1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + \text{蔗糖 } 30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + \text{琼脂 } 5.7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基上用胚轴诱导芽苗, 79% 的愈伤组织块可诱导分化产生芽苗。芽苗培养约 20 d, 在生根培养基 $1/2MS + NAA 3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + IAA 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + KT 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{蔗糖 } 15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + \text{琼脂 } 5.7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 上培养约 15 d, 芽苗生根率可达 76%。培养条件为: 光照 2 000—2 500 lx, 温度 25—29 ℃。

(3) 试管苗经室内瓶中炼苗约 30—40 d, 再经室外营养袋内培育至高 30 cm 左右定植, 成活率可达 90% 以上。

参考文献:

- [1] 江苏科技考察团. 秘鲁刺云实资源及其利用考察报告[J]. 林产化工通讯, 1992, (3): 31—34
- [2] 夏定久, 李志国, 吴昊. 刺云实的工业用途与栽培环境[J]. 云南林业科技, 1993, (1): 42—44
- [3] Ana Siccha, Olga Lok de Ugaz. Hidrocoloides de tres especies de Caesalpinia. su analisis quimico [J]. Revista de Quimica, 1994, 8 (2): 153—161
- [4] 陈笏鸿, 吴在嵩, 毕良武. 塔拉提取物化学利用的研究进展[J]. 林产化学与工业, 1996, 16(3): 79—86
- [5] 毕良武, 吴在嵩, 陈笏鸿. 塔拉粉一步法制备没食子酸的研究[J]. 林产化学与工业, 1996, 16(2): 7—12
- [6] 马文秀, 罗庆云, 尚征贤. 塔拉豆多糖研究[J]. 林产化学与工业, 1999, 19(4): 29—34
- [7] 孙达旺. 植物单宁化学[M]. 北京: 中国林业出版社, 1992
- [8] 李志国, 杨文云, 夏定久. 塔拉实生苗培育技术研究[J]. 西南林学院学报, 1996, 16(3): 148—152

- [9] 李志国, 杨文云, 夏定久. 塔拉生物生态学习性初步研究[J]. 林业科学研究, 1997, 10(1): 29-34
- [10] 杨文云, 吴昊, 赵一鹤. 塔拉及其繁殖栽培技术[J]. 林业科技通讯, 1998, (1): 34
- [11] 李志国, 杨文云, 赵一鹤. 塔拉害虫种类初步调查[J]. 西南林学院学报, 1999, 19(4): 228-230
- [12] 陈正华. 木本植物组织培养及应用[M]. 北京: 高等教育出版社, 1986

A Study on the Tissue Culture of Tara (*Caesalpinia spinosa* Kuntze)

LI Zhi-guo, WU Hao, YANG Wen-yun, XIA Ding-jiu

(The Research Institute of Resource Insects, CAF, Kunming 650216, Yunnan, China)

Abstract: Tara, *Caesalpinia spinosa* Kuntze, distributing naturally in South America, is mainly distributed in the valley area in the middle of the east Andes and in the seashore desert along the Pacific Ocean. The plant was successfully introduced to the xerothermic and semi-xerothermic valleys of Yunnan province, China in 1991. This paper deals with the technique of tissue culture of tara. There is rich tannin in tara explant because its tissue culture is very difficulty. Using tender stem, stem needle, leaf or leafstalk act as explant cultivate callus mass to cultivate callus mass and to use MS+ BA $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + cane sugar $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ + gagaragar $5.7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ act as sprout polarization culture medium, the percentage of callus mass to sprout is only 50%. Using $1/2 \text{ MS} + \text{BA } 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{cane sugar } 20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + \text{gagaragar } 5.7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ and MS+ BA $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{IAA } 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{casein } 1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + \text{cane sugar } 30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + \text{gagaragar } 5.7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ act as culture medium to culture asepsis young seedling 10 days and to culture callus mass about 20 days respectively, there are 79% callus mass that come from hypocotyl can be grows bud plantlets. To culture asepsis bud plantlet about 20 days, Using $1/2 \text{ MS} + \text{NAA } 3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{IAA } 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{KT } 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{cane sugar } 15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} + \text{gagaragar } 5.7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ act as growing root culture medium, the cent of growing root bud plantlet is 76% after 15 days. The experiment condition is that illumination is 2 000-2 500 lx and the temperature is 25-29 °C.

Key words: Tara (*Caesalpinia spinosa* Kuntze); tissue culture; induced rooting