

文章编号: 1001-1498(2008)03-0403-04

## 大叶相思下胚轴离体培养再生植株的研究

刘娟旭<sup>1,2</sup>, 刘玲<sup>1</sup>, 王静<sup>1</sup>, 余义勋<sup>1\*</sup>

(1. 华南农业大学园艺学院, 广东 广州 510642;

2. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Apopka, FL 32703-8504, U. S. A.)

关键词: 大叶相思; 下胚轴; 植物生长调节剂; 植株再生

中图分类号: S792.99

文献标识码: A

### Plant Regeneration from Hypocotyls of *Acacia auriculiformis* is Cultured in vitro

LIU Juan-xu<sup>1,2</sup>, LIU Ling<sup>1</sup>, WANG Jing<sup>1</sup>, YU Yi-xun<sup>1\*</sup>

(1. College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong, China;

2. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Apopka, FL 32703-8504, U. S. A.)

**Abstract:** The regenerated plantlets of *Acacia auriculiformis* were obtained by the method of re-differentiation of the callus from the hypocotyls explants. The effects of plant regulator compositions on the induction of callus and the differentiation of adventitious buds *in vitro* culture were studied. The optimum medium for callus induction was MS medium containing 1.0 or 1.5 mg · L<sup>-1</sup> 2,4-D and 0.5 mg · L<sup>-1</sup> KT and 100% the callus induction frequency was obtained. The optimum medium for re-differentiation of callus was MS medium containing 1.5 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA and 0.2 mg · L<sup>-1</sup> NAA and 84.7% of adventitious shoot regeneration frequency with 5.83 shoots per explants was obtained. In addition, the optimum medium for the adventitious buds induced from the hypocotyls explants without transferring the callus was MS medium containing 2.0 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA, 0.1 mg · L<sup>-1</sup> NAA and 0.2 mg · L<sup>-1</sup> KT. Excised shoots were effectively elongated in MS medium without appending any hormones. Elongated shoots of 3.0 cm rooted when they were transferred to MS medium containing 0.1 mg · L<sup>-1</sup> IAA and 0.2 mg · L<sup>-1</sup> NAA after 30 days and developed into healthy plantlets, which resulted in a rooting rate of 85%. The results of this study will facilitate the application of genetic transformation methods in *A. auriculiformis*.

**Key words:** *Acacia auriculiformis*; hypocotyls; plant growth regulator; plant regeneration

大叶相思 (*Acacia auriculiformis* A. Cunn.) 为含羞草科 (Mimosaceae) 金合欢属 (*Acacia* Mill.) 的落叶乔木, 原产澳洲, 20 世纪 60 年代初引入广东省。大叶相思适应性强, 速生、耐干旱瘠薄, 根瘤发达, 固氮能力较强, 枯枝落叶量大, 对改良土壤、提高肥力很有利, 是荒山造林、水土保持和改善生态环境的优良树种之一。此外, 大叶相思高大挺拔, 花期满树黄

花, 十分壮观, 为华南地区的优良行道树。有关其它相思类树种组培成功的报道较多<sup>[1-5]</sup>, 陈本学等<sup>[6]</sup>对相思类树种的外植体在组培中的应用进行了综述, 颜慕勤等<sup>[7]</sup>、翟应昌等<sup>[8]</sup>、高洁等<sup>[9]</sup>研究了大叶相思组培, 并获得成功, 但多以快繁为目的, 国外未见大叶相思组织培养的报道。本研究以大叶相思下胚轴为外植体, 通过愈伤组织诱导途径建立大叶相思高效再生

收稿日期: 2007-12-06

基金项目: 霍英东教育基金项目“反义 RNA 及 RNAi 技术延长月季切花自然保鲜期 (104031)”; 广东省自然科学基金项目“基因工程培育具有芳香品质红掌的研究 (05300848)”

作者简介: 刘娟旭, 女, 博士后, 主要研究方向: 园林植物生物技术. E-mail: juanxuli@yaho.com.cn

\*通讯作者: 余义勋, 男, 博士, 副教授, 主要研究方向: 园林植物生物技术; 电话: 13268200418; E-mail: yuyixun@scau.edu.cn

体系,为开展大叶相思转基因研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料来源

2005年4月在华南农业大学校园采收健康饱满的大叶相思种子,贮藏于4℃冰箱备用。

### 1.2 方法

**1.2.1 无菌苗的获得及诱导培养** 2个月后从冰箱中取出大叶相思种子,42℃温水浸泡10h后,用自来水冲洗10min,在超净工作台上用70%的酒精消毒30s,再用0.1%升汞溶液消毒8~10min,无菌水冲洗4次,接种到1/2MS培养基中。15d后种子膨大发芽,20d后子叶长出,35d后下胚轴伸长至3.5cm左右时,切取幼苗的下胚轴0.5~1.0cm接种到诱导培养基上培养。每培养瓶接种5个下胚轴切段外植体,每处理8瓶,下同。

培养基内琼脂浓度均为 $7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,蔗糖浓度为 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,pH值5.8~6.0,培养条件为 $24\sim 26\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,光照 $12\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ ,光照强度 $3\text{ 000 lx}$ 。

**1.2.2 2,4-D和KT以及6-BA和NAA组合对下胚轴愈伤组织的诱导** 诱导培养基的基本培养基为MS,附加不同浓度的2,4-D、KT、6-BA和NAA组成愈伤组织诱导培养基。2,4-D的浓度分别为0.0、0.5、1.0、1.5 $\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,KT的浓度分别为0.0、0.5 $\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,6-BA的浓度分别为0.0、0.5、1.0、2.0 $\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,NAA的浓度分别为0.0、0.2 $\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。大叶相思无菌苗下胚轴切0.5~1.0cm左右,平接于培养基中进行愈伤组织诱导培养,30d后统计愈伤组织诱导率。

**1.2.3 6-BA和NAA对愈伤组织再分化的影响** 在1.2.2节愈伤组织诱导培养基中继续培养,愈伤组织难以自行分化成芽。预试验中,作者曾选用TDZ、6-BA、Zr比较促进分化的效果,结果发现6-BA和NAA对大叶相思下胚轴愈伤组织的再分化有较好的效果。以MS为基本培养基,附加不同浓度的6-BA和NAA组成愈伤再分化培养基。6-BA的浓度分别为0.0、0.5、1.0、2.0、3.0 $\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,NAA的浓度分别为0.2、0.4 $\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。35d后统计萌发不定芽数,研究2种植物生长调节剂对愈伤组织再分化的影响。

**1.2.4 6-BA、NAA和KT组合诱导下胚轴愈伤组织和不定芽分化** 在实验中,通过调整激素配比,下胚轴可在含有6-BA、NAA和KT的培养基中不经过转换培养基诱导不定芽分化。以MS为基本培养基,6-BA

的浓度分别为0.0、0.5、1.0、1.5、2.0、3.0 $\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,NAA的浓度分别为0.1、0.3 $\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,KT的浓度为0.2 $\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。经30d的培养,研究3种植物生长调节剂对愈伤组织诱导和再分化的影响。

**1.2.5 6-BA和BA对再生植株增殖的影响** 以MS为基本培养基,附加不同浓度的6-BA和BA,30d后统计增殖倍数。6-BA的浓度分别为0.0、1.0、1.5、2.0 $\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,BA的浓度分别为0.1、0.3、0.5、1.0 $\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

**1.2.6 不定芽的伸长、生根及移植** 将再生不定芽接种到不添加植物生长调节剂的MS培养基中伸长培养,伸长后的小苗接种到MS+IAA 0.1 $\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA 0.2 $\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 培养基中,30d后统计生根率。待根长至3cm左右时,炼苗2d,之后将苗取出,洗去根上的培养基,移植到经过消毒的混合基质(园土:泥炭土=1:1)中,每周浇3次水,20d后统计成活率。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同植物生长调节剂配比对植株再生的影响

**2.1.1 2,4-D和6-BA对诱导愈伤组织的影响** 下胚轴分别接种于附加不同浓度的2,4-D和6-BA培养基中,均可不同程度地诱导愈伤组织(表1),20d后下胚轴上部和下部伤口处均开始出现疏松浅黄色愈伤组织(图版A)。在2,4-D 1.0 $\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 或1.5 $\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +KT 0.5 $\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组合中,愈伤组织诱导率最高,可达100%;而6-BA 2.0 $\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA 0.2 $\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组合愈伤组织诱导率也可达90.0%。

表1 MS培养基中2,4-D和KT及6-BA和NAA组合对下胚轴愈伤组织的诱导率

MS培养基中激素组成	愈伤组织诱导率/%
2,4-D 0.5 $\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +KT 0.5 $\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	82.5
2,4-D 1.0 $\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +KT 0.5 $\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	100.0
2,4-D 1.5 $\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +KT 0.5 $\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	100.0
6-BA 0.5 $\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA 0.2 $\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	52.5
6-BA 1.0 $\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA 0.2 $\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	75.0
6-BA 2.0 $\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA 0.2 $\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	90.0

**2.1.2 6-BA和NAA对愈伤组织再分化不定芽的影响** 将愈伤组织块转移到含不同浓度的6-BA和NAA培养基上进行芽诱导,20d后可分化出浅绿色不定芽点,后逐渐分化出芽(图版B、C);培养35d后,统计萌发不定芽数(表2)。由表2可见:6-BA浓度对大叶相思不定芽分化有很大影响,只有NAA时,不定芽分化率为0,最佳愈伤组织再分化培养基是MS+6-BA 1.5 $\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA 0.2 $\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,不定芽再分化率可达

84.7%, 平均每个愈伤组织块的分化芽数达 5.83 个。

表 2 MS 培养基中 6-BA 和 NAA 对愈伤组织再分化不定芽的影响

6-BA / (mg · L <sup>-1</sup> )	NAA / (mg · L <sup>-1</sup> )	不定芽分化率 / %	平均不定芽数 / 个
0.0	0.2	0.0	0.0 d
0.5	0.2	52.8 c	1.95 c
1.0	0.2	54.6 c	2.38 b
1.5	0.2	84.7 a	5.83 a
2.0	0.2	82.4 a	5.41 a
3.0	0.2	66.1 b	2.59 b
1.0	0.4	42.9 d	2.48 b
1.5	0.4	82.6 a	5.31 a
2.0	0.4	81.4 a	5.49 a
3.0	0.4	66.9 b	2.41 b

2.1.3 6-BA、NAA 和 KT 组合对下胚轴诱导愈伤组织和分化不定芽的影响 下胚轴外植体接种至含有 6-BA、NAA 和 KT 的培养基中,部分下胚轴接种 20~25 d 后产生浅绿至深绿色愈伤组织,质地较为致密,表面粗糙,呈块状;这种愈伤组织随后可分化出不定芽,逐渐长成小芽丛(图版 1, D~F)。由表 3 可见:最佳培养基是 MS+6-BA 2.0 mg · L<sup>-1</sup>+NAA 0.1 mg · L<sup>-1</sup>+KT 0.2 mg · L<sup>-1</sup>,愈伤组织诱导率达 92.5%,不定芽分化率达 72.5%,平均每个下胚轴分化芽数达 5.94 个。

表 3 MS 培养基中 6-BA、NAA 和 KT 组合对下胚轴诱导愈伤组织和分化不定芽的影响

6-BA (mg · L <sup>-1</sup> )	NAA	KT	愈伤组织 诱导率 / %	分化数 / 个	不定芽分 化率 / %	平均不定 芽数 / 个
0.0	0.1	0.2	17.5	0	0.0	0.0
0.5	0.1	0.2	47.5	8	20.0	2.93
1.0	0.1	0.2	80.0	19	47.5	2.49
1.5	0.1	0.2	85.0	21	52.5	3.71
2.0	0.1	0.2	92.5	29	72.5	5.94
3.0	0.1	0.2	87.5	27	67.5	4.16
1.0	0.3	0.2	82.5	17	42.5	1.37
1.5	0.3	0.2	82.5	18	45.0	2.96
2.0	0.3	0.2	85.0	27	67.5	5.13
3.0	0.3	0.2	90.0	14	35.0	3.26

注:各处理的外植体数均为 40 个。

## 2.2 再生植株的增殖

将获得的不定芽转入不同增殖培养基中进行丛生苗诱导。从表 4 看出:当 6-BA 和 BA 分别为 1.0、0.3 mg · L<sup>-1</sup> 时,平均增殖培数最高,达 4.82 倍,即最佳增殖培养基为 MS+6-BA 1.0 mg · L<sup>-1</sup>+BA 0.3 mg · L<sup>-1</sup>。

表 4 MS 培养基中 6-BA 和 BA 对比对增殖培数的影响

BA / (mg · L <sup>-1</sup> )	6-BA / (mg · L <sup>-1</sup> )		
	1.0	1.5	2.0
0.1	1.51	2.98	1.64
0.3	4.82	2.89	2.49
0.5	3.74	3.50	2.88
1.0	2.76	2.31	1.56

注:表中数据为增殖培数。

## 2.3 不定芽的伸长、生根及移植

再生不定芽接种到不添加植物生长调节剂的 MS 培养基中伸长培养,4 周后可伸长至 2.5 cm (图版 1, G),这些芽有的先形成羽状复叶,有的直接形成叶状柄,还有的叶状柄上长出复叶。将伸长后的芽接种到 MS+IAA 0.1 mg · L<sup>-1</sup>+NAA 0.2 mg · L<sup>-1</sup> 培养基上,35~40 d 后每株苗长出 3~4 条粗细均匀的根,生根率达 85%。待根长至 3 cm 左右时,炼苗 2 d,之后将苗取出,洗去根上的培养基,移植到经过消毒的混合基质(园土 泥炭土 =1:1)中,每周浇 3 次水,2 周后长出新叶表明移植成活,成活率达 90% 以上。

## 3 结论与讨论

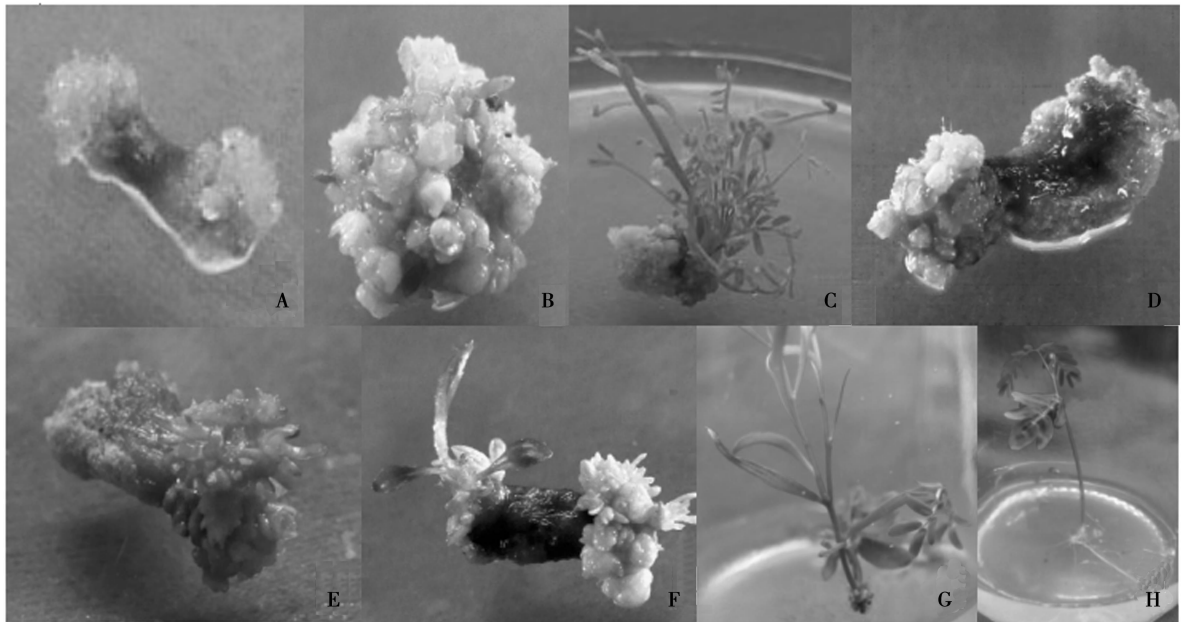
本研究利用大叶相思下胚轴为外植体,通过愈伤组织诱导途径建立了高效再生体系。最佳愈伤组织诱导培养基为 MS+2,4-D 1.0 mg · L<sup>-1</sup> 或 1.5 mg · L<sup>-1</sup>+KT 0.5 mg · L<sup>-1</sup>,下胚轴愈伤组织诱导率达 100%,如果继续在该培养基上培养,则不能形成不定芽,其原因可能是 2,4-D 对不定芽的分化具有抑制作用,黄莺等<sup>[10]</sup>在石竹组织培养研究中有相类似报道。将愈伤组织转移到再分化培养基 MS+6-BA 1.5 mg · L<sup>-1</sup>+NAA 0.2 mg · L<sup>-1</sup> 上,再分化率达 84.7%。下胚轴切段在 MS+6-BA 2.0 mg · L<sup>-1</sup>+NAA 0.1 mg · L<sup>-1</sup>+KT 0.2 mg · L<sup>-1</sup> 上培养,下胚轴可先形成愈伤组织,不需转换培养基就可以再分化不定芽,愈伤组织诱导率和分化率分别达 92.5% 和 72.5%。不定芽较适生根培养基为 MS+IAA 0.1 mg · L<sup>-1</sup>+NAA 0.2 mg · L<sup>-1</sup>,生根率达 85% 以上。

在不定芽分化研究中发现,分化培养基中的植物生长调节剂浓度较高时,不利于分化芽形成后的生长,若不及时继代转瓶,容易产生畸形苗,如过细、茎节分化不明显、植株玻璃化、长势弱等。因此,要及时将分化芽转移到植物生长调节剂浓度较低的增殖或伸长培养基中。

大叶相思原产于热带或亚热带地区,为热带造

林与观赏树种,耐寒性差,这极大地限制了这一优良树种在中国大面积推广和应用。本研究结果为利用

基因工程技术改良大叶相思的品质奠定了基础。



图版 A:在含有 2,4-D 的培养基中下胚轴伤口处诱导愈伤组织; B 和 C: 切下的愈伤组织块再分化出不定芽; D、E 和 F: 在  $MS+6-BA 2.0 mg \cdot L^{-1}+NAA 1.0 mg \cdot L^{-1}+KT 0.2 mg \cdot L^{-1}$  培养基中 1 次培养时下胚轴伤口处诱导愈伤组织和不定芽; G: 不定芽伸长; H: 不定芽生根。

### 参考文献:

- [1] 苏秀城. 黑木相思组织培养的初步研究 [J]. 福建林业科技, 1999, 26(4): 78 - 81
- [2] 张月娇. 厚荚相思组培育苗试验 [J]. 福建林业科技, 2003, 30(4): 72 - 74
- [3] 张祖荣, 刘兴良. 灰木相思茎段腋芽的组织培养及植株再生 [J]. 西南农业大学学报:自然科学版, 2004, 26(3): 291 - 293
- [4] 蔡玲, 王以红, 吴幼媚, 等. 马尖相思离体培养再生植株的研究 [J]. 广西林业科学, 1999, 28(3): 127 - 130
- [5] 裴珍飞, 曾蛹山, 刘英. 马占相思优树组培早期增殖速率研究 [J]. 林业科学研究, 2002, 15(1): 61 - 65
- [6] 陈本学, 林思祖, 丁国昌, 等. 相思类树种外植体繁殖研究进展 [J]. 中国农学通报, 2007, 23(4): 127 - 130
- [7] 颜慕勤, 陈平. 大叶相思的组织培养和植株再生 [J]. 植物生理学通讯, 1983(1): 29
- [8] 翟应昌, 周志坚, 李尚第. 金合欢属 (*Acacia*) 的组织培养 [J]. 热带林业科技, 1984(4): 20 - 25
- [9] 高洁, 王玲. 大叶相思茎段腋芽组织培养技术初探 [J]. 西南林学院学报, 2003, 23(2): 20 - 25
- [10] 黄莺, 范燕萍, 王文生, 等. 石竹愈伤组织诱导及植株再生 [J]. 华南农业大学学报:自然科学版, 2003, 24(1): 50 - 52