

文章编号:1001-1498(2008)03-0407-04

南非羊蹄甲的离体培养和植株再生*

吕秀立^{1,2}, 张庆费^{1**}, 边黎明², 王锐³, 徐闪峰¹, 桂仁意⁴

(1. 上海市园林科学研究所, 上海 200232; 2. 南京林业大学林木遗传和基因工程重点实验室, 江苏南京 210037; 3. 上海市林业总站, 上海 200072; 4. 浙江林学院林业与生物技术学院, 浙江临安 311300)

关键词: 南非羊蹄甲; 离体培养; 植株再生

中图分类号: S722.3 文献标识码: A

In Vitro Culture and Plant Regeneration of *Bauhinia galpinii*

LU Xiu-li^{1,2}, ZHANG Qing-fei¹, BIAN Li-ming², WANG Rui³, XU Shan-feng¹, GUI Ren-yi⁴

(1. Shanghai Landscape Gardening Research Institute, Shanghai 200232, China; 2. Key Laboratory of Forest Genetics and Gene Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China; 3. Shanghai Forestry Station, Shanghai 200072, China; 4. Forestry and Biotechnology School, Zhejiang Forestry University, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: Winter lignified stems of *Bauhinia galpinii* were used as explants for tissue culture, and the effects of different hormones on inductivity rate and rooting rate were investigated by supplementing different concentrations. The results indicated that buds were induced from a 2 cm high young plantlet cultured in MS medium supplemented with 1.0 mg · L⁻¹ 6-BA and 0.1 mg · L⁻¹ NAA for 20 d, and the induction rate was 100%. The mean amount of buds was 8.7. The medium of MS + 0.4 mg · L⁻¹ NAA was used for rooting and the rooting rate was 85%. The experiment strategy to establish tissue culture system from lignified stem was feasible, which could be used for cold acclimation and cold resistant mutant selection.

Key words: *Bauhinia galpinii*; *in vitro* culture; plant regeneration

南非羊蹄甲 (*Bauhinia galpinii*) 为豆科 (Leguminosae) 羊蹄甲属 (*Bauhinia* L.) 植物。该属植物世界分布约 600 余种, 遍布于热带地区, 我国有 40 种, 生长于南部和西南部^[1], 为灌木、藤本及小乔木, 是深根性树种, 易栽培难移栽, 抗炎热耐干旱贫瘠土壤, 绝大多数种类不耐寒。叶形似羊蹄甲状, 花色艳丽, 花形奇特, 像五角星, 有一定的社会意义^[2], 观赏效果极佳, 可以作为园林绿化树种, 在景观应用上能构建不同的效果^[3]。

目前, 羊蹄甲属植物药理作用、化学成分研究比较多^[4,5], 许又凯等^[6]认为羊蹄甲是一种营养丰富、具有很高开发潜力的野生食用花卉, 可以发展为特色蔬菜, Schmitz^[7]、Larsen^[8]、邹璞等^[9]学者对羊蹄甲属花粉形态进行了详细研究。上海城投绿化科技发展有限公司从 2002 年开始引种, 并栽植于野外, 每年冬季地上部分易受冻害枯死, 但地下根均未受冻伤, 翌年春季仍能萌发新枝, 因此, 冬季低温是限制南非羊蹄甲在上海绿化应用的主要因子^[10]。

收稿日期: 2007-10-08

基金项目: 国家科技支撑项目(2006BAD03A1702)和上海市科委登山计划(06DZ2303)资助

作者简介: 吕秀立(1980—), 女, 山东德州人, 绿化林业工程师, 林木遗传育种专业在读博士研究生, 主要从事珍稀木本、草本的组织培养研究。E-mail: lkdyun@163.com, Tel: 021-54354198

* 上海城投绿化科技发展有限公司钱又宇老师为本试验提供南非羊蹄甲材料, 特此致谢!

** 通讯作者: 张庆费。E-mail: qfzhang@126.com, Tel: 021-54357339

目前尚未见南非羊蹄甲离体培养技术体系研究的报道,建立南非羊蹄甲离体培养技术体系,为低温锻炼组培苗,筛选抗寒能力强的优良个体,提供了庞大的实验群体,为提高南非羊蹄甲抗寒性奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

2007年2月于上海城投绿化科技发展有限公司苗圃内取未冻伤的木质化枝条作为外植体。

1.2 外植体消毒

流水冲洗2 h 除去表面灰尘后剪段,于超净工作台上置于无菌瓶中,倒入75%无水乙醇浸泡30 s,10%的“84 消毒液”浸洗15 min,无菌水洗5次,0.1%升汞再浸洗5 min,无菌水洗5次,无菌滤纸吸干表面水分,接种于准备好的培养基中。按照上述步骤消毒,在冬季外植体数量有限的情况下,无菌苗获得率达到50%以上。

1.3 培养基的筛选

1.3.1 启动培养基培养 在初代培养基上培养2个月,外植体腋芽处才开始萌动,腋芽抽出。

1.3.2 分化培养基筛选 腋芽萌发至2 cm 时,剪取萌芽,接种到MS 附加不同浓度6-BA、KT 和0.1 mg · L⁻¹ NAA 的培养基上,诱导不定芽的增殖,培养1个月后统计分化情况,计算诱导率及平均诱导芽数。然后将诱导出的不定芽转移至添加0.2 mg · L⁻¹ 6-BA、0.1 mg · L⁻¹ NAA 的MS 培养基上,进行壮苗培养。

1.3.3 生根培养基筛选 MS 培养基附加不同浓度NAA、IAA、IBA 生长素,诱导不定芽生根,培养1个月后统计生根情况,计算诱导率及平均诱导根数。

1.4 培养条件

以上各种培养基的pH 值为5.75,蔗糖30 g · L⁻¹,琼脂6.4 g · L⁻¹,高压灭菌备用。光照时间为12 h · d⁻¹,光照强度为80 μmol · m⁻² · s⁻¹左右。

1.5 试管苗移栽

将生根试管苗开瓶炼苗3~4 d 后,洗净培养基,移栽于泥炭土中,注意保湿。

2 结果与分析

2.1 分化培养基筛选

待腋芽萌动长到一定高度时,剪取2 cm 左右茎段,接种于MS 附加不同浓度激素的分化培养基中,见表1。可以看出,MS 分化培养基诱导不定芽,6-BA 比

KT 诱导效果更显著,6-BA 浓度小于0.5 mg · L⁻¹时,需要1个月的时间才能分化出不定芽,数量很少。6-BA 浓度增加至1.0 mg · L⁻¹,接种10 d 左右观察到不定芽的分化,18 d 形成形态可见的不定芽,至1个月时,分化达到最高峰,平均诱导芽数可以达到8.7个,叶色浓绿,状如羊蹄,长势旺盛,株型正常(图1、2),6-BA 浓度为2.0 mg · L⁻¹时,平均诱导芽数略有下降,株型比较矮。添加KT 的培养基,平均诱导芽数比同浓度的6-BA 诱导芽数少,叶色嫩绿,不定芽参差不齐。比较得知MS + 6-BA 1.0 mg · L⁻¹ + NAA 0.1 mg · L⁻¹为诱导出芽的适宜培养基。

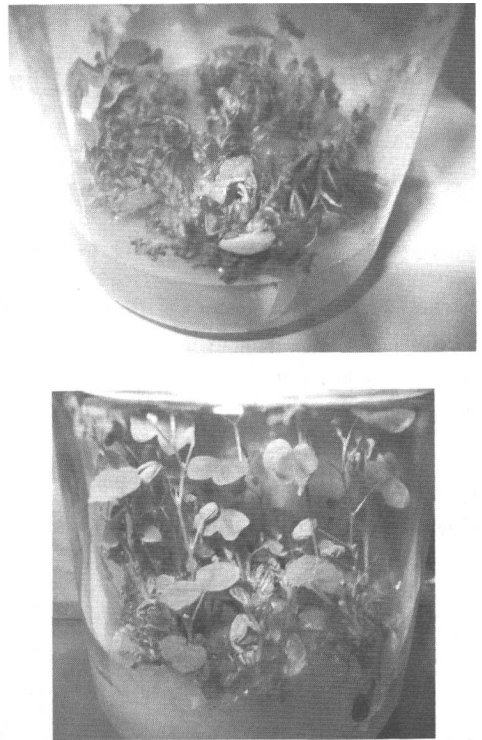


图1.2 增殖状态的南非羊蹄甲组培苗

表1 不同激素及不同激素水平对芽增殖的影响

6-BA/ (mg · L ⁻¹)	KT/ (mg · L ⁻¹)	NAA/ (mg · L ⁻¹)	接种数	平均诱导芽数	诱导率/%
0.1	0.0	0.1	30	2.2	100
0.5	0.0	0.1	30	3.1	100
1.0	0.0	0.1	30	8.7	100
2.0	0.0	0.1	30	7.0	100
0.0	0.1	0.1	30	2.1	100
0.0	0.5	0.1	30	3.3	100
0.0	1.0	0.1	30	6.1	100
0.0	2.0	0.1	30	5.3	100

注:诱导率 = 出芽外植体数/接种数; 平均诱导芽数 = 不定芽总数/出芽外植体数

南非羊蹄甲不定芽的极性生长现象明显,诱导出的不定芽全部向上生长,即使由于空间的限制,基部分化出的不定芽伸长后,扭转角度,仍向上生长。生长到2 cm左右时及时切下,以便母株上其余较小不定芽的正常发育。

2.2 壮苗培养

分割后的不定芽长势细弱,不适合直接诱导生根,需要壮苗培养,壮苗培养基以MS + BA 0.1 mg · L⁻¹ + NAA 0.1 mg · L⁻¹为宜。培养1个月后,茎段加粗,叶色浓绿,可以用来生根。

2.3 试管苗生根

将壮苗后的南非羊蹄甲无菌苗,接种于MS附加不同浓度生长素的培养基中,接种量为100,20 d后调查结果见表2。

表2 不同激素及不同激素水平对生根的影响

NAA/ (mg · L ⁻¹)	IBA/ (mg · L ⁻¹)	IAA/ (mg · L ⁻¹)	接种数	生根率/%
0.1	0.0	0.0	100	13
0.4	0.0	0.0	100	85
0.8	0.0	0.0	100	73
0.0	0.1	0.0	100	9
0.0	0.4	0.0	100	54
0.0	0.8	0.0	100	49
0.0	0.0	0.1	100	11
0.0	0.0	0.4	100	51
0.0	0.0	0.8	100	47

在实验的激素浓度范围内,生根率最多达到85%,且不同生长素诱导生根效果差异显著,NAA对促进生根效果最明显,IAA、IBA次之。当NAA的浓度为0.4 mg · L⁻¹时,生根率达到最大,为85%,当浓度为0.8 mg · L⁻¹时,生根率呈现下降趋势,并且随生长素浓度的增加,无菌苗基部开始出现愈伤组织,不利于生根以及后期移栽。MS + NAA 0.4 mg · L⁻¹可以作为南非羊蹄甲适宜的生根培养基。

2.4 试管苗移栽

当根长至0.5 cm时,即可进行试管苗移栽。先在培养室中开瓶炼苗3~4 d,然后洗净培养基,植入湿润的泥炭土中,覆以地膜,保持湿度。等到试管苗发出新根,并长出新叶片时,可去掉地膜,长至10 cm高时(图3、4)可植入户外排水灌溉良好的大田中,适当遮荫。共移栽了5 000棵,成活了近3 800棵,移栽成活率达到了75%,移栽成活的植株叶片形状与母株相同(图5、6)。

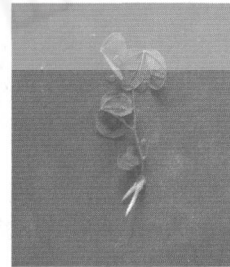


图3.4 生根良好的南非羊蹄甲组培苗



图5.6 移栽成活的南非羊蹄甲组培苗

3 分析与讨论

(1) 外植体一般采用当年生的幼嫩枝条,因其生长旺盛,感染病菌几率低,易获得无菌体系。本项研究的目的是提高南非羊蹄甲的抗寒性,采用冬季经历低温未受冻害的枝条作为外植体,建立离体无菌体系,进行组织培养,这样有可能筛选出抗寒能力强的南非羊蹄甲小苗,为今后抗寒株系的选育,提供一条有效的借鉴途径。

(2) 在外植体消毒处理过程中,两种药剂交替消毒、或一种药剂低剂量反复多次消毒比高剂量一次消毒安全可靠^[11-12],并且消毒方法对后期培养也会产生一定影响^[13]。在处理南非羊蹄甲木质化茎段时,先采用“84 消毒液”浸泡,除了消毒作用外,更是发挥了其湿润的作用,以利后续升汞的渗入,加强升汞的消毒效果,再用升汞短时间消毒,达到完全杀菌而又可以得到无菌苗的目的,效果好。

(3) 低温锻炼能使植物细胞的超微结构^[14]及质膜透性发生变化^[15],可溶性总蛋白^[16]、多糖类物质^[17]及各种保护性酶^[18]的含量也会发生相应的改变,可以不同程度地提高物种的抗寒能力水平,这在水母雪莲(*Saussurea medusa* Maxim.)^[19]等品种中已有成功报道。本研究取经历低温尚存活力的南非羊蹄甲枝条建立离体再生体系,并继续在离体条件下逐步提高冷胁迫量值,极有可能在一定程度上提高南非羊蹄甲的抗寒能力,培育出抗寒能力强的南非羊蹄甲新品种。低温锻炼对南非羊蹄甲组培苗的影响及对抗寒能力的提高,还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 吴德邻,胡加琪,陈邦余,等. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社,1999,153-165
[2] 胡长龙. 城市园林绿化[M]. 北京:中国林业出版社,1993

- [3] 张明忠,朱红业,张映翠,等. 元谋干热区多花植物的景观应用及效益分析[J]. 亚热带农业研究,2005,1(4):63-65
[4] 赵燕燕,崔承彬,孙启时. 羊蹄甲属植物研究进展[J]. 沈阳药科大学学报,2004,21(6):476-480
[5] 尚小雅,李帅,王映红,等. 红绒毛羊蹄甲的化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2006,31(23):1953-1955
[6] 许又凯,刘宏茂,刁祥生,等. 粉花羊蹄甲的营养成分及作为特色蔬菜的评价[J]. 云南大学学报,2004,26(1):88-92
[7] Schmitz A. Contributions palynologique a la taxonomie des Bauhinieae (Caesalpiniaceae) [J]. Bulletin Jardin Botanique National de Belgique,1973,43:369-423
[8] Larsen S S. Pollen morphology of the Thai species of *Bauhinia* (Caesalpiniaceae) [J]. Grana,1975,14:114-131
[9] 邹璞,张奠湘,廖景平. 羊蹄甲属中国特有种的花粉形态学[J]. 热带亚热带植物学报,2003,11(3):249-254
[10] 魏华丽,张冬梅. 羊蹄甲[J]. 园林,2006,172(9):44
[11] 张光楚,王裕霞,谭源杰,等. 丛生竹的组培快繁技术[J]. 竹子研究汇刊,2004,23(1):13-20
[12] 刘颂颂,叶永昌,招晓东,等. 蒟蒻薯的组织培养及植株再生[J]. 植物生理学通讯,2002,38(3):254
[13] 乔奇,张振臣,靳秀兰,等. 消毒方法对草莓花药愈伤组织形成的影响[J]. 河南农业科学,1999(7):29
[14] 周蕴薇. 翠南报春叶片细胞超微结构对低温的适应性变化[J]. 园艺学报,2006,33(6):1361-1364
[15] 李建明,黄志,王忠红. 低温锻炼对冷胁迫下甜瓜幼苗抗氧化酶活性与质膜透性的影响[J]. 西北农业学报,2007,16(1):168-171
[16] Lin Shanzhi, Zhang Zhiyi. Cold acclimation-induced changes in total soluble protein, RNA, DNA, RAase and freezing resistance in *Populus tomentosa* cuttings[J]. Forestry Studies in China, 2002,4(2):9-15
[17] Lin Shanzhi, Zhang Zhiyi. Effect of sugar on the process of cold-acclimation-induced freezing tolerance of *Populus tomentosa* [J]. Forestry Studies in China, 2001,3(1):1-6
[18] 李明玉,曹辰兴,于喜艳. 低温锻炼对冷胁迫下黄瓜幼苗保护性酶的影响[J]. 西北农业学报,2006,15(1):160-164
[19] 陈玉珍,卢存福. 水母雪莲愈伤组织和悬浮培养细胞的抗冻性研究[J]. 植物学通报,2002,19(2):219-223