



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102499086 A

(43) 申请公布日 2012. 06. 20

(21) 申请号 201110340118. 5

(22) 申请日 2011. 11. 01

(71) 申请人 北京林业大学

地址 100083 北京市海淀区清华东路 35 号

(72) 发明人 李云 习洋 王欢 孙宇涵 孙鹏

袁存权 李允菲 戴丽 胡瑞阳

(74) 专利代理机构 北京元本知识产权代理事务

所 11308

代理人 叶凡

(51) Int. Cl.

A01H 4/00 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 10 页 附图 5 页

(54) 发明名称

一种刺槐的繁殖方法

(57) 摘要

本发明公开了一种刺槐的繁殖方法,以不同胚龄的合子胚为外植体,以 MS+2, 4-D+BA+ 蔗糖+琼脂为胚性愈伤组织的诱导培养基;以 MS 基本培养基+MES+谷氨酰胺+水解酪蛋白+萘乙酸+6-苄氨基腺嘌呤+蔗糖+琼脂为体细胞胚诱导培养基,通过对愈伤组织的诱导,形成球形胚后将其转接到 MS+ 水解酪蛋白培养基上,进行体细胞胚的成熟培养,然后转接到 MS 基本培养基上萌发形成完整小植株。本发明方法中愈伤组织诱导率、体细胞胚诱导率、萌发率高,可以在短期内形成大量优良的刺槐试管苗,可进行规模化、工厂化生产。

1. 一种刺槐繁殖方法,包括如下顺序进行的步骤:
 - 1) 采集刺槐荚果;
 - 2) 将刺槐荚果进行表面灭菌后取出其合子胚,获得无菌合子胚;
 - 3) 将无菌合子胚接种到愈伤组织诱导培养基上,进行愈伤组织诱导培养,获得愈伤组织;
 - 4) 将愈伤组织接种于体细胞胚诱导培养基上,进行体细胞胚诱导培养,获得原胚培养物;
 - 5) 将原胚培养物接种于体细胞胚成熟培养基中进行体细胞胚的成熟培养,获得体细胞胚;
 - 6) 将成熟的体细胞胚接种于萌发培养基上进行萌发培养,获得体胚苗;
 - 7) 将体胚苗接种于壮苗培养基上进行壮苗培养,促进体胚苗的生长,获得试管壮苗;
 - 8) 将试管壮苗进行炼苗、移栽,即得。
2. 如权利要求1所述的方法,其特征是:所述的刺槐荚果是处于刺槐开花后第25天至第75天这一时间段内的刺槐荚果,优选为处于刺槐开花后第45天至第65天这一时间段内的刺槐荚果,更优选为处于刺槐开花后第55天至第65天这一时间段内的刺槐荚果,最优选为刺槐开花后第55天的刺槐荚果。
3. 如权利要求1所述的方法,其特征是步骤3)中所述愈伤组织诱导培养基是MS基本培养基+2-(N-吗啡啉)乙磺酸500mg/L+2,4-二氯苯氧基乙酸0.3-6.0mg/L+6-苄氨基腺嘌呤0-3.0mg/L+蔗糖30g/L+琼脂6g/L,pH值为5.8。
4. 如权利要求1或3所述的方法,其特征是步骤3)中所述愈伤组织诱导培养在以下条件下进行:黑暗条件下,培养温度为 $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ 。
5. 如权利要求1所述的方法,其特征是步骤4)中所述体细胞胚诱导培养基是MS基本培养基+2-(N-吗啡啉)乙磺酸500mg/L+谷氨酰胺250mg/L+水解酪蛋白500mg/L+萘乙酸0.1-2.0mg/L+6-苄氨基腺嘌呤0-1.0mg/L+蔗糖30g/L+琼脂6g/L,pH值为5.8。
6. 如权利要求1所述的方法,其特征是步骤4)中所述体细胞胚诱导培养在以下条件下进行:黑暗条件下,培养温度为 $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ 。
7. 如权利要求1所述的方法,其特征是步骤5)中所述的体细胞胚成熟培养基为MS基本培养基+水解酪蛋白500mg/L+蔗糖30g/L+琼脂6g/L。
8. 如权利要求1所述的方法,其特征是步骤6)中所述的萌发培养基为MS基本培养基+蔗糖30g/L+琼脂6g/L。
9. 如权利要求1所述的方法,其特征是步骤7)中所述壮苗培养基为+吲哚丁酸0.2mg/L+蔗糖30g/L+琼脂6g/L。
10. 如权利要求1所述的方法,其特征是步骤5)中所述体细胞胚成熟培养、步骤6)中所述萌发培养或步骤7)中所述壮苗培养在以下条件下进行:培养温度为 $26\pm 2^{\circ}\text{C}$,光照强度为1500-2000lux,光照周期为14-16小时光照/8-10小时黑暗;步骤8)中所述的炼苗移栽包括如下顺序进行的步骤:打开培养瓶的瓶盖,在移栽室中炼苗1天;然后将试管苗取出,用自来水洗净根部残留的琼脂培养基,移栽到刺槐无土栽培基质中进行移栽培养5-6周后再定植于大田。

一种刺槐的繁殖方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种植物组织培养的方法,特别涉及刺槐离体培养和植株再生的方法,属于刺槐的组织培养领域。

背景技术

[0002] 刺槐 (*Robinia pseudoacacia* L.) 又称洋槐,属于豆科 (Leguminosae) 蝶形花亚科刺槐属 (*Robinia* L.), 落叶乔木,原产于美国,天然分布于美国东部阿巴拉契山脉 (Appalachian. Mt.) 和奥萨克山脉 (Ozark. Mt.), 20 世纪初期引入我国,引进后得到迅速扩大栽植,是黄河中下游、淮河流域、海河流域、长江下游诸省的主要用材林、薪炭林、水土保持林、海堤及河堤防护林,仅在河北、河南、山东和山西等 6 省市就有 40 亿株。它生长速度快,是重要的速生用材树种,其木材材质坚硬、抗压强度大、具有较强的耐旱性、防腐力强。刺槐根系长有大量根瘤,可以通过生物固氮增加土壤肥力,在维持生态平衡、提高林分质量等方面发挥重要作用。刺槐的叶片含有粗蛋白,是优质廉价的家畜饲料资源。刺槐花营养丰富,虽花期较短但花量可观,除直接使用外,还可生产花蜜、提取香料等。

[0003] 中国对刺槐的育种研究始于 20 世纪 70 年代,至今已取得很多成就,但仍不能满足林业生产的需要。体细胞胚再生途径是对树木进行繁育和遗传改良的重要平台,也是实现基因转化的常用再生体系。体胚发生技术具有繁殖数量多、速度快、不受亲缘关系限制、一旦形成结构完整的体细胞胚一般都可直接萌发形成小植株等特点,是稳定高效的植物再生体系。此外,体细胞胚胎由单细胞起源,发育程序与合子胚相似,可作为胚胎学研究的模式系统,对细胞全能性表达过程和细胞分化机理等理论问题的研究也具有重要意义。Laine E 和 Dumet D 成功将加勒比松和油棕胚性愈伤组织在超低温下保存并保持了体胚发生潜力,解冻后仍能继续培养形成植株,这为挽救濒危植物提供了可能。刺槐的离体培养研究从 20 世纪 50 年代末开始,80 年代以后达到高潮。

[0004] 到目前为止,刺槐通过形成层培养、茎培养、叶片培养、未授粉子房的培养等已获得完整的植株,但这些研究都集中在器官发生途径,通过体细胞胚发生途径的研究还很少。例如,红艳以刺槐成熟种子的子叶为外植体,对刺槐体胚培养和诱导不定芽进行了研究,但体细胞胚发生率最高也仅有 36.7%。

[0005] 大量研究表明,外植体的发育时期是影响体细胞胚发生的关键因素,未成熟合子胚因其细胞全能性高、脱分化容易,在诱导体细胞胚发生时具有显著优势。大多数植物离体培养普遍采用未成熟合子胚外植体,但过于幼嫩或过度成熟的合子胚的体胚诱导率并不理想。在整个合子胚的发育过程中,只有一个较短的阶段具有很强的体胚发生潜能。目前,研究合子胚发育阶段对体细胞胚诱导影响的研究很多,但就刺槐而言,由于刺槐的体细胞胚培养比较困难,表现为体胚诱导率低、畸形胚数量多、体胚质量不高等,制约了其遗传改良的程度,也阻碍了优良无性系的高效繁殖和快速推广。目前,国内外对刺槐的体细胞胚培养的研究相对较少,国内尚未见相关报道,国外仅 Merkle et al. 和 Arrillaga et al. 发表了这方面的研究结果。其中,Merkle 等人从开花后第 1 周开始,每隔一周从 3 棵刺槐树上选

取未成熟合子胚为外植体,以 MS 培养基为基本培养基,研究了外植体胚龄对体胚诱导的影响,仅从开花后 4 周的一粒未成熟合子胚上观察到体细胞胚发生,其体细胞胚的诱导率低;Arrillaga 等人在 Merkle 的研究基础上提高了体细胞胚的诱导率,以 FM 培养基为基本培养基,采用开花后 1-4 周的为成熟合子胚为外植体,进行体细胞胚诱导培养,试验结果表明开花后 2-3 周的外植体体胚诱导率最高,仅达到 12%。上述研究均是以开花后 1-4 的未成熟合子胚为外植体进行诱导培养,其诱导率低,最高诱导率仅为 12%,难以满足刺槐繁殖和育种的需要,因此,建立刺槐高效体胚发生体系势在必行。

发明内容

[0006] 本发明的首要目的是针对上述现有技术存在的问题提供一种新的刺槐离体培养和植株再生的方法,该方法的刺槐体细胞胚诱导率高、体胚萌发率高,可以在较短时间内形成大量优良的刺槐试管苗,可进行规模化、工厂化生产,可用于刺槐转化体系研究,也可以用于分子育种研究。

[0007] 为实现上述目的,本发明一方面提供一种刺槐繁殖方法,包括如下顺序进行的步骤:

[0008] 1) 采集刺槐荚果;

[0009] 2) 将刺槐荚果进行表面灭菌处理后取出其合子胚,获得无菌合子胚;

[0010] 3) 将无菌合子胚接种到愈伤组织诱导培养基上,进行愈伤组织诱导培养,获得愈伤组织;

[0011] 4) 将愈伤组织接种于体细胞胚诱导培养基上,进行体细胞胚诱导培养,获得原胚培养物;

[0012] 5) 将原胚培养物接种于体细胞胚成熟培养基中进行体细胞胚的成熟培养,获得体细胞胚;

[0013] 6) 将成熟的体细胞胚接种于萌发培养基上进行萌发培养,获得体胚苗;

[0014] 7) 将体胚苗接种于壮苗培养基上进行壮苗培养,促进体胚苗的生长,获得试管壮苗;

[0015] 8) 将试管壮苗进行炼苗、移栽,即得。

[0016] 本发明中所述体细胞胚简称体胚。

[0017] 刺槐的外植体胚龄对愈伤组织的诱导率影响显著,过嫩或过熟的幼胚均不能得到理想的胚性愈伤组织诱导结果。本发明通过大量的实验发现,处于开花后第 25 天至第 75 天这一时间段内的刺槐荚果作为外植体,其胚性愈伤组织诱导效果相比于其它时间段内的荚果有明显的提高;进一步的实验发现,采集处于刺槐开花后第 45 天至第 65 天这一时间段内的荚果作为外植体的繁殖效果有进一步的提高,采用处于刺槐开花后第 55 天至第 65 天这一时间段内的荚果作为外植体的繁殖效果得到了更进一步的提高,采用处于开花后第 55 天的刺槐荚果作为外植体取得了最好的繁殖效果:采集刺槐开花后第 55 天的荚果中的未成熟合子胚在所有诱导培养基上的出愈率均高于其它时期的外植体,其愈伤组织诱导率为 66.72-95.42%、诱导得到的愈伤组织生长速度快,呈淡黄色或嫩黄绿色,结构紧密,呈颗粒状,经多次继代仍能保持较高的活力;其体细胞胚诱导率为 76.88-90.73%,体胚萌发率为 80-100%,均明显高于其它时段的外植体,所以本发明最优选采集处于开花后第 55 天的刺

槐荚果作为外植体。

[0018] 其中,步骤2)中所述灭菌处理包括如下顺序进行的步骤:

[0019] A) 将采集的刺槐荚果用无菌水洗净后,用酒精浸泡荚果后,用无菌水冲洗干净;

[0020] B) 用 HgCl_2 溶液浸泡荚果,用无菌水冲洗干净;

[0021] C) 吸干荚果表面水分后从荚果中取出合子胚,即得。

[0022] 特别是,步骤A)中所述的酒精的体积百分比浓度为75%;浸泡时间为30s;无菌水冲洗3-5次。

[0023] 特别是,步骤B)中所述 HgCl_2 溶液的质量百分比浓度为0.1%;浸泡时间为3-7min,优选为5min;无菌水冲洗5-6次。

[0024] 其中,步骤3)中所述的愈伤组织诱导培养基是MS基本培养基+2-(N-吗啡啉)乙磺酸(MES)500mg/L+2,4-二氯苯氧基乙酸0.3-6mg/L+6-苄氨基腺嘌呤0-3.0mg/L+蔗糖30g/L+琼脂6g/L,pH值为5.8;优选为:MS基本培养基+MES 500mg/L+2,4-二氯苯氧基乙酸0.3-5.0mg/L+6-苄氨基腺嘌呤0-3.0mg/L+蔗糖30g/L+琼脂6g/L,pH值为5.8;进一步优选为:MS基本培养基+MES 500mg/L+2,4-二氯苯氧基乙酸1.0-5.0mg/L+6-苄氨基腺嘌呤0.3-1.0mg/L+蔗糖30g/L+琼脂6g/L,pH值为5.8;更进一步优选为:MS基本培养基+MES500mg/L+2,4-二氯苯氧基乙酸5.0mg/L+6-苄氨基腺嘌呤0.5mg/L+蔗糖30g/L+琼脂6g/L,pH值为5.8。

[0025] 特别是,步骤3)中所述愈伤组织诱导培养在以下条件下进行:黑暗条件下,培养温度为 $26 \pm 2^\circ\text{C}$ 。

[0026] 尤其是,愈伤组织诱导培养过程中的相对湿度为60-75%。

[0027] 其中,步骤4)中所述体细胞胚诱导培养基是MS基本培养基+MES 500mg/L+谷氨酰胺250mg/L+水解酪蛋白500mg/L+萘乙酸0.1-2.0mg/L+6-苄氨基腺嘌呤0-1.0mg/L+蔗糖30g/L+琼脂6g/L,pH值为5.8;优选为:MS基本培养基+MES 500mg/L+谷氨酰胺250mg/L+水解酪蛋白500mg/L+萘乙酸0.1-1.0mg/L+6-苄氨基腺嘌呤0.1-1.0mg/L+蔗糖30g/L+琼脂6g/L,pH值为5.8;进一步优选为:MS基本培养基+MES 500mg/L+谷氨酰胺250mg/L+水解酪蛋白500mg/L+萘乙酸0.5mg/L+6-苄氨基腺嘌呤0.5mg/L+蔗糖30g/L+琼脂6g/L,pH值为5.8。

[0028] 特别是,步骤4)中所述体细胞胚诱导培养在以下条件下进行:黑暗条件下,培养温度为 $26 \pm 2^\circ\text{C}$ 。

[0029] 尤其是,体细胞胚诱导培养过程中相对湿度为60-75%。

[0030] 其中,步骤5)中所述的体细胞胚成熟培养基为MS基本培养基+水解酪蛋白500mg/L+蔗糖30g/L+琼脂6g/L,pH值为5.8。

[0031] 特别是,步骤5)中所述体细胞胚成熟培养在以下条件下进行:培养温度为 $26 \pm 2^\circ\text{C}$,光照强度为1500-2000lux,光照周期为14-16小时光照/8-10小时黑暗。

[0032] 尤其是,体细胞胚成熟培养过程中相对湿度为60-75%。

[0033] 其中,步骤6)中所述的萌发培养基为MS基本培养基+蔗糖30g/L+琼脂6g/L,pH值为5.8。

[0034] 特别是,步骤6)中所述萌发培养在以下条件下进行:培养温度为 $26 \pm 2^\circ\text{C}$,光照强度为1500-2000lux,光照周期为14-16小时光照/8-10小时黑暗。

[0035] 尤其是,体细胞胚萌发培养过程中相对湿度为 60-75%。

[0036] 其中,步骤 7) 中所述壮苗培养基为 MS 基本培养基 + 吲哚丁酸 (IBA)0.2mg/L+ 蔗糖 30g/L+ 琼脂 6g/L, pH 值为 5.8。

[0037] 特别是,步骤 7) 中所述壮苗培养在以下条件下进行:培养温度为 $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$,光照强度为 1500-2000lux,光照周期为 14-16 小时光照 /8-10 小时黑暗。

[0038] 尤其是,体胚苗壮苗培养过程中相对湿度为 60-75%。

[0039] 其中,步骤 8) 中所述的炼苗、移栽包括如下顺序进行的步骤:打开培养瓶的瓶盖,在移栽室中炼苗 1 天;然后将试管苗取出,用自来水洗净根部残留的琼脂培养基,移栽到刺槐无土栽培基质中进行移栽培养,移栽培养 5-6 周后再定植于大田。

[0040] 特别是,还包括将试管苗放置于遮光 50% 的自然光光照强度下培养 5-10 天后再打开培养瓶瓶盖。

[0041] 特别是,所述刺槐无土栽培基质由珍珠岩、蛭石组成,其中珍珠岩与蛭石的体积之比为 1 : 1。

[0042] 特别是,移栽培养是自然光光照条件下,培养 5-6 周

[0043] 尤其是,移栽培养温度为 $25 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度为 56-90%。

[0044] 本发明的刺槐的繁殖方法具有以下优点:

[0045] 1、本发明利用刺槐未成熟合子胚进行离体快速繁殖,每个培养阶段所采用的基本培养基的都是 MS 基本培养基,具有无机盐浓度高,特别是硝酸盐、钾和铵的含量高,可以为组织生长提供所需矿质营养和促进体细胞胚诱导、分化和萌发生长。

[0046] 2、本发明的繁殖方法中刺槐繁殖效率高,愈伤组织诱导培养基中添加植物生长调节剂利于外植体的愈伤组织的诱导、增殖,愈伤组织诱导率高,可达到 95.42%

[0047] 3、本发明的繁殖方法中刺槐繁殖效率高,体细胞胚诱导培养基中添加植物生长调节剂利于体细胞胚从愈伤组织上进行诱导、增殖、成熟,萌发和分化,本发明中使用的刺槐培养基中营养物质组成合理,用量和配比适宜,培育结果重复性高,再生体系稳定,体细胞胚的诱导率高,可达到 90.73%。

[0048] 4、本发明方法培育的刺槐再生苗生长健壮、繁殖系数高,成熟体细胞胚萌发率高,达到 80-100%;体胚苗移栽成活率高,达到 100%,是工厂化大规模生产刺槐植株的简便、快捷的技术体系。

附图说明

[0049] 图 1 是刺槐未成熟合子胚诱导培养得到的愈伤组织;

[0050] 图 2 是刺槐愈伤组织诱导培养得到的原胚培养物;

[0051] 图 3 是原胚培养物的薄层切片的显微镜观测照片;

[0052] 图 4 是刺槐原胚培养物进行成熟培养初期得到的初期培养物;

[0053] 图 5 是刺槐原胚培养物通过成熟培养得到的成熟的体细胞胚;

[0054] 图 6 是刺槐成熟体细胞胚萌发培养得到的体胚苗;

[0055] 图 7 是刺槐体胚苗壮苗培养得到的具有多个茎叶端的丛生试管壮苗;

[0056] 图 8 是刺槐体胚苗壮苗培养过程中继代培养得到的具有优势主干的试管壮苗;

具体实施方式

[0057] 下面结合具体实施例来进一步描述本发明,本发明的优点和特点将会随着描述而更为清楚。但这些实施例仅是范例性的,并不对本发明的范围构成任何限制。本领域技术人员应该理解的是,在不偏离本发明的精神和范围下可以对本发明技术方案的细节和形式进行修改或替换,但这些修改和替换均落入本发明的保护范围内。

[0058] 实施例 1

[0059] 一、试验材料

[0060] 1、本发明以北京市延庆米家堡苗圃生长良好的二倍体刺槐实生苗群体为取材资源,选取 10 棵生长良好、干型较直、结实率高的母树(各株之间的间隔大于 50 米),在 2010 年 6 月到 9 月间,采集开花后第 4-12 周的刺槐不同发育阶段的合子胚作为外植体试验材料,每间隔 10 天采集一次,每次采集 500 个荚果,即采集开花后 25、35、45、55、65、75 天的荚果,每次采集 500 个荚果,将当天采集的荚果在冰盒中低温保存带回实验室,之后放在 4℃ 的冰箱里冷藏备用。

[0061] 2、植物生长调节剂

[0062] 本发明中所使用的植物生长调节物质采用国产萘乙酸(NAA)、6-苄氨基腺嘌呤(6-BA)、2,4-二氯苯氧基乙酸(2,4-D)和吲哚丁酸(IBA)。

[0063] 3、培养基的配制:

[0064] (1)“MS 基本培养基”的组成或配制方法;

[0065] 表 1MS 培养基(Murashige and Skoog,1962)

[0066]

MS 大量元素母液成分	含量(g/L)	MS 微量元素母液成分	含量(g/L)	有机化合物母液成分	含量(g/L)
NH ₄ NO ₃	33	H ₃ BO ₃	1.24	肌醇	20
KNO ₃	38	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.72	烟酸	0.1
CaCl ₂ ·2H ₂ O	8.8	MnSO ₄ ·4H ₂ O	4.46	维生素 B6	0.1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	7.4	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.05	维生素 B1	0.02
KH ₂ PO ₄	3.4	KI	0.166	甘氨酸	0.4
		CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.005		
		CoCl ₂ ·6 H ₂ O	0.005		
		FeSO ₄ ·7H ₂ O	2.78		
		Na-EDTA	1.865		

[0067]

[0068] 上述 MS 培养基母液配好后,储存于 4℃ 冰箱待用。根据配置培养基的数量,称量所需琼脂和蔗糖,将其倒入欲配培养基体积 3/4 的无菌水中,顺序加入所需的大量元素母液、

微量元素母液和有机成分母液,每加入一种都充分搅拌,最后加水定容至培养基最终体积,用 pH 计测试培养基酸碱度,用 1mol/L 的 NaOH 或 1mol/L 的 HCl 将 pH 值调整至 5.8。

[0069] (2) 愈伤组织诱导培养基:MS 基本培养基添加 2,4-D 0.3-6.0mg/L、6-BA 0-3.0mg/L、MES 500mg/L、蔗糖 30g/L、琼脂 6g/L,调节 pH 值为 5.8,培养基在 121℃ 下恒温灭菌 15 分钟。

[0070] (3) 体细胞胚诱导培养基:MS 基本培养基添加 NAA 0.1-2.0mg/L、6-BA 0-1.0mg/L、MES 500mg/L、谷氨酰胺 250mg/L、水解酪蛋白 500mg/L、蔗糖 30g/L、琼脂 6g/L,调节 pH 值为 5.8,培养基在 121℃ 下恒温灭菌 15 分钟。

[0071] (4) 体细胞胚成熟培养基:MS 基本培养基添加水解酪蛋白 500mg/L、蔗糖 30g/L、琼脂 6g/L,调节 pH 值为 5.8。培养基在 121℃ 下恒温灭菌 15 分钟。

[0072] (5) 体细胞胚萌发培养基:MS 基本培养基添加蔗糖 30g/L、琼脂 6g/L,调节 pH 值为 5.8,培养基在 121℃ 下恒温灭菌 15 分钟。

[0073] (6) 体胚苗的壮苗培养基:MS 基本培养基添加 IBA 0.2mg/L、蔗糖 30g/L、琼脂 6g/L,调节 pH 值为 5.8,培养基在 121℃ 下恒温灭菌 15 分钟。

[0074] 4、培养条件

[0075] (1) 愈伤组织诱导培养的培养条件:黑暗条件,培养温度 $(26 \pm 2)^\circ\text{C}$,培养过程中的相对湿度为 60-75%。

[0076] (2) 体细胞胚诱导培养的培养条件:封闭式组织培养室,黑暗条件下,培养温度为 $26 \pm 2^\circ\text{C}$,培养过程中的相对湿度为 60-75%。

[0077] (3) 体细胞胚成熟培养的培养条件:培养温度为 $(26 \pm 2)^\circ\text{C}$,日光灯光源,光照强度为 1500-2000lx,光照周期为 14-16 小时光照 /8-10 小时黑暗,培养过程中的相对湿度为 60-75%。

[0078] (4) 体细胞胚萌发的培养条件:培养温度为 $(26 \pm 2)^\circ\text{C}$,日光灯光源,光照强度为 1500-2000lx,光照周期为 14-16 小时光照 /8-10 小时黑暗,培养过程中的相对湿度为 60-75%。

[0079] (5) 体胚苗的壮苗培养的培养条件:培养温度为 $26 \pm 2^\circ\text{C}$,光照强度为 1500-2000lux,光照周期为 14-16 小时光照 /8-10 小时黑暗,培养过程中的相对湿度为 60-75%。

[0080] 二、试验方法

[0081] 1、外植体的灭菌

[0082] 分别将采集的开花后第 25、35、45、55、65、75 天的荚果用水洗净,在超净工作台上用体积百分比浓度为 75% 的酒精浸泡荚果 30s 后,用无菌水冲洗数次(3-5 次);接着用质量百分比浓度为 0.1% 的 HgCl_2 溶液浸泡荚果 3-7min(优选为 5min),用无菌水冲洗数次(5-6 次);然后将荚果放在无菌干燥的滤纸上吸干表面水分后从荚果中取出未成熟的种子,即未成熟的合子胚,得到开花后第 25、35、45、55、65、75 天的表面灭菌的未成熟合子胚,备用;

[0083] 2、愈伤组织诱导培养

[0084] 1) 在超净工作台中将表面灭菌的开花后 25、35、45、55、65、75 天的未成熟合子胚的整体作为外植体接种于愈伤组织诱导培养基中,在黑暗条件下进行愈伤组织的诱导培

养,每 3-4 周继代培养一次,即将灭菌的未成熟合子胚培养 3-4 周之后取出,置于另一新鲜的愈伤组织诱导培养基中继续进行愈伤组织的诱导培养,以保持培养基内含有充足的养料和水分,其中,培养温度为 $(26 \pm 2)^\circ\text{C}$,愈伤组织诱导培养基中所用 2,4-D 为 5.0mg/L,6-BA 为 0.5mg/L,培养过程中相对湿度为 60-75%,诱导培养 3 周后,合子胚的下胚轴切口周围开始膨大,形成愈伤组织,愈伤组织颜色为淡黄色或嫩黄绿色,结构紧密,呈颗粒状(如图 1),培养 42 天后,统计愈伤组织诱导率,数据分析结果见表 2。

[0085] 在愈伤组织诱导培养过程中每次处理接种未成熟合子胚 10 个,重复处理 3 次。

[0086] 愈伤组织诱导率(%) = 诱导出愈伤组织的外植体数 / 接种外植体总数 $\times 100\%$

[0087] 表 2 愈伤组织诱导培养结果

[0088]

外植体胚龄	愈伤组织诱导率(%)					
	实施例 1	实施例 2	实施例 3	实施例 4	实施例 5	实施例 6
开花后 25 天	40.23 \pm 0.05	34.00 \pm 0.25	35.40 \pm 0.13	36.77 \pm 0.16	30.05 \pm 0.08	36.79 \pm 0.19
开花后 35 天	69.41 \pm 0.12	38.90 \pm 0.08	42.06 \pm 0.20	50.20 \pm 0.11	42.00 \pm 0.27	48.80 \pm 0.21
开花后 45 天	88.09 \pm 0.07	67.00 \pm 0.14	58.70 \pm 0.23	79.44 \pm 0.23	72.00 \pm 0.16	71.89 \pm 0.06
开花后 55 天	95.42 \pm 0.02	88.90 \pm 0.35	66.72 \pm 0.11	86.32 \pm 0.05	79.35 \pm 0.05	78.55 \pm 0.05
开花后 65 天	92.15 \pm 0.33	66.00 \pm 0.05	59.12 \pm 0.40	84.90 \pm 0.10	77.60 \pm 0.09	73.00 \pm 0.15
开花后 75 天	84.14 \pm 0.24	60.00 \pm 0.07	48.73 \pm 0.08	79.90 \pm 0.07	75.00 \pm 0.14	67.80 \pm 0.27

[0089] 3、体细胞胚诱导培养

[0090] 将愈伤组织分割成 0.5cm \times 0.5cm 的小块,接种到体细胞胚诱导培养基上,在黑暗条件下进行刺槐体细胞胚的诱导培养,其中,培养温度为 $(26 \pm 2)^\circ\text{C}$,体细胞胚诱导培养基中所用 6-BA 为 0.5mg/L, NAA 为 0.5mg/L,在体细胞胚诱导培养过程中每 3-4 周继代一次,即将愈伤组织块培养 3-4 周后取出,置于另一新鲜的体细胞胚诱导培养基中继续进行体细胞胚的诱导培养,以保持培养基内含有充足的养料和水分,诱导培养 6 周后在愈伤组织的边缘部位,可以观察到大小不一的胚状体突起,集中成簇分布,继代培养 2 次后,获得呈黄绿色原胚培养物(如图 2),统计诱导得到体细胞胚的愈伤组织块数,计算体细胞胚诱导率,结果如表 3 所示。

[0091] 对原胚培养物进行薄层切片试验,即将原胚培养物用琼脂糖包埋后用徕卡 UC6 型全自动震动超薄切片机切片(厚度为 100 μm),然后罗丹明染色液染色,在 Olympus 光学显微镜下观察,显微镜观测结果如图 3,镜检结果表明原胚培养物具有明显突起结构,包含多个集中分布的球形胚期的体细胞胚,表明诱导得到的原胚培养物中存在体细胞胚。

[0092] 在体细胞胚诱导培养过程中,每次处理接种愈伤组织 5 块(0.5 \times 0.5cm),重复处理 3 次。

[0093] 体细胞胚诱导率(%) = 诱导出原胚培养物的愈伤组织块数 / 接种愈伤组织块总数 $\times 100\%$

[0094] 表 3 体细胞胚诱导培养结果

外植体胚龄	实施例 1		实施例 2	
	体细胞胚诱导率 (%)	体细胞胚萌发率 (%)	体细胞胚诱导率 (%)	体细胞胚萌发率 (%)
开花后 25 天	70.52±0.05	86.36±0.07	58.45±0.43	76.55±0.13
[0095] 开花后 35 天	73.17±0.11	88.72±0.03	61.38±0.07	84.26±0.02
开花后 45 天	80.56±0.34	93.26±0.05	71.69±0.05	87.65±0.07
开花后 55 天	90.73±0.49	100.00±0.12	83.13±0.46	95.67±0.05
开花后 65 天	79.89±0.25	89.97±0.02	62.07±0.03	85.09±0.12
开花后 75 天	68.66±0.17	79.43±0.17	57.97±0.03	77.03±0.03

[0096] 4、体细胞胚成熟培养

[0097] 将原胚培养物整体转接到不含有任何外源激素的体细胞胚成熟培养基中,进行体细胞胚的成熟培养,其中培养条件如下:培养温度为 $26\pm 2^{\circ}\text{C}$,光周期为 16h 光照 /8h 黑暗,光照强度为 1500-2000Lux,培养过程中相对湿度为 60-65%,体细胞胚成熟培养过程中每 3 周继代一次,即将原胚培养物培养 3 周后整体取出,置于另一新鲜的体细胞胚成熟培养基中继续进行培养。培养 4 周后,原胚培养物上的体细胞胚个体增大,颜色逐渐变绿,形成类似于合子胚的有机体(如图 4)。继代培养 2 次后,可以观察到体细胞胚发育到子叶胚阶段(如图 5),获得成熟体细胞胚。

[0098] 5、体细胞胚的萌发培养

[0099] 将成熟的体细胞胚从愈伤组织上分离下来,转接到体细胞胚萌发培养基上,置于 $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ 条件下,在光周期为 16h 光照 /8h 黑暗,光照强度为 1500-2000Lux 条件下培养,萌发培养过程中的相对湿度为 60-75%,成熟体细胞胚下胚轴快速伸长生长,培养 4 周后成熟体细胞胚的顶端的子叶展开,另一端分化出明显的根生长端,形成体胚苗(如图 6),统计获得的体胚苗,计算体细胞胚的萌发率,分析结果如表 3。

[0100] 在体细胞胚萌发培养过程中,每次处理接种体细胞胚 10 个,重复处理 3 次。

[0101] 体胚萌发率 (%) = 萌发的体细胞胚数 / 接种的体细胞胚数 $\times 100\%$

[0102] 6、体胚苗的壮苗培养

[0103] 将体胚苗整体转移到壮苗培养基中,置于 $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ 条件下,在光周期为 16h 光照 /8h 黑暗,光照强度为 1500-2000Lux 条件下进行壮苗培养,壮苗培养过程中的相对湿度为 60-75%,体胚苗在壮苗培养过程中每 4 周继代一次,体胚苗的根逐渐伸长,形成主根和侧根,胚芽发育为茎和叶,继代 2 次后,得到具有多个茎叶端的丛苗试管壮苗(如图 7),继续继代培养,具有多个茎叶端的丛苗试管壮苗的弱小的茎叶端萎缩,培养 4 周后,得到具有明显优势主干的试管壮苗(如图 8)。

[0104] 7、试管苗的炼苗、移栽、定植

[0105] 将培养瓶置于有遮光条件(遮光率为 50%)的炼苗室内培养 5-10 天,然后打开培养瓶瓶盖,在移栽室中炼苗培养 1 天后,取出植株,用自来水洗净试管苗根部残留的琼脂培养基,移栽到刺槐无土栽培基质(珍珠岩、蛭石,珍珠岩与蛭石的体积之比为 1 : 1)中在移

栽室进行容器培养,移栽培养温度为 $25 \pm 5^\circ\text{C}$ 、相对湿度为 56-90%,自然光照培养 7-10 天后,统计移栽成活率,达到 100%。移栽 5-6 周后可将刺槐幼苗定植于大田。

[0106] 实施例 2

[0107] 除了愈伤组织诱导培养过程中,愈伤组织培养基所述的 6-BA 为 0mg/L,2,4-D 为 5.0mg/L;体细胞胚诱导培养过程中,体细胞胚诱导培养基所用 6-BA 为 1.0mg/L, NAA 为 1.0mg/L 之外,其余与实施例 1 相同,数据分析结果如表 2、3 所示。

[0108] 实施例 3

[0109] 除了愈伤组织诱导培养过程中,愈伤组织培养基所述的 6-BA 为 0.3mg/L,2,4-D 为 0.3mg/L;体细胞胚诱导培养过程中,体细胞胚诱导培养基所用 6-BA 为 0.1mg/L, NAA 为 0.1mg/L 之外,其余与实施例 1 相同,数据分析结果如表 2、4 所示。

[0110] 实施例 4

[0111] 除了愈伤组织诱导培养过程中,愈伤组织培养基所述的 6-BA 为 0.5mg/L,2,4-D 为 2.0mg/L;体细胞胚诱导培养过程中,体细胞胚诱导培养基所用 6-BA 为 1.0mg/L, NAA 为 0.5mg/L 之外,其余与实施例 1 相同,数据分析结果如表 2、4 所示。

[0112] 表 4 体细胞胚诱导培养结果

外植体胚龄	实施例 3		实施例 4	
	体细胞胚诱导率 (%)	体细胞胚萌发率 (%)	体细胞胚诱导率 (%)	体细胞胚萌发率 (%)
开花后 25 天	54.23±0.05	68.14±0.02	60.29±0.23	71.04±0.09
[0113] 开花后 35 天	67.18±0.07	75.31±0.07	62.39±0.02	71.37±0.20
开花后 45 天	72.86±0.05	79.66±0.04	68.78±0.12	76.43±0.26
开花后 55 天	76.88±0.20	82.53±0.05	80.15±0.44	80.32±0.02
开花后 65 天	69.42±0.19	77.45±0.05	78.26±0.05	78.05±0.05
开花后 75 天	55.83±0.05	68.96±0.13	52.33±0.05	75.44±0.03

[0114] 实施例 5

[0115] 除了愈伤组织诱导培养过程中,愈伤组织培养基所述的 6-BA 为 3.0mg/L,2,4-D 为 5.0mg/L;体细胞胚诱导培养过程中,体细胞胚诱导培养基所用 6-BA 为 0mg/L, NAA 为 0.1mg/L 之外,其余与实施例 1 相同,数据分析结果如表 2、5 所示。

[0116] 实施例 6

[0117] 除了愈伤组织诱导培养过程中,愈伤组织培养基所述的 6-BA 为 1.0mg/L,2,4-D 为 1.0mg/L;体细胞胚诱导培养过程中,体细胞胚诱导培养基所用 6-BA 为 0.5mg/L, NAA 为 1.0mg/L 之外,其余与实施例 1 相同,数据分析结果如表 2、5 所示。

[0118] 表 5 体细胞胚诱导培养结果

[0119]	外植体胚龄	实施例 5		实施例 6	
		体细胞胚诱导率 (%)	体细胞胚萌发率 (%)	体细胞胚诱导率 (%)	体细胞胚萌发率 (%)
	开花后 25 天	50.04±0.26	69.05±0.23	61.78±0.05	72.70±0.03
	开花后 35 天	53.19±0.09	72.10±0.31	65.43±0.14	76.82±0.15
	开花后 45 天	55.67±0.34	72.03±0.12	70.79±0.07	84.55±0.03
	开花后 55 天	77.83±0.03	80.65±0.03	82.99±0.45	91.32±0.05
	开花后 65 天	68.05±0.07	79.49±0.05	76.79±0.29	87.62±0.09
	开花后 75 天	53.85±0.02	71.37±0.09	62.74±0.02	73.28±0.14

[0120]

[0121] 表 2、3、4、5 的试验结果表明：

[0122] 1、外植体胚龄对愈伤组织的诱导率影响显著 ($p < 0.05$)，过嫩（早于开花后 45 天）或过熟（晚于开花后 75 天）的幼胚均不能得到理想的胚性愈伤组织诱导结果。开花后 55 天采集的未成熟合子胚在所有诱导培养基上的出愈率均高于其他时期的外植体，且诱导得到的愈伤组织生长速度快，呈淡黄色或嫩黄绿色，结构紧密，呈颗粒状，经多次继代仍能保持较高的活力。

[0123] 2、本发明中以 MS 为基本培养基，以添加 6-BA 0-3.0mg/L、2,4-D 0.3-5.0mg/L、MES500mg/L、蔗糖 30g/L、琼脂 6g/L，pH 值为 5.8 的培养基为愈伤组织诱导培养基，愈伤组织诱导率高，达到 59.12-95.42%，表明外源激素对单个外植体的平均体胚诱导数影响显著 ($p < 0.05$)。

[0124] 3、本发明方法中以 MS 为基本培养基，以添加 NAA0.1-2.0mg/L、6-BA0-1.0mg/L、MES500mg/L、谷氨酰胺 250mg/L、水解酪蛋白 500mg/L、蔗糖 30g/L、琼脂 6g/L，pH 值为 5.8 的培养基为体细胞胚诱导培养基，体细胞胚诱导率高，达到 50.04%-90.73%，表明外源激素对通过愈伤组织诱导体细胞胚的影响显著 ($p < 0.05$)。

[0125] 4、本发明方法由成熟体细胞胚萌发获得体胚苗的得率高，也就是成熟体细胞胚的萌发率高，达到 80% 以上，而且试管苗的移栽成活率高，表明本发明方法能够在短期内形成大量优良的刺槐试管苗，可进行规模化、工厂化生产。

[0126] 5、本发明中开花后第 55 天的外植体未成熟合子胚的愈伤组织诱导率为 66.72-95.42%、体细胞胚诱导率为 76.88-90.73%、体胚萌发率为 80-100%，明显高于其他时期的外植体，以开花后 55 天为未成熟合子胚取材的最佳时期。

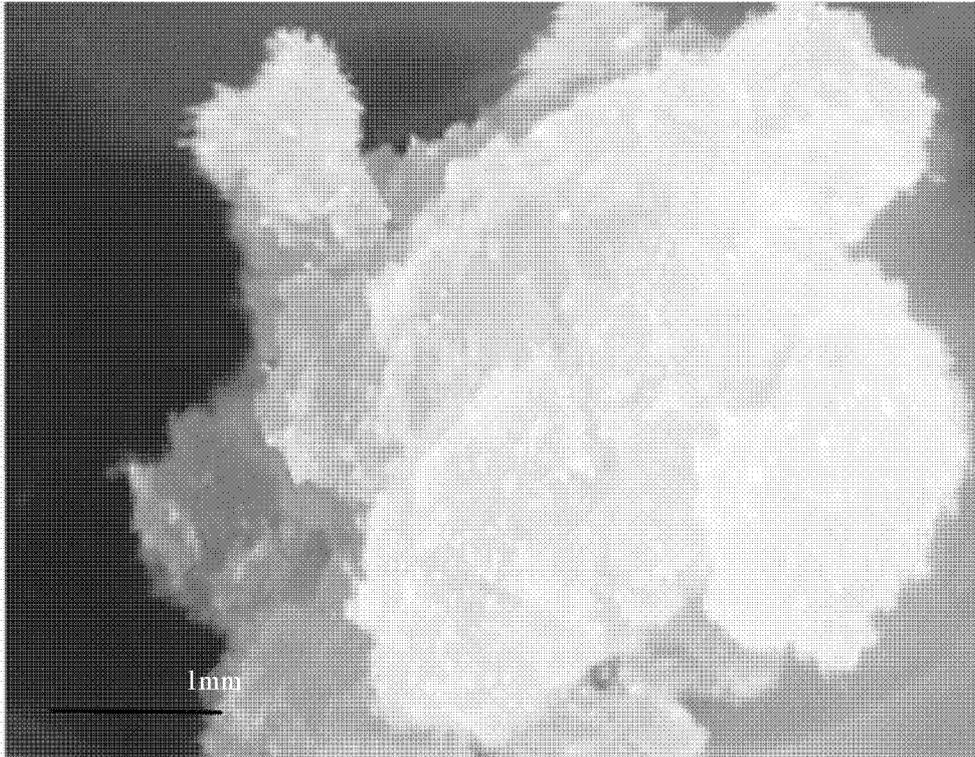


图 1

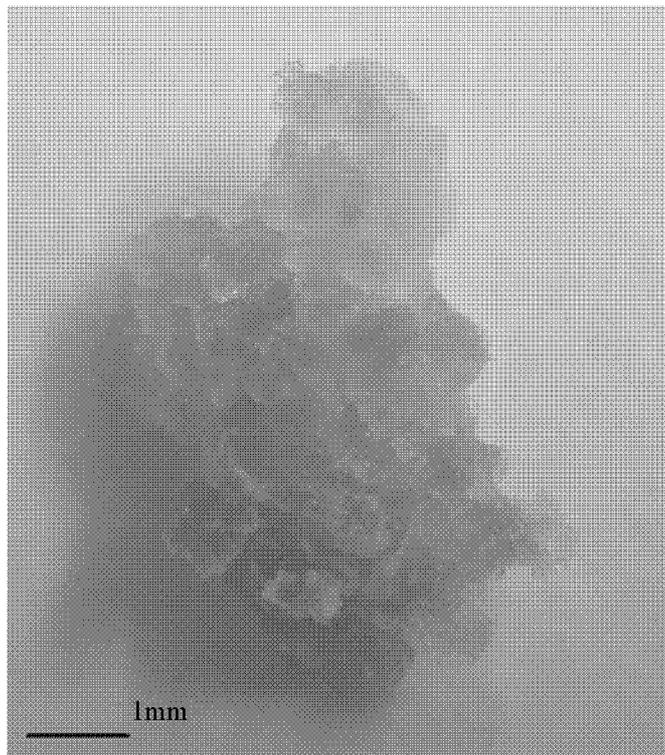


图 2

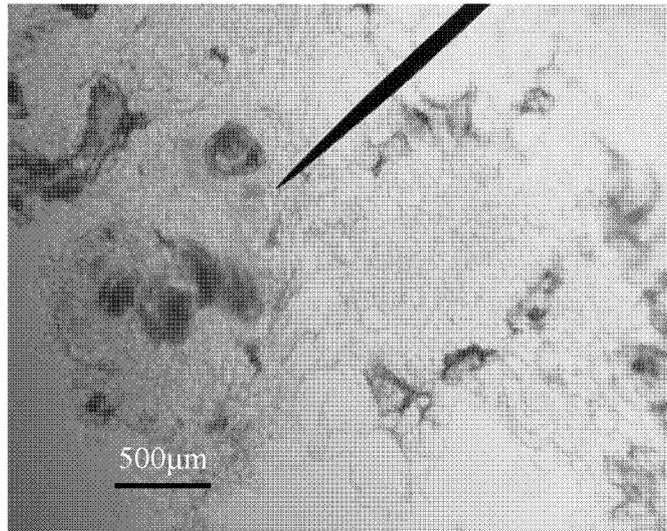


图 3

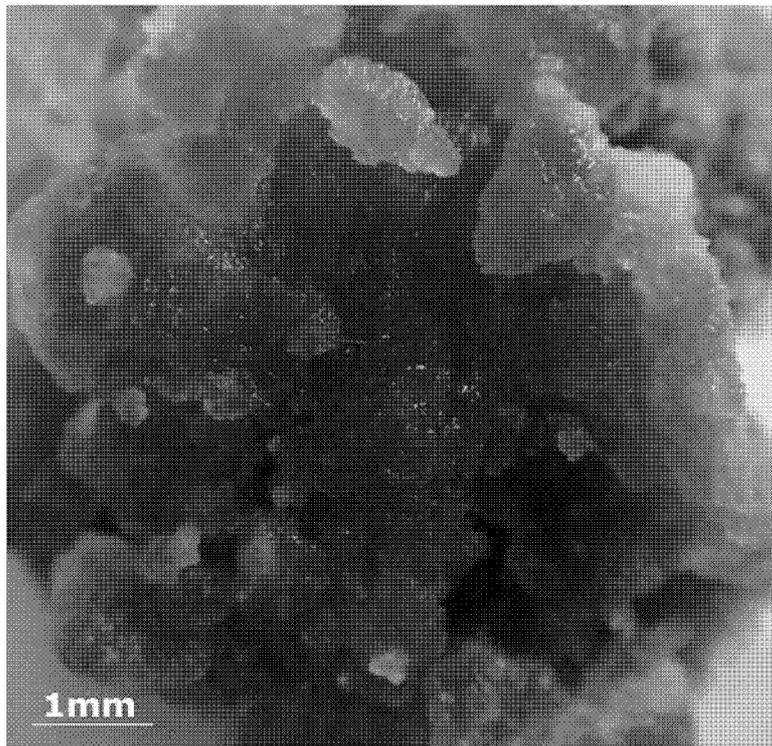


图 4

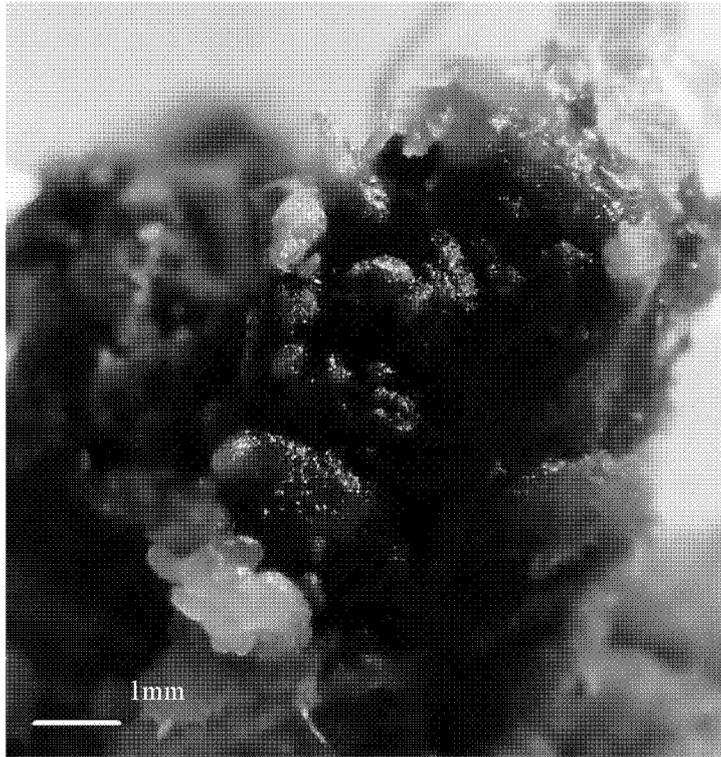


图 5

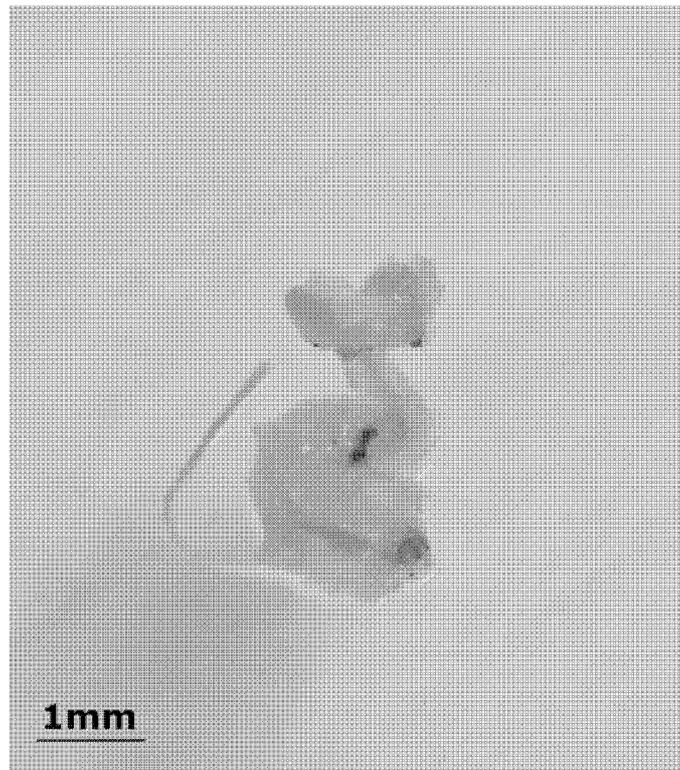


图 6



图 7

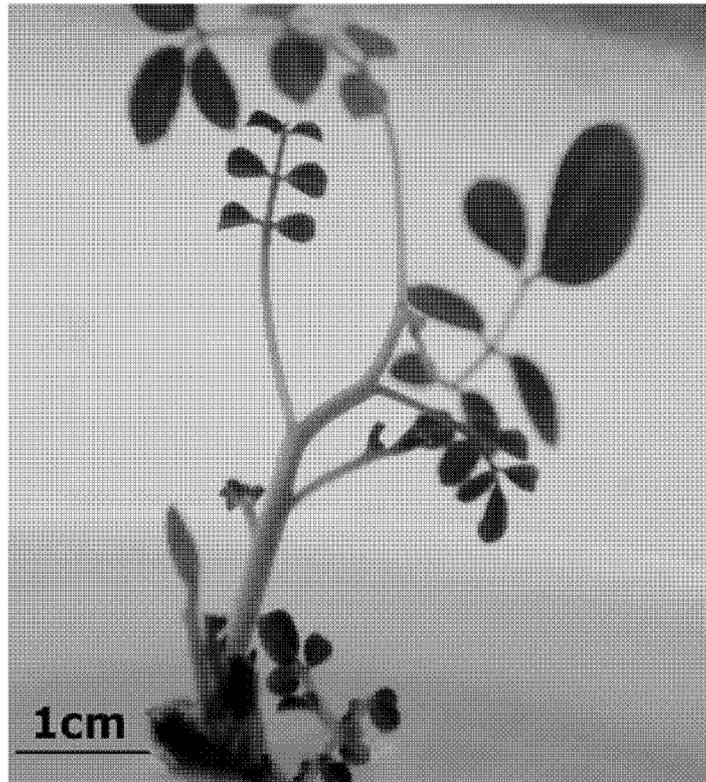


图 8