

文章编号: 1000-5692(2007)03-0377-05

四翅滨藜组培快繁技术

彭少兵, 王得祥

(西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要: 四翅滨藜 *Atriplex canescens* 在中国西北具有很大的应用前景, 利用组培进行扩繁是解决用于生产的优质苗木的有效方法。以四翅滨藜半木质化及全木质化枝条为材料, 研究了不同的取材时间、消毒方法、基本培养基、植物生长调节物质质量浓度对组培的影响。结果表明, 取材时间以4月为宜; 消毒方法先用体积分数70%乙醇表面消毒20 s, 无菌水冲洗2次, 再用 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化汞(HgCl_2)浸泡消毒6 min为宜; 初代培养宜选用高盐培养基MS(Murashige and Skoog) + $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-苄基腺嘌呤(6-BA); 继代培养基以MS + $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 萘乙酸(NAA)更有利于茎芽增殖和生长; 在 $1/2 \text{ MS} + 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA的培养基上进行生根培养, 生根率较高, 根系发育较好。图4表4参10

关键词: 植物学; 四翅滨藜; 组织培养; 植物生长调节物质

中图分类号: Q943.1 文献标志码: A

四翅滨藜 *Atriplex canescens* 为藜科 Chenopodiaceae 滨藜属 *Atriplex* 多年生准常绿灌木, 原产美国中西部。美国科罗拉多州立大学农业试验站、犹他州野生动物资源局、农业部林业局山际林业和牧场试验站及水土保持局等单位通过25 a的持续努力, 选育出四翅滨藜的优良品种, 具有耐干旱, 耐贫瘠, 抗盐碱等多种优良特性^[1]。20世纪90年代后, 我国青海、新疆、宁夏等地先后引进四翅滨藜。区域性栽培试验表明, 四翅滨藜具有良好的推广前景^[2-3]。实际生产中对四翅滨藜苗木的需求很大, 用种子播种繁殖易产生性状分离, 难以保持母本的优良特性, 用扦插繁殖受时间以及插穗数量的限制, 用组织培养的方法繁殖植物具有周期短和不受时间限制等优点, 在生产上得到了广泛应用^[4-6]。此研究旨在研究外植体取样时间、外植体年龄、消毒方法、基本培养基、不同植物生长调节物质质量浓度等对四翅滨藜组培增殖生长及生根的影响, 为四翅滨藜工厂化育苗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验所用的外植体为四翅滨藜的半木质化嫩枝和完全木质化老枝2种, 分别在2004年和2005年的4月中旬和6月中旬采自西北农林科技大学林学院教学苗圃, 消毒剂选用 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化汞(HgCl_2)。

1.2 方法

1.2.1 表面消毒 试验材料被剪成1.5~2.0 cm带腋芽茎段(尖), 接种前用流水冲洗1 h, 用体积分

收稿日期: 2006-08-28; 修回日期: 2007-01-02

基金项目: 农业部引进国际先进农业科学技术计划(948计划)项目(2003-Z99)

作者简介: 彭少兵, 讲师, 从事遗传育种研究。E-mail: pshaobing@163.com。通信作者: 王得祥, 教授, 博士, 从事生态学等研究。E-mail: Wangdx66@sohu.com

数为 70% 乙醇表面消毒 20 s, 无菌水冲洗 2 次, 再用 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ HgCl_2 浸泡消毒 4, 6, 8 min, 无菌水冲洗 3 次, 浸入无菌水中备用。接种时切去材料与消毒液接触部位, 切分为 1.0~1.5 cm 带腋芽茎段接种于无菌培养基上。

1.2.2 初代培养 以 MS (Murashige and Skoog), WPM (woody plant medium), White 为基本培养基, 附加 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-苄氨基腺嘌呤(6-BA), 比较不同基本培养基对四翅滨藜茎段起始培养的影响。

1.2.3 增殖培养 待茎段腋芽萌发展叶后, 切取 1.0 cm 小段, 以 MS 为基本培养基, 添加① 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.5, $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 和 $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 萘乙酸(NAA); ② $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 和 0, 0.05, 0.10, 0.20, $0.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA。

1.2.4 诱导生根培养 以 MS 和 $1/2$ MS 为基本培养基, 添加 0.05, 0.10, $0.20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA。

所有培养基中含琼脂(生产商为 Sanland International Inc.) $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 蔗糖 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 5.6~5.8。采用的容器为 100 mL 三角瓶, 每瓶分装 25~30 mL 培养基, 在 121°C (1.0787 kPa 压力) 条件下灭菌 20 min, 冷却备用。培养室温度为 $25\sim28^\circ\text{C}$, 光照时间为 $14 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$, 光照强度为 $2000\sim3000 \text{ lx}$ 。每处理 10 个外植体, 重复 3 次。采用 DPS 软件对数据进行统计处理, 其中包括方差分析和最小显著差数(LSD)测验等⁷。

2 结果与分析

2.1 取材时间及外植体的选择

于 4 月和 6 月分别取半木质化嫩枝和完全木质化老枝 2 种消毒后, 接种于 $\text{MS} + 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 的培养基上, 观察不同取材时间及不同年龄外植体对污染率(污染数/接种数)和存活率(存活数/接种数)的影响。由图 1 可以看出, 半木质化的外植体比完全木质化的外植体的污染率小, 存活率高, 这与半木质化的枝条较嫩, 生长的时间短, 外植体带菌较少有关, 而且半木质化的外植体形成愈合组织的时间比完全木质化的枝条早, 所以取材以半木质化的枝条为宜。不同取材时间对消毒效果的影响由图 2 可知, 4 月取的材料其污染率低而存活率高, 这与 6 月气温较高, 各种微生物繁殖速度增加, 影响消毒效果有关, 所以宜在 4 月取材进行初代培养较好。

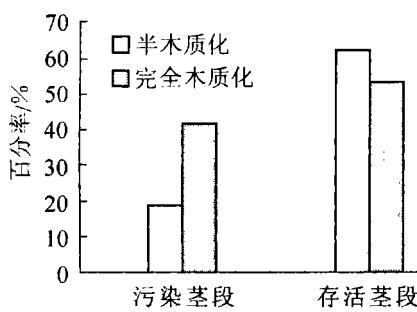


图 1 不同年龄的四翅滨藜外植体对消毒效果的影响

Figure 1 Effects of different ages of *Atriplex canescens* explants on sterilization

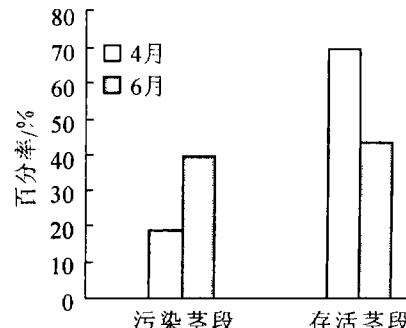


图 2 四翅滨藜外植体取材时间对消毒效果的影响

Figure 2 Effects of gathering time of *Atriplex canescens* explants on sterilization

2.2 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ HgCl_2 消毒时间长短对外植体消毒效果的影响

在 4 月, 以体积分数为 70% 乙醇表面消毒 20 s, 无菌水冲洗 2 次, 再用 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ HgCl_2 分别浸泡 + 振荡(手动)消毒 4, 6, 8 min, 接种于 $\text{MS} + 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 的培养基上, 观察不同 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ HgCl_2 消毒时间对外植体消毒效果的影响, 接种 10 d 后统计试验结果见表 1。消毒时间为 4, 6, 8 min 时, 污染率分别为 33%, 13%, 10%, 随着消毒时间的延长, 初代培养物的污染率下降, 当消毒时间达到 6 min 时, 绝大多数污染病菌已被杀死。但是, 褐变死亡率随消毒时间的延长呈上升趋势, 这是因为

在灭菌时, $HgCl_2$ 游离出汞离子, 外植体茎段受到汞离子的毒害而死亡。因此, 在考虑降低污染率的措施时, 不宜采用延长消毒时间的办法。存活率在消毒 6 min 时最高(75%), 之后呈下降趋势, 因此, 对于四翅滨藜初代培养的外植体, 以体积分数为 70%乙醇表面消毒 20 s, 无菌水冲洗 2 次, 再用 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} HgCl_2$ 浸泡消毒 6 min 为宜。

表 1 用 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} HgCl_2$ 消毒外植体时间对消毒效果的影响

Table 1 Effects of the disinfection's time on sterilization of tender stems of *Atriplex canescens*

$1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} HgCl_2$ 消毒时间/min	接种数/ 个	污染		褐化		存活	
		个数	百分率/%	个数	百分率/%	个数	百分率/%
4	60	20	33	3	5	37	62
6	60	8	13	7	12	45	75
8	60	6	10	15	25	39	65

2.3 基本培养基对外植体初代培养的影响

将茎段分别接种在 MS, WPM, White 为基本培养基, 附加 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA。10 d 后腋芽开始萌动, 呈现嫩绿色, 茎段基部膨大, 逐渐形成愈伤组织。20 d 后在腋芽基部周围产生数量不等的丛生芽(1~6 个), 腋芽没有明显伸长。30 d 后腋芽在不同培养基上的生长明显不同: 在 MS 培养基上的腋芽伸长生长明显大于 WPM 和 White 培养基, 产生的丛生芽也多(表 2)。方差分析表明, 在茎芽数及茎芽长方面, 培养基之间有极显著差异($P < 0.01$)。多重比较结果表明, MS 培养基明显高于 WPM 和 White。

2.4 6-BA 及 NAA 质量浓度对芽增殖和生长的影响

以 MS 为基本培养基, 分别添加 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.5, 2.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 及添加 0.1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA, 观察不同的 6-BA 质量浓度对芽增殖的影响(接种 30 d 后统计结果)。方差分析表明, 不同 6-BA 质量浓度对四翅滨藜芽增殖和生长有显著影响($F_{\text{增殖}} = 80.28$, $F_{\text{生长}} = 8.77$, $F_{0.01} = 4.18$)。多重比较也表明, 不同 6-BA 质量浓度对四翅滨藜芽增殖和生长影响差异显著。从图 3 可以看出: 在不含 6-BA 的培养基中, 平均茎芽数仅有 1.2 个, 当 6-BA 质量浓度为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 茎芽数达最高值 9.6 个, 但当 6-BA 质量浓度再增加时, 茎芽数明显减少, 且丛芽多成簇状, 芽间距短, 叶浓密, 面积小, 难于分切进行继代培养, 有的出现玻璃化特征, 表明高质量浓度 6-BA 对芽的增殖有抑制作用。

从图 4 可以看出不同 6-BA 质量浓度对茎芽生长的影响与芽增殖的影响基本一致, 茎芽长度变化幅度比增殖的变化幅度小。

表 2 不同培养基对四翅滨藜外植体芽分化及生长的影响

Table 2 Effects of different basic culture media on bud break and shoot growth of *Atriplex canescens* explants during initial culture period

基本培养基	茎芽数/个	芽长/cm
MS	5.07 ± 0.74 A	1.75 ± 0.07 A
WPS	2.93 ± 0.74 B	1.11 ± 0.07 B
White	1.40 ± 0.50 C	0.30 ± 0.06 C

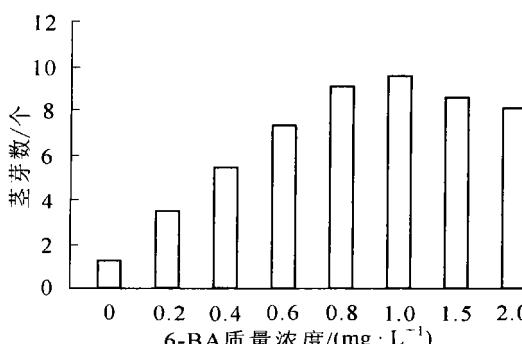


图 3 不同 6-BA 质量浓度对四翅滨藜芽增殖的影响

Figure 3 Effects of different concentrations of 6-BA on bud

?1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

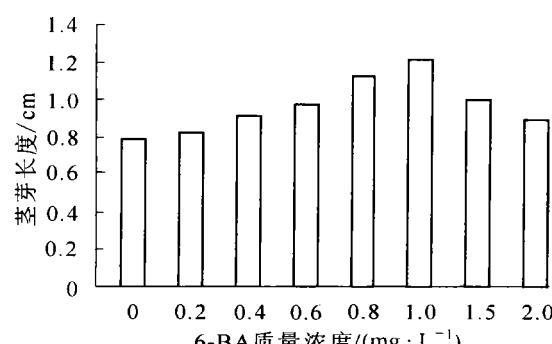


图 4 不同 6-BA 质量浓度对四翅滨藜芽生长的影响

Figure 4 Effects of different concentrations of 6-BA on bud

?1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

以 MS 为基本培养基, 添加 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 并分别添加 0, 0.05, 0.10, 0.20, $0.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA, 观察不同的 NAA 质量浓度对芽增殖的影响, 接种 30 d 后统计, 其结果见表 3。不同 NAA 质量浓度对四翅滨藜芽增殖和高生长有显著影响 ($F_{\text{增殖}} = 6.62$, $F_{\text{生长}} = 6.05$, $F_{0.01} = 4.18$), 在一定范围内随 NAA 质量浓度的增加, 增殖芽数增加, 茎芽长也增长, 当 NAA 质量浓度为 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 达最高值, 当 NAA 质量浓度达到 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时茎段基部形成大量的愈合组织,

表 3 不同 NAA 质量浓度对四翅滨藜芽增殖及生长的影响

Table 3 Effects of different concentrations of NAA on proliferation and growth of *Atriplex canescens* shoots

NAA/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	增殖芽数	茎芽长/ cm
0	5.50 ± 0.57 D	0.38 ± 0.07 E
0.05	8.11 ± 0.77 C	0.60 ± 0.07 C
0.10	9.57 ± 0.68 A	1.21 ± 0.10 A
0.20	8.60 ± 0.77 B	1.12 ± 0.09 B
0.50	2.67 ± 0.61 E	0.54 ± 0.07 D

说明 NAA 质量浓度过高不利于芽增殖和伸长。

2.5 不同培养基对诱导生根效果的影响

在经多代培养获得大量继代苗后, 切取高 2.0 cm 以上的有效芽苗转入以 MS 和 1/2 MS 为基本培养基, 同时分别添加 0.05, 0.10, 0.20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 的诱导生根培养基中诱导生根, 观察基本培养基种类和 NAA 质量浓度对生根的影响。20 d 后统计, 结果见表 4。结果表明, 在 1/2 MS 培养基上培养 8 d 即可见根芽眼, 而在 MS 培养基中 11 d 以上才见根芽眼。在 1/2 MS 培养基上平均生根率为 35.5%, 与在 MS 培养基中平均生根率(30%)相差不大, 但从节约生产成本考虑, 以 1/2 MS 为基本培养基为宜。随 NAA 质量浓度的增加, 生根率和平均根数都增加, 根由细长变为短粗。从生根数、根长和生根率综合因素考虑, 以 1/2 MS 为基本培养基, 附加 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 生根效果最好。

表 4 基本培养基和不同 NAA 质量浓度对生根效果的影响

Table 4 Effects of different basic culture media and concentrations of NAA on rooting of *Atriplex canescens*

基本培养基	NAA/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	生根率/ %	平均根数/ 条	平均根长/ cm
MS	0.05	23.3	1.6	4.35
MS	0.10	30.0	2.1	3.54
MS	0.20	36.7	2.4	2.16
1/2MS	0.05	30.0	1.5	4.12
1/2MS	0.10	36.7	2.2	3.62
1/2MS	0.20	40.0	2.3	1.78

3 结论

在开始进行四翅滨藜组织培养时最重要的一步是无菌体系的建立。研究表明, 外植体的取材时间及外植体年龄对无菌体系的建立有重要影响: 4 月与 6 月取的材料相比, 4 月取的材料污染率低而存活率高, 在 4 月取材进行初代培养较好。这与四倍体刺槐 *Robinia pseudoacacia* 无菌体系建立过程中的研究结论一致^[8]。半木质化的外植体比完全木质化的外植体的染率小, 存活率高, 而且半木质化的外植体接种在培养基中开始出现愈合组织的时间比完全木质化的枝条早。这与半木质化的枝条嫩, 该类外植体体内生长素含量较高有关。

植物生长调节物质在试管苗增殖中起着重要的作用。其中, 细胞分裂素 6-BA 和生长素 NAA 在茎尖分化培养和增殖培养时应用较多^[4-6, 8, 9]。研究表明, 在一定的质量浓度范围内, 6-BA 和 NAA 能促进四翅滨藜芽增殖和生长, 但当 6-BA 质量浓度过高时易引起丛芽多成簇状, 芽间距短, 有的甚至出现玻璃化特征, 这与蒋泽平等^[10]在研究苦楝 *Melia azedarach* 试管苗玻璃化的影响因素中得出的结论一致。当 NAA 质量浓度过高时茎段基部形成大的愈伤块, 也不利于芽增殖和伸长。

参考文献:

- [1] 王文颖, 王刚. 四翅滨藜的生物生态学特性及研究进展[J]. 草丛科学, 2004, 21(7): 18—21.
- [2] 王存桂. 四翅滨藜推广现状和发展建议[J]. 甘肃科技, 2002(7): 97.

- [3] 李跃进, 崔素英, 郝朝晖, 等. 淮常绿饲料灌木树种——四翅滨藜[J]. 中国林副特产, 2002(4): 30—31.
- [4] 张存旭, 杨锋利, 袁秀平. 常春藤离体快繁技术[J]. 浙江林学院学报, 2005, 22(2): 241—245.
- [5] 朱玉球, 黄华宏, 陆海根, 等. 光叶石楠组培快速繁殖[J]. 浙江林学院学报, 2005, 22(2): 238—240.
- [6] 刘志高, 童再康, 储家森, 等. 乳白石蒜组织培养[J]. 浙江林学院学报, 2006, 23(3): 347—350.
- [7] 袁志发, 周静芋. 试验设计与分析[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [8] 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.
- [9] 张存旭, 宋敏, 赵忠. 桤皮栎茎段离体培养的研究[J]. 西北植物学报, 2004, 24(7): 1260—1265.
- [10] 蒋泽平, 梁珍海, 汪有良, 等. 苦楝优良无性系试管苗玻璃化的影响因素[J]. 浙江林学院学报, 2006, 23(4): 420—423.

Tissue culture and rapid propagation of *Atriplex canescens*

PENG Shao-bing, WANG De-xiang

(College of Forestry, Northwest Agricultural and Forestry University, Yangling 712100, Shaanxi, China)

Abstract: *Atriplex canescens* (fourwing saltbush) is a salt, base and drought tolerant plant species, so it can be planted widely in the northwest of China. Use half and fully lignified stems as experimental materials, to study the influencing of the time of the explant was taken, the method of the optimal sterilization of explant, and the NAA and 6-BA concentrations on the tissue culture of fourwing saltbush. The results showed that the best picking time is in April, the optimal sterilization method of explant is dipped in 70% alcohol about 30 seconds and then in 1.0 g · L⁻¹ HgCl₂ about 6 minutes. The culture media MS (Murashige and Skoog) containing 0.5 mg · L⁻¹ 6-BA are suitable for the initial culture ($P < 0.01$), and MS medium supplemented with 1.0 mg · L⁻¹ 6-BA and 0.10 mg · L⁻¹ NAA in subculture was in favor of the shot proliferation and growth ($P < 0.01$). The material has high rooting percentages (36.7%) and excellent development root systems on 1/2 MS medium with 0.10 mg · L⁻¹ NAA. [Ch, 4 fig. 4 tab. 10 ref.]

Key words: botany; *Atriplex canescens*; tissue culture; plant growth regulators