

灰木相思离体培养体系的构建

何文锦^{1,2}, 黄 骢³, 陈由强², 代容春², 林思祖¹

(1. 福建农林大学 林学院, 福建 福州 350002; 2. 福建师范大学 生物工程学院, 福建 福州 350007;

3. 福州市农业科学研究所 福建 福州 350018)

摘要: 灰木相思 *Acacia implexa* 是南方优良的多用途造林树种, 但种子繁殖性状分离严重, 试图通过组织培养找到新的繁育途径。通过对灰木相思成年优树幼嫩的带腋芽茎段的离体培养试验, 探讨了灰木相思茎段不定芽分化、继代增殖和壮苗生根的最佳培养条件。采用正交试验对防止培养过程中出现玻璃化苗的方法进行了探讨。结果表明: 适宜灰木相思不定芽诱导的培养基配方为 MS (Murashige and Skoog) + 1.0 ng · L⁻¹ 6-苄氨基嘌呤(6-BA) + 0.2 ng · L⁻¹ 萘乙酸(NAA) + 1.0 ng · L⁻¹ 玉米素(ZT), 适宜继代培养的培养基为改良 1/2 MS (NH₄⁺: NO₃⁻ = 1:2) + 1.0 ng · L⁻¹ 6-BA + 0.05 ng · L⁻¹ NAA, 适宜进行壮苗生根的培养基配方为改良 1/2 MS + 0.1 ng · L⁻¹ NAA, 移栽后成活率可达 70 %。表3 参11

关键词: 植物学; 灰木相思; 离体培育

中图分类号: S723.1; Q943.1

文献标志码: A

相思是豆科 Leguminosae 含羞草亚科 Mimosoideae 金合欢属 *Acacia* 树种, 主要分布在澳大利亚、巴布亚新几内亚和印度尼西亚等地。相思是一类出色的短轮伐期多用途山地造林树种, 适应性广, 速生, 具根瘤, 对土壤有蓄水固氮作用, 具良好的经济、生态效益。其中灰木相思 *Acacia implexa* 主要集中分布于澳大利亚布里斯班以南至东南部和塔斯马尼亚岛。处于 16° ~ 18°S, 海拔从南部地区的海平面至新南威尔士州北部山地的 1 250 ~ 1 500 m^[1]。中心分布区气候凉爽湿润, 近年已在中国华南部分地区广为种植, 成为南方用材、薪炭、肥料、道路绿化和混交的良好树种。灰木相思木材光滑、平整, 有金黄色光泽, 耐腐蚀, 还可作为家具、高级装饰贴面板的材料, 也是制造纸浆、拷胶等工业用材树种。另外, 有实验证明^[2], 选用灰木相思造林可改良土壤, 提高地力, 是与杉木 *Cunninghamia lanceolata*, 松树 *Pinus* spp., 火力楠 *Mechelia madurei*, 木荷 *Schinus superba* 等混交的理想伴生树种, 可防治林地因连作而引起的地力衰退。目前, 灰木相思主要靠种子繁殖, 但其树形、生长量和抗逆性等受种源影响, 即使同一种批性状分离亦很严重^[3], 因此极大地限制了灰木相思的造林推广速度, 影响了它们的开发利用。作者以福建漳州中西林场引种的灰木相思优株为材料, 利用组织培养技术, 建立植株无性扩繁体系, 期望能为其种苗繁育提供一条新途径。

收稿日期: 2006-11-13; 修回日期: 2007-06-11

基金项目: 福建省林业厅攻关项目(闽林综[2003]17); 福建师范大学扶苗基金资助项目(FM007)

作者简介: 何文锦, 讲师, 从事林业生物技术研究。E-mail: liohwj@fjnu.edu.cn。通信作者: 林思祖, 教授, 博士生导师, 从事森林培育研究。E-mail: szlin@126.com

1 材料与方法

1.1 试验材料

在漳州中西林场筛选出4年生灰木相思优树为采穗母树,于久晴之后的晴天,从中上部选取长势旺盛的当年生半木质化带腋芽的健康穗条。

1.2 方法

1.2.1 外植体消毒 取外植体切成小段,浸入体积分数为70%乙醇中振荡约30 s,再用自来水荡洗,1.0 g·L⁻¹ HgCl₂ 灭菌13 min,无菌水漂洗4~5次,备用。

1.2.2 诱导不定芽的植物生长调节物质质量浓度 将已消毒的外植体切成长约1.5 cm左右的带芽茎段,接种于已灭菌的MS(Murashige and Skoog)固体培养基上,附加不同质量浓度的6-苄氨基嘌呤(6-BA, 0.5, 1.0, 1.5 ng·L⁻¹), 萘乙酸(NAA, 0.1, 0.2, 0.3 ng·L⁻¹), 玉米素(ZT, 0.4, 0.8, 1.0 ng·L⁻¹)诱导不定芽。

1.2.3 防止不定芽玻璃化条件的筛选 灰木相思继代4~5次后易玻璃化。本实验在含有1.0 ng·L⁻¹ 6-BA的培养基上采用正交试验方法优化培养条件。选取NAA、总氮量和铵态氮与硝态氮([NH₄⁺]:[NO₃⁻])的不同比例为3个试验因子,每个因子分别采用3个水平,选用L₉(3⁴)正交表(表1),观察培养5周,统计数据。

1.2.4 生根壮苗培养 挑选不定芽中健壮的芽体接入改良1/2 MS+(0.1, 0.4, 0.8 ng·L⁻¹)NAA培养基中进行生根培养,筛选出最适生根培养基配方。

1.2.5 练苗移栽 练苗:将完成生根壮苗培养的瓶苗转移到日光温室中,遮光70%,以防灼伤。健化2

周左右,以适应自然环境。移栽:基质为干净的黄心土:细沙=3:2,按常规组培苗移植管理,保持基质湿润,透气并适当喷施液肥及体积分数为0.1%的多菌灵和0.1%福美双以防杂菌感染,遮光70%,逐渐减少保湿和遮阴时间,至完全适应全光照条件。

表1 培养基配比实验方案

Table 1 Medium formulation

水平	因子种类		
	[NH ₄ ⁺]:[NO ₃ ⁻]	NAA 质量浓度 (ng·L ⁻¹)	总氮 (mmol·L ⁻¹)
1	1:2	0.05	40
2	1:4	0.10	20
3	1:8	0.20	10

2 结果与分析

2.1 不定芽诱导培养

外植体接种于分别添加不同植物生长调节物质组合的MS培养基上,约3周左右腋芽开始萌动,愈合组织开始形成,呈浅黄褐色,这种愈合不能分化成不定芽^[4]。结果显示(表2):在附加有1.0和1.5 ng·L⁻¹ 6-BA的培养基上,芽的分化较好,但在高质量浓度的培养基中愈合组织很多,且不定芽易玻璃化,虽能不断产生丛芽,但有效芽数减少。在附加1.0 ng·L⁻¹ 6-BA+0.2 ng·L⁻¹ NAA的培养基上,不定芽分化较好。附加1.0 ng·L⁻¹ ZT的培养基上,不定芽生长健壮,且愈合组织少,增殖倍数较高,只有少量玻璃化。实验结果表明,适宜灰木相思不定芽诱导的培养基配方为MS+1.0 ng·L⁻¹ 6-BA+0.2 ng·L⁻¹ NAA+1.0 ng·L⁻¹ ZT。

2.2 不定芽继代增殖培养,减少玻璃化

通过3水平3因素的实验设计^[5],5周后观察统计的试验结果,由显著性检验可知(表3),不同形态比例及总氮浓度处理差异显著,NAA处理差异不显著。3个因子的主次顺序为不同比例铵态氮和硝态氮,总氮浓度,NAA质量浓度。较低的铵态氮与硝态氮比例^[6]([NH₄⁺]:[NO₃⁻]=1:2)、较高的总氮浓度(40 mmol·L⁻¹)和较低质量浓度NAA(0.05 ng·L⁻¹)都适宜灰木相思不定芽增殖,玻璃化程度相对较轻。

表2 植物生长调节物质种类、质量浓度对不定芽和愈合发生的影响

Table 2 Effect of different phytohormone concentrations on adventitious bud and callus inducement				
植物生长调节物质组合	接种数 个	不定芽平均 增殖倍数	不定芽生长评价	愈合组织平 均直径 cm
0.5 ng ·L ⁻¹ 6-BA	30	2.1	芽丛偏少，生长较慢	0.6
1.0 ng ·L ⁻¹ 6-BA	30	2.8	芽丛较多，健壮，少量玻璃化	1.5
1.5 ng ·L ⁻¹ 6-BA	30	3.5	芽丛密集，生长快，玻璃化较多	2.8
1.0 ng ·L ⁻¹ 6-BA + 0.1 ng ·L ⁻¹ NAA	30	2.7	芽丛较多，较细	1.3
1.0 ng ·L ⁻¹ 6-BA + 0.2 ng ·L ⁻¹ NAA	30	3.6	芽丛密集，健壮，叶绿	1.2
1.0 ng ·L ⁻¹ 6-BA + 0.3 ng ·L ⁻¹ NAA	30	3.1	芽丛较密，玻璃化较多，部分叶枯黄	2.6
1.0 ng ·L ⁻¹ 6-BA + 0.2 ng ·L ⁻¹ NAA + 0.4 ng ·L ⁻¹ ZT	30	2.5	芽丛较多，较细，叶绿	0.9
1.0 ng ·L ⁻¹ 6-BA + 0.2 ng ·L ⁻¹ NAA + 0.8 ng ·L ⁻¹ ZT	30	3.6	芽丛较密，健壮，叶绿	1.5
1.0 ng ·L ⁻¹ 6-BA + 0.2 ng ·L ⁻¹ NAA + 1.0 ng ·L ⁻¹ ZT	30	4.8	芽丛密集，玻璃化少，叶绿，生长快	1.3

将不定芽丛的带芽茎段接入经筛选过的改良 1/2 MS (总氮量 40 mmol ·L⁻¹, [NH₄⁺]:[NO₃⁻] = 1:2) + 1.0 ng ·L⁻¹ 6-BA + 0.05 ng ·L⁻¹ NAA 培养基中进行增殖继代培养,大大减少了玻璃化苗的发生,同时离体培养体系的增殖倍数也提高到5。

表3 不同因素对不定芽玻璃化影响的方差分析

Table 3 Variance analysis of effect of different facts on vitrification of the adventitious buds						
变异来源	自由度	平方和	均方	F	F _{0.05}	F _{0.01}
[NH ₄ ⁺]:[NO ₃ ⁻]	2	1 528.22	764.11	75.58 *	19.00	99.00
NAA 质量浓度	2	134.22	67.11	6.64		
氮总量	2	854.22	427.11	42.25 *		
误差	2	20.22	10.11			
总变异	8	2 536.88				

2.3 壮苗生根培养

本本植物试管苗的生根是整个培养过程中最难克服的一个环节^[7]。本实验将继代增殖的健壮茎段接入改良 1/2 MS + (0.1, 0.4, 0.8 ng ·L⁻¹) NAA 生根培养基中。实验表明: NAA 质量浓度为 0.1 ng ·L⁻¹ 时,生根率可达 93%, 分别比 0.4 ng ·L⁻¹ 的生根率(71%) 和 0.8 ng ·L⁻¹ 的生根率为(59%) 高出了 22% 和 34%。

2.4 练苗移植

将生根试管苗(根长约 2.0~3.0 cm) 在自然条件下炼苗 14 d 左右,洗净根部残存的培养基,移栽于基质为干净的黄心土 细沙=3:2 的塑料大棚苗床中,按常规组培苗移植管理,保持基质湿润透气。经过 30 d 的培养,成活率可达 70% 以上。

3 结论

林地生长的成年灰木相思优树外植体消毒较困难,污染率较高^[8]。选择适宜的季节和天气取材是降低灰木相思外植体污染率,提高分离成功率的关键。选择新芽开始半木质化的季节最好,外植体较干净也耐消毒。阴雨天菌类易滋生,消毒相当困难,最好是连续一段晴热干燥天气后采样。灰木相思的叶片和枝条表面生有细小绒毛,极易吸附尘土,滋生菌类,在 1.0 g ·L⁻¹ 的升汞溶液中绒毛间易形成许多小气泡,升汞不易接触到外植体的表皮,所以外植体消毒时应先用体积分数为 70% 乙醇或洗衣粉荡洗,破坏其表面张力作用,使升汞能接触到外植体的表皮。

在诱导不定芽的培养基中,植物生长调节物质质量浓度较高时,外植体接触培养基处有较多浅黄褐色的愈合组织和不定芽发生,同时不定芽的质量下降,表现为不定芽短促肥大,含水量高。愈合组织的生长延长了不定芽的萌发时间,就相对减少了不定芽的增殖率,且这种愈合组织不能分化成有效不定芽。在继代培养的培养基中植物生长调节物质质量浓度较高时,虽然能使不定芽的增殖率提高,但也会促进玻璃化苗的生成^[9]。当选用中低质量浓度的(1.0 ng ·L⁻¹) 6-BA 和(0.05 ng ·L⁻¹) NAA 时,

不定芽增殖速度中等,形态正常,继代过程稳定,是长期继代增殖的适宜质量浓度。灰木相思组培苗生根率较低,同其他木本植物的组培苗生根情况相似^[10,11],且培养生根的组培苗极易失水萎蔫,导致移栽失败,所以环境要保持一定的湿度,适宜用干净的黄心土:细沙=3:2作为移栽基质。灰木相思外植体离体培养条件的建立,使批量生产品质优良、性状稳定的苗木成为可能,同时也大大降低造林用苗的成本,缩短育苗时间,也为今后灰木相思在分子生物学水平的进一步研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] 潘志刚,游应天,李玉科,等. 中国主要外来树种引种栽培[M]. 北京:北京科学技术出版社,1994:378-406.
- [2] 周鸿彬,高本旺,高登梅,等. 相思类树种引种初报[J]. 湖北林业科技,2001(4):19-22.
- [3] 詹夷生. 闽北耐寒相思种源选择研究初报[J]. 福建林学院学报,1999,19(2):153-156.
- [4] 陈桂芳,娄利华. 银荆相思组织培养及快繁技术研究[J]. 西南农业大学学报:自然科学版,2004,26(2):195-197.
- [5] 洪伟. 林业试验设计技术与方法[M]. 北京:北京科学技术出版社,1993:148-159.
- [6] 蔡玲,王以红,吴幼媚,等. 5种相思树组织培养研究[J]. 广西林业科学,2003,32(1):24-26.
- [7] 张宏伟,黄学林,傅家瑞. 大叶相思、马占相思腋芽培养和植株再生[J]. 热带亚热带植物学报,1995,3(3):62-68.
- [8] 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.
- [9] 蒋泽平,梁珍海,汪有良. 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.
- [10] 朱玉球,廖望仪. 山核桃愈伤组织诱导的初步研究[J]. 浙江林学院学报,2001,18(2):115-118.
- [11] 王碧琴,余发新,刘腾云. 木兰科7种植物的组织培养技术研究[J]. 江西农业大学学报,2006,28(2):268-273.

Optimum conditions for rapid propagation with clones of *Acacia implexa*

HE Wen-jin^{1,2}, HUANG Q³, CHEN You-qiang², DAI Rong-chun², LIN Si-zu¹

(1. Forestry College, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China; 2. Hoengineering College, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, Fujian, China; 3. Fuzhou Academy of Agriculture Science, Fuzhou 350018, Fujian, China)

Abstract: *Acacia implexa* is an excellent multipurpose tree species in South China, however seed propagation will cause segregation of inheritable characteristics and then, limit its utilization. This study looked at the use of tissue culture to clone trees with three plant growth regulators (6-BA; NAA, ZT) in different levels, and appropriate methods for possible ways to prevent vitrification of adventitious buds by orthogonal experiment $L_9(3^4)$. Results of experiments on micropropagation of young stem sections for selected adult trees of *A. implexa* showed that a suitable medium for adventitious bud differentiation of the stem sections with axillary buds was: MS (Murashige and Skoog's medium) + 1.0 ng · L⁻¹ BA (6-benzyladenine) + 0.2 ng · L⁻¹ NAA (α-naphthalene acetic acid) + 1.0 ng · L⁻¹ ZT (zeatin), a suitable medium for adventitious bud multiplication was: 1/2 MS (NH₄⁺: NO₃⁻ = 1:2) + 1.0 ng · L⁻¹ 6-BA + 0.05 ng · L⁻¹ NAA, and a suitable medium for improving roots was: 1/2 MS + 0.1 ng · L⁻¹ NAA. After transplanting, over 70% of the tube plantlets survived. [Ch, 3 tab, 11 ref.]

Key words: botany; *Acacia implexa*; in vitro culture