

文章编号:1001-1498(2016)04-0603-07

卷荚相思组培快繁技术研究

王 鸿, 黄烈健*, 施 琼, 胡 峰

(中国林业科学研究院热带林业研究所, 广东 广州 510520)

摘要: [目的] 建立 16 年生卷荚相思优树组培快繁技术体系。 [方法] 以 16 年生卷荚相思优树的当年新生枝条带腋芽茎段为材料, 对卷荚相思外植体进行消毒、初代培养、增殖培养、生根培养和移植等。 [结果] 表明: 通过对 16 年生卷荚相思成年优树采条进行扦插, 以扦插苗建立采穗圃, 选取采穗圃中当年生健康无病虫害枝条的中段为外植体, 最佳消毒方式为 75% 的酒精处理 0.5 min 和 0.1% 的升汞处理 18 min, 其存活率达 69.33%, 芽诱导率达 86.67%; 最佳初代培养基为改良 MS + 蔗糖 40 g · L⁻¹, 出芽率为 91.33%。最佳增殖培养基为 MS + 6-BA 0.5 mg · L⁻¹ + NAA 0.1 mg · L⁻¹ + 蔗糖 30 g · L⁻¹, 35 d 增殖倍数可达 3.50 倍; 最佳生根培养基为 1/2 MS + IBA 0.25 mg · L⁻¹ + NAA 0.5 mg · L⁻¹ + 蔗糖 40 g · L⁻¹, 15 d 生根率为 96.11%; 将生根苗移植至以沙为基质的营养杯中, 存活率为 71.11%。 [结论] 研究解决了 16 年生卷荚相思成年优树外植体污染率高和芽诱导率低等问题, 建立的组培快繁技术体系对今后加快卷荚相思良种选育及优质苗木大量扩繁具有重要作用。

关键词: 卷荚相思; 组培快繁; 外植体; 选择; 消毒

中图分类号: S722.3

文献标识码: A

Technique of Tissue Culture of *Acacia cincinnata*

WANG Hong, HUANG Lie-jian, SHI Qiong, HU Feng

(Research Institute of Tropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Guangzhou 510520, Guangdong, China)

Abstract: [Objective] To establish the technique system of tissue culture for 16-year-old *Acacia cincinnata* elite tree. [Method] Newborn branches with axillary buds from 16-year-old elite tree were collected as explants to study the sterilization strategy, primary culture, multiplication culture, rooting and transplant of *A. cincinnata*. [Result] A cutting orchard was established by using the newborn branches of 16-year-old *A. cincinnata* elite trees as cuttings. It was proved that the middle part of stem segments collected from the orchard was the best. As sterilized with 75% alcohol for 0.5 min and 0.1% HgCl₂ for 18 min, the survival rate and shooting rate of explants were 69.33% and 86.67% respectively; the best primary culture medium was modify MS + sucrose 40 g · L⁻¹, with germination rate 91.33%; the highest multiplication index was 3.50 after 35 d cultured on MS + 6-BA 0.5 mg · L⁻¹ + NAA 0.1 mg · L⁻¹ + sucrose 30 g · L⁻¹; the best medium for rooting was 1/2MS + IBA 0.25 mg · L⁻¹ + NAA 0.5 mg · L⁻¹ + sucrose 40 g · L⁻¹ with rooting rate 96.11% after cultured 15 d. The survival rate reached 71.11% after being transplanted the rooted plantlets to nutrition cup with sand. [Conclusion] This study would help to resolve the problems of sterilization and shoot induction of mature *A. cincinnata* elite tree, and the tissue culture technique could contribute to *A. cincinnata* breeding program and large-scale seedling propagation.

Keywords: *Acacia cincinnata*; tissue culture; explant; selection; sterilization

收稿日期: 2015-10-08

基金项目: 国家“十二·五”科技支撑计划项目(2012BAD01B0402)

作者简介: 王 鸿(1993-), 女, 硕士在读, 研究方向为相思遗传育种. Email: wanghong1993ziyu@163.com

* 通讯作者: 博士, 副研究员, 主要从事林木遗传育种研究. Email: 13802987948@163.com

卷荚相思 (*Acacia cincinnata* F. Mull) 原产印度尼西亚东部、澳大利亚昆士兰沿海和巴布亚新几内亚南部等地^[1], 根系发达且具根瘤, 生长迅速又耐瘠薄, 是十分重要的纸浆等工业用材树种^[2]。20世纪70年代引种入我国, 目前在广东、福建、云南、广西、海南等地逐渐受到重视, 种植前景较大^[3]。目前, 卷荚相思的苗木繁殖主要为种子, 在树形、生长量、抗性、纤维含量等性状上表现出较大的差异, 造成人工林生长不整齐, 严重影响其林产品质量及其加工利用。组培快繁技术在大量生产苗木的同时保持其母株的优良性状, 利于对优良性状的固定。因此, 开展卷荚相思组培快繁技术体系的研究, 对其优良无性系保持优良性状, 快速繁殖及推广种植具有重要意义。

周丽等^[4]最早报道了卷荚相思组织培养育苗技术, 初步解决了卷荚相思种源不足的问题。汪长水^[5]、张月娇^[6]以卷荚相思优树半木质化的带腋芽茎段为外植体, 通过研究外植体消毒、不定芽分化、继代增殖和壮苗生根等过程, 对卷荚相思组织培养技术进行了研究。陈翔^[7]、张月娇^[6]经过系统研究, 获得了较高的生根率; 但已报道的卷荚相思培养体系, 存在外植体污染率高, 增殖倍数低等主要问题, 阻碍了卷荚相思组培技术的推广应用, 同时也影响着卷荚相思良种选育的进度。本试验通过对外植体选择、消毒方式等进行研究, 解决成年优树外植体芽诱导高污染率的问题, 并对芽诱导、增殖培养、生根移植进行系统研究, 进一步完善卷荚相思组培技术体系。

1 试验材料

试验材料来源于广东省江门市新会区国家重点相思良种基地。本研究从卷荚相思试验林中通过对比胸径、树高、干形等因子, 选取16年生抗风直杆型优良单株 ACN 12001 (图 1A), 以当年新生枝条含腋芽的茎段为试验材料。

2 试验方法

2.1 卷荚相思消毒体系建立及初代培养

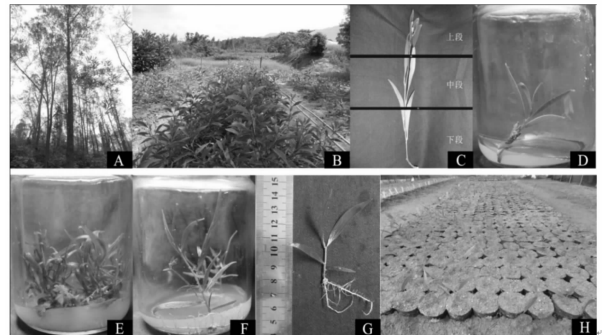
2.1.1 升汞和酒精消毒时间的选择 将采集的当年生枝条剪去叶片, 洗衣粉水浸泡 30 min, 软毛刷洗净后流水冲洗 2 h, 剪成长 1.0 ~ 2.0 cm 带腋芽的茎段, 在超净工作台上用 0.1% 的升汞和 75% 的酒精进行消毒, 75% 酒精处理设置 0.5、1 min, 分别与 0.1% 升汞处理 15、18、25 min 进行组合。消毒后用

无菌水冲洗 4 ~ 6 次, 滤纸吸干表面水分后接入初代培养基。

2.1.2 外植体来源的选择 材料 1: 以 ACN12001 当年新生枝条含腋芽茎段为试验材料; 材料 2: 将 ACN12001 当年新生长 10 ~ 15 cm 的枝条用 300 mg · L⁻¹ ABT 浸泡枝条基部 30 ~ 60 min 后, 插入经 800 mg · L⁻¹ 多菌灵消毒后的黄土为基质的营养袋中, 2 个月, 将存活的卷荚相思扦插苗按材料来源进行编号并建成采穗圃 (图 1B), 以 1 年生采穗圃中腋芽饱满的枝条且含腋芽的茎段为试验材料。

将以上 2 种材料用 2.1.1 节中选出的最佳消毒方法消毒后接入初代培养基。

2.1.3 材料部位的选择 以材料 2 为外植体来源, 将枝条的第 1 ~ 3 腋芽茎段 (上段)、第 3 ~ 5 腋芽茎段 (中段)、第 7 ~ 8 腋芽茎段 (下段) 剪成长 1.0 ~ 2.0 cm 带腋芽茎段 (图 1C), 按 2.1.1 节确定的最佳消毒时间消毒后接入初代培养基。



A: 卷荚相思优良单株; B: 卷荚相思优良无性系采穗圃; C: 卷荚相思组培快繁材料的选择; D: 卷荚相思外植体的初代培养; E: 卷荚相思增殖培养; F: 卷荚相思生根培养; G: 卷荚相思生根苗; H: 卷荚相思移植

图 1 卷荚相思组培快繁体系

2.1.4 采条季节的选择 以材料 2 为外植体来源, 分别于 1、5、9 月剪取当年生含腋芽枝条, 将卷荚相思当年生腋芽饱满枝条的第 3 ~ 5 腋芽茎段 (中段), 按 2.1.1 节确定的最佳消毒时间消毒后接入初代培养基中。

2.1.5 卷荚相思初代培养基选择 选用上述步骤中 (2.1.2 ~ 2.1.4) 最佳外植体类型, 将消毒后的外植体接种至初代培养基中。基本培养基选择 MS、1/2MS、改良 MS, 6-BA 浓度选择 0.0、0.5、1.0 g · L⁻¹, 蔗糖浓度选择 20、30、40 g · L⁻¹, 设置 L₉ (3³) 正交试验。

以上 2.1.1 ~ 2.1.5 试验, 除特殊说明外, 均以

MS为基本培养基,添加琼脂 $7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、蔗糖 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,pH值6.0左右。每个处理接种50瓶,每瓶接种1个外植体,重复3次。接种30 d后调查其生长情况,统计其污染率、褐化率、存活率、出芽率。

$$\text{污染率} = \text{污染数} / \text{接种数} \times 100\%$$

$$\text{褐化率} = \text{褐化数} / \text{接种数} \times 100\%$$

$$\text{存活率} = \text{存活数} / \text{接种数} \times 100\%$$

$$\text{出芽率} = \text{出芽数} / \text{存活数} \times 100\%$$

2.2 卷荚相思增殖培养

2.2.1 增殖培养中6-BA浓度筛选试验 将初代培养获得的无菌芽接入添加NAA $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的增殖培养基,向增殖培养基中分别添加浓度为0.1、0.5、1.0、1.5 $\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的6-BA。

2.2.2 增殖培养中NAA浓度筛选试验 将初代培养获得的无菌芽接入添加6-BA $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的增殖培养基中,向增殖培养基中分别添加浓度为0.01、0.25、0.75、1.00 $\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的NAA。

以上2.2.1~2.2.2试验,每组试验接种60株,3次重复,接种35 d后调查生长情况并统计增殖倍数。

2.3 卷荚相思生根培养

2.3.1 生长素对生根的影响 将增殖培养获得的健壮无菌芽接入生根培养基中,分别添加浓度为0.1、0.5、1.0、1.5、2.0 $\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的NAA、IAA、ABT。

2.3.2 生长素交互作用对生根的影响 将增殖培养获得的健壮无菌芽接入生根培养基中,分别添加IBA 0.25、0.50、0.75 $\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和NAA 0.25、0.50、0.75 $\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2种生长素 3×3 组合浓度。

2.3.3 最佳生根培养基筛选试验 基本培养基选择MS、1/2MS、改良MS,蔗糖浓度选择20、30、40 $\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,活性炭浓度选择0.05、0.10、0.20 $\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,设置 $L_9(3^3)$ 正交试验。

2.3.4 茎段长度对生根的影响 将健壮的增殖芽分别剪成含1、2、3个腋芽的茎段分别接种至2.3.3节筛选出的最佳生根培养基中。

以上2.3.1~2.3.4试验,除特殊说明外,均以MS为基本培养基,添加琼脂 $7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、蔗糖 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,pH值6.0左右。每个处理接种60个芽,重复3次,接种15 d后调查生长情况并统计其生根率、生根数。

增殖倍数 = 增殖后获得的苗数 / 用于增殖的接种数

$$\text{生根率} = \text{生根的株数} / \text{接种总株数} \times 100\%$$

平均每苗生根数 = 生根苗的总根数 / 总生根苗数

2.4 培养条件

将培养瓶置于温度 $(25\pm 2)\text{ }^\circ\text{C}$ 、光周期 $14\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ 、光照强度 $2\ 500\text{ Lx}$ 的培养室中培养。

2.5 卷荚相思移植

于11月至次年3月进行生根苗移植试验。生根后继续培养10~15 d,移于室温 $25\sim 30\text{ }^\circ\text{C}$ 的环境下开盖炼苗5 d,洗净根部的培养基后移植到经 $800\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 多菌灵消毒过的营养袋中。移植基质选择:黄心土、黄心土:沙(3:1)、黄心土:沙(2:1)、黄心土:沙(1:1)、沙,每种基质栽种60株,移植2个月调查生长情况并统计其存活率。

2.6 数据统计分析

将生根数、增殖倍数等数据进行 $P1/2$ 转化、百分率数据进行反正弦($y = \arcsin(P1/2)$)转化后,再使用Excel、SPSS18.0对数据进行处理和方差分析,以最小显著差数法(LSD)($p < 0.05$)评价差异的显著性。

3 结果与分析

3.1 外植体的消毒及初代培养

3.1.1 升汞和酒精消毒时间的选择 初代培养3~5 d后,部分外植体污染,第15 d调查消毒效果(表1)。分析表明:升汞和酒精的消毒时间对外植体的污染率、褐化率、存活率和出芽率的影响差异均显著。随着消毒剂时间的延长,污染率呈下降趋势,但褐化现象逐渐严重,存活率先升高后下降。升汞和酒精处理时间分别为18、0.5 min时,污染率为48.00%,褐化率最低,为1.33%,出芽率和存活率均较高,分别为58.00%和50.67%,故而选择此消毒方式。

表1 消毒时间对卷荚相思消毒效果的影响

消毒时间/min		染率/ 75%酒精	褐化率/ 0.1%升汞	存活率/ %	出芽率/ %
0.5	15	71.33a	2.67c	26.00	64.00a
0.5	18	48.00b	1.33c	50.67	58.00ab
0.5	25	37.37bc	15.33b	47.33	40.67b
1	15	56.67ab	15.33b	28.00	47.33ab
1	18	36.67bc	18.00b	45.33	36.67bc
1	25	29.33c	28.67a	42.00	21.33c

注:同一列中不同小写字母代表显著差异($P < 0.05$)(LSD法),下同。

3.1.2 外植体来源的选择 由表2可知:直接以优树枝条茎段为外植体时,外植体污染率高,存活率和

出芽率低;优树枝条通过扦插繁殖,建立优良无性系采穗圃,以采穗圃中当年生枝条为材料时,污染率降低,存活率和出芽率提高。因此,材料2是较适宜的外植体来源。

表2 外植体材料来源对卷荚相思消毒效果的影响

材料	污染率/%	褐化率/%	存活率/%	出芽率/%
1	48.67	4.67	46.67	59.17
2	33.33	5.33	61.33	71.67

3.1.3 材料部位的选择 从表3可知:选择半木质化枝条中段时,污染率为28.00%,存活率最高(69.33%),出芽率也较高(86.67%)。因此,最佳外植体材料为半木质化枝条中段。

表3 外植体部位对卷荚相思消毒效果的影响

材料部位	污染率/%	褐化率/%	存活率/%	出芽率/%
上段	26.67b	16.67a	56.67b	87.33a
中段	28.00b	2.67b	69.33a	86.67a
下段	52.00a	2.00b	46.00b	55.33b

3.1.4 采条季节的选择 表4表明:不同季节采集的外植体的污染率等指标均差异显著。综合各指标,最适宜的采条季节为9月,存活率和出芽率分别为65.33%和81.33%。

表4 采条季节对卷荚相思消毒效果的影响

采集时间/月	污染率/%	褐化率/%	存活率/%	出芽率/%
1	40.67b	5.33b	54.00b	56.67b
5	49.33a	11.33a	39.33c	86.00a
9	30.67c	4.00b	65.33a	81.33a

3.1.5 卷荚相思初代培养基选择 外植体接入初代培养基中15 d后腋芽开始萌发,30 d左右腋芽可长至2~3 cm。由表5、6可知:6-BA和基本培养基对卷荚相思出芽率的影响极显著,蔗糖浓度对出芽率的影响差异不显著。多重比较(表7)表明:培养基中不添加细胞分裂素6-BA时,出芽率为82.22%,极显著高于其他2组,且叶片舒展,茎段粗壮(图1D);而添加激素的培养基诱导的腋芽叶片扭曲,茎段短粗,基部形成大量愈伤组织。基本培养基以改良MS最佳,芽诱导率为67.78%。不同蔗糖浓度对出芽率的影响差异不显著。综上所述,卷荚相思的最佳初代培养基为改良MS+蔗糖40 g·L⁻¹。

3.2 卷荚相思增殖培养

表8表明:在增殖培养基中固定添加NAA 0.1 mg·L⁻¹时,随着6-BA浓度的增加,增殖倍数呈先

表5 6-BA、蔗糖和基本培养基对卷荚相思初代培养的影响

6-BA/ (mg·L ⁻¹)	蔗糖/ (g·L ⁻¹)	基本 培养基	出芽率/ %	描述
0.0	20	MS	67.33	芽健壮,但生长缓慢
0.0	30	1/2MS	88.00	芽健壮,但生长缓慢
0.0	40	改良MS	91.33	芽健壮,但生长缓慢
0.5	20	1/2MS	50.67	芽健壮,生长速度快
0.5	30	改良MS	68.00	芽健壮,生长速度快
0.5	40	MS	44.67	芽健壮,生长速度快
1.0	20	改良MS	44.00	芽丛生,玻璃化现象
1.0	30	MS	25.33	芽丛生,玻璃化现象
1.0	40	1/2MS	40.00	芽丛生,生长缓慢

表6 卷荚相思初代培养方差分析

项目	平方和	自由度	均方	Sig
6-BA	9 573.630	2	4 786.815	0.000
蔗糖	199.407	2	99.704	0.175
基本培养基	2 224.296	2	1 112.148	0.000
误差	1 048.296	20	52.415	-
总计	102 948.000	27	-	-

表7 卷荚相思初代培养3个因素出芽率的多重比较

因素	水平	出芽率/%	P=0.05	P=0.01
6-BA	0.0	82.22	a	A
	0.5	54.44	b	B
	1.0	36.44	c	C
蔗糖	20	54.00	a	A
	30	60.44	a	A
	40	58.67	a	A
基本培养基	MS	45.78	c	C
	1/2MS	59.56	b	B
	改良MS	67.78	a	A

注:同一列中不同大写字母表示差异极显著($P < 0.01$),不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

上升后下降的趋势;当6-BA为1.5 mg·L⁻¹时,芽长势较慢,有玻璃化现象。在增殖培养基中固定添加6-BA 0.5 mg·L⁻¹时,随着NAA浓度的升高,增殖倍数下降,但增殖苗的长势随NAA浓度的增加明显改善;NAA为0.01 mg·L⁻¹时,增殖倍数最高为3.63倍,但增殖芽长势较差;NAA为1.0 mg·L⁻¹时,增殖芽的长势达到最佳状态,但增殖倍数较低。综上所述,卷荚相思最佳增殖培养基为MS+6-BA 0.5 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹+蔗糖30 g·L⁻¹,增殖芽长势好,增殖倍数高(3.50倍)(图1E)。

3.3 卷荚相思生根培养

3.3.1 生长素种类及浓度对生根的影响 由表9可知:不同激素种类及浓度对卷荚相思生根的影响差异显著。随IBA和NAA浓度的增加,生根率先上

表8 植物激素对卷荚相思增殖的影响

激素	浓度/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	增殖 倍数/倍	描述
6-BA	0.1	1.74b	芽高大健壮,有少数芽生根
	0.5	3.50a	芽较高,叶片较绿
	1.0	2.72a	芽丛生,芽较矮小,部分叶片卷曲
	1.5	3.11a	芽丛生,有效芽少,叶片黄,玻璃化
NAA	0.01	3.63a	芽丛生,矮小,有效芽少,玻璃化
	0.25	2.75ab	芽丛生,较高,叶片较绿
	0.75	2.33b	芽较高,叶片较绿
	1.00	2.50b	芽高大健壮,有大多数芽生根

升后下降,IBA 浓度为 $1.0 \sim 1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,生根率均在 90% 以上,平均根数达 3.5 根以上;NAA 浓度为 $1.0 \sim 1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,生根率均达 75% 以上;虽然随 IAA 浓度的增加生根率上升,但生根苗长势较差,不适宜作为诱导生根的激素。

表9 生长素种类及浓度对卷荚相思生根的影响

激素	浓度/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	生根率/%	根数/条
IBA	0.1	73.02b	2.88bc
	0.5	81.06ab	3.23b
	1.0	91.63a	3.95ab
	1.5	92.78a	3.53ab
	2.0	77.78ab	3.99a
NAA	0.1	55.56bc	1.94c
	0.5	70.20bc	2.04c
	1.0	77.78ab	2.70bc
	1.5	81.11ab	3.11b
	2.0	71.43bc	3.72ab
IAA	0.1	34.92d	1.66c
	0.5	53.97c	1.72c
	1.0	63.49bc	1.91c
	1.5	76.19ab	2.24c
	2.0	76.19ab	2.23c

3.3.2 生长素交互作用对生根的影响 生根培养 7 d 即开始生根,根和芽的生长情况均较好,比单个激素诱导生根缩短 2~3 d。第 15 d 调查结果(表 10)表明:不同激素种类及浓度诱导的卷荚相思生根率、平均根数差异显著。当在培养基中添加 IBA $0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 NAA $0.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,生根效果最好,生根率最高为 95.24%,平均根数为 3.31;当 2 种激素浓度逐渐增加时,生根率下降,根数增加。实际观察发现,高浓度激素诱导形成的根系粗且短,在基部有愈伤组织形成,且后续的移植试验中,此类生根苗的移植存活率较低。因此,卷荚相思生根不宜

选用高浓度的生长素。

表10 生长素交互作用对卷荚相思生根的影响

IBA/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	NAA/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	生根率/%	根数/条
0.25	0.25	82.54ab	2.12c
0.25	0.50	95.24a	3.31b
0.25	0.75	90.56ab	3.74b
0.50	0.25	76.59b	3.29b
0.50	0.50	82.54ab	3.26b
0.50	0.75	73.81b	4.40ab
0.75	0.25	80.95ab	3.78b
0.75	0.50	69.05b	3.98ab
0.75	0.75	64.29b	4.87a

注:同一列中不同小写字母代表显著差异($P < 0.05$)(LSD 法)。

3.3.3 基本培养基、蔗糖、活性炭对卷荚相思生根的影响 由表 11 可知:基本培养基类型对生根率的影响显著,以 1/2MS 为基本培养基时生根效果最佳,MS 次之,改良 MS 最差。在蔗糖浓度为 $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,卷荚相思生根率在 90% 左右;此外,生根率均随培养基中活性炭浓度的增加而下降,当浓度为 $0.20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,生根率仅 56.11%;虽然活性炭不利于卷荚相思的生根,但茎、叶及根系的长势均随活性炭浓度的增加有明显改善。

表11 基本培养基、蔗糖、活性炭对卷荚相思生根的影响

因素	水平	生根率/%	根数/条	苗长势
基本培养基	MS	87.78a	3.63a	+
	1/2MS	96.11a	3.86a	++
	改良 MS	81.67b	3.06b	++
蔗糖/($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	20	65.00b	2.25b	+
	30	70.56b	2.53b	++
	40	90.56a	3.88a	++
活性炭/($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	0.05	70.00a	2.22a	+++
	0.10	66.11a	1.96ab	+++
	0.20	56.11b	1.67b	+++

3.3.4 不同茎段长度对生根的影响 不同茎段长度对生根的影响差异不大,生根率均在 93% 以上,生根条数均在 3.6 左右。含 1 个腋芽的茎段,生根苗长势较差;含 2 个腋芽和 3 个腋芽的茎段,生根苗长势均较好。因此,选择含 2 个腋芽的茎段作为生根材料,在实际生产中可以提高苗木的移植效率(图 1F、G)。

表12 茎段长度对卷荚相思生根的影响

茎段长度	生根率/%	根数/条	苗长势
含 1 个腋芽	93.65a	3.64a	++
含 2 个腋芽	95.24a	3.71a	+++
含 3 个腋芽	95.63a	3.57a	+++

3.4 卷荚相思移植

卷荚相思组培生根苗移植至黄心土、黄心土:沙(3:1)、黄心土:沙(2:1)、黄心土:沙(1:1)、沙5种基质的存活率分别为63.33%、60.00%、66.67%、70.00%、71.11%,以沙为基质时,移植存活率最高(图1H)。

4 讨论

组培技术在优良新品种培育、筛选及良种快繁等林木科研和生产中具有重要应用价值。目前,关于卷荚相思组培技术的相关报道虽然较多,但仍存在外植体污染率高、出芽率低等缺点,而有效的外植体选择和处理,能确保降低污染率,提高芽诱导率,是整个组培技术体系的重要环节。

前人研究多以优树腋芽为外植体建立组培技术体系,对其消毒策略重视不够,并且优树枝条采集不便,难以消毒,建立的技术体系存在污染率高的问题^[1,4-6]。汪长水^[5]研究了卷荚相思树冠不同部位的茎段及不同的采集季节,确定了外植体的最佳来源部位和采集季节,但也存在出芽率较低的问题。本试验在开展卷荚相思快繁技术体系研究时,通过对外植体来源、采集季节、外植体木质化程度、预处理,消毒等方面的系统研究,解决了卷荚相思外植体污染率高、芽诱导率低的问题,并建立了较好的增殖、生根技术,研究结果对今后的卷荚相思良种选育具有重要意义。

研究表明,同一植株的不同部位或组织器官发生能力各不同^[8],源自不同部位的外植体对应着不同的消毒策略,二者共同影响其器官的发生能力。施琼等^[9]和黄烈健等^[10]指出,枝条中部半木质化的茎段为最佳外植体。本试验对枝条不同部位茎段对消毒效果和芽诱导率的影响进行研究,结果表明:最佳外植体为中段半木质化茎段,其污染率为28.00%,存活率最高(69.33%),出芽率也较高(86.67%);顶端的茎段出芽率最高(87.33%),但褐化率也最高(16.67%);底端木质化程度高的茎段虽然褐化率最低(2.00%),但污染率最高(52.00%),出芽率和存活率都较低。可能是枝条顶端的腋芽生长旺盛,出芽率高^[11-12],但其木质化程度低,腋芽幼嫩,容易被消毒剂杀死,出现高褐化率;而枝条底端木质化程度高,易褐化^[13],且微生物容易通过导管等组织进入枝条内部,导致高污染率。因此,选择低污染率同时能保证高出芽率的中部半

木质化茎段作为外植体是最好的。

芽诱导的成功与否除了受茎段的木质化程度影响外,还受茎段来源的影响。本试验中,取自优树枝条扦插建立采穗圃的外植体,污染率为33.33%,其存活率和出芽率均高于直接采自优树枝条的外植体。可能是经过扦插精心培育后的采穗圃枝条,其内生菌较野外生长的优树枝条的少;然而,目前的研究、生产均主要直接从优树上获取外植体^[4-6,14]。因此,采集优树枝条建立采穗圃不仅能供应质量稳定的试验所需外植体,还能降低采集枝条的难度,提高工作效率。

获取外植体的季节对污染率及出芽率也有显著影响。黄骢^[14]指出,连续数日晴热干燥天气后采集的外植体污染率较低。续九如等^[15]指出,在7、8月旺盛生长期,植物内源激素含量高,外植体的出芽率高。本试验中,1月采集的卷荚相思枝条污染率高,而且存活率也偏低,5月的枝条虽然出芽率高(与最高出芽率的差异不显著),但污染率最高,而9月采集的枝条相对污染率低、出芽率高,这可能是因为9月高温少雨,植物生长旺盛,内生菌含量低。9月是卷荚相思生长的旺盛时期,推测其高含量内源激素利于外植体生长、出芽。

外植体选择对应着相应的消毒策略,在确定消毒剂种类及消毒时间的同时,要注意观察外植体的形态结构,不同物种区别对待。试验中,升汞和酒精处理时间分别为25、1 min时,污染率最低(29.33%),褐化率最高(28.67%);二者处理时间分别为18、0.5 min时,虽污染率上升了18.67%,但褐化率最低(1.33%),出芽率(58.00%)显著提高。这是由于卷荚相思不仅木材紧实,且外植体表面密被绒毛,不易与消毒剂直接接触作用,延长消毒时间利于消毒,但消毒时间过长会导致褐化严重。因此,应折衷选择消毒较充分,但褐化率较低的消毒时间。

由于卷荚相思枝条外被绒毛,容易藏纳污垢,故消毒剂处理前做相应的预处理,使后续消毒处理更容易。张月娇^[6]在对卷荚相思组培研究中,对外植体消毒前用 $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 灭菌剂浸泡,利于污染率的降低。本试验在消毒前仔细刷洗,保证外植体的清洁度,降低消毒难度。对枝条的预处理也是消毒的重要环节,依外植体清洁度决定预处理策略(若清洁度高可直接用灭菌剂浸泡,清洁度低则增加刷洗环节),可在保证低污染率的同时提高工作效率。良好的消毒处理是控制培养污染的源头,同时培养中需

严格防止交叉污染,二者结合控制污染率,提高存活率。

5 结论

本研究结论主要如下:(1)建立了外植体选择及消毒体系。9月份从采穗圃(优树枝条扦插建立的)采取当年生枝条中部半木质化茎段,消毒之前预处理(用毛刷仔细刷洗),最佳消毒时间为升汞处理18 min和酒精处理0.5 min,污染率、存活率和出芽率的综合效果最好,存活率高达69.33%,出芽率高达86.67%。(2)最佳初代培养基为改良MS+蔗糖 $40\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,出芽率为91.33%。(3)最佳增殖培养基为MS+6-BA $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +蔗糖 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,增殖芽长势好,增殖倍数为3.50倍。(4)最佳生根培养基为 $1/2\text{ MS}+\text{IBA } 0.25\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{NAA } 0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{蔗糖 } 40\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,生根率(96.11%)最高,平均根数为3.31。(5)移植以沙为基质,其存活率(71.11%)最高。研究建立了16年生卷荚相思完善的组培技术体系,为今后卷荚相思良种选育及工厂化育苗奠定重要基础。

参考文献:

- [1] 蔡 玲,王以红,吴幼媚,等. 五种相思树组织培养研究[J]. 广西林业科学, 2003, 32(1):24-26.
[2] 潘志刚,游应天. 中国外来树种引种栽培[M]. 北京:科学技术

出版社, 1994:378-406.

- [3] 刘德朝. 卷荚相思扦插繁殖试验[J]. 福建林业科技, 2005, 32(4):121-124.
[4] 周 丽,周志坚,翟应昌,等. 卷荚相思组培育苗技术的研究[J]. 广东林业科技, 1996(1):22-25.
[5] 汪长水. 卷荚相思组培快繁技术研究[J]. 福建林业科技, 2009, 36(3):92-97.
[6] 张月娇. 卷荚相思组培工厂化育苗技术[J]. 技术开发, 2012, 26(1):100-102.
[7] 陈 翔. 卷荚相思和厚荚相思组培生根影响因素研究[J]. 福建林业科技, 2012, 39(3):108-110.
[8] 刘青林,陈清华,陈俊愉. 梅花的愈伤组织培养研究初报[J]. 北京林业大学学报, 1999, 21(2):100-105.
[9] 施 琼,胡 峰,黄烈健,等. 马大杂种相思组培快繁技术[J]. 华南农业大学学报, 2015, 36(2):79-84.
[10] 黄烈健,陈祖旭,张赛群,等. 马占相思优树组培快繁技术研究[J]. 林业科学研究, 2012, 25(2):227-230.
[11] 林来水. 黑木相思优良无性系离体培养与快速繁殖技术研究[D]. 福州:福建农林大学, 2008.
[12] 谢寅峰,张志敏,尚旭岚,等. 青钱柳茎段腋芽萌发和丛生芽增殖[J]. 林业科学, 2011, 47(1):50-55.
[13] 张 玮,黄树燕,谢锦忠. 花吊丝竹组培快繁育苗技术研究[J]. 林业科学研究, 2010, 23(6):914-919.
[14] 黄 骐. 卷荚相思优树无性系快速繁殖技术.[J] 林业科技开发, 2007, 21(5):66-68.
[15] 续九如,李春立,孙建设. 毛叶枣组培快繁技术研究[J]. 北京林业大学学报, 2003, 25(3):28-32.

(责任编辑:徐玉秀)