

四倍体刺槐无性系 K2 和 K3 的组织培养

张 怡^{1,2}, 张俊琦¹, 罗晓芳^{1,①}, 沈应柏¹

(1. 北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083; 2. 上海应用技术学院科技处, 上海 200235)

Tissue culture of tetraploid clones K2 and K3 of *Robinia pseudoacacia* ZHANG Yi^{1,2}, ZHANG Jun-qi¹, LUO Xiao-fang^{1,①}, SHEN Ying-bai¹ (1. College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 2. Science and Technology Division, Shanghai Institute of Technology, Shanghai 200235, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2009, 18(4): 82-84

Abstract: The tissue culture conditions of fast-growing clone K2 and fodder-type clone K3 of *Robinia pseudoacacia* L. tetraploid were investigated using shoot sprouting in hydroponic growth chamber as explants. After disinfected by 70% ethanol then sterilized with NaClO solution containing 0.5% available chlorine, the explants should be initially cultured with MS medium (containing 30 g · L⁻¹ sucrose and 6 g · L⁻¹ agar, pH 5.8), and survival rate of K2 and K3 explants all reaches 90% in initial culture medium. The best proliferation medium of K2 adventitious bud is MS medium adding 0.3 mg · L⁻¹ 6-BA and 0.05 mg · L⁻¹ NAA, with the highest proliferation coefficient of 5.29, and that of K3 is MS medium adding 1.0 mg · L⁻¹ 6-BA and 0.10 mg · L⁻¹ NAA, with the highest proliferation coefficient of 3.36. The optimized rooting medium of K2 and K3 plantlets is 1/2MS medium (containing 30 g · L⁻¹ sucrose and 6 g · L⁻¹ agar, pH 5.8) adding 0.1 mg · L⁻¹ IBA and 0.1 mg · L⁻¹ NAA, respectively. After training, K2 and K3 plantlets are transplanted by two-step transplanting method, all of survival rate reach 98%.

关键词: 刺槐; 四倍体无性系; 组织培养; 不定芽增殖; 生根

Key words: *Robinia pseudoacacia* L.; tetraploid clone; tissue culture; adventitious bud proliferation; rooting

中图分类号: Q943.1; S792.27.05 文献标志码: A 文章编号: 1004-0978(2009)04-0082-03

1997年,北京林业大学从韩国引进了具有速生和饲料用途的刺槐(*Robinia pseudoacacia* L.)四倍体优良无性系,目前已在各省区试推广。与普通刺槐相比,四倍体刺槐具有叶大、速生等优点,且较普通刺槐有更强的适应性,耐干旱、贫瘠、烟尘及盐碱能力强,成林快,是水土保持、防风固沙及退耕还林的良好树种,可作为西北地区造林的先锋树种。目前,缺少足够数量的优质苗木成为四倍体刺槐推广应用的瓶颈。组织培养是快速获得优质苗木的途径之一,已广泛用于香果树(*Emmenopterys henryi* Oliv.)等树木的快繁研究^[1],有关四倍体刺槐组织培养技术的研究也已有少量报道^[2-6]。在前期研究的基础上,作者对四倍体刺槐饲料型无性系 K3 和速生型无性系 K2^[7-8]的组织培养条件进行了筛选及优化,以期为此 2 个刺槐无性系的推广应用提供技术支持。

1 材料和方法

1.1 材料

供试四倍体刺槐为 1997 年从韩国引进的饲料型无性系 K3 和速生型无性系 K2,栽种于北京林业大学苗圃内。

1.2 方法

1.2.1 外植体消毒及启动培养 于 2004 年春季刺槐芽萌发前,剪取当年生枝条,放入人工气候箱内水培;培养条件为:温度 28 ℃、相对湿度 70%~90%、光照度 3 000 lx、光照时间 14 h · d⁻¹;水培期间每天换水。剪取枝条上新长出的 2~3 cm 带腋芽茎段作为外植体。

用毛笔蘸药皂水轻轻刷洗外植体,流水冲洗 1 h 后用体积分数 70% 乙醇表面消毒 30 s,立即用适量有效氯含量为 0.5% 的 NaClO 溶液灭菌 4~5 min,然后用无菌水冲洗 5~6 次。将灭菌的外植体接种到含 30 g · L⁻¹ 蔗糖和 6 g · L⁻¹ 琼脂的 MS 培养基(pH 5.8)上,每瓶 1 个外植体,置于温度 (25 ± 2) ℃、相对湿度约 60%、光照度 3 000 lx(组培灯波长 400~600 nm)、光照时间 14 h · d⁻¹ 的条件下培养,1 周后统计外植体的成活率和污染率。

1.2.2 分化培养基筛选 以含 30 g · L⁻¹ 蔗糖和 6 g · L⁻¹ 琼脂的 MS 培养基(pH 5.8)为分化培养基,运用 2 因素 4 水平正交实验设计添加 6-BA 和 NAA。其中 6-BA 质量浓度为 0.1、0.3、0.5 和 1.0 mg · L⁻¹, NAA 质量浓度为 0.05、0.10、0.50 和 1.00 mg · L⁻¹,共 16 组分化培养基。将经过启

收稿日期: 2008-10-27

基金项目: 国家林业局“948”项目(97-4-05)

作者简介: 张 怡(1979—),女,浙江嘉善人,硕士研究生,助理研究员,主要从事植物抗旱生理生化研究。

①通信作者 E-mail: xiao-fang-luo@163.com

动培养且生长一致的茎段接种到各分化培养基中,每处理3次重复,每重复5瓶,每瓶4个茎段;在上述培养条件下培养20 d后统计不定芽的数量并计算增殖系数,结果取平均值。

1.2.3 生根培养基筛选 以含 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖和 $6\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂的1/2MS培养基(pH 5.8)为生根培养基,运用2因素4水平正交实验设计添加IBA和NAA。其中IBA质量浓度为0.0、0.1、0.2和 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,NAA质量浓度为0.0、0.1、0.2和 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,共16组生根培养基。将分化培养28 d的丛生芽接种到生根培养基中,每瓶5株,每处理20瓶,各3次重复;在上述培养条件下培养20 d后统计生根的组培苗数、根数及生根系数并计算生根率和生根度,结果取平均值。

1.2.4 炼苗和移栽 在生根培养基上培养14 d,待组培苗根长平均为2~3 cm时开始炼苗。先将培养瓶放在有自然光散射的室内炼苗10 d,然后在室外将瓶口半开炼苗2 d后采用两步成苗法进行移栽,注意避免强光照射和大风。选取根系完整健壮的组培苗,用温水洗去根部培养基,移栽至蛭石(预先用质量体积分数0.3% KMnO_4 消毒)盘中,浇透水后移至塑料薄膜小拱棚内,保持棚内温度 $15\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度70%以上,自然光照射。如光照过强且温度过高,可盖上遮阳网并适当通风降温。待组培苗长出白色新根后移栽到由珍珠岩、蛭石和营养土(体积比1:2:6)组成的混合基质中。

1.3 数据处理及统计分析

根据根数、根长及组培苗长势对生根系数进行赋值。无根生长,生根系数为0;生根1~2条,根长0.5~1.0 cm,长势弱,生根系数为1;生根3~4条,根长1.0~3.0 cm,长势一般,生根系数为2;生根4~5条,根长3.0~5.0 cm,长势较

好,生根系数为3;生根6~7条,根长5.0~6.0 cm,长势好,生根系数为4。丛生芽增殖系数=分化出的不定芽总数/接种腋芽数;组培苗生根率=(生根的组培苗数/接种的组培苗数) $\times 100\%$;生根度=生根率 \times 生根系数。

应用SPSS 13.0统计分析软件对相关实验数据进行方差分析和多重比较。

2 结果和分析

2.1 外植体的灭菌和启动培养效果

培养1周后四倍体刺槐无性系K2和K3外植体的污染率分别为6.7%和3.3%,成活率均达90%;外植体的灭菌致死率分别为3.3%和6.7%。可见,通过水培催芽得到的K2和K3的嫩芽和带芽茎段,由于污染率低且萌发启动快而成为最佳外植体。从环保角度考虑,选择有效氯含量0.5%的 NaClO 溶液替代 HgCl_2 ,配合体积分数70%乙醇作为消毒剂,外植体的灭菌效果良好。

2.2 分化培养基的筛选

在MS培养基中添加不同质量浓度的NAA和6-BA对四倍体刺槐无性系K2和K3不定芽分化的影响见表1。在含 $0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA和 $0.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA的增殖培养基上,K2的增殖系数最大,达到5.29;在含 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA和 $0.10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA的增殖培养基上,K3的增殖系数最大,达到3.36。方差分析结果表明,添加不同质量浓度6-BA和NAA对K2和K3不定芽的分化均有显著影响($P < 0.05$);多重比较分析结果也验证了在前述的2组增殖培养基上K2和K3不定芽的分化率最高。

表1 增殖培养基中添加不同质量浓度6-BA和NAA对四倍体刺槐无性系K2和K3不定芽增殖的影响

Table 1 Effect of different concentrations of 6-BA and NAA added in proliferation medium on proliferation of adventitious bud of *Robinia pseudoacacia* L. tetraploid clones K2 and K3

质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Concentration		K2的增殖系数 Proliferation coefficient of K2	K3的增殖系数 Proliferation coefficient of K3	质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Concentration		K2的增殖系数 Proliferation coefficient of K2	K3的增殖系数 Proliferation coefficient of K3
6-BA	NAA			6-BA	NAA		
0.1	0.05	3.71	2.38	0.5	0.05	4.04	2.48
0.1	0.10	2.85	2.69	0.5	0.10	3.66	2.71
0.1	0.50	3.31	1.68	0.5	0.50	4.13	1.78
0.1	1.00	2.94	1.72	0.5	1.00	2.04	2.30
0.3	0.05	5.29	2.03	1.0	0.05	2.91	2.48
0.3	0.10	3.82	2.31	1.0	0.10	2.77	3.36
0.3	0.50	3.47	1.60	1.0	0.50	2.76	2.91
0.3	1.00	4.04	1.54	1.0	1.00	2.36	2.28

2.3 生根培养基的筛选

在1/2MS培养基中添加不同质量浓度IBA和NAA对四倍体刺槐无性系K2和K3组培苗生根的影响见表2。方差分析结果显示,添加不同质量浓度IBA和NAA对K2和K3组培苗生根均有显著影响($P < 0.05$)。多重比较结果表明,

对于K2组培苗生根而言,添加 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA的生根效果显著优于其他IBA处理组,添加0.0和 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA的生根效果显著优于 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA处理组;对于K3组培苗生根而言,没有添加IBA的处理组生根效果显著优于其他IBA处理组,而添加了0.1和 $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA的处理组生

根效果显著优于 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 处理组。考虑到成本因素,在 K2 和 K3 组培苗的生根培养时分别仅需在生根培养基中添加 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA 和 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA。

表2 生根培养基中添加不同质量浓度 IBA 和 NAA 对四倍体刺槐无性系 K2 和 K3 组培苗生根状况的影响
Table 2 Effect of different concentrations of IBA and NAA added in rooting medium on plantlet rooting status of *Robinia pseudoacacia* L. tetraploid clones K2 and K3

质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Concentration		K2 生根状况 K2 rooting status			K3 生根状况 K3 rooting status		
IBA	NAA	生根率/% Rooting rate	生根系数 Rooting coefficient	生根度 Rooting degree	生根率/% Rooting rate	生根系数 Rooting coefficient	生根度 Rooting degree
0.0	0.0	65.27	2.5	1.63	75.50	2.9	2.19
0.0	0.1	87.78	2.2	1.93	98.25	3.2	3.14
0.0	0.2	93.75	2.3	2.16	93.85	2.7	2.53
0.0	0.5	84.21	2.1	1.77	84.17	2.0	1.68
0.1	0.0	92.50	3.5	3.24	60.00	2.8	1.68
0.1	0.1	89.64	3.2	2.87	85.43	2.5	2.14
0.1	0.2	94.11	2.9	2.73	82.86	2.2	1.82
0.1	0.5	88.75	2.6	2.31	81.14	2.0	1.62
0.2	0.0	76.25	3.3	2.52	42.66	2.8	1.19
0.2	0.1	88.75	2.8	2.49	75.75	2.7	2.05
0.2	0.2	92.50	2.5	2.31	80.00	2.5	2.00
0.2	0.5	83.20	2.2	1.83	72.25	2.2	1.59
0.5	0.0	81.43	3.2	2.61	71.76	2.9	2.08
0.5	0.1	79.18	2.3	1.82	69.67	2.5	1.74
0.5	0.2	82.91	2.1	1.74	70.43	2.4	1.69
0.5	0.5	67.79	1.6	1.08	57.20	1.5	0.86

2.4 组培苗的炼苗和移栽结果

移栽到蛭石盘中 10 d 后,98% 的组培苗成活并有白色新根长出,此过程主要为组培苗生长提供充足的水分。将成活的组培苗移栽到由珍珠岩、蛭石和营养土组成的混合基质中 20 d 后,组培苗成活率达 100%,此过程中必须浇透水并进行正常的田间管理,使组培苗生长加快,木质化程度增加,而且这种混合基质能够为幼苗提供充足的养分和生长空间。本实验移栽时间是 3 月中旬,室外温度较低,但采用塑料薄膜小拱棚保温,使组培苗免受低温的影响。

3 结 论

在四倍体刺槐无性系 K2 和 K3 的增殖培养过程中,在 MS 培养基中添加适量 NAA 和 6-BA,增殖效果较稳定,其中,添加 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 和 $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 最有利于 K3 增殖,添加 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 和 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 最有利于 K2 增殖。K2 和 K3 组培苗生根培养所需的营养水平和细胞分裂素浓度均较低,因而,K2 和 K3 的最佳生根培养基分别为仅添加了 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA 和 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 的 1/2MS 培养基。采用组织培养技术可以高效地培育出 K2 和

K3 的优质苗木,满足推广种植过程中对苗木的大量需求,也可为四倍体刺槐的分子生物学研究奠定基础。

参考文献:

- [1] 宿 静,汤庚国,万 劲,等. 香果树茎段和叶片的组织培养[J]. 植物资源与环境学报,2008,17(1): 71-74.
- [2] 孙满芝,王庆玲,乔元伟. 四倍体刺槐组培中生长调节物质应用的研究[J]. 山东林业科技,2001(5): 17-19.
- [3] 张新叶,蔡 晟,胡兴宜,等. 四倍体刺槐的组织培养研究[J]. 湖北林业科技,2002(4): 4-6.
- [4] 王树芝,田砚亭,李 云. 四倍体刺槐无性系组织培养技术的研究[J]. 核农学报,2002,16(1): 40-44.
- [5] 曹善东. 四倍体刺槐组培快繁技术研究[J]. 山东林业科技,2003(1): 11-12.
- [6] 司守霞,彭正峰,周 青. 刺槐离体快繁技术研究[J]. 河南林业科技,2004,24(2): 11, 18.
- [7] 张 怡,罗晓芳,沈应柏. 土壤逐渐干旱过程中刺槐新品种苗木抗氧化系统的动态变化[J]. 浙江林学院学报,2005,22(2): 166-169.
- [8] 张 怡. 刺槐新品种组织培养及抗旱性生理生化基础研究[D]. 北京:北京林业大学生物科学与技术学院,2005.