

马占相思优树组培快繁技术研究*

黄烈健¹, 陈祖旭¹, 张赛群², 梁日高³(1. 中国林业科学研究院热带林业研究所, 广东 广州 510520; 2. 厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005;
3. 广东省江门市林业科学研究所, 广东 江门 529000)

关键词: 马占相思; 优树; 组培

中图分类号: S723.1

文献标识码: A

Tissue Culture Technique of *Acacia mangium* Elite TreesHUANG Lie-jian¹, CHEN Zu-xu¹, ZHANG Sai-qun², LIANG Ri-gao³(1. Research Institute of Tropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Guangzhou 510520, Guangdong, China;
2. School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian, China;
3. Research Institute of Forestry of Jiangmen City, Jiangmen 529000, Guangdong, China)

Abstract: Taking *Acacia mangium* elite trees as explants, the tissue culture technique system for dormant bud of 3–5 year-old elite trees was established. The system includes the germination-inducing of the dormant buds, the multiplying of shoots, the rooting of adventitious shoots, and the pre-treating and transplanting of seedlings. The medium MS + Sucrose 30 g · L⁻¹ + BA 0.5 mg · L⁻¹ + NAA 0.1 mg · L⁻¹ was used for inducing the dormant buds; the medium MS + BA 1.0 mg · L⁻¹ + NAA 0.05 mg · L⁻¹ was used for multiplying; while the medium 1/2 MS + IBA 2.0 mg · L⁻¹ + NAA 0.5 mg · L⁻¹ was used for rooting. The results revealed that it was viable to producing field seedlings with micropropagation. Although the branches with dormant buds harbored many kinds of microbes and the adventitious shoots were not easy to root, 20% to 30% healthy germination could be yielded and the rooting rate of adventitious shoots could be higher than 85%. Pretreated with ABT powder (rooting hormone), both the rooting rate and survival rate of adventitious shoots were nearly 100%.

Key words: *Acacia mangium*; elite trees; tissue culture

相思(*Acacia* Mill.)类树种(俗称相思树)属含羞草科(Mimosaceae)金合欢属(*Acacia* Mill.),在我国广东、海南、广西、福建、云南和江西等地均有栽培。相思树植株高大挺拔,根系发达具根瘤,具有耐干旱贫瘠及抗风的特性,是水土保持及改良土壤的优良树种;同时,相思树还是优良的用材树种,其生长迅速,木材可作为高档家具、装饰板、木地板等的好材料。因此,相思类树种成为我国南方短周期

工业原料林的主推树种之一^[1-2]。

对相思树种开展组培技术研究虽有成功的报道^[3-8],但以前的研究,一般是采用经过扦插或者嫁接后幼态化的腋芽、茎尖等为外植体进行诱导、增殖,研究的时间不仅较长,而且其要求的技术环节也较多,影响了相思优良无性系的推广应用进程。中国林业科学研究院热带林业研究所历经“十五”、“十一五”研究,选育了一批优良的马占相思(*Acacia*

收稿日期: 2010-08-21

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAD01A15-5, 2006BAD32B010-3); 农业科技成果转化项目(2009GB24320482)

作者简介: 黄烈健(1971—),男,博士,副研究员,研究方向为林木遗传育种与森林培育,电话:020-87033463, E-mail: hlj@ritf.ac.cn

* 感谢广东省江门市林业科学研究所的戴智明、福建厦门涌泉公司的赖桂星、广东省江门市新会区沙堆镇林业站的区炳钦、赵祖文等对本研究提供的帮助。

mangium Willd.) 无性系,为了尽快使这些优良无性系在生产中发挥其应有的作用,本研究以前期试验林中筛选获得的优良马占相思无性系优树为材料,开展了直接以马占相思、马大杂种相思(*A. mangium* × *A. auriculiformis* Cunn. ex Bench) 等优良无性系的大田休眠芽为外植体的组培技术研究,以期建立高效、快速、繁殖系数高的组培技术体系。

1 材料和方法

1.1 植株材料

以中国林业科学研究院热带林业研究所前期建立试验林中筛选获得的优良马占相思 Am166(5年生)、Am97(5年生)、Am20(5年生)、L14(3年生),马大杂种相思 AMA9801(3年生) 5个无性系优树为材料。

1.2 外植体选择与处理

从林地中优选植株的中上部,采集长势旺盛的当年生半木质化带腋芽的健康枝条,剪去小叶,洗衣粉液浸泡 30 min,刷洗后流水冲洗;弃两端并剪成带 1~2 个腋芽的小段进行表面消毒,先用 75% 酒精浸

泡,然后以 1‰ 升汞(每升加 1~2 滴吐温-20) 浸泡消毒,并用无菌水多次洗涤。

1.3 萌芽培养基、增殖培养及生根培养基的筛选

试验采用 MS 及改良 MS 基本培养基,添加不同浓度 6-BA、NAA 进行不同培养基的筛选。

1.4 培养条件

培养温度为(26 ± 2) °C,每日光照 12 h,光照强度 2 500 lx。

2 结果与分析

2.1 休眠芽的表面消毒效果分析

表 1 统计数据为春夏季采摘的枝条,去顶芽后的消毒处理效果。从表 1 可以看出:直接采自林地的 3~5 年生树的休眠芽组培时的污染比较严重。在 1 个月左右的萌芽期中,都先后观察到不同接种茎段于不同时间出现污染。由此,可以推测污染可能是由内生菌引起,比较难以克服。可以采用表面消毒条件为 75% 酒精浸泡 15~20 s,1‰ 升汞浸泡 12~15 min,可以达到一个折中的效果,即在不完全避免污染的情况下,保证一定的存活率和萌芽率。

表 1 不同消毒方法对外植体培养的影响

处理	接种茎段数/个	污染茎段数/个	褐变茎段数/个	成活率/%
75% 酒精浸泡 15 s,1‰ 升汞浸泡 9 min	27	24	0	11.1
75% 酒精浸泡 20 s,1‰ 升汞浸泡 12 min	39	18	3	51.3
75% 酒精浸泡 15 s,1‰ 升汞浸泡 15 min	31	17	2	45.2
75% 酒精浸泡 15 s,1‰ 升汞浸泡 18 min	24	10	11	37.5

注:有些茎段既发生褐变也有污染;外植体为春夏季采的枝条。

研究发现:从 4~5 年生成年树上采的枝条,内生菌的含量较高,而且内生菌的种类非常多,包括多种细菌、真菌等,即使采用严格的表面消毒条件至枝条褐化,都不可避免地萌芽培养基上出现内生菌的生长;顶芽的褐化情况比较严重,因此,在将枝条剪成小段时,应以弃去顶芽为宜。春夏季为采摘外植体较为适宜的时间;秋冬季外植体的污染更加严重,很难得到萌芽。

2.2 休眠芽的诱导萌发

本研究中休眠芽的诱导萌发所采用的培养基配方及诱芽效果见表 2。综合不同诱芽培养基的效果发现:(1)基本培养基对芽萌发时间没有太大的影响,但激素质量浓度及比例对芽的状态具有较大的影响,MS + BA 0.5 mg · L⁻¹ + NAA 0.1 mg · L⁻¹ 为

各个品种都合适的培养基;(2)树龄对休眠芽的萌发具有较大的影响,本研究中 3 年生树的休眠芽萌发时间集中在 20~25 d,而 5 年生树的休眠芽萌发时间集中在 30~35 d;(3)萌发出的芽为单芽或丛芽,与无性系有一定的关系,马大杂种相思 AMA9801 及马占相思 Am20 较易诱导出丛芽;(4)不同无性系对不同激素有一定的差异,主要表现为马大杂种相思 AMA9801 及幼龄一点的 L14 萌芽对培养基中激素的水平要求更低一点。

利用上述筛选的诱芽培养基(MS + BA 0.5 mg · L⁻¹ + NAA 0.1 mg · L⁻¹),对不同无性系的休眠芽进行诱导萌发,芽诱导萌发率在 20%~30%(表 3),而且芽生长良好。

表 2 不同培养基配方对休眠芽的诱导萌发

培养基	AMA9801		Am166		Am97		Am20		L14	
	萌芽时间 /d	萌芽状态	萌芽时间 /d	萌芽状态	萌芽时间 /d	萌芽状态	萌芽时间 /d	萌芽状态	萌芽时间 /d	萌芽状态
MS + BA2.0 + NAA 0.2	30 ~ 35	玻璃化	30 ~ 35	玻璃化	30 ~ 35	玻璃化	30 ~ 35	玻璃化	20 ~ 25	玻璃化
改良 MS + BA2.0 + NAA 0.2	30 ~ 35	玻璃化	30 ~ 35	玻璃化	30 ~ 35	玻璃化	30 ~ 35	玻璃化	20 ~ 25	玻璃化
MS + BA1.0 + NAA 0.2	30 ~ 35	玻璃化	30 ~ 35	玻璃化	30 ~ 35	玻璃化	30 ~ 35	玻璃化	20 ~ 25	玻璃化
改良 MS + BA1.0 + NAA 0.2	30 ~ 35	玻璃化	30 ~ 35	玻璃化	30 ~ 35	大而舒展	30 ~ 35	玻璃化	20 ~ 25	玻璃化
MS + BA 0.5 + NAA 0.1	30 ~ 35	大而舒展	30 ~ 35	大而舒展	30 ~ 35	大而舒展	30 ~ 35	大而舒展	20 ~ 25	大而舒展
MS + BA 0.3 + NAA 0.07	30 ~ 35	大而舒展	30 ~ 35	舒展、小	30 ~ 35	舒展、小	30 ~ 35	舒展、小	20 ~ 25	大而舒展

注: 表中激素的质量浓度单位为 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 若无特别注明, 蔗糖质量浓度为 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 下同。

表 3 不同马占相思无性系休眠芽的诱导萌发率

无性系	接种茎段数/个	未污染茎段数/个	萌芽茎段数/个	萌芽率 /%
AMA9801	43	19	13	30
Am20	27	10	7	26
Am97	33	14	7	21
Am166	45	18	9	20
L14	39	18	11	28

表 4 不同培养基对芽增殖与伸长的影响

培养基	平均增殖倍数	芽苗表现
MS + BA 0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA 0.05 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	2.0	少 生长慢
MS + BA 0.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA 0.02 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	1.5	少 生长慢
MS + BA 1.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA 0.50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	2.5	快 较正常
MS + BA 2.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA 0.10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	3.5	芽多 有效苗少
MS + BA 1.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA 0.05 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	3.0	芽多 有效苗多
MS + BA 1.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA 0.10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	3.5	芽丛密集 有效苗少

2.3 丛生芽的增殖

将诱导出的丛生芽进行切割, 接种在增殖和伸长培养基中进行培养 25 d 左右, 每个芽即可分化出 2 ~ 3 个芽, 将这些芽再次进行切割, 接种于培养基中进行增殖培养。

马占相思的增殖与伸长培养中, 激素起着重要的作用, 不同质量浓度的激素配比有着不同的表现 (表 4)。在不加任何激素的 MS 基本培养基中, 接种下去的腋芽不能增殖, 也不能伸长, 最终老化而失去价值; 当附加 BA (0.5 ~ 1.0) $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 丛生芽的增殖随 BA 质量浓度的增加而增加, 且丛生芽表现旺盛, 有效芽苗多; 当 BA 浓度 $\geq 1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 丛生芽密集, 但不伸长, 有的变成愈伤组织, 有效苗少, 不利于下一步的增殖和生根培养。结果表明 (表 4): 培养基以 MS + BA 1.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA 0.05 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 对芽的增殖与伸长效果最好, 平均诱导芽数达 3.0 个, 芽苗平均长达 2.5 cm, 且生长旺盛, 利于扩繁及生根成苗。增殖中, 马大杂种相思 AMA9801 耳状叶 (叶状柄) 较多, 马占相思往往为羽状复叶。不同无性系的繁殖系数略有差异, 表 4 中为各无性系的平均值。

2.4 组培苗的生根及移植

在丛生芽中选择高 2.5 ~ 3.0 cm、叶色正常、茎干粗壮的芽苗从基部切下, 接种于生根培养基上, 经 30 d 左右, 试管苗就会从基部长出白色的根, 不同的生长素配比对生根产生不同效果, 不同培养基对马大杂种 AMA9801 芽苗生根的影响结果见表 5。

表 5 不同培养基对马大杂种相思 AMA9801 芽苗生根的影响

培养基	接种数/个	生根数/个	生根率 /%
MS	50	5	10
1/2MS + IBA0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA0.1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	50	26	52
1/2MS + IBA1.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	50	33	66
1/2MS + IBA2.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	50	43	86
1/2MS + IBA2.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA0.1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	50	40	80

马大杂种相思 AMA9801 芽苗在不添加任何植物生长调节剂的培养基上, 生根效果差, 30 d 后, 叶片变黄脱落, 不能移植; 在 1/2MS + IBA2.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基上, 生根效果较好, 生根率可达 86%。当试管苗根长 2 ~ 5 cm 时, 便可将瓶盖打开炼苗 3 ~ 5 d 后即可进移植。

生根苗直接移植, 未生根苗用生根粉 1 400 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 溶液浸泡 2 h 后再移植, 7 ~ 10 d 后观察发现, 几乎所有移植苗都形成了新根并存活。

3 小结与讨论

3.1 小结

本研究以优良马占相思无性系优树为材料, 建立了 3 ~ 5 年生优树休眠芽的组织培养技术体系。萌芽培养基为 MS + BA 0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA 0.1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 增殖培养基为 MS + BA 1.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA 0.05 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 生根培养基为 1/2 MS + IBA

2.0 mg · L⁻¹ + NAA 0.5 mg · L⁻¹。

研究表明:利用3~5年生相思树休眠芽进行组织培养并繁育生产用苗在技术上完全可行,建立的技术体系可得到20%~30%的正常萌芽,而且继代增殖效果良好,不定芽生根率达85%以上;未生根苗在移植前用生根粉处理后,生根率和成活率可接近100%。

3.2 讨论

利用休眠芽进行相思的组织培养快繁主要包括三个环节,即休眠芽的诱导萌发、丛生芽的增殖以及不定芽的诱导生根。通过研究,笔者成功建立了一套相应的组培技术体系,同时,笔者也注意到以下几个方面的问题:

3.2.1 外植体的选择 本研究采用了3~5年生的相思树休眠芽进行组织培养诱导萌发及增殖,结果发现:直接采自成年树枝条存在内生菌含量高,休眠芽诱导萌发过程中污染严重;不同季节的成年树休眠芽作为外植体可能关系到试验的成败。春夏季为比较合适的季节,秋冬季则不太适宜,且应考虑适当增大入瓶外植体数目。这可能是因为春夏季时,外植体正处于萌发生长阶段,带菌较少,成活率高,易诱导成苗。

3.2.2 休眠芽萌动的影响因素 本研究发现影响休眠芽萌动的因素主要包括下面4个方面:

(1) 树龄 树龄对休眠芽的萌发具有较大的影响,3年生树的休眠芽萌发时间集中在20~25 d,而且生长势也稍强;而5年生树的休眠芽萌发时间则相对长一些,萌芽时间集中在30~35 d。

(2) 培养基的激素水平 BA的质量浓度对萌芽的状态有很大的影响,较高的BA质量浓度会导致芽的玻璃化,叶片畸形、卷曲等现象;同时笔者也发现,不同幼嫩程度的枝条上的休眠芽对激素的反应也有区别,木质化程度稍高的枝条对激素敏感程度比较低,在BA质量浓度1.0~2.0 mg · L⁻¹时,都可以得到正常的萌芽。

(3) 枝条的营养状况 枝条的木质化程度及营养状况对休眠芽萌芽的强壮程度有一定的影响,表现为比较粗壮的外植体产生的萌芽相对比较强壮。

(4) 无性系 马大杂种相思及马占相思 Am20

较易诱导出丛生芽,而其他无性系则往往诱导出单芽。这说明不同的无性系形成芽原基的数量可能存在一定的差别。另外,在芽的增殖过程中,笔者也发现了无性系对增殖芽状态的影响,主要表现为马大杂种相思耳状叶(叶状柄)较多,马占相思往往为羽状复叶。

3.2.3 增殖中应注意的事项 在增殖过程中有一个矛盾:即若想提高增殖倍率,则往往得到的苗比较细弱;而如果为了让苗长得比较强壮,则增殖倍率就会相对降低。本研究结果表明:培养基以MS + BA 1.0 mg · L⁻¹ + NAA 0.05 mg · L⁻¹对芽的增殖与伸长效果最好,增殖时间为25 d左右,平均诱导芽数达3.0个,芽苗平均长达2.5 cm,且生长旺盛,利于扩繁及生根成苗。

3.2.4 生根过程中的特殊现象 在诱导生根过程中,笔者发现了2个比较特殊的现象:(1)在丛生芽的增殖过程中,如果较长时间不及时进行继代,培养基体积变小,部分丛生芽可直接生根;(2)未生根的不定芽,用生根粉处理后进行移植,可以生根和存活。从这2个现象笔者可以推测,马占相思可能是比较容易组培生根的树种,生根过程对养分的要求比较低,但对通气状况可能有比较高的要求。

参考文献:

- [1] 周鸿彬,高本旺,高登梅.相思类树种引种初报[J].湖北林业科技,2001(4):19-22
- [2] 高洁,王玲.大叶相思茎段腋芽组织培养技术初探[J].西南林学院学报,2003,23(2):16-18
- [3] 徐位力,罗焕亮,范恩友,等.二次正交旋转组合设计对马占相思组培增殖培养基的优化[J].广西植物,2002,22(6):517-520
- [4] 张祖荣,刘兴良.灰木相思茎段腋芽的组织培养及植株再生[J].西南农业大学学报:自然科学版,2004,26(3):291-293
- [5] 张宏伟,黄学林,傅家瑞,等.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
- [6] 裘珍飞,曾炳山,刘英.马占相思优树组培早期增殖速率研究[J].林业科学研究,2002,15(1):61-65
- [7] Galiana A, Tibok A, Duhoux E. In vitro propagation of the nitrogen fixing tree leagume *Acacia mangium* Willd [J]. Plant and Soil, 1991, 135: 151-159
- [8] Mittal A, Agarwal R, Gupta S C. In vitro development of plantlets from axillary buds of *Acacia auriculiformis* [J]. Plant cell Tissue and Organ Culture, 1989, 19: 65-70