

大叶相思、马占相思腋芽培养和植株再生

张宏伟

黄学林 傅家瑞

(第一军医大学中医系, 广州 510515)

(中山大学生物系, 广州 510275)

杨民权

陈传启

(中国林业科学院热带林业研究所, 广州 510520)

(广东省龙洞林场, 广州 510520)

摘要 从初选优树上采集的大叶相思、马占相思侧枝芽, 经 6% 次氯酸钠消毒 20min, 0.1% HgCl₂ 消毒 5 min 后在 MS + 10 μ mol/L BA + 0.5 μ mol/L IBA 培养基上进行丛生芽的诱导, 结果大芽比小芽更易进行腋芽的诱导。66.7% 的大叶相思大芽, 60.0% 的马占相思芽产生了丛生芽。最多的一个大叶相思大芽繁殖了 55 个芽, 而马占相思最多的是一个外植体繁殖了 48 个芽。根的诱导是在 1/2 MS 无机元素 + MS 有机元素 + 4.92-7.38 μ mol/L IBA + 2.69 μ mol/L NAA 的培养基上进行的。29.8% 的大叶相思芽苗和 25.0% 的马占相思芽苗产生了根, 根的诱导还与苗的健壮程度, 生理状态有关。继代培养能使植物组织复壮, 提高丛生芽的诱导率和促进生根。试管苗经两周锻炼移栽到花盆中, 81.3% 的小植株成活并健康生长。

关键词 大叶相思; 马占相思; 腋芽; 组织培养; 植株再生

AXILLARY BUD CULTURE AND PLANTLET REGENERATION OF *ACACIA AURICULIFORMIS* AND *A. MANGIUM*

Zhang Hongwei

(Department of TCM, The First Military Medical University, Guangzhou 510515)

Huang Xuelin Fu Jiarui

(Department of Biology, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

Yang Minquan

Chen Chuanqi

(Research Institute of Tropical Forestry, CAF, Guangzhou 510520)

(Longdong Forestry Station, Guangzhou 510520)

Abstract Buds of *Acacia auriculiformis* and *A. mangium* from 4-year-old mother trees were first sterilised in 6% chlorox for 20 minutes, and then in 0.1% mercuric chloride for 5 minutes. Multiple shoot induction was obtained through culturing on MS basal medium supplemented with 10 μ mol/L BA and 0.5 μ mol/L IBA. Large explants were easier to induce multiple shoots than small ones. 66.7% of large explants of *A. auriculiformis* and 60.0% of *A. mangium*

缩写词: NAA — α -萘乙酸; IBA — 吲哚丁酸; BA — 6-苄氨基嘌呤

1994-07-11 收稿; 1995-03-27 修回

explants produced multiple shoots, the largest shoot number per explant reached 55 and 48 respectively. Root induction was done on half concentration of MS inorganic compounds supplemented with formal MS organic compounds, $4.92-7.38\mu\text{mol/L}$ IBA and $2.69\mu\text{mol/L}$ NAA medium. Rooting percentages of *A. auriculiformis* and *A. mangium* shoots were 29.8% and 25.0%, respectively. The frequency of rooting also related with shoot's health and its physiological state. Subculture can rejuvenate plant tissue, increase the number of shoot per explant and promote rooting. Vigorous plantlet can be obtained when the rooted-shoots were transplanted to soil after two-week training.

Key words *Acacia auriculiformis*; *Acacia mangium*; Axillary bud; Tissue culture; Plantlet regeneration

相思树类(*Acacia*)是热带多年生木本豆科植物, 适应性广, 抗性强, 具根瘤, 生长快, 生物量大, 用途广泛, 是目前较具发展前途的树种之一^[1,2]。我国除台湾相思之外, 其余的相思皆从国外引进。大叶相思(*A. auriculiformis*)和马占相思(*A. mangium*)自六、七十年代从澳洲引进后, 已在华南地区广为种植, 成为南方用材、燃料、肥料、道路绿化和混交的良好树种^[1,2]。

目前, 相思树类主要靠种子繁殖, 但其树形、生长量、抗逆性受种源的严重影响, 同一种源, 用种子繁殖分离亦很严重^[1,2], 因此在一定程度上影响了它们的开发利用。进行林间单株选优, 利用组织培养技术, 建立无性繁殖体系, 对进一步发展相思树类将起着重要的作用。目前国内外对相思树类的组织培养研究, 主要是通过无菌苗或幼苗的茎段作外植体进行腋芽培养或通过愈伤组织的器官发生途径进行快速繁殖^[3-12], 尚未见到大叶相思、马占相思直接选用林间成年优树作为外植体进行无性快繁的研究报道。本文直接从林间初选优树上取材, 研究了大叶相思和马占相思腋芽培养及植株再生, 具有理论和实际意义。

1 材料与方法

材料 大叶相思的腋芽采用中山大学校园内直杆型四年生植株侧枝芽; 马占相思的腋芽采用热带林业研究所种源地四年生植株澳大利亚昆士兰种的侧枝芽。

材料的消毒和外植体的获得 将大叶相思和马占相思的侧枝芽剪成一寸长左右, 用洗衣粉液浸泡 15min, 流水洗净, 转入 6% 次氯酸钠消毒 20min 或 40min, 无菌水冲洗干净, 再转入 0.1% HgCl_2 消毒 5min, 无菌水冲洗干净。在消毒过的培养皿上把芽剪成约 1-1.5cm 长的大芽或 0.2-0.3cm 长的小芽(马占相思只做了大芽, 未做小芽)。大芽带 2-3 个腋芽, 小芽仅含顶芽, 不带腋芽。大小芽均接种于芽诱导培养基。

丛生芽的诱导 丛生芽诱导的培养基采用① $\text{MS} + 10\mu\text{mol/L BA} + 0.5\mu\text{mol/L IBA}$ ^[12]; ② $\text{B}_5 + 5\% \text{CM}(\text{Coconut Milk}) + 10^{-6}\text{mol/L BA}$ ^[10] 两种培养基, 每 4-6 周更换一次相同的新鲜培养基。

不定根的诱导 诱导不定根采用以 1/2 MS 无机元素 + MS 有机元素 + 蔗糖 20g L^{-1} 为基本培养基, 加入不同比例的 IBA 和 NAA(1:2, 2:1, 3:1, 4:1), NAA 浓度固定为 $2.69\mu\text{mol/L}$ 。

为了试验不定芽生理年龄对生根的影响,我们采用种子萌发的无菌苗的茎尖在颜慕勤^[7]所用的培养基上产生的不定芽作为生理年龄幼态的芽来对照。

移栽 将有根的试管苗在消毒过的营养土中无菌培养半个月,然后在室外过渡两天,再移栽到花盆中。

2 实验结果

2.1 消毒方法对芽存活的影响

从野外采集的材料较难消毒,尤其是木本成年树,我们对材料的消毒进行了不同的处理。从表1可见,次氯酸钠的消毒时间不宜过长,20min是比较适宜的,过长则会引起外植体的褐死。小芽的存活率高于大芽,但小芽的丛生芽诱导率远不及大芽(见表3)。

表1 消毒对外植体存活的影响

Table 1 Effects of sterilization on survival rate of explant from *Acacia auriculiformis*

消毒方法 Sterilization	外植体 Explants	存活率(%) Survival rate
6% 次氯酸钠 (chlorox) 20min, 0.1% HgCl ₂ 5min	大芽 Large buds	91.0
	小芽 Small buds	97.3
6% 次氯酸钠 (chlorox) 40min, 0.1% HgCl ₂ 5min	大芽 Large buds	8.45
	小芽 Small buds	36.6

2.2 丛生芽的诱导及其影响因素

表2可见,培养基②是不适合的,接种三个月后外植体黄化,且无一个外植体产生丛生芽,而培养基①则较合适,接种三个月,有36.0%的外植体产生丛生芽。事实上,将大叶相思的大芽接种在培养基①上,一周后,芽下的小叶片就开始肿大,一个月后,肿大叶片叶腋处的腋芽就开始生长,初时,新长的腋芽多为耳状叶(叶状柄)(图版I: 1),随着继代次数的增加,每个外植体的丛生芽诱导率不断增大,在305d内,最多一个外植体产生了55个芽。芽丛长满了密密麻麻的叶片和芽原基,有的长耳叶(图版I: 2),有的成为幼态的羽状复叶(图版I: 3),还有的在耳叶上又长复叶。66.7%的外植体产生了丛生芽。

表2 不同培养基对大叶相思外植体产生丛生芽的影响

Table 2 Effects of various media on explants producing multiple shoots in *Acacia auriculiformis*

培养基 Media	产生丛生芽的外植体/总外植体 Explants producing multiple shoots/Total explants
① MS + 10 μ mol/L BA + 0.5 μ mol/L IBA	0.36
② B ₃ + 5% CM + 10 ⁻⁶ mol/L BA	0

培养时间(Culture time): 3个月(3 months)

对于马占相思,接种在培养基①上的情形与大叶相思相似,但刚接种时,马占相思产生的酚

类物质较多, 因此需及时地转移到新鲜的培养基上。马占相思产生的丛生芽全部都显幼态的羽状复叶(图版 I: 4), 随着继代次数的增加, 最多一个外植体产生 48 个芽, 60.0% 的外植体产生了丛生芽。

2.2.1 外植体大小对丛生芽诱导的影响

大叶相思的大小芽同时接种在培养基①时, 产生丛生芽的结果却有不同。从表 3 可见, 虽然小芽存活率高于大芽, 但长丛生芽的外植体百分率很小, 接种的芽多半变成直径约为 1-2mm 的绿色圆点, 而大芽则在较短的时间里从叶腋处长出丛生芽, 而顶上的芽多半是渐渐枯死。因此, 单纯从快速繁殖而言, 大芽便于腋芽生长, 成苗时间短, 容易进行离体培养。

表 3 外植体大小对大叶相思丛生芽诱导的影响

Table 3 Effects of large and small buds from *Acacia auriculiformis* on inducing multiple shoots

	存活率 Survival rate	丛生芽诱导率 Rate of explant producing multiple shoots	丛生芽数/外植体 Multiple shoot num./explant
大芽 Large buds	91.0%	74.1%	1.77
小芽 Small buds	97.3%	11.0%	1.13

7 周后统计结果 The result was obtained after 7 weeks

表 4 继代次数对大叶相思丛生芽诱导的影响

Table 4 Effects of times of subculture on inducing multiple shoots in *Acacia auriculiformis*

继代次数 Times of subculture	产生丛生芽的外植体的百分比 Percentage of explant producing multiple shoots	产生带羽状叶芽的外植体/产生丛生芽的外植体 Explants producing shoots with pinnately compound leaf/ Explants producing multiple shoots	丛生芽数/外植体 Propagation coefficient
1	36.0%	0	1-3
2	58.9%	16.3%	
4	66.7%	38.5%	20-55

2.2.2 继代次数对丛生芽诱导率及植物组织复壮的影响

试验表明, 在大叶相思丛生芽诱导过程中, 随着继代次数的增加, 繁殖体的丛生芽诱导率, 产生丛生芽的外植体百分比以及丛生芽中带羽状复叶(幼态的标志)的比例增加(表 4)。这一现象表明继代培养能影响植物组织的生理状况。

2.3 根的诱导

以四年生树侧枝芽为外植体产生的腋芽生根比较困难, 但通过采用不同激素浓度的组合及不断的继代培养, 可成功地诱导出根。当马占相思芽苗接种在生根培养基上, 一周后出根, 根粗且壮, 根毛较多(图版 I: 5,6)。而大叶相思则在接种一周后先在苗的基部产生少量白色、致密的愈伤组织, 再过一周, 根才从愈伤组织处产生(图版 I: 7,8), 基部没有愈伤组织的苗不能长根, 一个月后统计的生根结果如表 5。

从表中可见, 根的诱导与芽苗的生理状况有关。来自无菌苗茎尖的芽苗生理年龄幼态, 因此它比来自四年生树的芽苗容易生根, 而同样是来自四年生树的芽苗, 显幼态的羽状叶芽苗生根率要比叶状柄的高, 随继代次数的增加, 芽苗生根率也增高。在根的诱导中, IBA 的作用要比 NAA 重要, 培养基中 IBA 应比 NAA 浓度大, 二者以 2:1 或 3:1 的比例较为合适, 而 1:2 则不合适, 4:1 也会降低生根率。对于马占相思, 激素的比例似乎并不重要, 在三个浓度上都差不多, 这主要与接种时芽苗的健壮程度有关。

表5 一些因素对芽苗生根的影响
Table 5 Effects of some factors on shoot rooting rates

大叶相思 (<i>A. auriculiformis</i>)						
IBA:NAA	无菌苗茎尖培养 产生的芽苗* Shoots produced by stem apex of aseptic seedlings	成年树腋芽培养产生的芽苗 Shoots produced by axillary buds of mature trees				马占相思 <i>A. mangium</i>
		羽状叶 With pinnately compound leaf*	叶状柄 With phyl- lude*	二次继代 Two times of subculture	四次继代 Four times of subculture**	
0:0	25%	0	7.14%	0	8.33%	0
1:2		0	0			
2:1	0	37.5%	18.2%	0	28.55%	23.5%
3:1	75%	33.3%	15.4%	0	29.8%	25.0%
4:1	75%	28.6%	0	7.15%	17.4%	25.0%

* 以四次继代的丛生芽为材料。Material from multiple shoot after four times of subcultures.

** 以芽苗长根总数/接种苗数计算; 取两次重复试验平均数

The percentage of total number of rooting shoots in total number of inoculating shoots; two replicates in each treatment

2.4 移苗成活率的有关因素

长根的组培苗移至花盆中, 锻炼与否对苗的成活影响很大。如果将小苗直接从培养基移至花盆中(小苗的根用0.05%的高锰酸钾浸泡数秒), 只有21.1%的小苗成活; 如果先将小苗在无菌土中锻炼半个月, 再移至花盆中, 有81.3%的苗成活, 这些苗在花盆中茁壮生长(图版I: 9)。

3 讨论

腋芽培养的程序可分成三个阶段, 首先是培养物系统的建立, 然后是丛生芽的增殖阶段, 最后是诱导根的产生。每一阶段都受诸多因素影响。

首先是外植体大小的影响。外植体的大小不但影响接种的外植体能否成活, 而且还影响繁殖的速度。一般来说, 外植体愈大, 成活率愈高^[13]。由于本试验采用的外植体为野外采集的四年生树侧枝芽, 含菌数量与种类均较多, 因此大外植体成活率反而低。不过外植体愈大, 成苗时间愈短^[13], 本试验的结果证明了这一点。虽然, 很小的茎尖培养可以达到去病毒的目的, 但在本文中目的是为了快速繁殖, 而且采用的材料又是难以培养的木本成年树, 因此采用较大的外植体使之在较短时间内产生腋芽是比较行之有效的。

其次是培养基的影响。Semsuntud^[12]等采用培养基①成功地使大叶相思成年树产生丛生芽, 这与本试验的结果是一致的, 但是本试验所用外植体年龄更老, 且大大提高了繁殖系数。Mittal等^[10]则采用培养基②使一个月苗龄的大叶相思无菌苗产生了丛生芽, 而本试验则表明它对成年树是不合适的。马占相思也在培养基①上产生了丛生芽, 而且繁殖系数也很高, 说明同属植物具有某种共性。但是马占相思诱导的丛生芽全部都是恢复幼态的羽状叶, 而大叶相思却既有羽状叶, 也有耳叶, 这说明不同的植物种类也有不同的反应, 很可能是二者的内源激素水平不同所致。

在试验中发现培养过程中的继代次数可以改变植物材料的生理状态。有人发现继代培养次数

增加,繁殖系数也会提高。有人报道经九次继代培养,其繁殖系数提高了7倍^[13]。本试验的结果与之相似。继代培养不仅使繁殖系数提高,它同时能使植物组织复壮^[13]。本试验的结果也表明了这一点。由于能使植物组织复壮,因而芽苗的发根也更容易。至于继代次数如何改变植物材料的生理状态的,其机理还有待于进一步研究。

对于木本成年树来说,芽苗的生根问题是整个培养过程中最难克服的^[13,14]。在本试验中,生根率也不高。有人认为BA是抑制生根的物质^[15],而生长素则是生根所必须的物质^[13],因此他们建议芽苗应先在不含BA的培养基上生长一个月,以稀释BA对生根的抑制作用^[16]。但是本试验的结果却与之相反。广东省林科所林木组织培养课题组^[1]的同志认为在生根培养基中IBA:NAA的比例为3:1配合适当的用量,能获得较理想的效果,这可能是因为他们采用的方法是通过愈伤组织而获得的芽苗生根。而在本试验中,IBA与NAA的比例似乎不很重要,重要的是芽苗的健壮程度和生理年龄。健壮的芽苗在不含激素的培养基上也能长根,生理年龄幼态的苗长根也比生理年龄成熟的芽苗容易,在IBA与NAA的各种比例的培养基上,长根的比例差别不大。如何提高来自成年树的芽苗生根问题尚需进一步研究。

生产实际中我们用这种方法为热带林业研究所材穗圃提供了部分芽苗,取得了一定的经济效益,因为试管苗比传统的扦插苗长得更整齐,也更经济,同时用枝条来扦插繁殖,如果影响优良母树的生势往往得不偿失。

参考文献

- 1 杨民权,曾育田.马占相思种源试验.林业科学研究,1989,2(2):113
- 2 曾育田,杨民权.大叶相思种源试验.广东林业科技,1990,5:25
- 3 广东省林科所林木组织培养课题组.用组织培养法快速繁殖大叶相思.热带林业科技,1982,(2):45-47
- 4 周志坚,翟应昌,李俩弟.马占相思的组织培养.植物生理学通讯,1983,(3):47
- 5 谢声信.大叶相思组织培养.植物,1982,(6):8
- 6 翟应昌,周志坚,李俩弟.金合欢属的组织培养和植株再生.植物生理学通讯,1984,(4):32
- 7 颜慕勤,陈平.大叶相思的组织培养和植株再生.植物生理学通讯,1983,(1):29
- 8 Ahmad D H. Multiplication of *Acacia mangium* by Stem Cuttings and Tissue Culture Techniques. Advances in Tropical *Acacia* Research: Proceedings of an international workshop held in Bangkok, Thailand, 11-15 February, ACIAR Proceedings NO. 35, 1991, 32-35
- 9 Galiana A, Tibok A, Duhoux E. *In Vitro* propagation of the nitrogen-fixing tree-legume *Acacia mangium* Willd. Plant and Soil, 1991, 135:151-159
- 10 Mittal A, Agarwal R, Gupta S C. *In vitro* development of plantlets from axillary buds of *Acacia auriculiformis* — a leguminous trees. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1989, 19:65-70
- 11 Ranga Rao G V, Prasad M N V. Plantlet Regeneration from the Hypocotyl Callus of *Acacia auriculiformis* — Multipurpose Tree Legume. J Plant Physiol, 1991, 137:625-627
- 12 Semsuntud N, Nitiwattanachai W. Tissue culture of *Acacia auriculiformis*. Advances in Tropical *Acacia* Research:

- Proceedings of an international workshop held in Bangkok, Thailand, 11-15 February, ACIAR Proceedings NO. 35, 1991, 39-42
- 13 陶国清. 植物茎尖培养. 植物生理学教学研究参考文集 — 理论进展及其在生产中的应用. 1987, 293-316
- 14 Haissig B E, Davis T D, Riemenschneider D E. Researching the controls of adventitious rooting. *Physiol. Plant*, 1992, 84:310-317
- 15 Halperin W, Wetherell D F. Adventive embryony in tissue cultures of the wild carrot, *Daucus carota*. *Amer J Bot*, 1964, 51(3):274-283
- 16 Skolmen R G. *Acacia* (*Acacia Koa* Gray). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. vol. 1. Trees I. Berlin: Springer Verlag, 1986, 375-384

图版说明

1. 由大叶相思腋芽诱导的丛生芽(外植体先膨大, 丛生芽在叶腋处长出, 初时多为耳状叶); 2-3. 大叶相思芽增殖过程中形态的变化; 2. 继代2-4次后, 丛生芽有的仍为耳状叶; 3. 有的变为羽状叶; 4. 马占相思的丛生芽, 全部为羽状叶; 5-6. 马占相思芽苗的根诱导; 5. 在生根培养基中的芽苗生根; 6. 从琼脂培养基中移出的小植株, 可见其根粗且壮, 具根毛; 7-8. 大叶相思芽苗的根诱导; 7. 在生根培养基中的芽苗生根; 8. 从琼脂培养基中移出的小植株, 可见在芽苗的基部有少量愈伤组织; 9. 经锻炼的小植株在花盆中茁壮成长(移栽6周后的情况)。(图中白短线为1cm)

Explanation of plate

1. Multiple shoots produced by axillary buds of *A. auriculiformis* (the explant was expanded, then multiple shoots were produced in leaf axil of the explant, most of them with phyllodes); 2-3. The morphological change of *A. auriculiformis* shoots during proliferation; 2. After 2-4 subcultures, some shoots with phyllodes remained; 3. Some shoots with pinnately compound leaves; 4. Multiple shoots of *A. mangium*, all with pinnately compound leaves; 5-6. Rooting of *A. mangium* shoots; 5. Shoot rooting in medium; 6. Plantlet from agar medium, which roots were with root hair, thick and strong; 7-8. Rooting of *A. auriculiformis* shoots; 7. Shoots rooting in medium; 8. The plantlets from agar medium, a few calli in the base of shoots can be seen; 9. The plantlets after hardening growing well in pots (after 6 weeks of transplanting). (Scale bar = 1cm)