

文章编号:1001-7380(2019)02-0043-03

楸叶泡桐杂种无性系 9503 的组织培养技术研究

王红玲¹, 孙倩², 黄瑞芳¹

(1. 江苏省林业科学研究院, 江苏 南京 211153; 2. 南通农业职业技术学院, 江苏 南通 226007)

摘要:以楸叶泡桐和白花泡桐杂交无性系的枝条为外植体,开展了离体芽增殖技术,以及愈伤组织诱导、芽分化和不定芽生根等组织培养技术的研究。结果表明,增殖培养基采用 MS+8 mg/L 6-BA +0.3 mg/L NAA,不定芽的增殖倍数可达到9;利用其叶片进行愈伤组织诱导的最佳培养基为 MS+12 mg/L 6-BA+0.4 mg/L NAA,诱导率高达95%;愈伤组织分化的最佳培养基为 MS+10 mg/L 6-BA +0.7 mg/L NAA,不定芽生根的最佳培养基为 1/2MS+0.5 mg/L IBA+0.3 mg/L NAA,生根率 100%。

关键词:愈伤组织;外植体;增殖;楸叶泡桐

中图分类号:Q943.1;S792.43

文献标志码:A

doi:10.3969/j.issn.1001-7380.2019.02.010

Research of tissue culture in hybrid clone 9503 of *Paulownia catalpifolia*

Wang Hongling¹, Sun Qian², Huang Ruifang¹

(1. Jiangsu Academy of Forestry, Nanjing 211153, China; 2. Nantong Vocational College of Science & Technology, Nantong 226007, China)

Abstract: By using excellent stem segments of the hybrid Clone 9503 of *Paulownia fortunei* and *P. catalpifolia* as explants, we studied the tissue culture technology, including callus induction, bud differentiation and bud proliferation. The results showed that the multiplication medium was MS+8 mg/L 6-BA+0.3 mg/L NAA, with 9 of multiplication time. The suitable medium for leaf callus induction was MS+12 mg/L 6-BA+0.4 mg/L NAA, with the induction rate of 95%. The suitable callus differentiation medium was MS+10 mg/L 6-BA+0.7 mg/L NAA. The suitable rooting culture medium was 1/2MS+0.5 mg/L IBA+0.3 mg/L NAA, with the rooting rate of 100%.

Key words: Callus differentiation; Explants; Multiflication; *Paulownia catalpifolia*

与泡桐属其他树种相比,楸叶泡桐(*Paulownia catalpifolia*)具有明显的形质和生殖学特异性。具有枝角小,冠型紧凑、冠幅窄、自然接干能力强、材色好、密度高、花纹美观等优良特性,是我国出口桐材中价格最高的树种^[1]。楸叶泡桐在地表40 cm土层范围内根量少,具有萌动晚发叶迟的特点,遮荫面积小,是优良的农桐间作树种。楸叶泡桐是北方型树种,分布于山东、河南、河北、山西、陕西等省,楸叶泡桐具有花药败育^[2-3]、根系分布深等特点,天然繁殖困难,资源流失严重^[4],研究楸叶泡桐的组织

培养技术对开展楸叶泡桐的种质资源保存和利用具有重要意义。前人以白花泡桐(*P. fortunei*)、兰考泡桐(*P. elongata*)和毛泡桐(*P. tomentosa*)等生产上常见的泡桐种为组织培养研究对象^[5-7],并未见以楸叶泡桐以及杂种优树为研究对象。

1 材料和方法

1.1 培养材料

研究对象为江苏省林业科学研究院在“十五”期间选育的无性系 9503(由楸叶泡桐和白花泡桐杂

收稿日期:2019-02-19;修回日期:2019-03-05

基金项目:江苏省科技支撑(现代农业)项目“适于平原林网更新的泡桐和落羽杉优质材新品种选育”(BE2015371);中央财政林业科技推广示范资金项目“苏北杨树更新良种繁育及高效培育技术推广”(苏[2017]TG03号)

作者简介:王红玲(1982-),女,江苏宝应人,副研究员,硕士。主要从事林木遗传育种研究。

交所得),形质表现近于母本,具有干型通直圆满、连续接干能力强的优点,木材密度和白度分别比普通泡桐高 11%—12%和 27%—28%。材料为于 2017 年 1 月 22 日采自江苏省林业科学研究院内泡桐无性系 9503 大树(14 a)的 1 年生枝条,树高 13 m,胸径 25 cm。采枝后用自来水清洗、晾干,用 hoagland's 营养液水培。培养室温度为 28 ℃、光照强度 1 500 lx,光照时间为 24 h/d,室内空气相对湿度为 75%。每 2 d 换 1 次培养液,待枝条长出的嫩芽约 2—3 cm 时,切下作为外植体材料。

嫩芽先用自来水冲洗约 10—15 min 后,在超净工作台用无菌水冲洗 2—3 遍后,用 75% 的酒精浸泡 10 s,0.1% HgCl₂ 灭菌 6 min 后,再用无菌水冲洗 5—7 遍,最后用无菌纸吸干材料表面水分。在 MS + 0.15 mg/L NAA + 6 mg/L 6-BA + 20 g/L 蔗糖 + 7 g/L 琼脂培养基上培养 30 d 后,继代到相同培养基上培养获得幼化芽。

1.2 增殖培养试验

基础培养基采用 MS,蔗糖 20—30 g/L,琼脂 7 g/L,pH 5.6—5.9。试验激素为 NAA 和 6-BA。NAA 为 3 水平(0.15,0.3,0.45 mg/L),6-BA 为 3 水平(6.0,8.0,10.0 mg/L)。培养室温度 26—28 ℃,光照 14 h/d,光照强度 1 500 lx,空气相对湿度 65%—70%。将幼化的新芽放入壮苗培养基中,每处理接种茎段 1 个、接种 20 瓶。30 d 后统计增殖系数

增殖倍数 = 增殖周期结束时的不定芽数/增殖周期起始时的不定芽数。

1.3 叶片愈伤组织诱导

以 MS 为基本培养基,添加不同质量浓度的 NAA(0.2,0.4,0.6 mg/L)和 6-BA(2.0,7.0,12.0 mg/L)。用组培苗上部第 1 和第 2 片叶作为培养材料,剪取 0.5 mm×0.5 mm 的小块放入添加 9 种不同质量浓度激素的培养基中,每处理 24 瓶,每瓶放 3 个小叶。20 d 时,观察愈伤组织的诱导率和颜色、大小等状态。

叶片愈伤组织诱导率(%) = (发生愈伤组织块数/72) × 100。

1.4 愈伤组织诱导芽分化

将培养 30 d 的泡桐叶片愈伤组织切成约 1.0 cm² 的小块放入芽分化培养基上。基础培养基为 MS,NAA 3 水平(0.5,0.7,0.9 mg/L),6-BA 3 水平(4,10,12 mg/L),9 个处理,每处理 8 瓶,每瓶 1 块。

3 次重复。培养 20 d,开始观测芽的分化情况。

1.5 生根培养

选取高 5 cm 左右,带 3—5 片小叶的健壮苗,以 1/2MS 为基本培养基,参考有关文献,激素配比设计 4 个处理:

- (1) 1/2 MS+IBA 0.5 mg/L+NAA 0.3 mg/L
- (2) 1/2 MS+IBA 0.2 mg/L+NAA 0.05 mg/L
- (3) 1/2 MS+IBA 0.1 mg/L
- (4) 1/2 MS+NAA 0.5 mg/L

15 d 后统计生根率[生根率(%) = (生根苗数/培养总苗数) × 100],根据生根量,根长,根部有无愈伤组织等筛选出最适合根生长的培养基。

2 结果与分析

2.1 不同激素水平对不定芽增殖倍数的影响

接种 30 d 后统计增殖系数,结果见表 1。可知,在设定的试验水平内,2 种激素质量浓度对 9503 泡桐不定芽增殖倍数具有显著影响,0.3 mg/L NAA、8 mg/L 6-BA 增殖效果最好,在 0.3 mg/L NAA + 8 mg/L 6-BA 时增殖系数为 9,且芽苗叶绿茎粗,效果最好。方差分析结果表明 6-BA 显著影响增殖系数($P = 0.018$),NAA 的作用达到了极显著水平($P = 0.001$)。

表 1 不同培养处理对泡桐嫩芽诱导的影响

处理号	NAA/(mg/L)	6-BA/(mg/L)	增殖倍数
1	0.15	6	4
2	0.15	8	7
3	0.15	10	5
4	0.3	6	6
5	0.3	8	9
6	0.3	10	7
7	0.45	6	2
8	0.45	8	3
9	0.45	10	2

2.2 不同培养处理对泡桐叶片愈伤组织诱导的影响

在不同质量浓度激素的 MS 培养基上诱导愈伤组织,结果(见表 2)表明,叶片在不同质量浓度激素培养基上诱导愈伤组织有显著差异。在 NAA 质量浓度为 0.2 mg/L 时,不产生愈伤组织,30 d 后,叶片只增大直至褐化死亡。当 NAA 为 0.4 mg/L 时,诱导率随 6-BA 质量浓度的升高而升高。当 NAA 质量浓度为 0.6 mg/L 时,产生较少的愈伤组织。由表 2 可

知,叶片愈伤组织的有无,与 NAA 的质量浓度水平有较大关系。当 6-BA 质量浓度同为 7,12 mg/L 时,NAA 0.4 mg/L 能诱导产生较好的愈伤组织,当 NAA 质量浓度上升为 0.6 mg/L 时,愈伤组织就有了较大的变化,即愈伤组织团较小,叶片颜色较深,到 30 d 时愈伤组织逐渐褐化。当 6-BA 在 7—12 mg/L 时,80% 以上接种于 0.4 mg/L NAA 培养基上的外植体,10 d 后叶片切口开始有淡绿色愈伤组织出现,愈伤组织随着时间的增长不断膨大,20 d 后开始形成致密的瘤状愈伤组织,25 d 后瘤状突起,形成一个个凸起的小芽点。随着 NAA 质量浓度的升高,当 NAA 在 0.6 mg/L 时,叶片无限增大,愈伤组织较小,在 30 d 后愈伤组织开始老化并相继坏死。因此,0.4 mg/L NAA+0.7 mg/L 6-BA 是泡桐叶片愈伤组织诱导的最适质量浓度配比。

表 2 不同培养处理对泡桐叶愈伤组织诱导的影响					
处理号	NAA/ (mg/L)	6-BA/ (mg/L)	发生时间	诱导率	生长情况
1	0.2	2	无	0	
2	0.2	7	无	0	
3	0.2	12	无	0	
4	0.4	2	无	0	
5	0.4	7	15 d	76	大、致密
6	0.4	12	10 d	82	大且密
7	0.6	2	无	0	
8	0.6	7	15 d	56	较小
9	0.6	12	15 d	63	较小

2.3 不同培养处理对泡桐叶片愈伤组织诱导芽分化的影响

取在 MS+0.4 mg/L NAA+0.7 mg/L 6-BA 培养基中培养 30 d 的愈伤组织在 9 种培养基上培养 30 d。结果表明(见表 3),9 种培养基中愈伤组织均有芽分化,但各处理对芽分化和生长情况有较大差异。当 0.5—0.9 mg/L NAA 时,10 mg/L 质量浓度的 6-BA 处理萌芽率都是最高的,NAA 的不同质量浓度水平对愈伤组织分化芽苗产生的差异不明显。可见 6-BA 质量浓度对愈伤组织芽诱导有较大影响,在设定的处理水平下,较高的 6-BA 质量浓度可抑制愈伤组织芽的分化率。在 0.7 mg/L NAA+10 mg/L 6-BA 的组合中芽的分化最为理想,愈伤组织在第 15 d 开始出现明显分化,表面有一个个绿色颗粒状隆起,形成类胚状体,25 d 左右芽体显现,继而芽体不断伸长,形成具有绒毛的小叶尖,愈伤组织

团不久便形成一大片丛生芽。方差分析结果表明,NAA 对发芽率的影响不显著,6-BA 的影响则达到显著水平($P=0.012$)。

表 3 不同培养处理诱导泡桐叶片愈伤组织芽分化的影响				
处理号	NAA/ (mg/L)	6-BA/ (mg/L)	发芽率	发生情况
1	0.5	10	63	芽较大、很少
2	0.5	12	50	芽较大、较少
3	0.5	14	48	较为密集
4	0.7	10	78	细小密集、生长慢
5	0.7	12	59	较密集
6	0.7	14	48	芽小而密
7	0.9	10	35	芽较多
8	0.9	12	32	数量少
9	0.9	14	30	数量少

2.4 生根培养

添加不同质量浓度的 1/2 MS 培养基均可诱导生根,但不同处理的生根率、生根数量、生根时间和根的粗壮程度,以及苗的长势等有一定较大差异(见表 4)。综合生根的各方面表现,9 个处理中以 1/2 MS+0.5 mg/L IBA+0.3 mg/L NAA 效果最好。

表 4 不同激素质量浓度对比对泡桐组培苗生根的影响				
处理号	IAA/ (mg/L)	NAA/ (mg/L)	生根率	生长情况
1	0.5	0.3	100	苗壮、根壮、有愈伤
2	0.2	0.05	78	苗壮、根细、有愈伤
3	0.1	0	37	苗弱、根细、无愈伤
4	0	0.5	89	根细、苗弱、有愈伤

3 小结与讨论

本研究表明,在较大的激素质量浓度变幅内,利用楸叶泡桐杂交无性系 9503 枝条水培新生的萌芽,直接诱发不定芽,以及利用萌芽的叶片诱导愈伤组织、不定芽分化和生根培养等均可以获得成功,但各试验处理下的培养效果存在差异,这与其他泡桐种或无性系的相关研究结果类似。但 NAA 和 6-BA 对 9503 叶片愈伤组织诱导发生的影响,与其他泡桐的结果有较大不同,0.2 mg/L NAA 和 2 mg/L 6-BA 条件下均没有愈伤组织发生^[5-10],这可能与研究对象杂交母本楸叶泡桐与其他泡桐的遗传特性不同有关。

(下转第 52 页)

4 结 论

林木抚育不仅要有一套完整的技术措施做支撑,而且还要有相关适宜林木生长的政策和一定的经济基础以及专业的技术人员作保障,才能为保证幼林成活,促进林木生长,改善林木组成及提高森林生产率和生态系统的稳定性,实现森林的经济、社会、生态三大效益有机结合,促进林业全面协调健康发展,让绿水青山在向金山银山的转化中持续保值增值并释放出更多生态红利。

参考文献:

- [1] 王海刚,王立.我国幼龄林抚育管理现状及对策[J].乡村科

技,2017(19):40-41.

- [2] 宋丽清.浅谈森林抚育措施[J].内蒙古林业,2017(12):21-23.
[3] 赵德双.浅谈杨树速生丰产林抚育管理技术[J].防护林科技,2016,151(4):121,123.
[4] 姚松,房会普,孙小波,等.天然次生针阔混交林不同定株抚育强度下林木生长状况差异研究[J].信阳师范学院学报(自然科学版),2017,30(2):220-223.
[5] 刘文,王敏增,兰欣,等.抚育间伐强度对侧柏林及林下植被生长的影响[J].东北林业大学学报,2016,44(7):4-7,18.
[6] 曹春根,朱相雄,卢伟强.遂昌县森林抚育补贴试点模式研究[J].现代农业科技,2011(16):221,223.
[7] 陈康,聂煜,钟纪生.官山林场杉木大径材培育试验[J].江西林业科技,2004(4):16-18.

(上接第 45 页)

本研究还发现,与茎段直接生长的芽相比,经由愈伤组织再分化出的小芽生长更快,且在培养基中存活时间也较前者多 2 倍。茎段生长的小芽一般 1 个月就要继代 1 次,否则就会枯死,而愈伤诱导的小芽可以 2—3 个月继代 1 次。通过愈伤组织诱导的芽苗,容易脱去原植物体所携带的病原体,其脱毒率可达 60%^[3]。因此,利用泡桐愈伤组织生产泡桐无菌苗,能大大提高泡桐繁殖效率,防止丛枝病的传播,对林业生产具有重要意义。

参考文献:

- [1] 乔杰,王炜炜,王保平,等.楸叶泡桐嫁接无性系苗期生长优良品种选择[J].东北林业大学学报,2015,43(10):35-41
[2] 蒋建平.泡桐栽培学[M].北京:中国林业出版社,1990:32-33.

- [3] 李芳东,乔杰,王保平,等.中国泡桐属种质资源图谱[M].北京:中国林业出版社,2013:18.
[4] 宋玉民,乔勇进,焦其宏,等.楸叶桐资源保护与发展途径初探[J].山东林业科技,2000(增刊):50-51.
[5] 王安亭,杨晓娟,翟晓巧,等.毛泡桐体细胞胚胎发生及植株再生研究[J].河南农业大学学报,2005,39(1):46-50.
[6] 范国强,翟晓巧,蒋建平,等.不同种泡桐叶片愈伤组织诱导及其植株再生[J].林业科学,2002,38(1):29-35.
[7] IPEKCI Z, GOZUKIRMIZI N. Direct somatic embryogenesis and synthetic seed production from *Paulownia elongate* [J]. Plant Cell Reports, 2003, 22(1):16-24.
[8] 张变莉,王杨,刘荣宁,等.同源四倍体台湾泡桐体外植株再生系统的建立[J].河南农业科学,2015,44(7):119-123.
[9] 范国强,翟晓巧,李松林.泡桐愈伤组织再生植株的诱导与培养[J].植物学通报,2002,19(1):92-97.
[10] 曲金柱,崔波,马杰,等.白花泡桐叶柄愈伤组织再生植株的诱导与培养[J].信阳师范学院学报(自然科学版),2006,19(4):407-410.