

# 单叶刺槐组织培养研究

朱建峰, 杨敏生, 王进茂

(河北农业大学 林学院, 河北 保定 071001)

**摘 要:**以单叶刺槐(*Robinia. pseudoacacia*f. *unifolia*)带腋芽的茎段为外植体, 探讨不同植物激素 6-BA、IBA、NAA 对试管苗增殖以及植株再生的影响, 建立单叶刺槐离体培养技术体系。结果表明:启动最适培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L; 增殖最适培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L; 生根培养基为 1/2MS+IBA 50 mg/L, 预培养 7 d, 再转至 1/2MS<sub>0</sub>培养 10 d; 在此体系中诱导率可达 95.0%, 增殖系数可达 5.72, 生根率 83.3%, 移栽成活率可达到 100%。

**关键词:**单叶刺槐; 组织培养; 快速繁殖

**中图分类号:**S 722.37 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)02-0175-04

单叶刺槐(*Robinia. pseudoacacia*f. *unifolia*)属豆科刺槐属, 起源于北纬 43°~45°之间。对土壤条件的适应性很强, 喜湿润肥沃的中性沙壤土, 但也可以在干旱贫瘠的石砾、矿渣上生长, 可以忍耐 3% 的土壤含盐量, 能很好的适应城市环境, 耐寒、耐烟, 同时具有叶大、树形优美, 生长速度快等优点, 可用于沙滩修复和沙丘固定, 也可用于园林观赏绿化<sup>[1]</sup>。河北农业大学杨敏生教授于 2004 年从德国引进单叶刺槐, 现通过组织培养再生植株, 对其快速繁殖、种质资源保存和改良及规模化生产利用提供一定的参考价值。国内关于刺槐的组织培养报道较多<sup>[2-9]</sup>, 但单叶刺槐的组织培养快速繁殖尚未见报道。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

5 月份采自河北农业大学标本园内生长健壮、无病虫害的单叶刺槐 1 a 生枝条。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 材料处理** 室外采集的枝条用自来水冲洗表面尘垢后切成 3~4 cm 小段, 并剪除叶片, 留一部分叶柄, 用软毛笔蘸洗洁精轻轻刷洗, 再用自来水冲洗干净。于超净工作台上用 75% 的酒精表面消毒 30 s, 无菌水冲洗 3 次, 0.1% 的升汞消毒处理 6 min, 无菌水冲洗 4 次, 然后接种于启动培养基上。

**第一作者简介:**朱建峰(1983—), 男, 河北衡水人, 在读硕士, 现主要从事林业生物技术研究工作。E-mail: jianfeng666@tom.com。

**通讯作者:**王进茂(1969—), 男, 在读博士, 副教授, 硕士生导师, 现主要从事植物生理教学及生物研究工作。E-mail: lxwj@hebau.edu.cn。

**基金项目:**科技部“十一五”科技支撑计划资助项目(2006BAD03A0106); 国家林业局科技推广资助项目(200603)。

**收稿日期:**2009-08-20

**1.2.2 启动和增殖培养** 以 MS 培养基为基本培养基, 添加不同浓度的 6-BA、IBA 和 NAA 组成 4 种培养基, 每种培养基接种 50 瓶, 每瓶接 2 个外植体, 20 d 后统计腋芽的萌发率及萌发芽的生长状况; 同样以 MS 为基本培养基, 添加不同浓度的 6-BA 和 IBA、NAA 组成 16 种培养基, 每个处理接种 10 瓶, 每瓶接 3 株带 1 个芽的无菌材料, 3 次重复, 30 d 后统计增殖系数、芽长, 观察材料生长状况。

**1.2.3 生根培养** 切取高 2~3 cm 的单叶刺槐组培苗茎段作为试材, 进行如下处理, 一组间接生根培养, 即先将嫩茎接种于含有较高生长素浓度的 1/2MS 培养基中预培养 7 d, 然后转入 1/2MS<sub>0</sub>培养基诱导嫩茎生根; 另一组直接接种于含有较低生长素浓度的 1/2MS 培养基中诱导嫩茎生根。每种处理 30 个嫩茎进行生根培养, 3 次重复, 20 d 后统计生根情况, 观察材料状态。

**1.2.4 移栽** 练苗 5 d 后洗掉培养基移入蛭石、河沙(1:1)的育苗钵中, 放在温室内进行培养, 以移栽苗长出 2 片以上新叶为成活标准, 30 d 后统计成活率。

**1.2.5 培养条件** 以 MS 和 1/2MS 为基本培养基, MS 培养基含 3% 蔗糖 0.64% 琼脂; 1/2MS 培养基含 2.5% 蔗糖, 0.64% 琼脂, pH 值为 5.8。培养室温度 25~30℃, 光照度 1 400~1 600 lx, 光照周期 15 h/9 h。

## 2 结果与分析

### 2.1 启动培养

将单叶刺槐带腋芽的嫩茎段接种于启动培养基, 培养 5 d 后腋芽开始萌发, 12 d 后萌芽长至 2~3 cm 高, 观察发现外植体的萌发与培养基中有无激素有显著关系, 在加有激素的 2、3、4 号培养基中, 其萌发率和芽长都显著高于未加激素的 1 号培养基中的试材。但在 2、3、4 号培养基中萌发率和芽长并无明显差异, 说明对单叶刺槐萌发及生长起主要作用的是 6-BA, 而 NAA 和 IBA 作

用不明显(见表 1), 因此在综合考虑的条件下, 启动培养 MS+6-BA 1.0 mg/L 为宜。

表 1 不同浓度 6-BA、IBA、NAA 对单叶刺槐茎段启动培养的影响

培养基 编号	6-BA / mg · L <sup>-1</sup>	IBA / mg · L <sup>-1</sup>	NAA / mg · L <sup>-1</sup>	萌发率 / %	芽长 / cm	材料状态
1	—	—	—	65.0	2.67	芽生长缓慢, 长势弱
2	1.0	—	—	95.0	4.41	芽生长迅速, 无愈伤
3	1.0	0.2	—	92.4	4.00	芽生长迅速, 无愈伤
4	1.0	—	0.2	97.2	4.08	芽生长迅速, 有少量愈伤

2.2 增殖培养

启动培养基中培养 20 d 后, 将萌芽分别剪下, 转入增殖培养基中, 5 d 后出现少量愈伤, 10 d 后开始有芽点分化, 20 d 后整个茎段长成一丛小芽, 并伴有愈伤组织形成。经观察可以发现, 外殖体在加有 NAA 的培养基

与加有 IBA 的培养基相比, 愈伤组织生长更旺盛且分化系数更高, 分化出的芽子长势也更好, 由此可知 NAA 比 IBA 更有利于单叶刺槐茎段的增殖和生长。由表 2 可知, 随着 6-BA 浓度的增加增殖系数随之增加, 但当 6-BA 添加超过 1.0 mg/L 时, 增殖系数虽然还在增加, 但出现大量愈伤, 且愈伤上分化出的芽子出现了玻璃化及节间缩短、叶片皱缩变小等畸形生长现象, 说明 6-BA 的使用浓度在 1.0 mg/L 较为适宜, 低于或超过这个浓度对单叶刺槐茎段的增殖和生长都是不利的。由表 2 及图 1 可知不同培养基中单叶刺槐均有一定程度的增殖, 但以 14 号培养基增殖效果最好, 增殖系数达 5.72, 苗高 3.58 cm。因此增殖培养基以 MS+6-BA 1.0 mg/L +NAA 0.2 mg/L 为宜。

表 2 MS 培养基中添加不同浓度的激素组合对丛生芽诱导的影响

培养基 编号	6-BA / mg · L <sup>-1</sup>	IBA / mg · L <sup>-1</sup>	NAA / mg · L <sup>-1</sup>	增殖系数 / 倍	芽长 / cm	材料状态
1	0.5	0.1		3.38	2.67	生长正常 无愈伤
2	1.0	0.1		4.38	2.41	生长正常 无愈伤
3	1.5	0.1		5.00	2.00	出现玻璃化现象, 有少量愈伤
4	2.0	0.1		5.19	2.08	玻璃化现象严重, 愈伤较多
5	0.5	0.2		5.22	2.83	生长正常 无愈伤
6	1.0	0.2		5.08	2.91	出现玻璃化现象, 有少量愈伤
7	1.5	0.2		5.32	2.08	出现玻璃化现象, 有少量愈伤
8	2.0	0.2		4.86	2.50	玻璃化现象严重, 愈伤较多
9	0.5		0.1	3.47	2.58	生长正常 有少量愈伤
10	1.0		0.1	4.83	2.66	生长正常 有少量愈伤
11	1.5		0.1	5.09	2.58	生长正常 有少量愈伤
12	2.0		0.1	6.21	2.67	玻璃化现象严重, 愈伤较多
13	0.5		0.2	2.79	2.60	生长正常 有少量愈伤
14	1.0		0.2	5.72	3.58	生长正常 有少量愈伤
15	1.5		0.2	4.87	2.91	出现玻璃化现象, 有少量愈伤
16	2.0		0.2	6.42	2.82	玻璃化现象严重, 愈伤较多

注: 增殖系数为腋芽萌生数和基部丛生芽数之和与接种外植体数之比。



图 1 单叶刺槐在增殖培养基中生长情况

注: 左: MS<sub>0</sub>; 右: 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L。

2.3 生根培养

2.3.1 直接诱导试管苗生根过程中激素对单叶刺槐生根的影响 将单叶刺槐无根试管苗转入生根培养基中,

20 d 时观察生根情况(表 3), 结果表明, 在 1、2、3 号培养基中随着 IBA 浓度的增加生根率逐渐增大, 最高生根率达 30.8%, 幼苗长势弱, 叶色发黄。在 4、5、6 号培养基中随着 NAA 浓度的增加生根率也逐渐增大, 当 NAA 浓度为 0.3 mg/L 时生根率最高达 40.0%, 但当超过该浓度时生根率有所下降, 幼苗长势弱, 叶色发黄。1、2、3 号培养基与 4、5、6 号培养基相比较, 可以发现 NAA 与 IBA 的诱导生根方式有所不同, 在加有 IBA 的培养基中, 无愈伤或仅有少量愈伤便可出现根的分化, 且 1 条主根长出后, 在主根上多发须根; 在加有 NAA 的培养基中, 茎基部先长出一定量的愈伤, 再在愈伤上长出根, 且根短、愈伤化、须根少、易于脱落。

2.3.2 预培养对单叶刺槐生根的影响 在含有较高生长素浓度的 7~14 号培养基中预培养 7 d, 再转至 1/2MS<sub>0</sub> 培养基中培养 10 d 后统计生根情况(表 4), 从表中数据可看出, 20~70 mg/L 的 IBA、NAA 均可诱导单

叶刺槐试管苗生根, 在加有 IBA 的培养基中预培养, 随着 IBA 浓度的增加生根率逐渐增大, 当 IBA 浓度为 50 mg/L 生根率最高可达 83.3%, 根条数 5.4 条, 但当 IBA 浓度超过 50 mg/L 时生根率有所下降, 且根色出现发黑的现象。在加有 NAA 的培养基中预培养, 随着 NAA 浓度的增加生根率逐渐增大, 当 NAA 浓度为 35 mg/L 生根率最高可达 64.3%, 根条数 2.4 条, 但当 NAA 浓度超过 35 mg/L 时生根率有所下降。同时还可以观察到, 经过预培养后生根, 植株在分别加有 IBA 与

NAA 的培养基中诱导生根方式与在直接诱导生根培养基中观察到的现象是相一致的(如图 2 所示), 说明 NAA 和 IBA 在诱导单叶刺槐生根方式上存在差异。由表 3、4 可看出, 经过预培养的组培苗比直接诱导生根的组培苗, 无论是生根率还是生根质量都要好, 因此 1/2MS+IBA 50 mg/L 中预培养 7 d 再转至 1/2MS<sub>0</sub> 培养基中生根, 是单叶刺槐组培苗的最佳生根方法, 生根率达 83.3%, 平均生根数 5.4 条。

表 3 不同激素配比对单叶刺槐生根的影响

培养基 编号	IBA / mg · L <sup>-1</sup>	NAA / mg · L <sup>-1</sup>	生根率 / %	根条数 / 条	根长 / cm	生根及组培苗生长情况
1	0.2	—	25.0	3.0	2.1	茎基部发根, 根粗, 基本无愈伤, 植株叶色发黄, 生长慢
2	0.3	—	29.2	1.5	2.5	茎基部发根, 根粗, 有少量须根, 植株叶色发黄, 生长慢
3	0.5	—	30.8	2.0	3.0	茎基部发根, 根粗且短, 有少量愈伤, 植株叶色下部发黄, 生长一般
4	—	0.2	27.3	3.0	0.5	茎基部长出少量愈伤, 在愈伤处有根长出, 植株叶色发黄, 生长慢
5	—	0.3	40.0	3.5	1.0	茎基部长出愈伤, 在愈伤处有根长出, 叶色发黄, 生长慢
6	—	0.5	28.6	3.3	0.7	茎基部有大量愈伤长出, 在愈伤处有根生出, 易于脱落, 植株叶色发黄, 生长慢

表 4 预培养过程中不同浓度的 NAA、IBA 对单叶刺槐生根的影响

培养基 编号	IBA / mg · L <sup>-1</sup>	NAA / mg · L <sup>-1</sup>	生根率 / %	根条数 / 条	根长 / cm	生根及组培苗生长情况
7	20	—	63.4	3.5	1.5	根由茎基部生长, 基本无愈伤, 植株叶色正长, 生长较快
8	35	—	76.9	4.3	2.7	根由茎基部生长, 有少量愈伤, 植株叶色正长, 生长较快
9	50	—	83.3	5.4	4.0	根由茎基部生长, 有少量愈伤, 主根上多发须根, 植株叶色正长, 生长较快
10	70	—	75.3	4.0	3.0	根由茎基部生长, 有少量愈伤, 根为黑褐色, 须根少, 植株叶色发黄, 生长缓慢
11	—	20	50.0	2.5	2.5	茎基部愈伤, 在愈伤处有根长出, 根较短, 植株叶色正常, 生长一般
12	—	35	64.3	2.4	3.5	茎基部愈伤, 在愈伤处有根长出, 根较短, 有少量须根, 植株叶色正常, 生长较慢
13	—	50	44.4	3.7	4.3	茎基部愈伤量较大, 在愈伤表面有根生出, 根色发白, 愈伤质地松软, 植株叶色黄, 生长较慢
14	—	70	37.3	2.3	3.1	同上

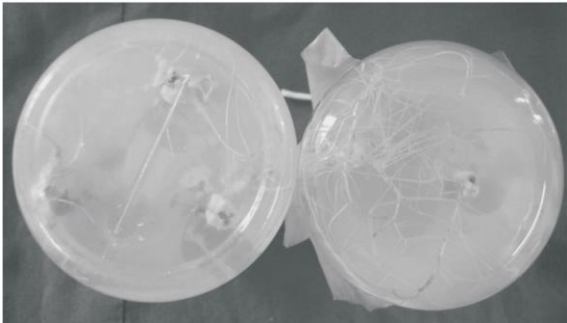


图 2 预培养过程中不同浓度的 NAA、IBA 对单叶刺槐生根的影响

注: 左 1/2MS+NAA 50 mg/L; 右 1/2MS+IBA 50 mg/L。



图 3 移栽苗在营养钵中生长情况

2.4 移栽

生根培养 20 d 后, 选取生根条数多生长健壮的组培苗去掉瓶盖, 在瓶内倒少许水, 于组培室内练苗 5 d, 然后洗掉培养基移入蛭石: 河沙(1:1)的育苗钵中, 放在温室内进行培养, 定期浇以稀释 10 倍的 MS 培养液, 以移栽苗长出 2 片以上新叶为成活标准, 30 d 后统计成活

率达 100%。

3 结论与讨论

建立适宜单叶刺槐的组培快繁体系, 即启动培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L, 增殖培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L 和生根培养基为 1/2MS+IBA 50 mg/L 预培养 7 d 再转至 1/2MS<sub>0</sub> 培养基中培养, 此体系建立, 为这一品种的规模化育苗奠定了技术基础。

研究过程中发现, 单叶刺槐组培苗在培养过程中, 易发生玻璃化现象, 这与任建武、任东岁等<sup>[7-8]</sup>的研究是一致的, 通过添加适宜种类和浓度的激素可以控制单叶刺槐玻璃化现象, 其它一些方法如通气、调节 pH 值<sup>[9]</sup>、改变光照强度等对单叶刺槐玻璃化的影响, 有待进一步研究。

单叶刺槐的组织培养与其它豆科刺槐属的植物相似, 组培苗较难生根, 这与杜鹃等<sup>[10]</sup>的报道是相一致的, 但通过在含有较高生长素浓度的培养基上预培养, 可大大提高其生根率和生根的质量, 也说明低浓度的生长素不能很好的刺激组培苗生根, 但高浓度的生长素长期存在又对根的生长起到抑制作用, 采用预培养的方法, 很好的克服了这个矛盾, 达到了较好的生根效果。同时可以观察到, 在加有 IBA 与 NAA 的培养基中生根方式不同, 李云等<sup>[11]</sup>所做的四倍体刺槐生根试验中也得出相似结论。在加有 IBA 的培养基中, 形成愈伤或形成少量愈伤便可出现根的分化, 在加有 NAA 的培养基中, 根部会在长出一定量的愈伤后, 再在愈伤上生根, 根表现出粗短、愈伤化等畸形现象, 后期移栽成活率低。

#### 参考文献

- [1] 赵梁军. 刺槐新品种—无刺红花刺槐[J]. 中国花卉园艺, 2004(9): 40—42.
- [2] 王树芝, 田砚亭, 罗晓芳. 刺槐的离体培养研究进展[J]. 河北林果研究, 1999, 14(4): 368—371.
- [3] 栾庆书, 罗凤霞. 刺槐组织培养研究现状[J]. 辽宁林业科技, 2001(5): 28—31.
- [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] 张新叶, 蔡晨, 胡兴宜. 四倍体刺槐的组织培养研究[J]. 湖北林业科技, 2002(4): 4—6.
- [6] Luan Q S, Luo F X. Shoot tissue culture of *Robinia pseudoacacia* f. *decaisneana* [J]. Journal of Forestry Research, 2002, 13(1): 51—55.
- [7] 任建武. 四倍体刺槐试管苗玻璃化研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(12): 4867—4868, 4950.
- [8] 任东岁, 段新玲, 张卫芳, 等. 毛刺槐试管无性系的建立[J]. 塔里木农垦大学学报, 2000, 12(1): 5—8, 12.
- [9] 黄茶英, 刘青林. 激素、通气和 pH 值对四倍体刺槐和二乔刺槐离体生长的影响[J]. 中南林学院学报, 2003, 23(5): 38—41.
- [10] 杜娟, 甄志先, 王进茂, 等. 预培养在刺槐试管苗生根中的作用[J]. 河北农业大学学报, 2007, 30(5): 57—61.
- [11] 李云, 田砚亭, 钱永强, 等. NAA 和 IBA 对四倍体刺槐试管苗生根影响及不定根发育过程解剖观察[J]. 林业科学, 2004, 40(5): 75—80.

## Tissue Culture of *Robinia. pseudoacacia* f. *unifolia*

ZHU Jian-feng, YANG Min-sheng, WANG Jin-mao

(Forestry College, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071001)

**Abstract:** Stems with axillaries bud of *Robinia. pseudoacacia* f. *unifolia* were used as explants, this paper probed into the effects of 6-BA, NAA, IBA on proliferation and plantlet regeneration of *Robinia. pseudoacacia* f. *unifolia*. The results showed that the medium suitable for bud germination was MS+6-BA 1.0 mg/L; The optimum multiplication culture medium was MS+BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L; The rooting culture medium was that the clones were cultured 7 d in 1/2MS+IBA 50 mg/L, then were cultured 10 d in 1/2MS<sub>0</sub> medium. In this system, the rate of induction of 95.0% the highest propagation coefficient was 5.72 and the rooting rate was 83.3% and the survived plantlets rate of transplant was 100%.

**Key words:** *Robinia. pseudoacacia* f. *unifolia*; tissue culture; rapid propagation

## 白菜贮存期间窖内管理

**前期:**放风量要大,放风时间要长。下窖初期要打开全部通风口,鼓风机、排风扇、昼夜开放,随着气温下降逐渐减少通风面积,压缩放风时间。

**中期:**风要放透,使库内各部位均达到适宜的

温湿度,控制风口大小,延长放风时间,放细长风,不使库温骤变。

**后期:**随着天气转暖,逐渐加大放风量,要放夜间的凉风,白天停止放风,把相对湿度控制在 85%。