

马媛春,刘 慧,薛晓辉,等. 黄连木茎段组培快繁体系的建立[J]. 江苏农业科学,2018,46(24):67-70.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.24.015

黄连木茎段组培快繁体系的建立

马媛春^{1,2}, 刘 慧², 薛晓辉³, 程宗明²

(1. 江苏省农业科学院果树研究所/江苏省高效园艺作物遗传改良重点实验室, 江苏南京 210014;
2. 南京农业大学园艺学院, 江苏南京 210095; 3. 江苏省海安市林果技术推广站, 江苏海安 226600)

摘要:以黄连木(*Pistacia chinensis* Bunge)当年生带芽嫩枝为外植体,研究基本培养基(WPM,MS)对黄连木腋芽诱导、无菌苗增殖扩繁以及生根的影响,同时研究细胞分裂素类生长调节剂 6-苄氨基腺嘌呤(6-BA)与细胞生长素吲哚丁酸(IBA)、萘乙酸(NAA)的配比、种类等因素对黄连木成苗的影响。结果表明,当基础培养基为 WPM 时,有助于黄连木腋芽的诱导和组培苗的生根,而当基础培养基为 MS 培养基时,更有利于提高无菌苗的增殖扩繁率。试验结果还表明,1/2 WPM + 1.5 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA + 0.1 mg/L IBA 为最佳腋芽诱导培养基,当培养基配方为 MS + 3.5 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA 时,增殖效果最佳,生根培养基以 1/2 WPM + 0.02 mg/L NAA + 1 mg/L IBA 效果较好。

关键词:黄连木;茎段;组培快繁体系;培养基

中图分类号: S723.1⁺32.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)24-0067-04

黄连木(*Pistacia chinensis* Bunge), 英文名为 Chinese pistache,属于漆树科黄连木属,别称黄楝树、黄连茶、楷树、药树、药瘤树等,其树干挺拔,树形美观,树叶繁茂秀丽,可作为庭阴树、行道树及观赏风景树^[1]。此外,黄连木也是一种优良的木材、药用和油料树种^[2]。近年来,人们对黄连木的研究主要集中于黄连木作为能源树种的经济价值、作为彩色叶树种拥有的景观价值,以及作为药用植物的社会价值。

常规的黄连木繁殖方法有籽播育苗、嫁接和扦插等,然而

由于黄连木种子外被蜡质,属于深根类型,直接播种发芽较为困难,需要对种子进行脱蜡处理,然后再进行低温层积处理^[3-6]。嫁接和扦插繁殖对于环境要求较高,繁殖率较低,已不能满足消费者的需求。

目前,由于江苏省东部沿海滩涂盐碱浓度较高,极少有观赏植物能够正常生长,为了改变这一现状,应加大力度引进具有抗盐能力的景观植物。本研究所试种的黄连木来自美国海滨弗吉尼亚州,具有一定的耐盐能力。组织培养技术能够克服常规繁殖方法繁殖系数低的缺点,从而降低培养成本,提高经济效益,实现良种快繁并达到产业化发展的客观需求。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验所用材料为一年生黄连木实生苗(种子来自美国

收稿日期:2017-06-29

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(14)2051]。

作者简介:马媛春(1986—),女,甘肃临夏人,博士,助理研究员,主要从事果树系统生物学研究。E-mail:myc@jaas.ac.cn。

通信作者:程宗明,博士,教授,主要从事果树系统生物学研究。E-mail:zmc@njau.edu.cn。

- [9] Collingridge G, Olsen R J, Spedding M. A nomenclature for ligand-gated ion channels[J]. *Neuropharmacology*, 2009, 56(1): 2-5.
- [10] Straub C. Distinct functions of kainate receptors in the brain are determined by the auxiliary subunit Neto1 [J]. *Nature Neuroscience*, 2011, 14(7): 866-873.
- [11] Lerma J, Marques J M. Kainate receptors in health and disease[J]. *Neuron*, 2013, 80(2): 292-311.
- [12] Kidd F L, Isaac J T. Developmental and activity-dependent regulation of kainate receptors at thalamocortical synapses [J]. *Nature*, 1999, 400(6744): 569-573.
- [13] Zhang W, St-Gelais F, Grabner C P, et al. A transmembrane accessory subunit that modulates kainate-type glutamate receptors [J]. *Neuron*, 2009, 61(3): 385-396.
- [14] Sheng N Y, Shi Y S, Nicoll R A. Amino-terminal domains of kainate receptors determine the differential dependence on Neto auxiliary subunits for trafficking [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114

(5): 1159-1164.

- [15] Tang M, Ivakine E, Mahadevan V, et al. Neto2 interacts with the scaffolding protein GRIP and regulates synaptic abundance of kainate receptors[J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e51433.
- [16] Vernon C G, Swanson G T. Neto2 assembles with kainate receptors in DRG neurons during development and modulates neurite outgrowth in adult sensory neurons[J]. *Journal of Neuroscience the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 2017, 37(12): 3352-3363.
- [17] 韦雪芳, 王冬梅, 刘 思, 等. 信号肽及其在蛋白质表达中的应用[J]. *生物技术通报*, 2006, 22(6): 38-42.
- [18] 章晓联. 蛋白糖基化与免疫[J]. *中国免疫学杂志*, 2004, 20(4): 290-293.
- [19] 刘振宇, 谢荔岩, 吴祖建, 等. 孔石莼质体蓝素氨基酸序列分析和分子进化[J]. *分子植物育种*, 2005, 3(2): 203-208.
- [20] 杭柏林, 徐 军, 胡建和. 鸡内源性抗菌肽 LEAP-2 的生物信息学分析[J]. *江苏农业科学*, 2018, 46(6): 46-50.

海滨弗吉尼亚州)。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的准备与培养 选取长势优良且健壮的黄连木植株的当年生嫩枝,去除叶片,用流水冲洗 2 h 左右,剪成 15~20 cm 长的带腋芽的茎段备用(图 1)。在超净工作台上对外植体进行灭菌处理,先将茎段剪成 1~2 cm 左右(带 1 个腋芽)的若干小段,用 70% 乙醇溶液消毒 30 s,其间不断摇晃,之后用无菌水冲洗 3 次,然后用 0.1% 氯化汞溶液消毒 10 min,消毒后立即用无菌水冲洗 5 次,最后用无菌滤纸吸干材料表面的水分,准备好单芽茎段用于接种^[7]。



从左到右为当年生黄连木不同节位的嫩枝条
图1 试验用黄连木材料

1.2.2 黄连木腋芽的诱导培养 将已处理的无菌茎段斜插于腋芽诱导培养基上进行诱导培养。所选取的诱导培养基以 MS、WPM 为基本培养基,并添加不同浓度的 6-苄氨基腺嘌呤(6-BA)、萘乙酸(NAA)、吲哚丁酸(IBA),共组成 6 种培养基(表 1)。将外植体接种到 6 种培养基上,每瓶 2 个,每种培养基接种 20 瓶。于黑暗环境下培养,以减少褐化现象,培养温度为(25±2)℃,培养 3 d 后置于光照条件下培养^[8]。培养基中蔗糖浓度均为 30 g/L,琼脂浓度为 5.6 g/L,pH 值为 5.8,光照时间为 14 h/d,光照度为 100 μmol/(m²·s),培养湿度为 70%~80%。观察离体芽的诱导培养情况,20 d 后进行统计调查。

调查统计所用的相关公式:萌发率=(萌发外植体数/接种

表 1 6 种培养基组成成分

基本培养基	6-BA 浓度 (mg/L)	NAA 浓度 (mg/L)	IBA 浓度 (mg/L)
MS	0.5	0.05	0.1
MS	1.0	0.10	0.2
MS	1.5	0.20	0.3
1/2 WPM	0.5	0.20	0.2
1/2 WPM	1.0	0.05	0.3
1/2 WPM	1.5	0.10	0.1

表 2 不同培养基对黄连木腋芽萌发的影响

基本培养基	6-BA 浓度 (mg/L)	NAA 浓度 (mg/L)	IBA 浓度 (mg/L)	接种芽数 (个)	丛生芽数 (个)	萌芽率 (%)	褐化率 (%)	分化率 (%)	生长情况
MS	0.5	0.05	0.1	20	1	5	65	100.0	丛生芽少
MS	1.0	0.10	0.2	20	0	0	70	0	丛生芽少
MS	1.5	0.20	0.3	20	0	0	40	0	无丛生芽
1/2 WPM	0.5	0.20	0.2	20	5	25	10	33.3	丛生芽较少,节间短
1/2 WPM	1.0	0.05	0.3	20	3	15	15	27.3	丛生芽多,节间短
1/2 WPM	1.5	0.10	0.1	20	11	55	10	91.7	丛生芽较多,节间较长,生长粗壮

外植体数)×100%;褐化率=(褐化茎段数/接种茎段数)×100%;分化率=[分化数/(接种数-褐化数-污染数)]×100%。
1.2.3 丛生芽的继代增殖培养 将在诱导培养基上已经诱导培养 20 d 后的嫩芽剪切成 1 cm 左右的带芽茎段,进行丛生芽诱导。以 MS、WPM 及 1/2 WPM 为基本培养基,附加不同浓度的 6-BA、NAA,每个处理接种 20 瓶,每瓶接种 1 个茎段,重复 3 次。培养 30 d 后对材料的增殖系数、苗高及组培苗的生长状况进行观察并作统计分析。以上培养基中蔗糖浓度为 30 g/L,琼脂浓度为 5.6 g/L,pH 值均为 5.8,培养温度为(25±2)℃,光照时间为 14 h/d,光照度为 100 μmol/(m²·s)。

调查增殖系数、苗高、生长形态等,相关公式如下:增殖系数=调查时的芽数-接种芽数;苗高=调查时的苗高-接种时的苗高。

1.2.4 组培苗的生根培养 以继代培养的组培苗为试验材料,选取生长健壮的组培苗,将增殖生成的丛生芽分株,每个芽为 1 株苗,接种到生根培养基上。每个培养基接种 20 株,重复 3 次,50 d 后开始调查统计每种培养基的生根苗数及平均生根数。培养基中蔗糖浓度为 30 g/L,琼脂浓度为 5.6 g/L,pH 值为 5.8,培养温度为(25±2)℃,光照时间为 14 h/d,光照度为 100 μmol/(m²·s)。

1.2.5 生根组培苗的驯化与移栽

1.2.5.1 驯化 将生根良好、根系健壮的组培苗瓶盖拧松,放置在无菌环境下 3 d 后,每 2 d 加入微量无菌水,光照度设为 100 μmol/(m²·s),光照时间设为 12 h/d。并且逐渐开盖,第 10 天时彻底开盖,并及时补充适当水分(无菌水)。

1.2.5.2 移栽 将未污染、长势良好的驯化组培苗取出,用无菌水冲洗附着在根系上的培养基,勿伤及根部,接着修剪基部叶片,保留顶端长势好的复叶 3~5 张,然后移栽至基质中,放入人工气候培养箱内进行培养。所选基质为蛭石、草炭土、珍珠岩,其体积比为 9:3:1,放入高压蒸汽灭菌锅内于 121℃ 灭菌 30 min。人工气候培养箱中的温度为 25℃,相对湿度为 80%,光照度为 100 μmol/(m²·s),光照时间为 12 h/d。移栽 7 d 后进行相关数据的统计。

1.3 统计分析

采用 Excel 和 SPSS 软件进行数据统计与分析。

2 结果与分析

2.1 离体芽的诱导培养结果

通过预试验发现,采用 MS、WPM、1/2 WPM 为基本培养基时,未取得腋芽萌发效果。由此可以看出,基本培养基不适合用于黄连木的腋芽萌发试验。在预试验的基础上,添加细胞分裂素类生长调节剂 6-BA 以及细胞生长素 NAA 和 IBA。由表 2 可以明显看出,在黄连木腋芽诱导时期,基本培养基为

MS 的 3 种培养基褐化率较高,萌发率极低,基本无从生芽;当培养基为 1/2 WPM + 1.5 mg/L 6 - BA + 0.10 mg/L NAA + 0.10 mg/L IBA 时,丛生芽较多,叶色较嫩绿,节间较长,生长粗壮,分化率达到 91.7% (图 2)。通过 6 种培养基的对比可知,影响黄连木腋芽诱导的因素主次顺序为基本培养基 > 细胞分裂素 > 细胞生长素,因此可见,细胞分裂素类生长调节剂 6 - BA 的浓度对分化率的影响较大,当 6 - BA 浓度达到 1.5 mg/L 时,分化率最高,长势最好。



图2 培养基为1/2 WPM+1.5 mg/L 6-BA +0.1 mg/L NAA +0.1 mg/L IBA的诱导培养情况

2.2 丛生芽的继代增殖培养结果

在黄连木继代增殖培养前期,经过不间断的反复试验,发现在细胞分裂素与细胞生长素共同作用的情况下,丛生芽的增殖数较多,当细胞分裂素类生长调节剂 6 - BA 的浓度达到 3.5 mg/L 时,增殖倍数最高。由表 3 可以看出,在黄连木继代增殖培养时期,在 3 种培养基上培养 30 d 后,芽的增殖倍数和生长情况存在差异,在 WPM + 3.5 mg/L 6 - BA + 0.2 mg/L NAA 培养基上的丛生芽较少,节间短,畸形苗多,玻璃化严重;在 1/2 WPM + 3.5 mg/L 6 - BA + 0.2 mg/L NAA 培养基上的丛生芽密集,微型化,畸形苗较多,玻璃化严重 (图 3); 而在培养基 MS + 3.5 mg/L 6 - BA + 0.2 mg/L NAA 培养基上的丛生芽较多,苗生长健壮,生长速度较快 (图 4)。综合这 3 种培养基的研究结果以及本试验的前期研究可以看出,除了细胞分裂素类和生长素类生长调节剂的用量配比对黄连木继代增殖比较重要以外,基本培养基的选用对于黄连木继代增殖也极为重要。经过 3 次重复试验筛选出的适宜黄连木继代增殖培养的最佳培养基配方为 MS + 3.5 mg/L 6 - BA + 0.2 mg/L NAA。

表 3 不同培养基对黄连木继代增殖的影响

基本培养基	6 - BA 浓度 (mg/L)	NAA 浓度 (mg/L)	接种芽数量 (个)	增殖芽数量 (个)	增殖倍数	生长情况
MS	3.5	0.2	35	133	3.8b	丛生芽多,苗生长健壮
1/2 WPM	3.5	0.2	35	217	6.2a	节间短,丛生芽密集,微型化
WPM	3.5	0.2	35	66	1.9c	有丛生芽,有畸形苗



图3 培养基为1/2 WPM+3.5 mg/L 6-BA +0.2 mg/L NAA的继代增殖培养情况

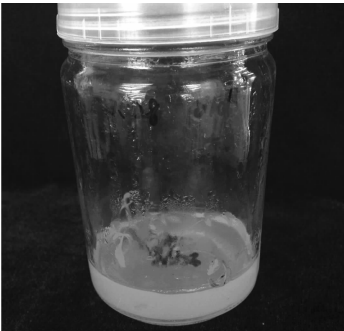


图4 培养基为MS+3.5 mg/L 6-BA +0.2 mg/L NAA的继代增殖培养情况

2.3 组培苗的生根培养结果

在试验前期,采用 MS 为基本培养基进行生根培养,未取得生根效果。随后,以 1/2 MS、WPM、1/2 WPM 为基本培养基进行试验,结果表明,以 WPM 为基本培养基时无生根效果,因此可以得出结论:降低培养基无机盐浓度,有利于不定根的发生^[9]。外源生长素对生根有一定的促进作用,但外当源生长素的浓度超过一定限度时,组培苗的生长又呈下降趋势。当以 1/2 MS 为基本培养基时,单独添加不同浓度的 NAA 诱导黄连木苗生根,发现其生根效果不佳;当 NAA 浓度

为 0.02 mg/L 时,生根率最高;而当 NAA 浓度在 0.2 mg/L 及以上时,基本无发根 (表 4)。

在以上试验的基础上,添加 IBA 与 NAA 组合作用,继续筛选适合生根的培养基。由表 5 可以看出,IBA 能够较好地诱导生根,但是浓度大于 1 mg/L 时,效果下降;基本培养基为 1/2 WPM 时比 1/2 MS 的生根效果好。培养基为 1/2 WPM + 0.02 mg/L NAA + 1 mg/L IBA 时生根效果最佳 (图 5),培养基为 1/2 WPM + 0.02 mg/L NAA + 2 mg/L IBA 时,根系粗短,不适宜移栽 (图 6)。

表 4 不同浓度 NAA 对生根的影响

培养基	接种芽数(个)	生根苗数(株)	生根率(%)	生长情况
1/2 MS + 0.02 mg/L NAA	20	5	25	发根早,根粗壮,平均生根数多
1/2 MS + 0.05 mg/L NAA	20	2	10	发根晚,根系细弱
1/2 MS + 0.10 mg/LNAA	20	2	10	发根晚,根系细弱
1/2 MS + 0.20 mg/L NAA	20	0	0	未发根

表 5 不同培养基生根诱导的影响

基本培养基	IBA 浓度 (mg/L)	NAA 浓度 (mg/L)	接种芽数 (个)	生根苗数 (株)	生根率 (%)	生长情况
1/2 WPM	1	0.02	20	9	45	发根早,根系粗壮
1/2 WPM	2	0.02	20	9	45	根系粗短
1/2 WPM	3	0.02	20	5	25	生根数少
1/2 MS	1	0.02	20	4	20	发根早,根系健壮
1/2 MS	2	0.02	20	5	25	根系短,生根数较少
1/2 MS	3	0.02	20	3	15	生根数少

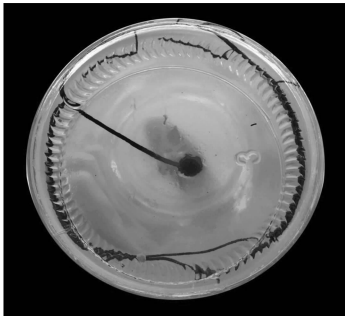


图5 培养基为 1/2 WPM+0.02 mg/L NAA+1.0 mg/L IBA 的生根培养情况



图6 培养基为 1/2 WPM+0.02 mg/L NAA+2.0 mg/L IBA 的生根培养情况

2.4 组培苗的驯化与移栽

将黄连木生根组培苗在驯化 10 d 后移栽,然后于人工气候培养箱中放置 20 d,再过渡到自然环境下生长,苗木移栽成活率可达 67% 以上(图 7)。

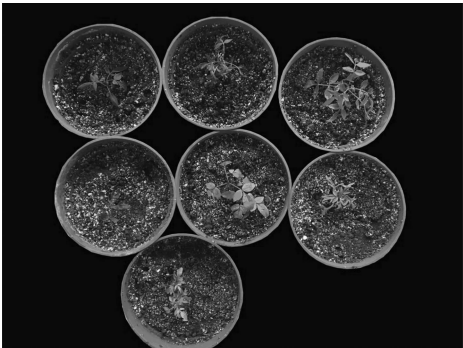


图7 移栽成活后的黄连木

3 结论与讨论

黄连木组织培养难度较大,在初代阶段的褐化率较高,烧苗现象严重;在继代时期,组培苗玻璃化严重,易产生畸形苗,

从而影响试验的进行;在诱导生根阶段,大部分根系呈黑色,且组培苗生长缓慢,总体生根率不高^[10]。利用黄连木茎段进行组培快繁,筛选出的最佳腋芽诱导培养基为 1/2 WPM + 1.5 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA + 0.1 mg/L IBA。在继代增殖时期,MS + 3.5 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA 培养基的增殖效果最佳,生根效果以 1/2 WPM + 0.02 mg/L NAA + 1.0 mg/L IBA 配方的培养基较好。

本试验发现,基本培养基的选用对于黄连木初代腋芽诱导极为重要;细胞分裂素类生长调节剂与细胞生长素的配比是影响黄连木继代增殖的重要因素;影响黄连木生根培养的因素很多,包括无机盐浓度、是否添加细胞分裂素、不同细胞生长素的作用、多种细胞生长素的协调作用配比等^[11-12]。

黄连木组培快繁体系的建立,大大缩短了繁殖周期,降低了生产成本,也能够解决种子繁殖所带来的观赏形态不一的缺点。本试验建立了可供海滨生长的黄连木从腋芽诱导、增殖、生根、炼苗到移栽的快繁体系,从而为黄连木工厂化生产提供了理论依据。

参考文献:

[1] 陈有民. 园林树木学[M]. 北京:中国林业出版社,1988:57.
[2] 蒲志鹏,王卫刚,蒋建新,等. 黄连木生物柴油及其低温流动性性能研究[J]. 北京林业大学学报,2009,31(增刊1):56-61.
[3] 徐金燕,石玉琴. 中国黄连木播种育苗技术[J]. 经济林研究,2001,19(4):35.
[4] 柳振亮,李树蓉,苏淑钗. 北京地区阿月浑子嫁接繁殖的研究[J]. 北京林业大学学报,2004,26(5):85-88.
[5] 杨 镇,杨华生,王志彦. 黄连木嫩枝扦插育苗研究[J]. 河北林果研究,1997,12(1):31-34.
[6] 秦 飞,郭同斌,刘忠刚,等. 中国黄连木研究综述[J]. 经济林研究,2007,25(4):90-96.
[7] 王 蒂,陈劲枫,朱延明,等. 植物组织培养[M]. 北京:中国农业出版社,2004:27-30.
[8] 杨 博,韩振海,张 永,等. 不同光照强度对玫瑰组织培养中初代培养物褐化的影响[J]. 中国农学通报,2003,19(6):194-196.
[9] 沈惠娟. 木本植物组织培养技术[M]. 北京:中国农业科技出版社,1992.
[10] 陈雪莲,陆六一,姜春武. 黄连木组织培养研究初报[J]. 安徽农业科学,2009,37(3):974-975.
[11] 程世平,施 江,史国安,等. 黄连木茎尖组培快繁技术研究[J]. 江苏农业科学,2010(6):66-68.
[12] 王冬梅,黄学林,黄上志. 细胞分裂素类物质在植物组织培养中的作用机制[J]. 植物生理学通讯,1996,32(5):373-377.