

白花泡桐优树试管嫁接幼化及组培快繁技术研究

邓建军, 李芳东, 乔杰, 刘昌勇, 夏辛, 黄琳

(国家林业局泡桐研究开发中心, 郑州 450003)

摘要:以白花泡桐优树‘白优2号’为试验材料,通过组织培养和试管嫁接方法,对白花泡桐优树材料的幼化技术进行了研究。结果表明:外植体初代培养萌发的嫩芽为最适合的接穗;‘建始桐3号’为试管嫁接较合适的砧木;采用劈接进行;MS+NAA 0.3 mg·L⁻¹+蔗糖 30 g·L⁻¹为试管嫁接培养基;继代增殖和生根培养基分别为1/2MS+6-BA 6.0 mg·L⁻¹+NAA 0.3 mg·L⁻¹+蔗糖 20 g·L⁻¹和1/2MS+NAA 0.1 mg·L⁻¹。

关键词:白花泡桐;优树;组培快繁;试管嫁接;幼化

中图分类号:S723.1

文献标识码:A

Study on Grafted Tissue Rejuvenation Technology and Rapid Propagation of *Paulownia fortunei* Superior Trees

DENG Jian-jun, LI Fang-dong, QIAO Jie, LIU Chang-yong, XIA Xin, HUANG Lin

(Paulownia Research & Development Center of the State Forestry Administration, Zhengzhou 450003, He'nan, China)

Abstract: *Paulownia fortunei* superior trees “Baiyou 2” were used as trial materials to explore the rejuvenation technology of *P. fortunei* superior tree by tissue culture and *in vitro* grafting. The results are as follows: (1) The sprouting of explant is the most suitable scion; (2) The *Paulownia* variety “Jianshi 3” is a good rootstock; (3) Split grafting is a suitable; (4) 1/2 MS+6-BA 4.0 mg·L⁻¹+NAA 0.3 mg·L⁻¹ is the most appropriate medium for *in vitro* grafting, 1/2 MS+6-BA 6.0 mg·L⁻¹+NAA 0.3 mg·L⁻¹+Sucrose 20 g·L⁻¹ is the most appropriate for multiplication and 1/2 MS+NAA 0.1 mg·L⁻¹ is the most appropriate for rooting. The old *Paulownia* superior tree material was rejuvenated successfully and the rapid propagation was realized.

Key words: *Paulownia fortunei*; superior tree; tissue culture and rapid propagation; *in vitro* grafting; rejuvenation

白花泡桐(*Paulownia fortunei* (Seem.) Hemsl.)为玄参科(Scrophulariaceae)泡桐属落叶乔木,其生长快,抗性强,适应范围广,材质优良,是我国中东部地区的重要速生造林树种^[1-2]。然而,由于自然和人为等种种原因,我国许多泡桐种质资源,特别是珍贵的白花泡桐遭到严重破坏,这直接威胁我国特有珍贵资源的保存和今后育种工作的开展。搜集优良泡桐资源建立育种群体,是抢救和保护优良资源的重要措施。但受成熟化效应影响,搜集到的老龄白花

泡桐优树,采用常规的方法对白花泡桐优树材料进行幼化,存在很多问题,如扦插繁殖,难生根;埋根繁殖,萌芽率很低,且根段采集不易;嫁接繁殖,在后期亲和性方面留下隐患,同时影响无性系测定以及在造林生产中优良性状不能得到充分表达;利用组织培养对泡桐优树进行幼化繁殖,部分样品由于树龄太大,幼化周期过长等问题。试管嫁接,是一种在试管内将砧木与接穗进行嫁接的技术,它是植物组织培养与嫁接技术的结合^[3-4]。本研究以白花泡桐优

收稿日期:2010-12-20

基金项目:林业公益性行业科研专项“泡桐基因库与育种群体建立技术研究”(200804021)

作者简介:邓建军(1977—),男,湖南浏阳人,硕士。主要从事泡桐、经济林育种与栽培的研究。

通讯作者:李芳东(1963—),男,河南太康人,研究员,博士生导师。主要从事泡桐和经济林育种、栽培与利用研究。

树‘白优2号’为试验材料,对白花泡桐老龄优树材料试管嫁接幼化技术进行了研究,为珍稀白花泡桐优树种质资源挽救、保护提供了一条有效途径,也为珍稀泡桐优树资源的幼化和快速繁殖提供科学方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

白花泡桐优树‘白优2号’来源于湖南省常德市,树龄33年,春季嫁接后备用;砧木为‘武夷山2号’、‘建始桐3号’、‘白优39号’等组培材料。

1.2 试验方法

1.2.1 砧木的选择和处理 选择生长旺盛,茎段粗壮,较易生根的‘建始桐3号’、‘武夷山2号’和‘白优39号’3个组培材料,剪切成长5~6 cm,带一片或两片叶作为砧木备用。每种砧木各选择30株,统一以‘白优2号’组培初代培养后萌发的带叶嫩芽为接穗进行试管嫁接试验。嫁接后接种到1/2MS+NAA 0.1 mg·L⁻¹的培养基中进行培养,每瓶培养1株,每个处理20瓶,重复3次。20天后统计成活率和嫩芽的萌发率。

1.2.2 接穗的处理 3月中旬,将白花泡桐优树材料‘白优2号’进行室外嫁接,成活后,采集长度在25 cm左右的嫩枝,剪去叶片后,将材料表面的尘土洗刷干净,然后剪切成1~1.5 cm带侧芽的茎段,进行表面灭菌。灭菌时,先用75%酒精浸泡约10 s,无菌水冲洗2次,再用0.1% HgCl₂消毒5~6 min,后用无菌水冲洗3次,接种在MS+BA 4.0 mg·L⁻¹+NAA 0.3 mg·L⁻¹培养基上。接穗分别为单芽接穗、双芽接穗、嫩芽接穗。选择初代培养10天后直径为0.5 cm左右带双芽的组培材料为双芽接穗,将双芽接穗切开成带单芽的材料为单芽接穗,嫩芽接穗为外植体接种25天左右,萌发到1.5 cm左右的嫩芽(图1A)。将3种接穗削成契形分别与两种砧木进行嫁接,嫁接方式采用劈接进行。培养条件为:光照强度为3 000 lx,温度条件为25~27℃,光照周期12 h。接种20瓶,每瓶培养1株,重复3次。试验分批进行。成活率=(成活数/未污染数)×

100%,萌发率=(萌芽数/未污染数)×100%。

1.2.3 不同培养基和生长调节物质对试管嫁接效果的影响 基本培养基为1/2MS和MS,附加一定浓度的BA和NAA,嫁接20天后,观察嫁接苗接穗的萌发率和长势以及嫁接部位的愈合程度。

1.2.4 增殖培养 将已经萌发伸长,长势较好的接穗材料剪切,在增殖培养基中进行增殖。以1/2MS、MS、WPM为基本培养基,添加不同浓度的蔗糖和植物生长调节剂6-BA和NAA,琼脂粉5.5 g·L⁻¹,pH值为5.8,光照强度为3 000 lx,温度条件为25~27℃,光照周期12 h。每处理30个外植体,每瓶培养1株,培养25天,重复3次。

1.2.5 生根、炼苗和移栽 诱导生根培养基为1/2MS附加NAA 0.1 mg·L⁻¹。选取长度在3 cm左右的单芽诱导生根,其它培养条件同增殖培养。7天后统计生根情况。试管苗根长1.5 cm左右时即可进行炼苗移栽。移栽基质为泥炭土,移栽后用透明塑料一次性水杯覆盖3天保湿。揭盖后经常喷水保持土壤湿润,视生长情况,喷施托布津等杀菌剂进行病害防治,20天后统计结果。1个月,将幼苗移栽到口径为15 cm的营养盆中,置于塑料大棚进一步炼苗至生长粗壮的幼苗,并统计成活率。

1.2.6 数据统计分析 数据分析与处理采用SPSS 13.0统计软件进行

2 结果与分析

2.1 不同砧木对试管嫁接效果的影响

由表1可以看出,3种砧木在嫁接后其成活率都在80%以上,但萌发率差异明显。‘建始桐3号’砧木嫁接的萌发率最高,达到26.7%,其次是‘武夷山2号’为6.7%,‘白优39号’最低为3.3%;从生长状况来看,同样也以‘建始桐3号’作砧木嫁接的生长最好,嫁接5天后砧木开始产生不定根,25天后芽开始萌发并长势旺盛(图1E),其它两种砧木生根较慢,砧木和接穗愈合慢且生长缓慢,接穗后期逐渐褐化。因此,选择‘建始桐3号’为白花泡桐优树试管嫁接幼化的最合适的砧木。

表1 不同砧木对试管嫁接效果的影响

项目	统计数	成活数	成活率/%	萌发数	萌发率/%	生长状况
武夷山2号	30	24	80	2	6.7	砧木生根较慢,砧木接穗愈合慢,接穗生长缓慢,后期逐渐褐化
建始桐3号	30	27	90	8	26.7	砧木生根快,砧木接穗愈合较好,接穗部分萌发伸长
白优39	30	26	87	1	3.3	砧木生根较慢,砧木接穗愈合慢,接穗生长缓慢,后期逐渐褐化

2.2 不同接穗对试管嫁接效果的影响

由表2可以看出,3种接穗在嫁接后20天进行统计,其成活率差异很大。以双芽接穗的成活率最低,只有43.3%,且接穗萌发率极低,几乎没有萌发,单芽接穗的成活率和萌发率较高,分别为53.3%和6.7%,但接穗萌发后生长缓慢,后期也逐

渐褐化(图1D);嫩芽接穗的成活率和萌发率都显著提高(图1C),分别达到93.3%和23.3%,且砧木和接穗愈合紧密,后期生长状况良好。因此,选择嫩芽接穗为白花泡桐优树试管嫁接幼化的最合适的接穗(图1E)。

表2 不同接穗对试管嫁接效果的影响

项目	统计数	成活数	成活率/%	萌发数	萌发率/%	生长状况
单芽接穗	30	16	53.3	2	6.7	砧木接穗愈合较慢,接穗生长缓慢,后期逐渐褐化
双芽接穗	30	13	43.3	0	0	砧木接穗愈合慢,接穗萌发缓慢,后期逐渐褐化
嫩芽接穗	30	28	93.3	7	23.3	砧木接穗愈合好,接穗萌发较快,生长较好

2.3 不同培养基和生长调节剂对试管嫁接效果的影响

从表3可见,不同培养基中添加不同浓度的生长调节剂和蔗糖的9种组合中,对试管嫁接的幼化效果影响不同。未添加细胞分裂素的处理1、4、7幼化效果最好,萌发率分别达到19.3%、13.5%、15.8%,嫁接5天后砧木开始生根,接穗萌发,并生长较好,而添加了细胞分裂素的其它处理幼化效果均不理想。

从极差来看,基本培养基、6-BA、NAA、蔗糖这4种因素中,细胞分裂素6-BA的影响最大,其极差值达到12.9,其它几种因素相对较小,它们的影响大小顺序为:6-BA浓度>蔗糖浓度>基本培养基>NAA浓度。从均值情况来看,均值最大的一项为该因素最佳的水平项,结合实验结果,得出MS+6-BA 0 mg·L⁻¹+NAA 0.3 mg·L⁻¹+蔗糖30 g·L⁻¹为最合适的嫁接培养基。

表3 不同培养基和生长调节剂对试管嫁接效果的影响

处理	基本培养基	BA/(mg·L ⁻¹)	NAA/(mg·L ⁻¹)	蔗糖/(g·L ⁻¹)	萌发率/%	长势
1	MS(1)	0(1)	0.1(1)	15(1)	19.3	砧木有根,接穗生长旺盛
2	MS(1)	4.0(2)	0.2(2)	30(2)	6.2	砧木萌芽多,接穗生长缓慢
3	MS(1)	6.0(3)	0.3(3)	45(3)	2.3	砧木萌芽多,接穗生长缓慢
4	1/2MS(2)	0(1)	0.2(2)	45(3)	13.5	砧木有根,接穗生长较慢
5	1/2MS(2)	4.0(2)	0.3(3)	15(1)	4.8	较弱
6	1/2MS(2)	6.0(3)	0.1(1)	30(2)	5.2	砧木萌芽多,接穗生长缓慢
7	WPM(3)	0(1)	0.3(3)	30(2)	15.8	砧木有根,接穗生长较快
8	WPM(3)	4.0(2)	0.1(1)	45(3)	3.1	砧木萌芽多,接穗生长缓慢
9	WPM(3)	6.0(3)	0.2(2)	15(1)	2.4	砧木萌芽多,接穗生长缓慢
k ₁	9.27	16.2	9.2	8.83		
k ₂	7.83	4.7	7.37	9.07		
k ₃	7.1	3.3	9.41	6.3		
R	2.17	12.9	2.04	2.77		

注:k₁、k₂、k₃表示均值,R表示极差

2.4 不同生长调节物质对丛生芽增殖效果的影响

从表4可见,不同组合方式‘白优2号’丛生芽的增殖效果不同,6-BA浓度为6.0 mg·L⁻¹的7、8、9号处理的丛生芽的增殖倍数都达到4.20以上,且丛生芽苗生长粗壮;6-BA浓度为2.0 mg·L⁻¹的1、2、3号处理的丛生芽的增殖倍数低,都在1.73以下,且生长缓慢。6-BA浓度为4.0 mg·L⁻¹的4、5、6号3个处理的丛生芽的诱导也能够获得较理想增

殖倍数,并且丛生芽也生长粗壮,但在生长速度上不及6-BA浓度为6.0 mg·L⁻¹的处理。

从极差分析结果可以看出,6-BA的浓度是‘白优2号’丛生芽增殖倍数的决定因子,NAA的影响次之,蔗糖的影响不大,基本培养基的影响最小。根据极差的大小,可以确定‘白优2号’试管苗最佳增殖组合为:1/2MS+6-BA 6.0 mg·L⁻¹+NAA 0.3 mg·L⁻¹+蔗糖20 g·L⁻¹(图1F)。

表4 不同培养基及生长调节剂对丛生芽增殖效果的影响

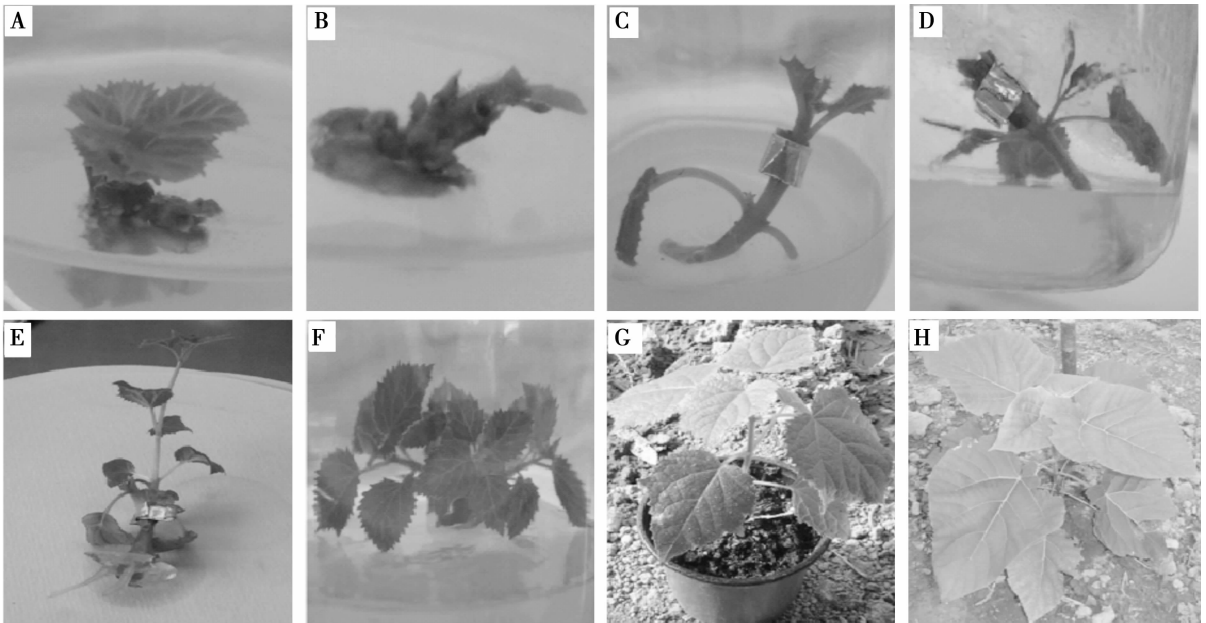
处理	6-BA/(mg·L ⁻¹)	NAA/(mg·L ⁻¹)	蔗糖/(g·L ⁻¹)	培养基	增殖倍数	生长状况
1	2.0(1)	0.1(1)	10(1)	MS(1)	1.39	生长缓慢,部分长根
2	2.0(1)	0.2(2)	20(2)	1/2MS(2)	1.61	生长缓慢,部分长根
3	2.0(1)	0.3(3)	30(3)	WPM(3)	1.73	生长缓慢,长根较多
4	4.0(2)	0.1(1)	20(2)	WPM(3)	2.93	生长较慢,粗壮
5	4.0(2)	0.2(2)	30(3)	MS(1)	3.42	生长较好,粗壮
6	4.0(2)	0.3(3)	10(1)	1/2MS(2)	3.74	生长较慢,粗壮
7	6.0(3)	0.1(1)	30(3)	1/2MS(2)	4.20	生长较快,粗壮
8	6.0(3)	0.2(2)	10(1)	WPM(3)	4.34	生长较快,粗壮
9	6.0(3)	0.3(3)	20(2)	MS(1)	4.65	生长较快,粗壮
k_1	1.58	2.84	3.16	3.15		
k_2	3.49	3.22	3.26	3.18		
k_3	4.40	3.37	3.12	3.00		
R	2.82	0.53	0.14	0.18		

注: k_1 、 k_2 、 k_3 表示均值, R 表示极差

2.5 诱导生根、炼苗和移栽

白花泡桐优树‘白优2号’幼化后,诱导生根比较容易,5天开始生根,生根率可达95%以上。当根

长达到1.0 cm左右进行炼苗移栽,成活率达到85%以上。约1个月后,将幼苗移栽到口径为15 cm的营养盆中,置于塑料大棚壮苗(图1G)。



图片说明:A:嫩芽;B:成熟化芽;C:嫩芽嫁接;D:单芽嫁接;E:试管嫁接幼化;F:增殖培养;G:组培幼化苗;H:嫁接苗

图1 白花泡桐优树试管嫁接幼化及组培快繁

3 结论与讨论

为保证优树性状能稳定遗传,通常采用扦插,嫁接,压条,组培等无性繁殖进行,但不管采取那一种方式,都会遇到共同的难题,就是繁殖材料的位置效应和成熟效应^[5]。白花泡桐老龄优树材料在进行无性繁殖时,这两种效应均表现突出,如嫁接繁殖,有树干偏向生长现象,叶片形态,颜色等表现为成熟态

(图1H),且嫁接当年就有花芽分化;硬枝扦插和嫩枝扦插,生根率均很低,扦插苗抗逆性弱;采用母树成熟硬枝材料作外植体进行培养,初代培养后褐化死亡,几乎不能分化出丛生芽^[6]。经嫁接复壮培养后再进行组织培养,仍表现出生长缓慢,嫩叶脱落等较严重的成熟化现象(图1B),这些不利影响,为无性系测定以及造林生产推广造成了不可逾越的障碍。目前,国内外有些关于优树幼化方面的报道,李

明鹤^[9],梁在金^[10],李新国^[11]等用根萌条或树干基部萌条,对杉木(*Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook),池杉(*Taxodium ascendens* Brongn.),毛白杨(*Populus tomentosa* Carr.)等优树进行了幼化;季孔庶^[12]、林武星^[13]等在进行马尾松(*Pinus massoniana* Lamb.)成熟化效应和位置效应研究时,发现马尾松树龄在4年以上,成熟化效应就比较明显,他们采取继代扦插法对马尾松进行了幼化。本课题组在前期通过对优树材料进行嫁接复壮和组织培养,成功地^[6]对12个白花泡桐优树材进行了幼化,‘白优2号’树龄达到33年,在前期多次组培继代仍未幼化的情况下,本研究通过试管嫁接和组织培养相结合,成功地实现了幼化。

在白花泡桐试管嫁接幼化的过程中,接穗的选择是影响幼化成功与否的关键因素之一。以嫩芽接穗效果最好,其原因有三,一是外植体经组织培养一段时间后萌发的新芽,其成熟化影响有了一定程度的降低,部分得到了幼化;二是接穗大小与砧木大小一致,嫁接后砧木和接穗更加容易愈合;三是嫩芽接穗嫁接时能带叶进行嫁接,嫁接后能进行光合作用制造营养,提高了成活率与幼化效果。

砧木的选择,同样也是影响白花泡桐优树材料

试管嫁接成活率和幼化效果的关键因素之一,砧木宜选择茎段粗壮,且易生根的泡桐材料,嫁接后置于生根培养基中培养,这样有利于接穗与砧木的愈合以及营养的供应,提高成活率和幼化效果。

参考文献:

- [1] 蒋建平. 泡桐栽培学[M]. 北京:中国林业出版社, 1993:28
- [2] 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,2006,19(4):407-410
- [3] Jonard R, Httgard J, Macheix J J, et al. *In vitro* micrografting and its applications to fruit science[J]. *Sci Hort*,1983,20:147-159
- [4] Estrada-Ltma A A, Loez-Peralta C, Cadenas-Soriano E. *In vitro* micrografting and the histology of graft union formation of selected species of prickly pear cactus[J]. *Sci Hort*,2002,92(3):317-322
- [5] 朱之悌. 树木的无性繁殖与无性系育种[J]. 林业科学,1986,22(3):280-290
- [6] 李芳东,邓建军,张悦,等. 白花泡桐组织培养幼化技术研究[J]. 中南林业科技大学学报,2010,30(8):22-28
- [7] 李明鹤,沈宝仙,杨昌岩,等. 用杉木伐桩萌条建立采穗圃的研究[J]. 林业科技通讯,1990(8):14-15
- [8] 梁在金. 池杉优树幼化技术的初步研究[J]. 林业科技通讯,1995(3):26-28
- [9] 李新国,段安安,朱之悌. 毛白杨无性系年龄效应及根萌条幼化效果的初步研究[J]. 西南林学院学报,1998,18(2):61-66