

生长调节剂对马大杂种相思开放式组培增殖的影响 *

李泽瑞 卢艳平 陈玉军 李 玮 黄烈健

(中国林业科学研究院 热带林业研究所, 广东 广州 510520)

摘要 为实现马大杂种相思 *Acacia mangium × A. auriculiformis* 树种的开放式组培增殖, 建立马大杂种相思开放式组培增殖培养体系, 文章以马大杂种相思组培苗为试验材料, 在无蔗糖的条件下, 采用正交设计研究生长调节剂 6-BA、IBA、NAA 对马大杂种相思芽增殖的影响。结果表明: 不同质量浓度的 6-BA、IBA、NAA 对马大杂种相思的增殖有显著影响; 马大杂种相思开放式组培最佳增殖培养基为: MS + 2.5 mg · L⁻¹ 6-BA + 0.1 mg · L⁻¹ IBA + 1.0 mg · L⁻¹ IAA + 0.2 g · L⁻¹ 百菌清, 增殖倍数为 2.97。通过对不同生长调节剂的种类和浓度进行组合, 可以在无蔗糖的培养基中实现马大杂种相思有效增殖。

关键词 马大杂种相思; 开放式组织培养; 生长调节剂; 增殖

中图分类号: S792.99 **文献标志码:** A **文章编号:** 2096-2053 (2023) 06-0035-05

Effects of Growth Regulators on *Acacia mangium × A. auriculiformis* Proliferation in Open Tissue Culture

LI Zerui LU Yanping CHEN Yujun LI Mei HUANG Liejian

(Research Institute of Tropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Guangzhou, Guangdong 510520, China)

Abstract In order to realize the open tissue culture and proliferation of *Acacia mangium × A. auriculiformis*, an open tissue culture and proliferation culture system of *A. mangium × A. auriculiformis* was established. In this paper, *A. mangium × A. auriculiformis* were used as test materials. An orthogonal design was used to study the effects of growth regulators 6-BA, IBA, and NAA on the proliferation under the condition of no sucrose, aiming to establish *A. mangium × A. auriculiformis* open tissue culture proliferation culture systems. The results showed that different concentrations of 6-BA, IBA and NAA had significant effects on the proliferation of *A. mangium × A. auriculiformis*; the effects of different growth regulators on the proliferation of *A. mangium × A. auriculiformis* were as follows: IAA > 6-BA > IBA. The best growth medium for open tissue culture is: MS + 2.5 mg · L⁻¹ 6-BA + 0.1 mg · L⁻¹ IBA + 1.0 mg · L⁻¹ IAA + 0.2 g · L⁻¹ chlorothalonil, the multiple of proliferation achieved 2.97. The research results lay an important foundation for the further establishment of a perfect open tissue culture system of *Acacia*, and also provide an important reference for the related research of other tree species.

Key words *Acacia mangium × A. auriculiformis*; open tissue culture; growth regulator; proliferation

污染是传统组培过程中的常见问题, 也是导致组培失败的重要因素。为解决污染问题, 有研

* 基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金 (CAFYBB2017MB009)。

第一作者: 李泽瑞 (2000—), 女, 在读硕士, 主要从事林木遗传育种研究工作, E-mail: lsr15927358929@126.com。

通信作者: 黄烈健 (1971—), 男, 副研究员, 主要从事林木遗传育种及分子生物学研究, E-mail: 13802987948@163.com。

究者提出,可以通过在培养基中加入抑菌剂,用化学灭菌来代替高压灭菌,以达到显著降低组培污染,同时简化操作程序、大幅度降低生产成本^[1-2],这种组培新技术被称为开放式组培技术。目前,已在香蕉 *Musa nana*^[3]、蓝莓 *Vaccinium* spp.^[4]、甘蔗 *Saccharum officinarum*^[5]、凤梨 *Ananas comosus*^[6]、百合 *Lilium brownii*^[7]、非洲菊 *Gerbera jamesonii*^[8-9]、半夏 *Pinellia ternata*^[10]、铁皮石斛 *Dendrobium officinale*^[11]、杂交构树 *Broussonetia papyrifera*^[12]、大叶相思 *Acacia auriculiformis*^[13]等多种植物开展了相关研究,分别针对不同植物筛选出了有效的抑菌剂,为今后建立完善的开放式组培技术体系奠定了重要基础,但这些研究都没有增殖成功。

传统组培研究表明,增殖过程必须添加蔗糖,蔗糖作为渗透压调节物质维持细胞内外渗透压的平衡,同时为组培苗的生长发育提供底物与能量,最终实现有效增殖^[14-15]。而开放式组培,培养基中如果添加蔗糖,则抑菌剂无法有效控制污染从而导致增殖失败^[16]。

在传统组培研究中,大家还发现:生长调节剂对组培增殖起着至关重要的作用^[17-18],如细胞分裂素类能够诱导芽增殖与分化^[19];生长素类能促进细胞分裂和分化,使细胞的体积和质量增加,促进植物的生长发育^[20]。特别是细胞分裂素及其与生长素的相互作用能够有效的调节增殖效果^[21-26]。

根据生长调节剂在传统组培增殖过程中的作用,作者提出假设:开放式组培的增殖过程中,为控制污染,不添加蔗糖,仅仅通过对不同生长调节剂的种类和浓度进行组合,应该可以实现有效增殖。为验证此假设,以马大杂种相思为研究对象,开展生长调节剂 6-BA、IBA、NAA 不同浓度组合对开放式组培增殖影响的研究,期望在不添加蔗糖的条件下实现有效增殖。研究结果验证了作者的假设是正确的,为今后建立成熟完善的马大杂种相思开放式组培技术体系奠定重要基础,同时也为其他树种相关研究提供重要参考。

1 材料与方法

1.1 试验地点与试验材料

试验地点位于广东省江门市相思良种繁育基地。试验材料为马大杂种相思。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的采集

于 2021 年 9 月,根据 Huang

等^[13]的方法,进行外植体的采集及消毒处理。

1.2.2 相思芽诱导 将消毒后的外植体接种于芽诱导培养基进行培养,30 d 后将诱导的嫩芽切下,用于增殖研究。马大杂种相思芽诱导培养基:1/8 MS + 0.5 mg · L⁻¹ 6-BA + 0.2 g · L⁻¹ 百菌清^[16]。

1.2.3 增殖试验设计 将诱导出的嫩芽切下,接种到含不同生长调节剂的增殖培养基中培养。增殖培养基以 MS 培养基为基础培养基,添加 5 g · L⁻¹ 琼脂,0.2 g · L⁻¹ 百菌清。选用不同浓度的 6-BA (1.5, 2.0, 2.5 mg · L⁻¹), IBA (0.1, 0.5, 1.0 mg · L⁻¹), IAA (0.1, 0.25, 0.5 mg · L⁻¹), 采用正交设计 L9 (3³) (表 1), 每处理接种 10 瓶,每瓶接种 3 个嫩芽,培养 45 d 后统计总芽数、增殖倍数。

表 1 生长调节剂正交因素水平 mg · L⁻¹

Table 1 Orthogonal factor and levels of growth regulators

水平 Level	试验因素 Experiment factor		
	6-BA (A) Concentration of 6-BA	IBA (B) Concentration of IBA	IAA (C) Concentration of IAA
1	1.5	0.1	0.1
2	2.0	0.5	0.25
3	2.5	1.0	0.5

1.3 培养条件

pH 调至 5.8 ± 0.2, 培养条件温度 (25 ± 2)℃, 光照时间 16 h/d, 光照强度 2 500 lx。

1.4 数据处理及分析

使用 Excel 2003 进行数据收集整理, SPSS 26.0 进行单因素方差分析,采用 Minitab 19 分析软件进行正交试验数据分析,采用最小显著差异法 (LSD 法) 进行显著性检验和多重比较 ($\alpha = 0.05$)。

2 结果与分析

方差分析结果表明:6-BA 和 IAA 显著影响马大杂种相思的增殖倍数。IBA 对其无显著影响 (表 2)。

结合正交试验结果,由图 1 可知,不同质量浓度 6-BA、IAA 对增殖倍数的影响差异显著,均表现为:随着浓度增加,增殖倍数增加。当 6-BA 浓度为 1.5, 2.0 和 2.5 时,增殖倍数分别为 1.80, 2.01 和 2.31。当 IAA 浓度为 0.1, 0.25 和 0.5 时,增殖倍数分别为 1.58, 2.02 和 2.61。

表 2 马大杂种相思增殖倍数方差分析结果
Table 2 The results of variance analysis of *Acacia mangium* × *A. auriculiformis* proliferation

因素 Factors	SS	df	F	P	显著性 Significance
6-BA	0.053	2	499.15	0.002	*
IBA	0.006	2	5.62	0.151	
IAA	1.589	2	1485.31	0.001	*
误差	0.001	2			

注: * 表示在 0.05 水平差异显著。

Note: * represent significant differences ($P < 0.05$).

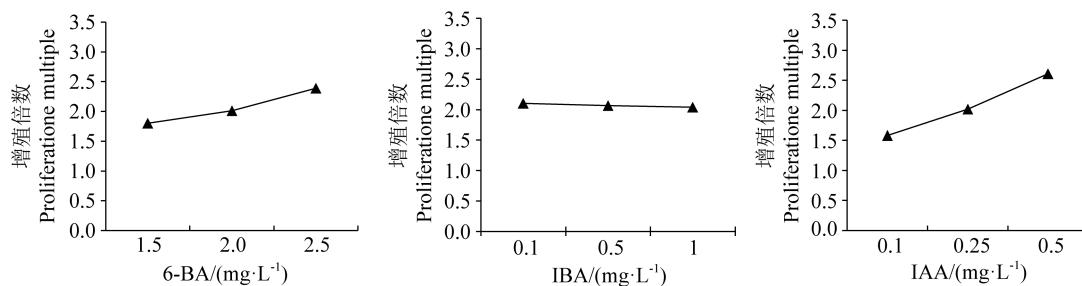


图 1 马大杂种相思增殖倍数随生长调节剂质量浓度变化的趋势

Fig. 1 Variation trend of *Acacia mangium* × *A. auriculiformis* proliferation with different concentrations of growth regulators

表 3 马大杂种相思正交设计与极差分析

Table 3 Orthogonal design and range analysis of *Acacia mangium* × *A. auriculiformis*

处理号 No.	试验因素水平 Experiment factor level			增殖倍数 Proliferation multiple
	6-BA(A)/(mg·L⁻¹) Concentration of 6-BA	IBA(B)/(mg·L⁻¹) Concentration of IBA	IAA(C)/(mg·L⁻¹) Concentration of IAA	
1	1.5 (1)	0.1 (1)	0.1 (1)	1.33 ± 0.14d
2	1.5 (1)	0.5 (2)	0.25 (2)	1.76 ± 0.24cd
3	1.5 (1)	1 (3)	0.5 (3)	2.32 ± 0.24b
4	2 (2)	0.1 (1)	0.25 (2)	2.01 ± 0.17c
5	2 (2)	0.5 (2)	0.5 (3)	2.53 ± 0.14b
6	2 (2)	1 (3)	0.1 (1)	1.50 ± 0.17d
7	2.5 (3)	0.1 (1)	0.5 (3)	2.97 ± 0.07a
8	2.5 (3)	0.5 (2)	0.1 (1)	1.91 ± 0.13c
9	2.5 (3)	1 (3)	0.25 (2)	2.30 ± 0.17bc
K_1	1.804	2.104	1.581	
K_2	2.015	2.067	2.022	
K_3	2.393	2.041	2.607	
R	0.589	0.063	1.026	
主次顺序		C > A > B		
优水平	A_3	B_1	C_3	
优组合	$C_3 A_3 B_1$			

注: K 为均值, R 为极差。不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。

Note: K means average, R means range, different letters indicates significant difference ($P < 0.05$).

IBA 浓度对增殖倍数无显著影响, 随浓度增加, 增殖倍数略有降低, 分别为 2.10、2.07、2.04, 整体变化不大。

正交试验结果表明: 马大杂种相思每个处理均实现了增殖, 不同处理间的平均增殖倍数差异显著; 根据极差 R 值, 不同激素对马大杂种相思增殖的影响顺序为 C > A > B; 根据 K 值以及多重比较分析结果, 最优组合为 $C_3 A_3 B_1$, 即 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA + $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA, 45 天增殖倍数达 2.97 (表 3)。组合 $C_3 A_3 B_1$ 的增殖苗颜色翠绿, 芽体较小, 生长状态良好 (图 2)。



图 2 马大杂种相思最佳处理增殖苗生长状态
Fig. 2 The growth state of *Acacia mangium* × *A. auriculiformis* seedlings proliferated under the best-treatment

3 结论与讨论

研究表明，在无蔗糖且无 CO₂富集的培养基中，刺芹 *Eryngium foetidum* 仍能正常增殖及生根，并表现出 100% 的存活率^[27]；在无蔗糖培养基上，体外培养的竹子与在加糖培养基上培养的相比产生了更多的芽及叶子^[28]；在红掌 *Anthurium andraeanum* 增殖培养中发现，培养基中不添加蔗糖也能进行增殖^[29]，说明在组培中并非必需添加蔗糖等碳源。开放式组培在开放有菌的环境中进行操作，简化了操作步骤，节约了成本。为避免污染，开放式组培的培养基成分中添加了抑菌剂，同时去除蔗糖，从而控制了污染率。MS 培养基无机盐浓度较高，微量元素及有机成分齐全而丰富，对多数植物而言是影响组培苗增殖的重要因素^[30]，使用的生长调节剂也是影响增殖的重要因素^[31-32]。在马大杂种相思的传统组培中，增殖培养基中添加 30 g · L⁻¹ 蔗糖，初次继代的增殖倍数为 2.60，7 次平均增殖倍数为 2.52^[33]。本实验中未添加蔗糖，最佳增殖倍数为 2.93，增殖芽长势良好，未受到蔗糖缺失的影响，说明马大杂种相思的增殖主要归因于 MS 培养基和激素的组合。

本研究通过对生长调节剂浓度和组合的探究，经过极差分析得出最优方案 C₃A₃B₁，与正交设计

中增殖倍数最高的处理 7 方案 C₃A₃B₁一致，增殖倍数为 2.97。分析单一生长调节剂对马大杂种相思增殖的影响可知，IAA 和 6-BA 对马大杂种相思增殖的促进作用的变化趋势相同，均表现为随浓度的增加而增加，IBA 的促进作用随浓度变化不大，结合该趋势，本研究中得出的最优方案仅为实验浓度内的最佳组合，在实验浓度范围外的组合或存在更高的增殖倍数。

本次开放式组培中，在无蔗糖添加的情况下，通过调节不同生长调节剂浓度，实现了相思开放组培的增殖，最终确定适合马大杂种相思开放组培增殖培养基为：MS + 2.5 mg · L⁻¹ 6-BA + 0.1 mg · L⁻¹ IBA + 1.0 mg · L⁻¹ IAA + 5 g · L⁻¹ 琼脂 + 0.2 g · L⁻¹ 百菌清，增殖倍数为 2.97。在传统组培中，马大杂种相思在 I 型培养基中进行继代增殖培养后，第 1, 3, 5, 7 代增殖倍数分别为 3.97, 3.26, 2.76, 2.24，呈现下降趋势^[33]。本研究没有进行多次继代增殖，多次继代增殖后增殖倍数是否会下降等问题有待于进一步的研究。本试验仅分析了植物生长调节剂对其增殖的影响，而基本培养基，培养温度、以及光照等均起着重要的作用，因而在后续的试验中应从多方面考虑相思开放组培增殖的影响因子，以提高相思增殖倍数。

参考文献

- [1] SAWANT R A, TAWAR P N. Use of Sodium Hypochlorite as Media Sterilant in Sugarcane Micropagation at Commercial Scale [J]. Sugar Tech, 2011, 13(1):27-35.
- [2] PEIRIS S, SILVA E, EDUSSURIYA M, et al. CSUP technique: a low cost sterilization method using sodium hypochlorite to replace the use of expensive equipment in micropagation [J]. Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka, 2012, 40(1):49-54.
- [3] 罗燕羽, 黄绍力, 刘绍钦, 等. 六种抑菌剂在香蕉开放式组培中的应用 [J]. 热带农业科学, 2021, 41(2):71-76.
- [4] 陈泽斌, 李冰, 高熹, 等. 抑菌剂在蓝莓开放组培中的应用试验研究 [J]. 中国南方果树, 2017, 46(3):139-142.
- [5] 李松, 刘欣, 刘红坚, 等. 次氯酸钠在甘蔗开放式组培苗繁殖中的应用研究 [J]. 中国糖料, 2016, 38(6):3-6.
- [6] TEIXEIRA S L, RIBEIRO J M, TEIXEIRA M T. Influence of NaOCl on nutrient medium sterilization and on pineapple (*Ananas comosus* cv Smooth cayenne) behavior [J]. Plant Cell Tiss Organ, 2006, 86(3):375-378.

- [7] CURVETTO N, MARINANGELI P, MOCKEL G. Hydrogen peroxide in micropropagation of *Lilium*. A comparison with a traditional methodology [J]. Biocell, 2006, 30(3) :497-500.
- [8] CARDOSO J C, INTHURN A C. Easy and efficient chemical sterilization of the culture medium for in vitro growth of gerbera using chlorine dioxide (ClO_2) [J]. Ornamental Horticulture, 2018, 24(3) :218-224.
- [9] PAIS A K, DA SILVA A P, DE SOUZA J C, et al. Sodium hypochlorite sterilization of culture medium in micropropagation of *Gerbera hybrida* cv. Essandre [J]. African Journal of Biotechnology, 2016, 15(36) ,1995-1998.
- [10] 李欣,赵振军,张建,等.半夏叶片开放式组培体系初步建立[J].特产研究,2021,43(2):46-50.
- [11] 王娟,朱小东,常玮.不同抑菌剂在铁皮石斛开放组培中抑菌效果比较研究[J].南阳师范学院学报,2021, 20(6) :29-34.
- [12] 徐凯南,杨笑如.杂交构树开放式组培快繁技术研究 [J].科技创新与应用,2017(6) :19-20.
- [13] HUANG L J, WANG H, SHAHID M Q, et al. Chlorothalonil: an effective bacteriostatic agent for bud induction of *Acacia auriculiformis* under open condition (non-axenic) [J]. Plant methods, 2019, 15(1) :5.
- [14] GIBSON S I. Plant sugar-response pathways. Part of a complex regulatory web [J]. Plant Physiol, 2000, 124 (4) :1532-1539.
- [15] HAZARIKA B N, PARTHASARATHY V A, Nagaraju V. Influence of in vitro preconditioning of *Citrus* sp. microshoots with sucrose on their ex vitro establishment [J]. Indian Journal of Horticulture, 2004, 61 (1) : 29-31.
- [16] 王鸿.三种相思开放式组培快繁及扦插生根技术研究 [D].北京:中国林业科学研究院,2017.
- [17] YEO U D, PANDEY D M, KIM K H. Long term effects of growth regulators on growth and turnover of symplastic and apoplastic sugars in the suspension subculture of kidney bean [J]. Journal of Plant Biology, 2004, 47(1) : 21-26.
- [18] PUTHUR J T, THOMAS T D. High frequency in vitro regeneration of *Kigelia pinnata* L. via organogenesis [J]. Journal of Plant Biology, 2004, 47(1) :48-51.
- [19] REN B, ZHANG J, DONG S, et al. Regulations of 6-Benzyladenine (6-BA) on leaf ultrastructure and photosynthetic characteristics of waterlogged summer maize [J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2017, 36(3) : 743-754.
- [20] ZHAO Y, HASENSTEIN K H. Primary root growth regulation: the role of auxin and ethylene antagonists [J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2009, 28(4) :309-320.
- [21] FATIMA N, AHMAD N, AHMAD I, et al. Interactive effects of growth regulators, Carbon sources, pH on plant regeneration and assessment of genetic fidelity using single primer amplification reaction (SPARS) techniques in *Withania somnifera* L. [J]. Applied Biochemistry Biotechnology, 2015, 177(1) :118-136.
- [22] FATIMA N, AHMAD N, ANIS M. In vitro propagation of *Cuphea procumbens* Orteg. and evaluation of genetic fidelity in plantlets using RAPD markers [J]. Journal Plant Biochemistry and Biotechnology, 2012, 21(1) :51-59.
- [23] FATIMA N, ANIS M. Thidiazuron induced high frequency axillary shoot multiplication in *Withania somnifera* L. Dunal [J]. Journal of Medicinal Plants Research, 2011, 5(30) :6681-6687.
- [24] SCARPA G M, MILIA M, SATTA M. The influence of growth regulators on proliferation and rooting of in vitro propagated myrtle [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2000, 62(3) :175-179.
- [25] Bahrany A, Abdulaziz M. Effect of phytohormones on in vitro shoot multiplication and rooting of lime *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing [J]. Scientia Horticulturae, 2002, 95(4) :285-295.
- [26] RODRIGUES M, COSTA T H F, FESTUCCI RA, et al. Effects of flask sealing and growth regulators on in vitro propagation of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2012, 48(1) :67-72.
- [27] MARTIN K P. In vitro propagation of the herbal spice *Eryngium foetidum* L. on sucrose-added and sucrose-free medium without growth regulators and CO_2 enrichment [J]. Scientia Horticulturae, 2004, 102(2) :277-282.
- [28] GARCÍA-RAMÍREZ Y, BARRERA G P, FREIRE-SEIJÓN M, et al. Effect of sucrose on physiological and biochemical changes of proliferated shoots of *Bambusa vulgaris* Schrad. Ex Wendl in temporary immersion [J]. Plant Cell Tissue Organ Culture, 2019, 137 (2) : 239-247.
- [29] 张伟.盆栽红掌离体快繁简化培养基的研究[J].信阳农业高等专科学校学报,2012,22(2) :102-106.
- [30] 赵元增,单长卷,杨靖,等. MS 培养基成分调整对太行菊不定芽增殖与生长的影响[J].河南科技学院学报(自然科学版),2016,44(5) :7-11.
- [31] COENEN C, LOMAX T L. Auxin-cytokinin interactions in higher plants: old problems and new tools [J]. Trends in Plant Science, 1997, 2(9) :351-335.
- [32] SHEKHAWAT J K, RAI M K, SHEKHAWAT N S, et al. Synergism of m-topolin with auxin and cytokinin enhanced micropropagation of *Maytenus emarginata* [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2021, 57 (3) :418-426.
- [33] 王鸿.三种相思开放式组培快繁及扦插生根技术研究 [D].北京:中国林业科学研究院,2017.