

· 技术方法 ·

黑木相思愈伤组织诱导及植株再生

胡峰^{1,2}, 施琼¹, 黄烈健^{1*}

¹中国林业科学研究院热带林业研究所, 广州 510520; ²广东省农业科学院作物研究所, 广州 510640

摘要 以黑木相思(*Acacia melanoxylon*)优良单株(AMY12004)的当年新生枝条带腋芽茎段为外植体, 灭菌后接入MS培养基上培养, 以其无菌萌芽的叶片、茎段和叶柄为实验材料, 通过间接器官发生途径建立黑木相思愈伤组织诱导及高频植株再生体系。研究表明, 诱导愈伤组织的最佳外植体为茎段; 愈伤组织诱导的最佳培养基为MS+1.5 mg·L⁻¹6-BA+0.2 mg·L⁻¹NAA+3%蔗糖, 诱导率为93.33%; 愈伤组织再分化的最佳培养基为MS+2.0 mg·L⁻¹6-BA+0.5 mg·L⁻¹NAA+3%蔗糖, 分化率为79.17%, 再生系数为9.58; 再生芽生根的最佳培养基为MS+0.5 mg·L⁻¹IBA+0.5 mg·L⁻¹NAA+4%蔗糖, 生根率为96.05%, 移栽存活率为81.40%。

关键词 黑木相思, 愈伤组织诱导, 植株再生, 生根

胡峰, 施琼, 黄烈健 (2014). 黑木相思愈伤组织诱导及植株再生. 植物学报 49, 603–610.

近年来, 我国南方集体林区因连栽导致了土壤酸化、板结和林分生产力下降等问题, 故生态功能型树种越来越备受关注。黑木相思(*Acacia melanoxylon*)隶属含羞草科(Mimosaceae)金合欢属(*Acacia*), 具有速生、耐贫瘠、耐寒、耐涝(周期性)、耐轻度盐碱、耐中度干旱和抗风防火等特点, 并能与根瘤菌共生固氮, 在改良土壤、提升地力和保持水土等方面具重要作用, 被认为是杉木、松树、桉树(*Eucalyptus robusta*)、火力楠(*Michelia macclurei*)和木荷(*Schima superba*)等混交林的理想伴生树种和优良生态防护林树种(苏秀城等, 1999; Hussain et al., 2011)。此外, 黑木相思木材的收缩率小、硬度适中、纹理华丽且耐腐蚀性强, 可用于制作高档家具和工艺品, 经济效益显著。

目前, 黑木相思造林存在的主要问题是品种树干分枝较多、抗风能力弱和生长速度慢等。20世纪80年代以来, 黑木相思组织培养技术研究发展迅速, 相继以其茎段、种子苗和根蘖萌条为外植体, 通过直接器官发生途径(Meyer and Van Staden, 1987; 苏锦强和张方秋, 2008; 林来水, 2008; 戴智明等, 2012); 或以下胚轴、茎段、茎尖和叶片(Jones, 1986; Jones and Smith, 1988; 姬明, 2006; 罗万业等,

2006; 王盼盼, 2011)为外植体, 通过间接器官发生途径获得了再生植株。然而, 上述对黑木相思再生过程的研究, 尚存在胚性愈伤组织获得率及再分化率低、不定芽弱小(需壮苗培养)以及生根率和移栽存活率低等缺陷。本研究以黑木相思优树带腋芽茎段为外植体, 通过进一步完善黑木相思间接器官发生途径, 不仅成功获得了健壮的再生植株, 而且提高了愈伤组织的诱导率、再分化率、再生系数和生根率, 建立了高效且高频的再生体系, 为黑木相思优良无性系工厂化育苗、遗传改良及培育无性系新品种提供了理论依据。

1 植物材料

剪取四年生黑木相思(*Acacia melanoxylon* R. Br.)优树(AMY12004)的当年新生枝条, 以2–3 cm的含腋芽茎段为外植体, 消毒后接种至MS培养基上进行培养。30天后从茎段腋芽处获得新萌的无菌芽, 以其茎段、叶片和叶柄为实验材料。

2 培养基成分和培养条件

2.1 愈伤组织诱导

从无菌芽上剪下大小为0.5 cm×0.5 cm的叶片、长

收稿日期: 2013-10-08; 接受日期: 2014-01-26

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划(No.2012BAD01B0402)

* 通讯作者。E-mail: 13802987948@163.com

0.5–1.0 cm的叶柄和0.5–1.0 cm的茎段, 分别接种至培养基上。培养基成分配比见表1。每种材料接种10瓶, 每瓶接种5–6个外植体。设3次重复, 共27个处理。观察生长情况并在第45天统计愈伤组织的诱导率。

2.2 愈伤组织继代

以愈伤组织诱导率最高的培养基为继代培养基。以愈伤组织诱导效果最好的外植体在该培养基上诱导出的愈伤组织为材料进行继代培养。每30天继代1次。

2.3 愈伤组织再分化

将继代培养的愈伤组织切成0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm左右的小块, 接入分化培养基(表2)。每组接种10瓶, 每瓶接种5–6块。设3次重复, 共9个处理。观察生长情况并在第40天统计再分化率和再生系数。

2.4 不定芽的生根诱导

(1) 不同激素种类及其浓度对生根的影响: 以MS为基本培养基, 分别添加浓度为0.5、1.0和1.5 mg·L⁻¹的IBA、NAA和IAA, 共9个处理。(2) 激素的交互作用对生根的影响: 以MS为基本培养基, 选用浓度为0.5、1.0和1.5 mg·L⁻¹的IBA与浓度为0.5、1.0和1.5 mg·L⁻¹的NAA进行组合, 共9个处理。(3) 基本培养基类型对生根的影响: 以1/2MS、MS和改良MS(大量元素减半)为基本培养基, 附加步骤(2)筛选出的最佳激素, 共3个处理。(4) 蔗糖浓度对生根的影响: 选择步骤(3)筛选出的最佳培养基, 分别添加浓度为1%、2%和3%的蔗糖, 共3个处理。(5) 活性炭浓度对生根的影响: 选择步骤(4)筛选出的最佳培养基, 分别添加浓度为0.04、0.1和0.2 g·L⁻¹的活性炭, 共3个处理。以上实验每个处理均接种30株, 重复3次。观察生长情况并在第20天统计生根率、生根条数和根长。

除特殊说明外, 培养基均附加3%蔗糖和7 g·L⁻¹琼脂, 调pH至5.5–6.0后, 经121°C高压灭菌15分钟。置于室温为(25±3)°C、光周期为16小时光照/8小时黑暗及光照强度36 μmol·m⁻²·s⁻¹条件下培养。

2.5 生根苗移栽

选择高为3–5 cm的生根苗进行移栽。在自然光照条件下炼苗5天, 洗净根系黏附的培养基, 移栽至以黄心

土为基质(栽种前用多菌灵溶液进行消毒)的营养杯中, 盖膜保湿7天后揭开, 40天后统计成活率。

2.6 数据统计分析

愈伤组织诱导率(%)=(诱导出愈伤组织的外植体数/接种外植体总数)×100%;

再分化率(%)=(再分化的愈伤组织数/接种的愈伤组织总数)×100%;

植株再生系数=再生芽数/形成再生芽的愈伤组织。

将植株再生系数和生根数等数据进行P^{1/2}转化, 百分率数据进行反正弦转化($y=\arcsin(P^{1/2})$)后, 再用SPSS 18.0软件进行方差分析。用最小显著差数法(least significant difference, LSD)进行多重比较。用Origin 7.5软件作图。

3 结果与讨论

3.1 愈伤组织的诱导及再生体系的建立

无菌茎段在愈伤组织诱导培养基上培养10天左右, 即从切口处长出少量黄白色且形状不规则的愈伤组织(图1A); 约40天部分愈伤组织可达2–3 cm³, 甚至完全覆盖外植体(图1B)。观察发现, 不同外植体及不同培养基诱导出的愈伤组织在结构、质地、颜色和生长速度等方面有很大差异。当培养基中无2,4-D时, 诱导的愈伤组织颜色偏绿, 质地致密, 呈团状, 生长速度快, 部分愈伤组织表面甚至有绿色芽点产生, 此类愈伤组织为胚性愈伤组织(图1C); 而当培养基中添加2,4-D时, 所形成的愈伤组织结构松散, 呈颗粒状, 颜色黄白, 且随着2,4-D浓度的增加, 愈伤组织的生长速度加快, 质地变得更松散, 无绿色芽点产生, 此类愈伤组织为非胚性愈伤组织(图1D)。

选择胚性愈伤组织接入不定芽分化培养基, 约20天即可见愈伤组织表面的部分绿色芽点逐渐再分化形成不定芽, 此时的不定芽透明纤细、颜色翠绿、无叶片形成且长势较弱(图1E)。继续培养20天, 部分不定芽高可达4–5 cm, 颜色正常, 叶片舒展, 长势较好(图1F)。将其从愈伤组织上剥离后接入生根培养基, 第10天即可见白色根原基在基部切口处形成。待根系发育完全, 苗高达3–5 cm时(图1G), 即可用于移栽(图1H)。

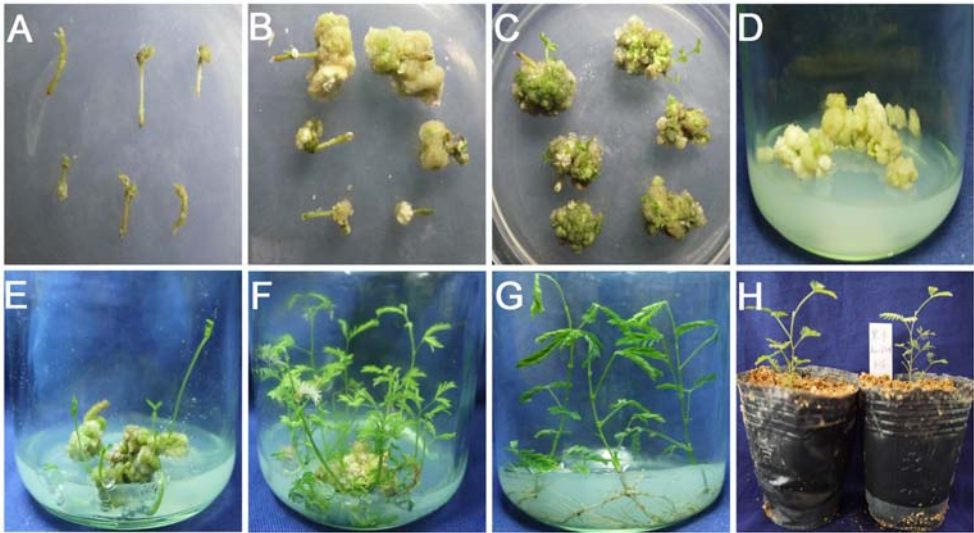


图1 黑木相思的愈伤组织诱导及植株再生
(A)–(D) 茎段愈伤组织的诱导; (E), (F) 愈伤组织的分化; (G) 再生植株生根; (H) 再生植株移栽

Figure 1 Callus induction and shoots regeneration of *Acacia melanoxylon*
(A)–(D) Callus induced from stems; (E), (F) Differentiation of the callus; (G) Plantlets rooting; (H) Transplantation

表1 植物生长调节剂组合对黑木相思叶片、叶柄和茎段愈伤组织诱导效果的影响
Table 1 Effect of phytohormone combinations on callus induction of *Acacia melanoxylon*

No.	Phytohormones (mg·L ⁻¹)			Leaf		Petiole		Stem	
	6-BA	2,4-D	NAA	Callus induction (%)	Callus type	Callus induction (%)	Callus type	Callus induction (%)	Callus type
1	1.0	0	0	55.4 ^{cd}	T3	74.0 ^{bc}	T3	86.1 ^{ab}	T3
2	1.0	0.5	0.2	33.4 ^d	T2	89.1 ^{ab}	T1	92.1 ^{ab}	T1
3	1.0	1.0	0.4	24.6 ^d	T2	59.7 ^{bc}	T2	63.7 ^{bc}	T2
4	1.5	0	0.2	59.4 ^{bc}	T4	79.1 ^b	T4	93.3 ^a	T4
5	1.5	0.5	0.4	26.5 ^d	T2	69.6 ^{bc}	T1	89.3 ^{ab}	T1
6	1.5	1.0	0	26.5 ^d	T2	72.5 ^{bc}	T2	84.2 ^{ab}	T2
7	2.0	0	0.4	34.9 ^{cd}	T4	87.0 ^{ab}	T4	72.6 ^{bc}	T4
8	2.0	0.5	0	18.5 ^d	T2	76.0 ^{bc}	T1	52.9 ^{cd}	T1
9	2.0	1.0	0.2	56.4 ^c	T2	81.1 ^{ab}	T2	61.0 ^{bc}	T2

数据上标不同小写字母表示LSD多重分析差异显著($P<0.05$)。
Superscripts represent significant difference at 0.05 level with LSD multiple analysis ($P<0.05$).

3.2 激素组合和外植体类型对愈伤组织分化效果的影响

表1为不同植物生长调节剂组合对叶片、叶柄和茎段愈伤组织诱导的影响。从表1可以看出, 各外植体愈伤组织的诱导顺序为: 茎段>叶柄>叶片。方差分析结果表明, 6-BA是茎段愈伤组织诱导的重要影响因子,

当6-BA的浓度为1.5 mg·L⁻¹时, 其诱导率最高。以茎段为外植体, 在MS培养基上添加1.5 mg·L⁻¹6-BA和0.2 mg·L⁻¹NAA, 可使愈伤组织诱导率达93.3%, 且诱导出的愈伤组织多为胚性愈伤组织, 不仅生长较快, 而且结构紧致, 颜色偏绿, 有绿色突起。
2,4-D和NAA对叶片愈伤组织的诱导均达极显著水平。随着2,4-D浓度的增加, 愈伤组织的诱导率逐渐

表2 6-BA与NAA组合对黑木相思愈伤组织再分化的影响

Table 2 Effect of 6-BA and NAA combinations on callus redifferentiation of *Acacia melanoxylon*

Phytohormones		6-BA:NAA	Callus redifferentiation rate (%)	Regeneration coefficient	Growth vigour of callus	Growth vigour of the plantlets
6-BA (mg·L ⁻¹)	NAA (mg·L ⁻¹)					
0.1	0.5	1:5	57.20 ^b	4.99 ^b	+	+++
0.5		1:1	58.02 ^b	5.42 ^b	++	+++
1.0		2:1	56.52 ^b	3.18 ^b	+++	++
1.5		3:1	59.85 ^b	5.50 ^b	+++	++
2.0		4:1	54.17 ^{bc}	3.95 ^b	+++	++
0.5	0.1	5:1	79.17 ^a	9.58 ^a	++	++
	1.0	1:2	56.25 ^{bc}	4.79 ^b	++	+++
	1.5	1:3	37.00 ^c	4.60 ^b	++	+++
	2.0	1:4	32.64 ^c	5.67 ^b	++	+

数据上标不同小写字母表示LSD多重分析差异显著($P<0.05$)。+代表愈伤组织和再生植株的长势, +越多表示长势越好。Superscripts represent significant difference at 0.05 level with LSD multiple analysis ($P<0.05$). + represent the growth vigour of callus and plantlets, the more +, the better growth.

下降;随着NAA浓度的增加,愈伤组织的诱导率呈先上升后下降趋势,以0.2 mg·L⁻¹NAA的诱导效果最好。在MS培养基上添加1.5 mg·L⁻¹6-BA和0.2 mg·L⁻¹NAA,叶片外植体可获得59.4%的愈伤组织诱导率,且多为胚性愈伤组织,生长最快。

植物生长调节剂组合对叶柄愈伤组织诱导率的影响不显著。但从愈伤组织的长势来说,在MS培养基上添加2.0 mg·L⁻¹6-BA和0.4 mg·L⁻¹NAA,愈伤组织的诱导率最高,为87.0%;且愈伤组织长势好,多为胚性愈伤组织。

将非胚性愈伤组织分为Type1和Type2两类。Type1结构疏松、颜色灰白且生长较快;Type2结构极松散、呈白色、水渍状且生长速度快。胚性愈伤组织分为Type3和Type4两类。Type3结构紧致、形状不规则、生长慢且颜色黄绿;Type4结构致密、团块状、生长较快且颜色偏绿,出现绿色芽点。

3.3 生长素和细胞分裂素组合对愈伤组织再分化的影响

再分化培养40天时,不定芽高且健壮,新叶绿且叶片舒展。实验表明,黑木相思胚性愈伤组织在含不同浓度6-BA和NAA的培养基上,均能再分化出不定芽,但不同植物生长调节剂组合对其再分化率和再生系数的影响差异显著。表2为生长素与细胞分裂素组合对愈伤组织再分化的影响。由表2可知,当NAA的浓度为0.5 mg·L⁻¹时,随着6-BA浓度的变化,愈伤组织

的再分化率(50%–60%)并未表现出明显差异;当6-BA的浓度为0.5 mg·L⁻¹时,随着NAA浓度的增加,愈伤组织再分化率逐渐下降,其中以NAA的浓度为0.1 mg·L⁻¹时再分化率(79.17%)最高;此浓度组合的愈伤组织再生系数也最高,为9.58,且不定芽高大健壮,长势较好。此外,随着6-BA浓度的升高,愈伤组织生长速度变快且分化能力变强;随着NAA浓度的升高,不定芽的长势则呈先上升后下降的趋势,当NAA的浓度为0.5–1.5 mg·L⁻¹时,不定芽长势最好。

3.4 影响不定芽生根的相关因素

3.4.1 不同浓度IBA、NAA和IAA对不定芽生根的影响

将芽高大于2 cm的不定芽接入生根培养基,10天后即可见不定芽基部形成了白色根原基。图2为不同浓度IBA、NAA和IAA诱导黑木相思不定芽的生根率(第20天的调查结果)。方差分析结果表明,不同浓度的IBA、NAA和IAA对黑木相思不定芽生根率的影响差异显著。随着IBA和NAA浓度的升高,黑木相思的生根率呈先上升后下降的趋势,平均根数呈递增趋势;而随着IAA浓度的升高,生根率呈上升趋势。诱导黑木相思生根的最佳植物生长调节剂依次为IBA>NAA>IAA;IBA、NAA和IAA的最佳浓度分别为0.5、1.5和1.5 mg·L⁻¹。其中,IBA的浓度为0.5 mg·L⁻¹时,黑木相思不定芽的生根率为94.97%,显著高于其它植物生长调节剂的各个浓度处理,平均根数为3.37,生根苗健壮且长势较好。

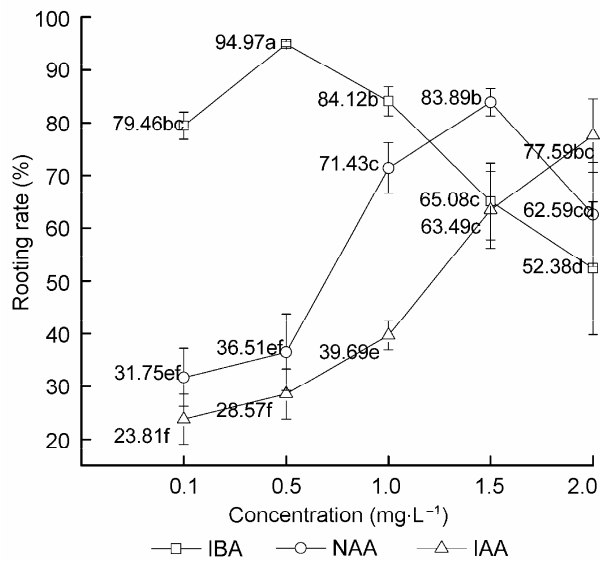


图2 不同浓度IBA、NAA和IAA诱导黑木相思不定芽的生根率
图中数字后不同小写字母表示LSD多重分析差异显著($P<0.05$)。

Figure 2 Rooting rate of *Acacia melanoxylon* adventitious shoots on different concentration of IBA, NAA and IAA
Different letters represent significant difference at 0.05 level with LSD multiple analysis ($P<0.05$).

3.4.2 不同浓度IBA和NAA组合对不定芽生根的影响

由表3可知, 选用IBA和NAA两种激素进行组合诱导黑木相思生根, 其生根率比单独使用IBA或NAA一种激素时高, 且随着IBA和NAA浓度和的升高表现出先上升后下降的趋势。在浓度和分别为0.5、0.75、1.0、1.25和1.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 其平均生根率分别为70.97%、87.62%、91.67%、87.46%和73.37%, 以二者浓度和为1.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时最高, 为91.67%。二者浓度和为1.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 随着浓度比的不同, 诱导黑木相思生根率的差异显著。IBA和NAA浓度比为1:3、1:1和3:1时, 其生根率分别为86.11%、96.83%和92.06%, 以浓度比为1:1时效果最好。可见, 黑木相思生根培养基选用0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA和0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA的组合效果最佳。

3.4.3 培养基类型、糖及活性炭浓度对再生芽生根的影响

表4为培养基类型、蔗糖及活性炭浓度对黑木相思不定芽生根的影响。从表4可以看出, 培养基类型和活性炭浓度对黑木相思不定芽生根率的影响显著。在供

表3 不同浓度IBA和NAA组合对黑木相思不定芽生根的影响
Table 3 Rooting effect of *Acacia melanoxylon* adventitious shoots on different IBA and NAA combination

Phytohormones ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)		Ratio	Rooting rate (%)	Growth vigour of the plantlets
IBA	NAA			
0.25	0.25	1:1	70.97 ^b	+++
0.25	0.50	1:2	81.49 ^b	+++
0.25	0.75	1:3	86.11 ^b	+++
0.50	0.25	2:1	93.75 ^{ab}	+++
0.50	0.50	1:1	96.83 ^a	+++
0.50	0.75	2:3	92.37 ^{ab}	++
0.75	0.25	3:1	92.06 ^{ab}	+++
0.75	0.50	3:2	82.54 ^b	++
0.75	0.75	1:1	73.37 ^b	+

数据上标不同小写字母表示LSD多重分析差异显著($P<0.05$)。+表示生根苗的长势, +越多表示长势越好。

Superscripts represent significant difference at 0.05 level with LSD multiple analysis ($P<0.05$). + represent the growth vigour of the plantlets, the more +, the better growth.

试的不同培养基中, 以1/2MS诱导黑木相思的生根效果最佳, 不仅生根率(94.97%)最高, 而且平均根数(3.37)最多; 其次为MS, 改良的MS最差。活性炭的添加明显降低了生根率, 且浓度越高, 生根率越低; 当活性炭浓度为0.2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 生根率降至66.67%; 而添加0.04 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 活性炭虽使生根率降低了约4%, 却有效改善了生根苗的品质, 利于移栽。蔗糖浓度对黑木相思不定芽生根率的影响不大, 当糖浓度为4%时, 生根数较多, 生根苗健壮, 生根效果最好。综合比较, 得出黑木相思不定芽的生根培养基为MS+0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA+0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA+4%蔗糖。

3.5 再生植株移栽

部分黑木相思生根苗移栽至营养袋20天左右即有新叶冒出。40天时观察发现, 移栽存活率为81.40%; 存活幼苗长势较好, 健壮且叶片舒展, 苗高5–10 cm, 根系呈黄白色, 长约5–15 cm。

3.6 讨论

黑木相思组织培养及其离体再生技术主要分为通过以芽繁殖过程实现的直接器官发生途径和通过愈伤组织脱分化和再分化过程实现的间接器官发生途径。虽然有较多学者对黑木相思间接器官发生途径进行了相关研究, 但尚未见报道。另外, 黑木相思品种的

表4 培养基类型、蔗糖及活性炭浓度对黑木相思不定芽生根的影响

Table 4 Rooting effect of *Acacia melanoxylon* adventitious shoots on different media, sucrose level and active carbon level

Treatments			Rooting rate (%)	No. of adventitious roots	Length of roots (cm)	Growth vigour of the plantlets	With or without fibrils
Medium	Sucrose (%)	Active carbons (g·L ⁻¹)					
1/2MS	3	0	94.97 ^a	3.37±0.35	2–3	+	No
MS	3	0	90.48 ^{ab}	2.34±0.25	2–5	++	Yes
Modified-MS	3	0	75.92 ^b	1.39±0.24	2–3	+	No
1/2MS	1	0	92.57 ^a	2.57±0.27	1–2	+	No
1/2MS	2	0	93.67 ^a	2.92±0.42	2–3	++	Yes
1/2MS	3	0	94.97 ^a	3.37±0.35	2–3	++	Yes
1/2MS	4	0	96.05 ^a	3.74±0.20	3–4	+++	Yes
1/2MS	4	0.04	92.06 ^a	2.19±0.17	2–4	++	Yes
1/2MS	4	0.1	81.48 ^{ab}	2.04±0.24	3–4	++++	Yes
1/2MS	4	0.2	66.67 ^b	1.40±0.21	3–5	++++	Yes

数据上标不同小写字母表示LSD多重分析差异显著($P<0.05$)。+代表生根苗的长势, +越多表示长势越好。

Superscripts represent significant difference at 0.05 level with LSD multiple analysis ($P<0.05$). + represent the growth vigour of the plantlets, the more +, the better growth.

基因型及其所处的发育阶段是影响愈伤组织诱导和植株再生不可忽略的因子(王盼盼, 2011)。不同来源的外植体所建立的再生体系之间并不完全具备可重复性。本研究以黑木相思优树AMY12004新生枝条的带腋芽茎段为外植体, 以其在无菌瓶内新萌芽的茎段、叶柄和叶片为实验材料, 通过进一步完善黑木相思愈伤组织诱导及脱分化过程中存在的胚性愈伤组织获得率低、再生系数低和再生苗弱小等问题, 建立了一种黑木相思优树间接器官发生途径的高效再生体系, 其愈伤组织诱导率为93.33%, 再分化率为79.17%, 再生系数为9.58。

本研究以黑木相思在无菌瓶内的新萌芽茎段、叶柄和叶片为实验材料, 选用杨树(*Populus deltoides*)(Cavusoglu et al., 2011)和大果榉(*Zelkova sinica*)(Jin et al., 2012)等木本植物组织培养常选用的6-BA、2,4-D及NAA进行愈伤组织诱导与植株再生, 结果表明, 诱导黑木相思愈伤组织的3种材料以茎段为最佳, 叶柄次之, 叶片最差; 此外, 利于黑木相思愈伤组织诱导的激素为6-BA和NAA, 而2,4-D不利于黑木相思胚性愈伤组织的形成。这与姬明(2006)和王盼盼(2011)分别以黑木相思种子下胚轴及优树茎尖为外植体的实验结果不同(其结果表明2,4-D对黑木相思愈伤组织的诱导作用最大)。其原因可能是不同种类的外植体对植物生长调节剂的敏感性有差异, 致使其诱导出的愈伤组织在形态结构上差异显著。另外, 2,4-D可明显降低植物组织内的IAA氧化酶和细胞分

裂素氧化酶的活性, 从而影响愈伤组织的正常生长和分化(杨万年等, 2003)。

在植物形态建成过程中, 起主要作用的是培养基中生长调节剂组合的配比(赵术珍等, 2006)。随着6-BA/NAA比值的增大, 萝卜(*Raphanus sativus*)愈伤组织的不定芽再生率呈现增加的趋势, 再生系数也逐渐增大(李海萍等, 2011)。本研究结果也表明, 当6-BA/NAA比值升高至5:1(6-BA为0.5 mg·L⁻¹, NAA为0.1 mg·L⁻¹)时, 黑木相思愈伤组织的再分化率和再生系数均达到最高, 分别为79.17%和9.58, 且不定芽高大健壮, 再分化效果最好。范秀平(2010)研究发现, 用培养基(0.4–0.6) mg·L⁻¹IBA+(1.0–2.0) mg·L⁻¹ABT+0.1 g·L⁻¹活性炭诱导FM25与黑木相思4号的生根率分别为98%和80%。本实验显示, 用培养基MS+0.5 mg·L⁻¹IBA+0.5 mg·L⁻¹NAA+4%蔗糖诱导黑木相思AMY12004的生根率为96.05%。由此可见, 黑木相思不同优良无性系的生根培养基类型因基因型的不同有较大差异。此外, 活性炭为生根培养提供了黑暗环境, 防止褐变而利于生根(Thomas, 2008)。但活性炭不仅吸附了培养基中的有害物质, 同时吸附了生长调节剂, 使生根率下降(朱丽华和吴小芹, 2005)。这解释了本实验中生根率随活性炭浓度的升高而降低, 但生根苗的品质和长势有明显提升这一现象。

筛选出具有优良组织培养特性的基因型材料是进行组织培养成功的关键, 对利用基因工程方法改良作物品质意义重大(刘琳等, 2013)。然而, 目前黑木相

思的不同基因型愈伤组织诱导及分化差异等方面的研究还较薄弱,且在组织培养过程中尚存在愈伤组织易褐化及多次继代后胚性降低等问题,需进一步探索以建立更加高效的黑木相思再生体系。

参考文献

- 戴智明, 梁日高, 宗亦臣 (2012). 黑木相思种子无菌体系建立的初探. 林业实用技术 (12), 35–36.
- 范秀平 (2010). 黑木相思优良无性系组培苗生根技术及其生根机理. 硕士论文. 福建: 福建农林大学. pp. 15–19.
- 姬明 (2006). 黑木相思离体培养与再生系统的建立. 硕士论文. 福建: 福建农林大学. pp. 27.
- 李海萍, 张鲁刚, 张静, 茹磊, 刘学成, 孙希禄 (2011). 萝卜带柄子叶高频再生体系的建立. 植物学报 46, 331–337.
- 林来水 (2008). 黑木相思优良无性系离体培养与快速繁殖技术研究. 硕士论文. 福建: 福建农林大学. pp. 15.
- 刘琳, 俞斌, 黄鹏燕, 贾军, 赵华, 彭俊华, 陈鹏, 彭良才 (2013). 芒不同基因型愈伤组织诱导及分化的差异. 植物学报 48, 192–198.
- 罗万业, 房亦文, 林春兰 (2006). 黑木相思的组培育苗技术. 林业实用技术 (11), 23–24.
- 苏锦强, 张方秋 (2008). 黑木相思根蘖促萌及组培繁育技术研究. 广东林业科技 24, 42–45.
- 苏秀城 (1999). 黑木相思组织培养的初步研究. 福建林业科技 26, 78–81.
- 王盼盼 (2011). 黑木相思不同优良无性系组培快繁技术比较研究. 硕士论文. 福建: 福建农林大学. pp. 48–82.
- 杨万年, 张秀红, 熊永华, 张国彬, 吕应堂 (2003). 2,4-D和激动素对烟草愈伤组织IAA氧化酶和细胞分裂素氧化酶活性的影响. 植物生理学通讯 39, 589–591.
- 赵术珍, 阮圆, 王宝山 (2006). 盐地碱蓬幼嫩花序的组织培养及植株再生. 植物学通报 23, 52–55.
- 朱丽华, 吴小芹 (2005). 湿地松组培苗生根的影响因子. 东北林业大学学报 33, 15–18.
- Cavusoglu A, Ipekci-Altas Z, Bajrovic K, Gozukirmizi N, Zehir A (2011). Direct and indirect plant regeneration from various explants of eastern cottonwood clones (*Populus deltoides* Bartram ex Marsh.) with tissue culture. *Afr J Biol* 10, 3216–3221.
- Hussain MI, González L, Reigosa MJ (2011). Allelopathic potential of *Acacia melanoxylon* on the germination and root growth of native species. *Weed Biol Manag* 11, 18–28.
- Jin XL, Hu XJ, Sun YP, Zhang DL, He P (2012). Callus induction and plant regeneration from immature embryos of *Zelkova sinica* Schneid. *Eur J Hort Sci* 47, 790–792.
- Jones C (1986). Getting started in micropropagation of Tasmanian blackwood (*Acacia melanoxylon*). *Proc Int Plant Prop Soc* 36, 477–481.
- Jones C, Smith D (1988). Effect of 6-benzylaminopurine and 1-naphthylacetic acid on *in vitro* axillary bud development of mature *Acacia melanoxylon*. *Proc Int Plant Prop Soc* 38, 389–393.
- Meyer HJ, Van Staden J (1987). Regeneration of *Acacia melanoxylon* plantlets *in vitro*. *S Afr J Bot* 53, 206–209.
- Thomas TD (2008). The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnol Adv* 26, 618–631.

***Acacia melanoxylon* Callus Induction and Shoot Regeneration System**

Feng Hu^{1,2}, Qiong Shi¹, Liejian Huang^{1*}

¹Research Institute of Tropical Forestry, Chinese Academy Forestry, Guangzhou 510520, China

²Crops Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China

Abstract Newly born stems with axillary buds of eminent *Acacia melanoxylon* (AMY12004) were used as explants and cultured on MS after sterilization. The aseptic leaf, petiole and stem of germinated axillaries were used to induce callus, and high-frequency regeneration systems were established via indirect organogenesis. The optimal material for callus induction was the stem, the optimal medium for induction was MS+1.5 mg·L⁻¹6-BA+0.2 mg·L⁻¹NAA+3% sucrose, and the optimal medium for redifferentiation was MS+2.0 mg·L⁻¹6-BA+0.5 mg·L⁻¹NAA+3% sucrose. The callus induction rate, redifferentiation rate and regeneration coefficient was 93.33%, 79.17% and 9.58, respectively. The optimal rooting medium was MS+0.5 mg·L⁻¹IBA+0.5 mg·L⁻¹NAA+4% sucrose and the highest rooting rate was 96.05%; the transplant survival rate was 81.40%.

Key words *Acacia melanoxylon*, callus induction, plant regeneration, rooting

Hu F, Shi Q, Huang LJ (2014). *Acacia melanoxylon* callus induction and shoot regeneration system. *Chin Bull Bot* **49**, 603–610.

* Author for correspondence. E-mail: 13802987948@163.com

(责任编辑: 孙冬花)

欢迎订阅2015年《杂交水稻》

《杂交水稻》是由国家杂交水稻工程技术研究中心和湖南杂交水稻研究中心主办, 国内外公开发行的专业技术刊物, 刊号: ISSN 1005-3956, CN 43-1137/S。该刊荣获第二届国家期刊奖提名奖, 为历届全国中文核心期刊、中国科学引文数据库(CSCD)核心库来源期刊、《中国核心期刊(遴选)数据库》收录期刊、中国科技论文统计源期刊、中国学术期刊综合评价数据库来源期刊、《中国期刊网》和《中国学术期刊(光盘版)》全文收录期刊、万方数据资源系统数字化期刊群全文收录期刊、湖南省一级期刊、湖南省十佳科技期刊、中国期刊方阵双效期刊。刊物主要宣传报道我国及国外杂交水稻研究、应用中的最新成果、进展、动态、技术经验和信息等; 并辟有**专题与综述、选育选配、栽培技术、繁殖制种、新组合、基础理论、国外动态和简讯**等栏目。

《杂交水稻》为双月刊, 大16开本, 96页, 逢单月出版, 每册定价10元, 年价60元。

订阅办法:

(1) 可到当地邮局订阅, 邮发代号: 42-297。

(2) 直接向本刊杂志社订阅, 另加收挂号费每个订户全年18元整。

请将刊款邮局汇款至长沙市芙蓉区马坡岭远大二路736号《杂交水稻》杂志社, 邮编: 410125; 或信汇中国农业银行长沙马坡岭支行, 账户名为湖南杂交水稻研究中心, 账号18035801040000507(务请注明杂交水稻2015年杂志款)。

编辑部电话: 0731-82872955, 82872954

E-mail: zjsd@chinajournal.net.cn, zjsdzs@163.com; <http://zjsd.cbpt.cnki.net>

欢迎订阅, 并欢迎投稿、刊登广告。