

印楝快繁技术的研究*

周丽华 何雪香 王振师 龚 峥

(广东省林业科学研究院 广州 510520)

摘要 试验以印楝实生苗的嫩枝为材料,对印楝的初代培养、丛生芽诱导和生根、再生植株炼苗等进行系统研究,通过单因素和正交试验筛选出各阶段的最适培养条件:(1)初代培养基为 MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.05 mg/L + 蔗糖 30 g/L;(2)丛生芽诱导培养基为 MS_{2k} + 6-BA 0.4 ~ 1.0 mg/L + KT 0.5 ~ 1.5 mg/L + NAA 0.05 ~ 0.2 mg/L + 蔗糖 30 g/L;(3)生根培养基为 1/2 MS + IBA 0.3 mg/L + PG 3 μmol/L + 糖 20 g/L。

关键词 印楝 组织培养 快速繁殖 试管内生根 试管外生根

中图分类号:S722.3*7 **文献标识码**:A **文章编号**:1006-4427(2006)04-0071-04

印楝(*Azadirachta indica*)为楝科楝属的常绿阔叶树乔木,原产印度次大陆,被引入东亚、澳大利亚、非洲和南美洲等地区种植,在干旱地区生长表现优良,被国际林联推荐为干旱地区优先发展树种。我国赵善欢等人^[1]于1986年从非洲多哥引入种子并在广东省的徐闻县和海南省的万宁县引种成功。印楝的种子、树皮、树叶均含较高的印楝素(azadirachtin)等杀虫活性成分,具有很强的拒食等生理活性,可作植物性杀虫剂。印楝种子不易保存,且我国优质种源缺乏,因此,采用组织培养快速繁殖技术获得大批量的优质苗木,具有重要的现实意义。2002年广东省林业科学研究院从国外引进了几个印楝素含量较高的种源,并对其中3个种源进行组织培养快繁研究,现将结果报导如下。

1 材料与方法

1.1 试验材料

采用引进的3个印楝种源的一年生实生苗的嫩枝及叶片作外植体。外植体采用1 g/L升汞液进行表面灭菌处理,然后将嫩枝切成1 cm长并带顶芽或休眠侧芽的茎段,嫩叶每单叶横切成3段,接种于培养瓶内。

1.2 试验方法

所有培养基如无特别注明,均添加蔗糖30 g/L,用7 g/L的卡拉胶作培养基的凝固剂,培养基的pH值为5.8。培养室的温度为(25±3)℃,光照强度为1 500 lx,光照时间为10 h/d。

1.2.1 初代培养 经处理后的外植体接种到初代培养基中培养,每个种源的嫩枝及叶片各接种50瓶。初代培养基为:MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.05 mg/L。

1.2.2 丛生芽诱导培养 采用单因子试验,以逐步添加和逐步排除的试验方法进行芽增殖培养的一系列筛选试验。进行试验的因子有硝态氮与氨态氮的不同比例,细胞分裂素和生长素的种类和浓度,糖、磷的含量,稀土元素的添加等。

1.2.3 试管内生根培养 印楝试管苗的生根采用试管内生根和试管外生根两种形式。试管内的生根培养以芽增殖培养基中获得M₁种源的丛生芽分割为单芽,接种到生根培养基上,诱导其生根。采用1/2MS为基本培养基,选择IBA、PG、糖作为考察因素,每个因素设置3个水平,采用L₉(3⁴)正交设计法进行根诱导培养基的附加物种类和配比的筛选(见表3)。

1.2.4 试管外生根培养 试管外的生根采用M₁种源在芽增殖培养基中获得的丛生芽经壮芽的培育阶段(壮芽培养基为去掉外源激素的芽增殖培养基)后所获得的芽,种植于基质为黄心土的育苗袋中。

2 结果与分析

2.1 印楝外植体初代培养的生长分化表现

诱导外植体生长和分化是无菌外植体接种中成功建立无性繁殖体系最关键的环节之一。在印楝组培繁殖研究中,外植体进行了丛生芽和不定芽2种再生类型的试验。试验主要为筛选含印楝素高,且生物生长量

* 本文是广东省科技厅国际合作项目“高产杀虫产物印楝人工示范林的建立”的部分研究内容。

也高的单株进行生产推广,为了减少变异机率,最终采用的是直接从顶芽或腋芽中产生丛生芽的再生类型芽,在初代培养基 MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.05 mg/L 上诱导。不同的外植体材料、不同种源经诱导后的生长分化表现及其 20 d 诱导腋芽萌发的情况见表 1。

表 1 印楝初代培养生长分化的情况

外植体	不同种源 20 d 腋芽诱导率(%)			生长分化情况
	M ₁	M ₂	M ₃	
顶芽或腋芽	90	84	60	1 周后在基部会形成愈伤组织; 2 周后腋芽处可形成侧芽; 30 d 形成丛生芽
叶片				1 周后叶片变皱拱起而加厚;10 d 后叶柄、叶片均形成愈伤组织,愈伤组织初期为黄白色;2 周后表面的突起开始变绿;30 d 后如不及时转接培养基,愈伤组织会褐化枯死

从表 1 可看到,印楝不同种源的诱导效果及其诱导率均不同。在 3 个种源中以腋芽作外植体诱导 20 d 时, M₁ 种源的诱导率最高, M₃ 种源的诱导率最低;以叶片作外植体时,不同种源其愈伤组织的诱导和生长差异不明显。不同外植体的生长和分化情况亦不一样,从表 1 看出,以顶芽或腋芽的生长分化较叶片的好。

2.2 丛生芽的诱导

用初代培养基培养外植体所分化的丛生芽,数量极少,生长不理想。为满足规模化生产的基本条件,需进行芽的增殖培养。经过一系列增殖培养基的筛选试验,最终筛选出以改良的 MS 为基本培养基(硝态氮与氨态氮的比值、糖和磷的含量都比 MS 的高),即 MS_改 为基本培养基附加 6-BA 0.4 ~ 1.0 mg/L + KT 0.5 ~ 1.5 mg/L + NAA 0.05 ~ 0.2 mg/L, 20 ~ 25 d 为一个周期(见图片 1)。不同种源芽增殖倍数不同,增殖倍数为 2 ~ 4 倍(见表 2)。

表 2 印楝不同种源芽的增殖效果

种源	增殖数(倍)	芽生长状况
M ₁	4.0	有效芽少,易褐化
M ₂	3.5	芽生长健壮、均匀,有效芽多
M ₃	2.0	芽生长健壮、均匀,有效芽多

从表 2 可看到印楝不同种源的芽的增殖效果,不同的种源在同等的条件下其增殖速度不同。在 3 个种源中以 M₁ 种源的增殖倍数最高, M₃ 种源的增殖倍数最低,但有效芽数 M₁ 种源的不如 M₂ 种源和 M₃ 种源的。采用稀土元素的增殖培养基,对印楝丛生芽的增殖率影响不大,但可明显地改善芽的生长,如芽的叶片变大、叶色变深,且对后期根的诱导有促进的作用。

2.3 根的诱导

2.3.1 试管内生根 将长 1.5 cm 以上的芽,从芽丛中分割出来,并接种到生根培养基中,10 d 后,在芽的基部长出 2 ~ 4 条根(见图片 2)。除去污染的芽,每种培养基抽取 100 个芽,进行生根率的统计与分析。诱导根的培养基组合的正交试验的直观分析结果表明(表 3): 3 个因素及其交互作用诱导根的效应大小依次为: IBA > 糖 > IBA × PG > PG, 9 种处理以 1/2MS 为基本培养基,附加 IBA 0.3 mg/L、PG 3 μmol/L、糖 20 g/L 的生根培养基的生根率最高,达 100%。根据各试验因素的平均数可以看出: IBA 和 PG 取水平 3,糖取水平 2,为生根培养基的最佳组合。

方差分析结果表明(表 4),在试验中所列的 3 个因素及其交互作用中,IBA 对芽的生根率存在极显著影响,糖、IBA × PG 交互作用对芽的生根率存在显著影响,因素 PG 对芽的生根率无显著影响。由于 IBA × PG 交互作用对芽的生根率存在显著影响,须考虑 IBA × PG 的交互作用,在这种情况下诱导印楝芽生根的最适

组合应为:IBA 和 PG 取水平 3,糖取水平 2,即诱导印楝芽生根的最适培养基应为:以 1/2MS 为基本培养基,附加 IBA 0.3 mg/L、PG 3 μ mol/L、糖 20 g/L。

表 3 根的诱导培养基配比及正交试验的测试结果

试验号	培养基配方				生根株数 (株)	生根率 (%)
	IBA(mg/L)	PG(μ mol/L)	糖(g/L)	IBA $\times$ PG		
1	0.1	1	15		0	0
2	0.1	2	20		55	55
3	0.1	3	30		30	30
4	0.2	1	20		92	92
5	0.2	2	30		70	70
6	0.2	3	15		45	45
7	0.3	1	30		83	83
8	0.3	2	15		75	75
9	0.3	3	20		100	100
K_1	85	175	120	145		
K_2	207	200	247	183		
K_3	258	175	183	197		
$\bar{X}_1$	28.33	58.33	40.00	48.33		
$\bar{X}_2$	69.00	66.67	82.33	61.00		
$\bar{X}_3$	86.00	58.33	61.00	65.67		
R	57.67	8.33	42.33	17.33		

表 4 芽的生根率方差分析

变异来源	自由度	均方离差	F 值
IBA	2	2634.11	9.03 **
PG	2	69.44	0.24
糖	2	1344.11	4.61 *
IBA $\times$ PG	2	1251.72	4.29 *
误差	9	291.67	

注:1. * 表示 0.05 水平差异显著, ** 表示 0.01 水平差异显著;2. $F_{0.05}(2,9) = 4.26$, $F_{0.01}(2,9) = 8.02$ 。

从图 1 可以看出,在试验范围内,印楝芽的生根趋势随着 IBA 的浓度增大而增大;而 PG、糖对印楝芽的生根的影响均以浓度适中(PG 2 μ mol/L、糖 20 g/L)为宜,过大或过小对芽的生根影响呈减弱的趋势;IBA $\times$ PG 的交互作用对印楝芽的生根的影响是随着 IBA 和 PG 的浓度增大而呈缓慢的增加趋势。

2.3.2 试管外生根 丛生芽经壮芽的培育阶段后,将这些试管苗放到大棚内炼苗,逐渐过渡到完全自然光照,获得较粗壮的苗,然后把丛生的苗切割下来作为插穗,用生根促进剂浸蘸处理后种植到育苗袋中,基质的消毒和种植管理与组培苗的种植管理一样。移栽成活率为 68%,成活后 2 个半月的生长情况见表 5 中序号为 4 的结果。

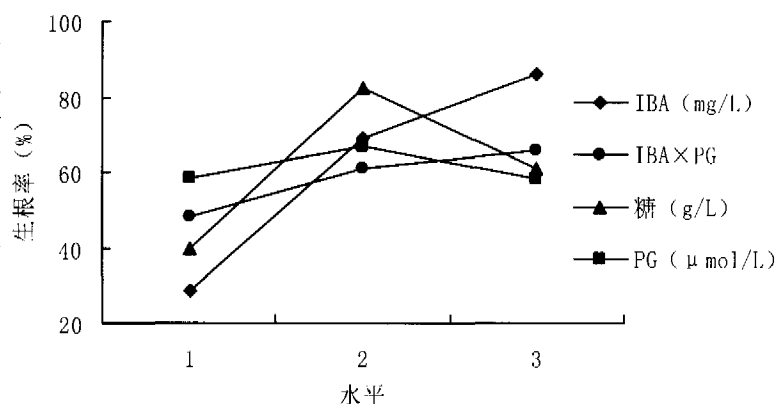


图 1 各因素对生根率的影响曲线

2.4 组培苗的移栽及苗期管理

试管苗移到遮荫棚内,炼苗 15~20 d,然后把试管苗取出,洗净粘附在基部的培养基,移栽到育苗袋中,移栽基质为经消毒处理的黄心土。上袋 10 d 内应注意保湿、遮荫及预防病虫害为害,随后可进行正常的水肥管理,印楝组培苗的移栽成活率达 90% 以上(见图片 3)。印楝组培苗的苗期管理很重要的一环是虫害的防治,主要是螺和蝗虫的为害严重,并造成成苗率低。

试管苗移栽时,分别以 4 种形式进行移栽:(1)具明显的主根(诱导具明显主根的培养基与上述所提的生根培养基在激素的种类及用量都有所不同);(2)具多条侧生根而无明显的主根;(3)原具多条侧生根,经修剪只保留一条粗壮的根;(4)无根。4 种形式的苗的移栽成活后 2 个半月的生长情况见表 5。

表 5 4 种形式的苗的移栽生长情况

序号	形式	平均地径 (mm)	平均主根长 (mm)	平均根系质量 (g)	平均株高 (mm)	移栽成活率 (%)
1	明显主根	3.83	247.00	0.97	161.00	60
2	多条侧生根	3.67	178.67	0.80	154.00	95
3	保留一条根	3.00	265.67	0.57	162.67	90
4	无根	3.33	124.67	0.40	116.33	68

从表 5 可看出:在诱导芽苗长明显的主根时,生根率低,只有 50% 左右,且根和苗连接处有愈伤组织,根和苗的维管束联系薄弱,这为移栽工作带来困难,造成移栽成活率低,只有 60%。4 种形式的苗的移栽,随着种植时间的增加,其生长的差异会缩小,但综合考虑移栽成活率因素,采用具多条侧生根而无明显主根的试管苗移栽为佳。

3 结论与讨论

3.1 印楝的三个培养阶段的最适培养条件

印楝的三个培养阶段的最适培养基为:(1)初代培养基为 MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.05 mg/L + 蔗糖 30 g/L;(2)丛生芽诱导培养基为 MS_改 + 6-BA 0.4~1.0 mg/L + KT 0.5~1.5 mg/L + NAA 0.05~0.2 mg/L + 蔗糖 30 g/L;(3)生根培养基为 1/2 MS + IBA 0.3 mg/L + PG 3 μmol/L + 糖 20 g/L。

3.2 印楝不同种源对组培的影响

在印楝离体培养过程中,不同种源在同等条件下,其初代培养的表现、丛生芽的增殖率以及诱导芽的生根率都有所不同。个别种源丛生芽的生长及诱导芽的生根率,会随继代数的增加而得到改善。这些情况的产生或许与种源的生物学特性有关,具体到哪一特性还需进一步的研究。

3.3 印楝快繁体系与工厂化育苗

首先应根据不同的造林目的进行选育,在此基础上建立印楝的快繁体系。通过组织培养快繁技术获得大量的表现一致的优良无性系,采用这些优良无性系建立扦插采穗圃,再进行扦插繁殖,以这种工厂化的育苗方式进行规模化生产,获得大批量的质优、价廉苗木。

参考文献

- [1] 黄光斗,曾鑫年,钱辉,等. 印楝组织培养繁殖研究[J]. 华南农业大学学报,1997,18(3):129-130.
- [2] 曹汝义,刘国民. 实用植物组织培养技术教程[M]. 兰州:甘肃科学技术出版社,2003:23-75.
- [3] 赵淑英,谭卫红,宋湛谦. 印楝素的稳定性研究[J]. 福建林学院学报,2005,25(3):247-250.
- [4] 廖声熙,杨玲,郑益兴,等. 印楝 4 个种源抗旱能力的比较[J]. 福建林学院学报,2005,25(3):279-283.
- [5] 李春喜,王志和,王文林. 生物统计学[M]. 北京:科学出版社,2003:149-153.

The Primary Selecting of Superior Anti-noise Tree Species in Zhujiang Delta

Yin Aihua Hu Xiancong Wu Xiaoying Kuang Jianzhi

(Research Institute of Forestry Science of Foshan, Foshan, 528000)

Abstract The study was to test the Anti-noise effects of 16 representative tree species of pure woods on three different woods-widths which were 10 m, 20 m and 30 m in Zhujiang Delta. By means of variance analysis method the results indicated that on reducing noise anti-noise effects of *Viburnum odoratissimum*, *Ficus altissima* were better in 10 m woods-width and *Viburnum odoratissimum*, *Michelia alba*, *Ficus annulata*, *Carallia brachiata*, *Ficus altissima* were better in 20 m woods-width and *Michelia alba*, *Ficus altissima* were better in 30 m woods-width. Effect of the Anti-noise of woods-width meter 20 and 30 were better and woods-width meter 20 was the best in the three different woods-widths.

Key words Anti-noise tree species, select, Zhujiang Delta

(上接第 74 页)

Studies on the Rapid Tissue Culture Propagation of Neem (*Azadirachta indica*)

Zhou Lihua He Xuexiang Wang Zhenshi Gong Zheng

(Guangdong Forest Reserch Institute, Guangzhou, 510520)

Abstract The complete tissue culture plants have been developed successfully from seedling explants (young stems with apical buds or axillary buds and leaves) through callus culture, bud proliferation and subsequent rooting raised on MS (Murahige and Skoog, 1962) medium supplemented with cytokinins. The screening experiments based on both single-factor and orthogonal designs showed that the best formulation of culture medium for callus culture (primary culture), bud clumping induction and bud rooting induction is MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.5 mg/L + sucrose 30 g/L, MS_改 + 6-BA 0.4 ~ 1.0 mg/L + KT 0.5 ~ 1.5 mg/L + NAA 0.05 ~ 0.2 mg/L + sucrose 30 g/L and 1/2 MS + IBA 0.3 mg/L + PG 3 μmol/L + sucrose 20 g/L respectively.

Key words *Azadirachta indica*, tissue culture, rapid propagation, in vitro rooting, out vitro rooting

印楝快繁技术的研究插图

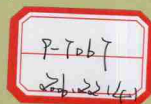


图1 印楝丛生芽的诱导



图2 印楝根的诱导



图3 印楝一年生组培苗