

巨桉组织培养及工厂化育苗技术的研究

陈碧华, 李乾振, 吴丽君, 翁秋媛, 王志洁, 陈 达, 洪志猛

(福建省林业科学研究院, 福建 福州 350012)

摘要: 巨桉是造纸和人造板的良好材料, 其组织培养微繁殖体系已经研究成功。取优树主干基部萌芽或扦插苗 1~1.5 cm 长的茎段做为外植体, 外植体和增殖培养在附加有 BAP 和 NAA 的 MW 培养基上进行。培养条件为 $26 \pm 2^\circ\text{C}$, 日光灯光照 $10 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 。增殖培养采用 BAP $0.1 \sim 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 NAA $0.01 \sim 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。离体的茎芽适合在 B2 附加 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA 生根。小苗移栽红心土上, 在简易温室成活率高达 93%。

关键词: 巨桉; 组织培养; 离体; 茎芽增殖; 生根培养

中图分类号: S792.390.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-7351(2006)01-0061-03

Studies on Tissue Culture and Commercial Production of *Eucalyptus grandis*

CHEN Bi-hua, LI Qian-zhen, WU Li-jun, WENG Qiu-yuan, WANG Zhi-jie, CHEN Da, HONG Zhi-meng

(Fujian Academy of Forestry Sciences, Fuzhou 350012, China)

Abstract: A micropropagation system was developed for *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden, which is widely used for pulp and artificial boards. Shoots of 1~1.5 cm long from the base of plus tree trunks or cutting seedlings served as explants. The explants and shoot multiplication cultures were cultured on MW medium supplemented with combinations of BAP and NAA. Cultures were maintained at $26 \pm 2^\circ\text{C}$ and exposed to 10-h photoperiods of cool-white fluorescent light. Shoot multiplication cultures were maintained by BAP at $0.1 \sim 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and combined with $0.01 \sim 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA. In-vitro-produced shoots were suitable to root on $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA supplemented to medium B2. Plantlets survived in red soil and exhibited high survivability (more than 93%) under simple greenhouse conditions.

Key words: *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden; tissue culture; *In vitro*; shoot multiplication; rooting culture

桉树是世界上生长最快的木本植物之一, 不仅被广泛地应用于建筑、矿井、造船、卡车、家具和人造板工业, 而且是良好的造纸工业原料。巨桉属于桃金娘科桉属, 原产于澳大利亚东南沿海^[1], 可以抵抗 $-4 \sim -5^\circ\text{C}$ 的低温^[2]。1999 年冬季的低温天气给永林集团等地的尾巨桉带来严重的冻害, 因此, 该项目得到福建省林业厅的高度重视。本研究利用幼嫩组织离体培养的优点, 采用扦插苗或幼树茎干基部萌芽条作为诱导材料, 外植体取其茎尖或腋芽, 直接利用以芽繁芽方式繁殖^[3]。

1 材料和方法

1.1 外植体灭菌

本研究所用的外植体来源于永林集团和华安县林业局。外植体采自优树扦插苗或优树茎干基部萌芽条, 并剪除叶片。1~1.5 cm 长外植体经 70%~75% 酒精消毒 30~60 s 后, 转入每 100 ml 附加 2 滴 Tween 20 的 0.1% HgCl_2 中消毒, 然后用无菌水冲洗 4~5 次。

1.2 离体条件下外植体诱导

经过消毒的外植体每个分别垂直插在 250 ml 的沙茶瓶里, 每瓶装 25 ml 的培养基。培养基包括: ①基本培养基(MS, White, 改良 White); ②BA(0.5, 1.0, 1.5); ③NAA(0.1, 0.2, 0.4)。所有生长调节剂单位是 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (下同)。试验应用正交设计 $L_9(3^4)$, 每处理 50 个外植体。

收稿日期: 2005-07-26

基金项目: 福建省林业厅科研项目(闽林综[2003]126 号)

作者简介: 陈碧华(1967-), 男, 福建龙海人, 福建省林业科学研究院高级工程师, 福建农林大学博士研究生, 从事林木遗传育种的研究和开发。

以上所有培养基填加 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 白糖(广西龙安南华糖业有限公司生产),琼脂 $6.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (福建惠安化工厂生产)。pH 值调整到 5.8。培养条件:35 d, $26 \pm 2^\circ\text{C}$, 每天日光灯光照 10 h, 光照度 $0 \sim 1\,000 \text{ lux}$ 。

1.3 茎芽诱导

外植体诱导的芽转入 250 ml 沙茶瓶,半透明塑料盖封口,每瓶装培养基 25 ml, 每瓶 5 丛。

培养基:①基本培养基:MS, 1/2 MS, White, 改良 White;②BA:0.1, 0.5, 1.0;③NAA:0.05, 0.01, 0.1。采用正交试验设计 $L_{16}(4^5)$, 每处理 50 丛芽。

上述所有培养基均附加 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 白糖,琼脂 $6.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。pH 值调整为 5.8。培养条件:30 d, $26 \pm 2^\circ\text{C}$, 每天 10 h 日光灯光照,光强 $2\,000 \sim 3\,000 \text{ lux}$ 。观测茎芽形成指数和生长活力。

1.4 茎芽生根和小苗移栽

当茎芽生长达到 1.5~2.0 cm 长时,转入生根培养,每个 250 ml 山茶瓶装有 25 ml 生根培养基。每瓶 10 个茎芽,每处理 10 瓶。

生根培养基:①基本培养基用改良 MS;②ABT1 号生根粉(中国林科院生产):0.1, 0.5, 1.0;③IBA:0.1, 0.5, 1.0;④NAA:0.1, 0.5, 1.0。

上述所有培养基填加 $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 白糖,琼脂 $6.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 值 5.8。培养 30 d, $26 \pm 2^\circ\text{C}$, 每天日光灯光照 10 h, 光强 $3\,000 \sim 6\,000 \text{ lux}$ 。观察内容包括生根率,平均根数,平均根长和生长活力。

小苗移栽于 $8 \text{ cm} \times 12 \text{ cm}$ 塑料袋,14 d 内覆盖塑料薄膜。期间小苗慢慢得到驯化而逐渐适应外界环境。第 1 周,每天给小苗喷雾 4~6 次,保持薄膜内较高的相对湿度。第 8~21 d 塑料薄膜逐渐打开,每天打开几个小时,最后全部打开。苗木在苗圃锻炼完全适应,最后在全光下炼苗。当苗木达到 15~25 cm 高时即可以出圃造林。

2 试验结果

2.1 离体外植体诱导

经过培养基筛选后,外植体培养都在改良 MW 培养基^[4]。采用上述的消毒方法,结果见表 1。

表 1 不同无性系外植体污染率

无性系	外植体来源	外植体总数	污染情况		污染率/%	萌芽率/%
			真菌	细菌		
1T	优树扦插苗	50	3	8	22.0	67.0
2T	优树扦插苗	50	2	10	24.0	69.0
3T	优树扦插苗	50	2	11	22.0	72.0
4T	优树扦插苗	50	1	12	26.0	64.0
HA2	优树基部萌芽条	296	71	13	28.4	35.8

2.2 基本培养基的对比

MS 和 White 培养基从参考书查得^[5]。改良 White 培养基简称为 MW。(见表 2^[6])

表 2 不同培养基大量元素的对比

单位: $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

培养基	N			P	K	Ca	Mg	S	Cl	合计
	硝态 N	氨态 N	总 N							
MS	552.00	288.82	840.82	38.72	783.92	119.84	36.46	55.46	212.00	2087.22
1/2MS	276.00	144.41	420.41	19.36	391.96	59.92	18.23	27.73	106.00	1043.61
White	46.64	0	46.64	4.27	64.90	50.90	73.89	144.33	30.84	415.77
MW	364.85	63.00	427.85	61.45	773.66	105.83	35.50	46.83	40.08	1874.98

2.3 芽的增殖

12 种培养基用于检验基本培养基和生长调节剂的影响,试图建立巨桉微繁体系。试验目的在于从单芽或丛生芽获得理想的增殖芽。4 种不同基本培养基、3 种不同浓度水平的 BAP 以及 3 种不同浓度水平

的 NAA,按照正交试验设计表 $L_{18}(6,1 \times 3,6)^{[7]}$ 进行设计。30 d 后进行统计分析(表 3)。

表 3 基本培养基、BAP and NAA 浓度对巨桉芽增殖的影响

试验号	培养基	BAP/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	NAA/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	茎芽形成指数	平均芽长/cm	芽生长活力
1	MS	0.1	0.1	2.1	1.3	不正常叶片
2	MS	0.5	0.01	1.8	1.7	不正常叶片
3	MS	1.0	0.05	2.6	1.5	不正常叶片
4	1/2MS	0.1	0.05	1.2	1.4	不正常叶片;芽弱
5	1/2MS	0.5	0.1	1.1	1.4	不正常叶片;芽弱
6	1/2MS	1.0	0.01	1.5	1.1	不正常叶片;芽弱
7	White	0.1	0.01	1.3	1.7	不正常叶片;芽弱
8	White	0.5	0.05	1.4	1.6	不正常叶片;芽弱
9	White	1.0	0.1	1.9	1.4	不正常叶片;芽弱
10	MW	0.1	0.01	1.7	2.1	绿色伸展叶片;健壮芽
11	MW	0.5	0.05	2.5	1.9	绿色伸展叶片;健壮芽
12	MW	1.0	0.1	2.8	1.5	绿色伸展叶片;健壮芽

通过上述试验的差异分析,细胞分裂素浓度对茎芽长度、芽数和芽生长活力影响显著。基本培养基 MW 适合巨桉的芽增殖。为了获得又长又高的茎芽,选择 BAP $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 NAA $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组合为佳。在特定范围内,芽数随细胞分裂素的增加而增加。虽然试验 11 的茎芽比试验 10 的矮一些,但芽数明显较多。在高浓度情况下,如试验 12, BAP $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 比 BAP 0.5 或 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 所产生的芽要多,但平均芽长却相反。

该试验利用茎段或腋芽作为外植体,没有出现长根现象。在工厂化育苗过程中,随代数增加,造成茎芽中激素累聚,应该调节 BAP 和 NAA 的浓度。BAP 为 $0.1 \sim 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, NAA 为 $0.01 \sim 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。生产过程中最高茎芽形成指数达到 4.0。

2.4 茎芽的生根和植株的形成

取 $1.5 \sim 2.5 \text{ cm}$ 长的茎芽用于生根试验。基本培养基 B2^[4] 附加 ABT1 生根粉(中国林科院生产)、IBA 和 NAA 分别取 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度作试验。7 d 后可见根原始体,14 d 内可见 $1 \sim 2 \text{ cm}$ 长的根系。然后生根苗转入荷兰进口的玻璃温室进行炼苗。茎芽生根率随生根剂种类及其浓度不同而不同(表 4)。

表 4 不同生长调节剂及其浓度对生根培养的影响

生长调节剂	浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	生根率/%	平均根数	平均根长/cm
ABT1	0.1	45	1.9	3.4
ABT1	0.5	65	2.3	2.6
ABT1	1.0	89	3.2	1.5
IBA	0.1	62	2.0	4.1
IBA	0.5	93	4.1	3.2
IBA	1.0	91	4.8	1.9
NAA	0.1	58	1.8	3.3
NAA	0.5	90	2.3	2.3
NAA	1.0	86	2.9	0.8

将茎芽转入生根培养基 28 d 后,观察表明:IBA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 是适合生根培养的,根系生长良好。ABT1 其次, NAA 根系较弱。高浓度的 ABT1、IBA 或 NAA 抑制根的扩展,即使根条数较多,不适宜工厂化育苗。在 2003 年和 2004 年,本试验直接或间接提供造林苗木几十万株。

组培苗移栽在红心土上,成活率超过 93%。小苗在简易温室中生长正常,没发现表形变异现象。

3 结论

总之,通过茎诱导已建立了巨桉工厂化微繁体系。该方法提供了连续不断的、无菌的、实用的扩繁方法,也为其它植物扩繁提供了技术依据。

MW 培养基附加 BA 和 NAA 能够有效地诱导和促进芽的增殖以及维持继代材料。B2 (下转第 79 页)

率随光照的加强、温度的升高而升高,到中午前后达到峰值,下午随光照强度和气温的降低而降低,故呈单峰曲线。比较4种常绿植物的蒸腾速率的峰值和日平均值,珊瑚树>海桐>桂花>大叶黄杨,并不与4种植物叶片的组织水高低一致,但与自由水的高低顺序较为一致,表明植物组织中自由水的含量越高,水分散失越快,蒸腾速率也越高。

虽然4种植物的蒸腾速率日变化为单峰曲线,但4种常绿植物的净光合速率仍然为双峰曲线,可能与中午温度过高有关,温度过高,与光合作用有关的各种酶的活性下降,导致光合速率也降低^[5]。4种植物的净光合速率的峰值和日均值以海桐为最高,其次为珊瑚树,大叶黄杨最低,与光合色素中总叶绿素及叶绿素a含量高低一致,并且与4种植物对光照的响应有关,海桐的光补偿点低,而光饱和点高,表明海桐既能适应较低的光照,又能适应较高的光照,故光合能力较强。

植物对环境的调节作用,既受到植物的生理特性、植物树冠、叶片的形态结构等内部因素的影响,同时还受到大气中光照、温度、风等外因的影响。4种常绿植物冠内温度与大气比较,以海桐差异最大,大叶黄杨几乎没有差异,主要与树冠的形态结构有关,海桐枝叶浓密,树冠表面积大,光线不易直射到树冠内,故温度比大气中低;大叶黄杨枝叶稀疏,易受外界环境影响,因此,几乎与大气中没有差异,4种植物树冠外围的湿度和CO₂含量均与大气中的湿度和CO₂含量呈显著差异,湿度的大小和CO₂浓度高低与植物蒸腾速率和净光合速率关系密切,蒸腾速率强,树冠外围的湿度高,净光合速率高,释放出的氧气就多,CO₂的相对含量就低。就吸尘能力来讲,海桐的叶片小且光滑平整,不易吸收灰尘,吸尘能力差,而珊瑚树叶片大,成“V”形,吸尘能力较强。

参考文献:

- [1] 张志良, 瞿伟菁. 植物生理学实验指导: 第三版[M]. 北京: 高等教育出版社, 2003: 127-128.
- [2] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 164-166, 260-261.
- [3] 潘瑞炽, 董愚得. 植物生理学(第三版)[M]. 北京: 高等教育出版社, 1993: 21-23.
- [4] 王梦本, 李洪建, 才宝峰, 等. 树种蒸腾作用、光合作用和蒸腾速率的比较研究[J]. 植物生态学报, 1999, 23(5): 401-410.
- [5] 易干军, 姜小文, 霍合强, 等. 瑛溪蜜柚光合特性的研究[J]. 园艺学报, 2003, 30(5): 519-524.

(上接第63页)培养基附加IBA能够有效诱导根系形成和形成小植株。由此培育的组培苗移栽在红心土上, 具有很高的成活率。

参考文献:

- [1] 祁述雄. 中国桉树[M]. 北京: 中国林业出版社, 1989: 49.
- [2] GB/T15776-1995, 中华人民共和国造林技术规程[S].
- [3] HUANG Feng H., AL-KHAYRI Jameel M., and GBUR Edward E.. Micropropagation of *Acacia mearnsii*[J]. In Vitro Cellular and Developmental Biology, 1994, 30(1): 70-74.
- [4] 陈碧华, 万泉, 李乾振, 等. 尾叶桉组织培养快速繁殖的研究[J]. 福建林业科技, 2002, 29(2): 9-11.
- [5] 谭文澄. 观赏植物组织培养技术[M]. 北京: 中国林业出版社, 1991: 374.
- [6] Smith Robert H., Plant Tissue Culture Techniques and Experiments (Second Edition)[M]. California: Academic Press, 2000: 43-55.

(上接第66页)

- [2] 孙耀星. 木材浸注处理技术研究进展[C]//中国林学会木材科学分会第九次学术研讨会论文集. 哈尔滨: 中国林学会木材科学分会, 2004.
- [3] 闵锁田. 一种木材阻燃处理工艺: 中国, 02145544.9[P]. 2002-12-13.
- [4] 尹崇福. 超声学[M]. 北京: 科学出版社, 1990: 507-521.
- [5] 高云玲. 超声波应用于纺织品前处理[J]. 染整技术, 2000, 22(10): 27-28.
- [6] 杜水源. 功率超声在化工领域的应用[J]. 国际电子设备, 2002, (10): 35-39.