

文章编号:1001-7380(2006)06-0010-04

光叶楮组织培养快速繁殖技术的研究

蒋泽平, 梁珍海, 李荣锦, 吴 纲

(江苏省林业科学研究院, 江苏 南京 211153)

摘要:对光叶楮组织培养中的外植体灭菌、苗玻璃化预防、增殖培养、根原基诱导及室外移栽进行的试验结果表明:以优良母株的具腋芽茎段为外植体,经过0.1%的 $HgCl_2$ 灭菌后,外植体成活率为53.6%;培养基中添加4.0%的蔗糖及增加培养容器的透气性能能较好地预防玻璃苗的发生;在MS培养基中附加BA、NAA等植物生长调节剂可有效促进试管苗的增殖和生长,其中以1.5 mg/L BA + 0.15 mg/L NAA的组合最为适宜;适宜的根原基诱导培养基为1/2MS + 0.5 mg/L IBA + 0.3 mg/L NAA + 100 mg/L LH + 2%蔗糖;具根原基试管苗移栽于混合基质(蛭石:珍珠岩:泥炭 = 6:3:1,体积比)中,温度控制在20~30℃,相对湿度为85%~90%,保湿15~20 d,其间适当遮荫,30 d后试管苗成活率达90%。

关键词:光叶楮;组织培养;玻璃苗;快速繁殖**中图分类号:**Q945.52 **文献标识码:**A

Research on *in vitro* rapid micropropagation of *Bronssonetia papyrifera* (L.) Vent.

JIANG Ze-ping, LIANG Zhen-hai, LI Rong-jin, WU Gang

(Jiangsu Academy of Forestry, Nanjing 211153, China)

Abstract: The experiments in *Bronssonetia papyrifera* (L.) Vent. were committed concerning explant sterilization, shoot vitrification control, multiplication culture, root promordia induction and transplant. Results showed that with the nodal segments from the elite parent trees of *Bronssonetia Papyrifera* (L.) Vent. as explants, their survival could get 53.6% after 0.1% $HgCl_2$ sterilization; addition of 4.0% sucrose (S) to media and container air-permeability could effectively control shoot vitrification; MS supplemented with BA and NAA could improve culture multiplication and growth, with the media containing 1.5 mg/L BA + 0.15 mg/L NAA optimal; the optimal root promordia induction took place in 1/2MS media containing 0.5 mg/L IBA + 0.3 mg/L IBA + 100 mg/L LH + 2% S; transplant of the shoots with root promordia into the substrate mixed with 6:3:1 (volume ratio) vermiculite, perlite and peat in 20~30℃, under relative humidity 85%~90% for 15~20 d, preferable shading occasionally, could get the transplant survival up to 90% after 30 d.

Key words: *Bronssonetia papyrifera* (L.) Vent.; Tissue culture; Vitreous shoots; Rapid micropropagation

光叶楮 [*Bronssonetia papyrifera* (L.) Vent.] 为桑科构树属多年生落叶乔木,为日本从野生构树中选育的品种,高达6~16 m,胸径60 cm。根系水平分布,深度30~40 cm,广度是冠径的2~3倍。枝条粗壮而平展,小枝及叶片很少绒毛或无毛,叶柄短,叶片大而肥厚,枝条节间长,枝杈少,皮、杆纤维长。该树种在干旱瘠薄或水湿地及酸、碱性等土壤上均宜生长,特别在含盐量达0.3%的盐碱地里也

能生长,而且对空气中二氧化硫等有毒气体有较强的抗性,是极好的环保树种。树皮为生产优质长纤维纸浆或高档纺织品的原料;木杆可用于生产木浆、木板;叶是猪等家畜的优质饲料;果实和根可入药,有补肾利尿、强壮筋骨的功效。据报道,光叶楮为速生纸材新品种,因其韧皮纤维平均长度7.54 mm,长宽比33:2,成浆率在80%以上,原浆白度在85%以上;木杆纤维平均长度0.79 mm,最长1.14 mm,成

收稿日期:2006-08-29

基金项目:江苏省农业三项工程项目“光叶楮引种快繁及栽培示范推广”[SX(2005)124]

作者简介:蒋泽平(1963-),男,江苏丹阳人,高级工程师,主要从事植物组织培养及选育技术研究工作。

浆率在 85% 以上,原浆白度在 80% 以上,适于制 APMP 和 CTMP 高得率木浆^[1]。发展光叶楮,有利于解决江苏丘陵岗地、沿海等困难立地造林绿化问题,加快生态省建设的步伐;又因其且有极高的经济价值,市场需求旺盛,故该树种的发展前景十分广阔。但江苏发展光叶楮,目前面临优质种苗缺乏的问题,有关光叶楮的组织培养技术虽有文献报道^[2-3],但整个培养过程中会出现玻璃苗、移栽成活率不高等难题。本文就光叶楮组织培养中的外植体灭菌、苗玻璃化预防、增殖培养、根原基诱导及移栽等关键技术进行了探索,试图在短期内提供大量优质种苗,加快推广应用的速度。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

从生长优良的光叶楮母株上,采集嫩枝先端(半木质化)部分为外植体,剪成长 1 cm 左右的单芽,茎段部分去叶,留 2 cm 左右叶柄,用 10% 的洗衣粉溶液浸泡 15 min,用棉球对外植体仔细清洗后,经流水冲洗干净备用。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体灭菌 将洗净的外植体用 75% 乙醇溶液浸泡杀菌 30 s 后,经无菌水冲洗 2~3 次,于灭菌液中灭菌,灭菌液分别为 10% $\text{Ca}(\text{ClO})_2$, 0.1% HgCl_2 和 17% H_2O_2 ;灭菌时间分别采用 5, 10, 15 min 和对照(不灭菌),采用随机区组排列,表面灭菌后用无菌水冲洗 3~4 次,沥干水后迅速将带腋芽的茎段接到诱导培养基 $\text{MS} + \text{BA} 1.0 \text{ mg/L} + \text{NAA} 0.1 \text{ mg/L}$ 中,每瓶接 1 个,每次 30 瓶,每组重复 3 个,20 d 后统计外植体的污染率、死亡率和成活率。

1.2.2 增殖培养试验 待诱导的不定芽长至 2 cm 左右,切下接入增殖培养基中培养。芽苗增殖培养基试验方法是在 MS 基本培养基中附加不同的 BA, NAA, V_c , 按正交试验表^[4]形成不同配方的培养基。BA, NAA, V_c 为 3 个变化因素。BA 采用 1.0, 1.5, 2.0 mg/L 等 3 个水平, NAA 采用 0.1, 0.15, 0.2 等 3 个水平, V_c 采用 10, 50, 100 mg/L 等 3 个水平,培养基添加蔗糖 30 g/L,每处理接种 30 瓶,每瓶 1 个外植体,接种培养 35 d 时观测试管芽苗增殖倍数和芽苗生长高度。

1.2.3 试管苗玻璃化预防 在探索蔗糖处理预防光叶楮试管苗玻璃化试验中,蔗糖的不同质量浓度分别为 3.0%, 4.0%, 4.5%, 5.0% 等 4 个梯度;在

探索增加培养容器的透气性对试管苗玻璃化影响的试验中,采用透气封口膜(北京振泰园艺设施有限公司生产的规格为 4 孔 12 cm × 12 cm)与封闭封口膜为材料进行培养。具体试验为:处理 I:三角瓶封闭式封口材料;处理 II:三角瓶透气式封口材料。上述试验培养基均为 $\text{MS} + 1.5 \text{ mg/L BA} + 0.15 \text{ mg/L NAA}$, 琼脂用量 0.65%, pH 5.8。

1.2.4 根原基诱导 芽苗根原基诱导培养基配比试验方法是将光叶楮生长健壮的芽苗,接种在 1/2MS 附加不同质量浓度的生长素 NAA, IBA, 以及不同质量浓度水解乳蛋白(LH)配比的培养基上,进行诱导处理。采用正交试验设计 $L_9(3^4)$ 的方案,观察根原基形成的早迟,选择最佳根原基诱导培养基。每处理 30 瓶,每瓶 5 个芽苗。

1.2.5 组培苗移栽管理 试管苗移栽试验方法是将已具根原基的试管小苗,移栽于蛭石:珍珠岩:泥炭(体积比)=6:3:1, 6:3:3, 4:3:3 等 3 种混合基质中,环境温度控制在 25~30℃,相对湿度 85%~90%,保湿、遮荫 15~20 d, 35 d 后统计成活率。

上述除有说明外,所有培养基均加入 3% 的蔗糖和 0.65% 卡拉胶, pH 5.8, 培养室温度白天为 25~28℃, 夜晚为 20~22℃, 光照度 1 500~2 000 lx, 光照时间 12 h/d。

2 结果与分析

2.1 外植体灭菌

用不同的灭菌药剂 [A_1 :17% H_2O_2 ; A_2 :0.1% HgCl_2 ; A_3 :10% $\text{Ca}(\text{ClO})_2$] 和不同的灭菌时间 (B_1 :5 min; B_2 :10 min; B_3 :15 min) 灭菌光叶楮外植体, 20 d 后对成活率的影响结果见表 1。

不同药剂和不同灭菌时间对外植体灭菌的结果表明:不同灭菌剂与相同灭菌时间及同一灭菌剂与不同灭菌时间的处理组合影响差异明显。说明光叶楮外植体灭菌应综合考虑灭菌的时间和灭菌的药剂才有助于提高外植体成活率。在考虑主效应的同时,应当考虑它们之间的交互效应。如在选择不同灭菌时间的同时,还应考虑采用何种药剂;在选用何种药剂的同时,还要考虑恰当的灭菌时间,这样才能获得较高的成活率。本试验条件下灭菌效果最好的处理是 A_2B_3 即 0.1% HgCl_2 灭菌 15 min, 其外植体成活率达 53.6%。

2.2 植物生长调节剂正交组合对芽苗生长的影响 结果见表 2。

表1 不同灭菌剂和不同灭菌时间外植体灭菌结果

处理	灭菌剂	灭菌时间 /min	污染率 /%	死亡率 /%	成活率 /%
CK		0	100	0	0
A ₁ B ₁	H ₂ O ₂	5	85.6	0	14.4
A ₁ B ₂	H ₂ O ₂	10	82.2	0	17.8
A ₁ B ₃	H ₂ O ₂	15	81.1	0	18.9
A ₂ B ₁	HgCl ₂	5	79.6	0	20.4
A ₂ B ₂	HgCl ₂	10	45.3	8.2	46.5
A ₂ B ₃	HgCl ₂	15	33.0	13.4	53.6
A ₃ B ₁	Ca(ClO) ₂	5	96.5	0	3.5
A ₃ B ₂	Ca(ClO) ₂	10	84.4	0	15.6
A ₃ B ₃	Ca(ClO) ₂	15	82.2	0	17.8

表2 光叶楮增殖的正交试验结果

组合号	A (BA)	B (NAA)	C (V _C)	平均增殖倍数	平均高度 /cm	长势
1	1.0	0.1	10	2.4	2.9	较弱
2	1.0	0.15	100	2.6	3.3	较壮
3	1.0	0.2	50	3.0	3.8	粗壮
4	1.5	0.1	100	4.3	2.7	较弱
5	1.5	0.15	50	4.6	3.2	较壮
6	1.5	0.2	10	4.4	3.4	较壮
7	2.0	0.1	10	5.2	1.6	很弱
8	2.0	0.15	50	5.0	1.8	很弱
9	2.0	0.2	100	4.8	2.1	较弱
T1	3.5	3.8	4.0			
T2	4.6	5.1	4.9			
T3	5.8	4.5	5.2			
R	2.3	1.3	1.2			

(1)各组合均以MS为基本培养基。(2)T1~T3为每一因素每一水平之和;R为最大与最小水平间距。

从表2可以看出,BA质量浓度是决定芽苗增殖主要因子,5号组合的芽苗增殖效果最好,增殖倍数达4.6,生长高度为3.2cm,且芽苗生长较壮。当BA超过1.5mg/L时,芽苗增殖倍数虽有小幅增加,但其芽苗生长高度大大下降,更为不利的是芽苗生长很弱,叶片稀少、皱缩,叶形不正常,茎细弱,甚至出现烂心、玻璃苗现象。3号组合对光叶楮试管芽苗的壮苗最佳,生长高度达3.8cm,也有一定的增殖(3.0倍),芽苗生长过程中,表现为叶片大,叶色浓绿,茎粗,非常适宜生根培养。V_C的抗氧化作用减少了培养过程中植株分泌的次生物质对无菌芽苗的毒害^[5],使试管芽苗正常生长,从试验结果看V_C用量为50mg/L较为适宜。所以,光叶楮芽苗增殖最佳组合为MS+1.5mg/L BA+0.15mg/L NAA+50mg/L V_C+3% S。

2.3 玻璃苗预防处理

结果见表3。当蔗糖质量浓度在3.0%~5.0%

表3 蔗糖不同浓度对光叶楮组培苗玻璃化及其生长的影响

处理	蔗糖质量浓度 /%	玻璃化苗率 /%	芽苗生长情况
1	3.0	57.33 a	玻璃苗多,叶色浅绿,生长快
2	4.0	12.56 b	玻璃苗少,叶色浓绿,生长快
3	4.5	12.33 b	玻璃苗少,叶色深绿,生长快
4	5.0	12.42 b	玻璃苗少,叶色深绿,生长快

玻璃苗率(%) = 玻璃化苗数量/总苗数 × 100

范围内,玻璃化苗发生的频率随质量浓度的增加而显著降低,且各处理间的差异显著。其中处理1即蔗糖的质量浓度为3.0%时,玻璃化苗率极显著高于其他处理。可以看出蔗糖质量浓度是影响玻璃化苗发生的重要因素,质量浓度较高的处理可减少玻璃化苗的发生,处理2,3,4差异不显著而且生长情况类似,故可选蔗糖4.0%用于继代培养中。

培养容器内的湿度和透光率等因素直接影响试管芽苗的生长,封口材料透气性不同造成培养物所处的微环境存在差异。通过试验发现,处理I玻璃化苗率为57.33%,处理II为5.36%。说明处于封闭状态下,容器内部微环境湿度大,缺乏气体交换,不利试管苗的健壮生长,容器内生长的芽苗细弱,叶色浅。用透气膜为封口材料,由于具有良好的透气性,降低了微环境中的湿度,便于容器内芽苗的生长,因而试管苗叶色浓绿、健壮^[6]。

2.4 根原基诱导

将经壮苗培养长至高为2~3cm的光叶楮试管芽苗,接入根原基诱导培养基中,诱导培养10d后,基部出现愈伤组织,12d后可见基部分化出许多根原基。

结果(见表4)表明,对光叶楮根原基诱导影响最大的是IBA,其次是NAA和LH。组合5与6的根原基发生率分别达到95%和92%。因此,认为组合5:1/2MS+0.5mg/L IBA+0.3mg/L NAA+100mg/L LH+2% S为最佳根原基诱导培养基。

2.5 组培苗的移栽

移栽试验结果表明,在相同条件下,基质对光叶楮试管苗移栽成活有影响。成活所需时间,成活率都有明显差异。蛭石:珍珠岩:泥炭(体积比)=6:3:1,成活所需时间25d,成活率达92%,为最佳配比的混合基质。

表4 光叶楮生根处理对根原基发生率的影响

组合号	因子			根原基发生率/%
	A(NAA) /(mg/L)	B(IBA) /(mg/L)	C(V _c) /(mg/L)	
1	0.05	0.1	100	56
2	0.05	0.5	50	65
3	0.05	1.0	10	78
4	0.3	0.1	10	82
5	0.3	0.5	100	98
6	0.3	1.0	50	92
7	0.5	0.1	50	83
8	0.5	0.5	10	88
9	0.5	1.0	100	90
T1	10.2	12.6	13.6	
T2	8.6	8.2	9.0	
T3	7.4	4.9	8.2	
R	2.8	1.9	1.8	

(1)根原基发生率=具根原基株数/总株数;(2)T1~T3为每一因素每一水平之和;R为最大与最小水平间距。

表5 3种基质对光叶楮试管苗移栽成活的影响

组合	成活所需时间/d	成活率/%
6:3:1	25	92
6:2:2	29	85
4:3:3	32	75

3 结论与讨论

(1)在组织培养接种阶段,要控制好灭菌方法,污染率的高低直接影响初期的繁殖速度。在光叶楮的组织培养中,以0.1%升汞溶液杀菌时间10~15 min为宜。在取得光叶楮母株后,先置于温室内栽培14 d左右,期间注意不洒叶面水,每隔3~5 d喷施1次杀菌剂,可有效降低接种培养时的污染率。

(2)糖对试管芽苗作用,主要为其生长提供碳源和调节渗透势,作为能量的供给者,糖对离体培养物的生长具有重要作用。本试验发现提高蔗糖的质量浓度对控制玻璃化苗有促进作用,但并不能完全抑制玻璃化苗的发生,过高的蔗糖质量浓度培养会抑制试管芽苗的生长,说明玻璃化苗的发生不仅是能量的不足,可能与代谢紊乱有关。通过不同封口材料及容器试验表明,培养的试管芽苗生长效果的差异是由于透气状况不同引起的。其原因与较高浓

度的细胞分裂素类物质导致玻璃化原因类似,可能在封闭状况下,较高质量浓度的BA加快了试管苗生长速度,芽苗呼吸作用大大增强,需要在培养的微环境中进行气体交换(水蒸气、氧气、二氧化碳、乙烯等)^[7-9]。在封闭状况下,容器内外气体得不到有效的交换,无法满足试管芽苗生长需求,导致玻璃化。采用透气类型的封口膜或容器,改善了通气状况,促进了呼吸,产生了丰富的ATP,满足了芽苗对ATP的要求,试管植株生长健壮。

(3)当光叶楮腋芽长到2 cm左右,可切下接入继代培养基中进行增殖培养。经过实验筛选,分化较好的芽增殖培养基为MS+1.5 mg/L BA+0.15 mg/L NAA。

(4)当光叶楮试管芽苗长到高2 cm左右时可转移到根原基诱导培养基1/2MS+0.5 mg/L IBA+0.3 mg/L NAA+100 mg/L LH+2% S上培养。提高光照度到2500 lx,延长光照时间到每天16 h。一般12 d后开始有根原基形成,即可进行炼苗及驯化,准备移栽。

(5)试管苗移栽,基质以蛭石:珍珠岩:泥炭(体积比)=6:3:1较好。温度控制在25~28℃之间,在移栽前后3~5 d湿度控制在95%以上,7 d后控制在85%~95%左右,20 d即可成活,成活率达92%以上。

参考文献:

- [1] 雷晓春,陈嘉川.速生纸材新品种—光叶楮[J].中华纸业,2003,24(5):55-56.
- [2] 李际红,孟凡志,邵小杰.光叶楮组织培养快繁技术研究[J].山东林业科技,2002(4):13-15.
- [3] 孙天渊,王清海.日本光叶楮组织培养技术[J].农业科技开发,2004,18(5):59-60.
- [4] 李春喜,王志和,王文林.生物统计学[M].北京:科学出版社,2000.
- [5] 姚洪军,罗晓芳,田颀亭.植物组织培养外植体褐变的研究进展[J].北京林业大学学报,1999,21(3):78-84.
- [6] 梁海曼,周菊华.试管苗玻璃化现象的生理生化和机理探讨[J].武汉植物学研究,1994,12(3):281-288.
- [7] 钟士传,曹帮华.控制毛白杨新无性系试管苗玻璃化的研究[J].山东林业科技,2000(2):17-19.
- [8] 王哲之,胡正海.槐树组织培养中超度含水态苗发生与防治研究[J].应用与环境生物学报,1998,4(3):227-231.
- [9] Matthieu Falque, Daniel Compan, Rose Galzy. A method for the study of CO₂ exchange in vitro cultured *Vitis rupestris* plantlets[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 1991,27:175-181.