

光皮桦组织培养技术研究

陈伟¹, 林镇斌², 郑郁善²

(1. 南京林业大学, 江苏 南京 210037; 2. 福建农林大学, 福建 福州 350002)

摘要: 对光皮桦带芽茎段组织培养技术的外植体启动培养、丛生芽增殖以及试管苗生根和炼苗移栽等方面开展研究, 结果表明, 外植体灭菌最优流程: 经 75% 酒精 1~1.5 min 处理后转入 0.1% HgCl_2 溶液消毒处理 7 min; 在改良 MS+6-BA 5.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA 0.01 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的培养基上, 外植体启动速度最快; 在改良 MS+6-BA 4.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +蔗糖 40 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA 0.01 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的培养基上, 外植体增殖系数最高可达 6.9 倍; 在改良 WH+IBA 3.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA 1.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 培养基中, 继代苗的生根率最高; 试管苗移栽的最佳基质为沙: 田园土=1:1。

关键词: 光皮桦; 组织培养; 无性繁殖

中图分类号: S792.150.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-7351(2006)01-0067-05

Study on Technology of Tissue Culture in *Betula luminifera*

CHEN Wei¹, LIN Zhen-bin², ZHENG Yu-shan²

(1. Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China;

2. Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: This article studied the tissue culture of *Betula luminifera*, including inducing callus, bourgeoning buds, multiplication a cluster of buds and growing root and practicing seedling in different nutrient organic. The result showed that the best proceeding of disinfecting of the stems with bud are disinfecting 75% alcohol after 1~1.5 min, treated by 0.1% HgCl_2 liquor in seven minutes; The fast initiation speed of culture medium is mend-MS+6-BA 5.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA 0.01 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; the medium with mend-MS+6-BA 4.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +saccharose 40 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA 0.01 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ is best medium which multiplication coefficient is up to 6.9; The medium of the highest root rate include mend-WH+IBA 3.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA 1.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; the optimize transplanting medium are the sandy and garden soil which mixed with 1:1.

Key words: *Betula luminifera*; tissue culture; asexual propagation

光皮桦(*Betula luminifera*)为桦木科桦木属, 落叶高大乔木, 在秦岭、淮河流域以南的河南、陕西、甘肃、四川、贵州、安徽、湖北、湖南、浙江、江西、福建、云南、广西、广东等 14 个省区均有天然分布, 具有喜光、耐贫瘠、速生、材质好和用途广的特性, 是优良的速生珍贵阔叶树种。近年来, 在我国南方的一些省份已大力推广应用。但由于光皮桦各产地种子的成熟期差异大, 种子轻、带翅, 采集困难, 同时种子发芽能力丧失快, 采种育苗操作难, 因此光皮桦的优质苗木供不应求。选择优良材料, 利用优良材料的组织培养技术育苗, 可保持苗木的优良遗传特性, 规模化生产优质苗木, 对光皮桦的良种推广具有重要意义。

1 试验材料和方法

1.1 试验材料

光皮桦优树当年生枝条, 选取健康、无病虫害的带芽茎为外植体, 经 75% 酒精消毒处理 1~1.5 min 再转入 0.1% HgCl_2 溶液消毒处理 7 min 后, 接种于培养基中。

1.2 试验设计

1.2.1 不同培养基及不同激素浓度组合对外植体诱导 以 MS 和改良 MS 基本培养基为基础, 添加不同

收稿日期: 2005-09-12

基金项目: 福建省科学技术厅重大科研项目(2003N003)

作者简介: 陈伟(1969-), 女, 福建福清人, 福建省森林资源管理总站高级工程师, 南京林业大学林木遗传和基因工程重点实验室博士研究生。

通讯作者: 郑郁善

浓度 6-BA 及 NAA, 按照完全随机化的方法, 安排 3 因素不同水平的全面组合试验设计见表 1。

表 1 3 因素不等水平随机化全面组合试验设计

试验 编号	培养基组合	试验 编号	培养基组合
1	MS+6-BA 1.0 mg·L ⁻¹ +NAA 0.01 mg·L ⁻¹	7	改良 MS+6-BA 1.0 mg·L ⁻¹ +NAA 0.01 mg·L ⁻¹
2	MS+6-BA 1.0 mg·L ⁻¹ +NAA 0.1 mg·L ⁻¹	8	改良 MS+6-BA 1.0 mg·L ⁻¹ +NAA 0.1 mg·L ⁻¹
3	MS+6-BA 3.0 mg·L ⁻¹ +NAA 0.01 mg·L ⁻¹	9	改良 MS+6-BA 3.0 mg·L ⁻¹ +NAA 0.01 mg·L ⁻¹
4	MS+6-BA 3.0 mg·L ⁻¹ +NAA 0.1 mg·L ⁻¹	10	改良 MS+6-BA 3.0 mg·L ⁻¹ +NAA 0.1 mg·L ⁻¹
5	MS+6-BA 5.0 mg·L ⁻¹ +NAA 0.01 mg·L ⁻¹	11	改良 MS+6-BA 5.0 mg·L ⁻¹ +NAA 0.01 mg·L ⁻¹
6	MS+6-BA 5.0 mg·L ⁻¹ +NAA 0.1 mg·L ⁻¹	12	改良 MS+6-BA 5.0 mg·L ⁻¹ +NAA 0.1 mg·L ⁻¹

*: 试验每处理每次接种 50 瓶, 每瓶接种 1 个外植体。

1.2.2 不同激素浓度对增殖培养的影响 根据启动培养外植体的生长情况, 调整培养基成分及激素水平, 以期得到最好的培养效果。采用 4 因素 3 水平的正交设计 L₉(3⁴)(见表 2), 以空白作对照。

表 2 不同激素浓度增殖培养试验因素与水平表

因素与水平	A(6-BA 浓度)/mg·L ⁻¹	B(蔗糖浓度)/g·L ⁻¹	C(NAA 浓度)/mg·L ⁻¹
1	A ₁ (4.0)	B ₁ (20)	C ₁ (0.01)
2	A ₂ (4.5)	B ₂ (30)	C ₂ (0.1)
3	A ₃ (5.0)	B ₃ (40)	C ₃ (0.5)

1.2.3 不同培养基及激素浓度对生根培养的影响 以改良 WH、1/2 改良 MS 和 1/2MS 为基本培养基, 添加了不同浓度的 IBA 和 NAA 组合的培养基上, 试验设计安排了 4 因素 3 水平的正交设计 L₉(3⁴), 具体试验设计见表 3, 以空白作对照。

表 3 不同培养基及激素浓度生根培养试验因素水平表

因素与水平	A(基本培养基)/mg·L ⁻¹	B(IBA 浓度)/mg·L ⁻¹	C(NAA 浓度)/mg·L ⁻¹
1	A ₁ (改良 WH)	B ₁ (1.0)	C ₁ (0.5)
2	A ₂ (1/2 改良 MS)	B ₂ (2.0)	C ₂ (1.0)
3	A ₃ (1/2MS)	B ₃ (3.0)	C ₃ (1.5)

1.2.4 不同的移栽基质对移栽成活率的影响 采用单因素随机区组设计, 沙(E₁)、田园土(E₂)、沙与田园土的等比混合(E₃)3 种基质水平。共计 3 个处理。

2 结果和分析

2.1 不同培养基及不同激素浓度组合对外植体诱导的影响

将消毒后的外植体放入不同基本培养基与不同浓度的启动培养基中, 观察外植体的生长分化情况及启动天数, 30 d 调查愈伤组织分化率、芽体分化率, 结果如表 4。方差分析结果表明(表 5), 2 种基本培养基、6-BA 浓度及两者的交互作用均对带芽茎培养的启动速度有极显著影响, NAA 浓度对启动速度无显著性影响; 2 种基本培养基及 6-BA 浓度对愈伤组织分化率有显著性影响, NAA 浓度对愈伤组织分化率无显著性影响, 各处理因素的交互作用对愈伤组织分化率也无显著性影响; 6-BA 浓度对芽体分化率有极显著性影响, 基本培养基、NAA 浓度以及各因素的交互作用对芽体分化率无显著性影响。当 6-BA 浓度为 1.0 mg·L⁻¹时, 外植体不能分化出新的芽体。6-BA 浓度在 3.0 mg·L⁻¹与 5.0 mg·L⁻¹时, 能促进芽体分化。在改良 MS+6-BA 3.0 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹处理下, 启动速度最快, 且产生丛生芽及少量愈伤组织, 芽体分化率最高。

2.2 不同激素浓度对增殖培养的影响

将启动培养所得的无菌材料, 转入各增殖培养基中, 30 d 后统计增殖情况见表 6。从表中可以看出, 9 种组合试验中, 改良 MS+6-BA 4.5 mg·L⁻¹+蔗糖 40 g·L⁻¹+NAA 0.01 mg·L⁻¹组合, 增殖系数最高

达6.9,根据k值的大小,比较3因素各水平求得最优水平组合仍为这一组合。增殖培养效果方差分析表明(表7),6-BA浓度对增殖系数有极显著影响,NAA浓度对增殖系数有显著影响,蔗糖浓度对增殖无显著影响。

表4 不同培养基及不同激素浓度组合对外植体诱导的影响结果

试验号	平均启动速度/d	愈伤组织分化率/%	芽体分化率/%	启动培养效果
1	15.9	8.4	0	产生愈伤组织,并伴有抽梢生长
2	16.5	43.6	0	产生愈伤组织,并伴有抽梢生长
3	13.7	84.3	68.0	产生愈伤组织、丛生芽
4	14.0	90.0	20.9	产生愈伤组织、丛生芽
5	15.5	30.1	58.2	产生愈伤组织、丛生芽
6	15.6	47.1	44.8	产生愈伤组织、丛生芽
7	13.4	8.3	0	产生愈伤组织,并伴有抽梢生长
8	13.6	11.0	0	产生愈伤组织,并伴有抽梢生长
9	11.2	26.4	89.4	产生丛生芽及少量愈伤组织
10	11.1	32.5	81.3	产生愈伤组织、丛生芽
11	10.0	16.8	72.0	产生丛生芽及少量愈伤组织
12	10.3	19.4	72.3	产生丛生芽及少量愈伤组织

表5 方差分析表

变异来源		平方和	自由度	均方	F值
启动速度	A(基本培养基)	938.89	1	938.89	774.30**
	B(6-BA浓度)	300.72	2	150.36	124.00**
	C(NAA浓度)	4.01	1	4.01	3.31
	A×B	120.13	2	60.07	49.54**
	A×C	0.68	1	0.68	0.56
	B×C	0.72	2	0.36	0.30
愈伤组织分化率	A(基本培养基)	1217.78	1	1217.78	43.63*
	B(6-BA浓度)	1583.62	2	791.81	28.37*
	C(NAA浓度)	190.78	1	190.78	6.83
	A×B	392.32	2	196.16	7.03
	A×C	80.33	1	80.33	2.88
	B×C	47.96	2	23.98	0.86
芽体分化率	A(基本培养基)	496.44	1	496.44	16.42
	B(6-BA浓度)	7580.01	2	3790.01	125.38**
	C(NAA浓度)	150.38	1	150.38	4.97
	A×B	346.66	2	173.33	5.73
	A×C	73.11	1	73.11	2.42
	B×C	169.41	2	84.71	2.80

2.3 不同培养基及激素浓度对生根培养的影响

采用经无激素的改良MS培养基壮苗培养后大于1.5cm的嫩枝作为生根材料,接种在不同激素组合的生根培养基中,进行根系诱导试验,试管苗转接至生根培养基中约10~16d后,可见白色根点长出,25d

表 6 增殖培养效果与极差分析表

列号	A	B	C	D(空白)	30 d 增殖系数
1	A ₁	B ₁	C ₁	D ₁	3.2
2	A ₁	B ₂	C ₂	D ₂	2.7
3	A ₁	B ₃	C ₃	D ₃	2.6
4	A ₂	B ₁	C ₂	D ₃	6.4
5	A ₂	B ₂	C ₃	D ₁	5.6
6	A ₂	B ₃	C ₁	D ₂	6.9
7	A ₃	B ₁	C ₃	D ₂	3.7
8	A ₃	B ₂	C ₁	D ₃	4.5
9	A ₃	B ₃	C ₂	D ₁	4.1
K ₁	8.50	13.30	14.60	12.90	
K ₂	18.90	12.80	13.20	13.30	
K ₃	12.30	13.60	11.90	13.50	
k ₁	2.83	4.43	4.87	4.30	T = 39.7
k ₂	6.30	4.27	4.40	4.43	
k ₃	4.10	4.53	3.97	4.50	
R	3.47	0.27	0.90	0.20	

表 7 增殖培养方差分析表

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	F _α
A(6-BA 浓度)	18.46	2	9.23	296.71 **	F _{0.05} (2, 2) = 19.00
B(蔗糖浓度)	0.11	2	0.05	1.75	F _{0.01} (2, 2) = 99.00
C(NAA 浓度)	1.22	2	0.61	19.54 *	
误 差	0.06	2	0.03		
总 和	19.85	8			

表 8 生根培养极差分析表

列号	A(基本培养基)	B(IBA 浓度) /mg·L ⁻¹	C(NAA 浓度) /mg·L ⁻¹	D(空白)	生根率/%	生根率反正弦 平方根转换值
1	1(改良 WH)	1(1.0)	1(0.5)	1	74.2	59.47
2	1	2(2.0)	2(1.0)	2	82.7	65.42
3	1	3(3.0)	3(1.5)	3	95.1	77.21
4	2(1/2 改良 MS)	1	2	3	50	45.00
5	2	2	3	1	66.3	54.51
6	2	3	1	2	76.1	60.73
7	3(1/2MS)	1	3	2	47.8	43.74
8	3	2	1	3	55.2	47.98
9	3	3	2	1	63.7	52.95
K ₁	199.11	148.21	168.19	166.94		
K ₂	160.25	167.92	163.37	169.89		
K ₃	144.68	187.90	172.47	167.20		
k ₁	66.37	49.40	56.06	55.65		T = 504.03

表9 正交设计方差分析表

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	F _α
A(基本培养基)	524.01	2	262.00	293.47**	F _{0.05} (2,2)=19.00
B(IBA)	262.51	2	131.26	147.02**	F _{0.01} (2,2)=99.00
C(NAA)	13.80	2	6.90	7.73	
误差	1.79	2	0.89		
总和	802.11	8			

2.4 不同的移栽基质对移栽成活率的影响

将试管苗材料,从培养瓶中小心取出,用清水冲洗净根部的培养基后,再移入各种基质中。移植后7 d内覆盖保湿,不受光照直射,7 d后逐步增加光照,15 d便可进行正常管理,30 d后统计成活率。试验结果见表10。经方差分析,各处理间F检验值=311.46>F_{0.01}(2,2)=99.00,即不同基质处理对移栽成活率有极显著影响。最有利于移栽的基质为沙:田园土=1:1。

表10 不同基质对移栽成活率的影响

基质	移栽苗数/株		成活苗数/株		成活率/%		平均成活率/%	5%显著水平	1%极显著水平
	I	II	I	II	I	II			
E ₁	54	50	45	43	83.3	86.0	84.7	b	B
E ₂	55	52	18	19	32.7	36.5	34.6	c	B
E ₃	60	58	57	56	95.0	94.8	95.0	a	A

*:各处理间F检验值=311.46>F_{0.01}(2,2)=99.00。

3 小结

1)外植体灭菌:经75%酒精1~1.5 min处理后转入0.1% HgCl₂溶液处理7 min,污染率为41.6%,存活率为54.4%。

2)启动培养:2种基本培养基及6-BA浓度对愈伤组织分化率有显著性影响,芽体分化率主要与6-BA浓度相关,当6-BA浓度为1.0 mg·L⁻¹时,外植体不能分化出新的芽体;6-BA浓度为3.0 mg·L⁻¹与5.0 mg·L⁻¹时,促进芽体的分化,两者不存在显著性差异。芽体分化率最高的培养基为改良MS+6-BA 3.0 mg·L⁻¹+NAA 0.01 mg·L⁻¹,分化率达89.4%。2种基本培养基、6-BA浓度及这两者的交互作用对带芽茎的启动速度有极显著影响,在改良MS+6-BA 5.0 mg·L⁻¹+NAA 0.01 mg·L⁻¹的培养基上,平均启动速度最快,为10 d。

3)继代培养:6-BA浓度、蔗糖浓度、NAA浓度三者对增殖效果影响的主次关系是:6-BA浓度>NAA浓度>蔗糖浓度。6-BA浓度对增殖系数有极显著影响,NAA浓度对增殖系数有显著影响,改良MS+6-BA 4.5 mg·L⁻¹+蔗糖40 g·L⁻¹+NAA 0.01 mg·L⁻¹组合,增殖系数最高为6.9。

4)生根培养:基本培养基、IBA和NAA三者对生根率的影响的主次关系为,基本培养基>IBA>NAA。基本培养基与IBA浓度对生根率有极显著性影响,而NAA浓度对生根率无显著性影响。改良WH培养基是光皮桦组培苗生根的良好基质,组培苗生根的最适IBA浓度为3.0 mg·L⁻¹。在改良WH+IBA 3.0 mg·L⁻¹+NAA 1.5 mg·L⁻¹培养基中生根率最高,达95.1%。

5)移栽:不同基质处理对移栽成活率有极显著影响。最有利于移栽的基质为沙:田园土=1:1。在温室闭口锻炼3 d、开口炼苗3 d后,以沙:田园土=1:1为基质进行移栽,成活率高达95%,与其它2种基质处理间存在极显著差异;其次是沙,成活率为84.7%,与田园土处理间存在显著差异;效果最差的是田园土,成活率只有34.6%。

参考文献:

[1]洪伟.林业试验设计技术与方法[M].北京:北京科学技术出版社,1993.

[2]徐妙珍.林木组织培养的基础研究(一)[J].国外林业,1993,23(3):1-3.

(下转第101页)

3.8 建立和完善松材线虫病防治相关的法规

我国现有松材线虫病防治的相关规定均是林业部门规章,缺乏有力的法律支持。因此,国家应加快制订松材线虫病预防和除治法规,修订《植物检疫条例》、《森林病虫害防治条例》等相关法规,以及制(修)相关的国家标准;各省(区、市)也可根据本省的实际制定相关的省级法规和地方标准。在我国逐步形成以法律、条例为主体,部门规章和地方法规及标准相配套的防治法规体系,构建以法律手段为主体,法律、行政、经济手段相结合的防治新格局,使松材线虫病等外来有害生物的防控得到强有力的法规支持,达到治理中有法可依,有据可循。

3.9 加强科学研究,提升治理的科技含量

目前,松材线虫病需研究的领域还很多,如在病原方面,致病机理还不明确,不同地域的松材线虫在寄主和致病性等方面的差异性;在治理方面,快速准确、简便易行、经济实用的检疫检验技术,有效的管理机制和治理模式的研究,松材线虫病的无公害防治技术,疫木处理技术,伐桩利用的探索,特别是对松材线虫病生态型控制技术,控制后生态恢复与危害地生态环境复原与方法的研究等^[8~10]。因此,建议林业部门应进一步联合科研院校、生产部门,利用其他部门的设备、人才和技术优势,组织专家攻关,并积极关注、引进和推广国内外已成型的松材线虫病防治技术、方法、研究成果等,如中科院上海微生物研究所研制和开发的松材线虫病快速检测试剂盒、厦门大学研制的松材线虫快速分离器等,从根本上增加我国松材线虫病治理的科技含量,提高防治质量和技术水平。

3.10 加大宣传力度,形成松材线虫病群防群治的局面

松材线虫病防治不仅是集行政手段、技术手段、法律手段为一体的防治工作,而且也是一项社会系统防治工程。要做好松材线虫病的治理工作,就应争取社会各界和人民群众的支持,得到政府和有关部门的高度重视。可将有关松材线虫病的相关知识制作成公益广告、宣传片、教学片等,通过电视、网络等多种媒体向社会大力宣传松材线虫病的严重危害性和防治的必要性、重要性等,增强林户主动防治意识,引导群众主动报告疫情和举报违规、违法行为的积极性,形成良好的群防群治的社会氛围。另外,还应根据疫情动态及时划定和公布疫区,让全社会共同警惕松材线虫,共同保护家园的生态安全。

参考文献:

- [1]杨宝君,朱克恭,周元生.中国松材线虫病的流行与治理[M].北京:中国林业出版社,1995.
- [2]森林病虫害经济损失评估课题组.森林病虫害经济损失评估技术报告[R].沈阳:林业软科学研究先导专项验收材料,2004.
- [3]潘宏阳.当前我国松材线虫病的治理对策[J].森林病虫害通讯,2000,(6):44-47.
- [4]郝燕湘.松材线虫病工程治理及对策[J].中国林业,2000,(5):14.
- [5]李永成,赵宇翔,周茂建,等.加强疫木管理 遏制松材线虫病扩散蔓延[J].中国森林病虫,2005,24(1):36-39.
- [6]祝列克.强化政府职责提高科技含量坚决遏制外来有害生物的危害[J].中国森林病虫,2005,24(1):27-30.
- [7]国务院办公厅.关于进一步加强松材线虫病预防和除治工作的通知[Z].北京:2002-04-12(5).
- [8]杨佐忠.日本松材线虫病治理技术考察[J].四川林业科技,2004,25(4):28-31.
- [9]谈家金,叶建仁.松材线虫病致病机理的研究进展[J].华中农业大学学报,2003,22(6):613-617.
- [10]杨宝君.松材线虫病致病机理的研究进展[J].中国森林病虫,2002,21(1):27-31.

(上接第71页)

- [3]徐妙珍.林木组织培养的基础研究(二)[J].国外林业,1994,24(1):1-4.
- [4]王利民,周毅,陈龙友,等.植物组织培养中消毒剂的运用[J].贵州师范大学学报:自然科学版,2002,20(1):15-17.
- [5]朱广廉.植物组织培养中的外植体灭菌[J].植物生理学通讯,1996,32(6):444-449.
- [6]向邓云.植物生长调节物质对植物组织培养形态建成的调节控制[J].涪陵师专学报,2001,17(3):119-123.
- [7]王冬梅,黄学林,黄上志.细胞分裂素类物质在植物组织培养中的作用机制[J].植物生理学通讯,1996,32(5):373-377.
- [8]黄学林,李筱菊.高等植物组织离体培养的形态建成及其调控[M].北京:科学出版社,1995.