

柳桉组培快繁技术

吴美华¹, 林文革¹, 兰贺胜², 杨宗武³, 李海花¹, 陈水洲¹

- (1. 福建省永安林业(集团)股份有限公司种苗中心, 福建 永安 366000;
2. 福建省林木种苗总站, 福建 福州 350003; 3. 福建省林业科学研究院, 福建 福州 350012)

摘要:以3年生柳桉优树环割促萌枝条为外植体,以MS为基本培养基,通过激素种类与浓度、大量元素配比等试验,探讨了柳桉腋芽诱导、继代增殖、生根培养基配方。结果表明:外植体宜采用中等幼嫩的茎段,用75%酒精消毒30s、0.1%升汞溶液消毒4min效果最佳;在3/4 MS+0.3 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L⁻¹ NAA培养基上进行侧芽诱导,柳桉外植体出芽率最高;在改良MS+0.2 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L⁻¹ NAA继代培养基上,柳桉增殖效果最好,其芽体健壮,生长正常,增殖率3倍以上;应用1/2MS培养基附加ABT 1[#] 0.5 mg·L⁻¹和IBA 0.1 mg·L⁻¹,其生根率可达95%以上,生根3~4条,苗木生长健壮,移栽成活率可达92%以上。这些配方已成功应用于柳桉优良无性系苗木的工厂化生产,单个超净台月苗木生产能力达7万株以上。

关键词:柳桉;组织培养;快繁技术;育苗

中图分类号: S792.380.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-7351(2006)04-0159-04

Micropropagation of *Eucalyptus saligna*

WU Mei-hua¹, LIN Wen-ge¹, LAN He-sheng², YANG Zong-wu³, LI Hai-hua¹, CHEN Shui-zhou¹

- (1. Yong'an Forestry Group Company, Yong'an, Fujian 366000, China;
2. General Forest Seed and Seedling Station of Fujian Province, Fuzhou, Fujian 350003, China;
3. Fujian Academy of Forestry, Fuzhou 350012, China)

Abstract: A tissue culture protocol by shoot proliferation is developed for *Eucalyptus saligna* through adjusting the plant growth regulators and ratio of macro-elements using sprouts collected from stubs of three-year-old plus trees as explants. The main results are as follows: 1. Half lignified shoots were most suitable for explants. Dipping them in solution of 75% alcohol for 30 seconds and then in 0.1% HgCl₂ for 4 minutes are the best way for their disinfection; 2. 3/4 MS supplemented with 0.3 mg·L⁻¹ 6-BA, 0.2 mg·L⁻¹ NAA and 20 g·L⁻¹ sugar is crucial for shoot germination and proliferation, while amended MS supplemented with 0.2 mg·L⁻¹ 6-BA, 0.2 mg·L⁻¹ NAA and 30 g·L⁻¹ sugar for clump shoot induction; 3. 1/2 MS supplemented with 0.5 mg·L⁻¹ ABT-1 and 0.1 mg·L⁻¹ IBA is suitable for rooting, with rooting rate up to 95%; and 4. The survival rate of out-planting in nursery is more than 92%. The protocol has been successfully used in large-scale clonal production of the seedlings.

Key words: *Eucalyptus saligna*; tissue culture; micropropagation; raise seedlings

柳桉(*Eucalyptus saligna*)属高大乔木,天然分布于澳大利亚新南威尔士州悉尼以南至昆士兰州最北端太平洋沿岸宽约160 km的地带,是适生于受近海洋影响的亚热带以及夏季多雨气候环境的一个典型树种^[1]。柳桉在20世纪70年代即引入我国,但直到近年来随着桉树往北推进到我国中亚热带地区,柳桉因其耐寒性强且生长较为迅速才逐渐为人们所关注。福建和湖南等省区的桉树引种试验表明,柳桉是一个适合我国中亚热带地区规模发展的理想桉树种类^[2-5]。2001年以来,福建省永安林业(集团)股份有限公司在福建省永安市开展了柳桉种源试验,亦证明了柳桉的较强耐寒性和速生性。鉴于目前柳桉种子完全依赖进口,而且实生苗造林存在较大分化,限制了柳桉的大面积造林推广。为此,研究利用柳桉种源试验林中的优树为材料,开展了柳桉组织培养技术研究,成功应用于柳桉无性系苗木的商业化生产。

收稿日期: 2006-06-07

基金项目: 福建省林木种苗科技攻关项目“福建省桉树良种选育与扩繁应用”的部分研究内容

作者简介: 吴美华(1978-),女,福建宁化人,福建省永安林业(集团)股份有限公司助理工程师,从事林木组培快繁技术开发。

通讯作者: 林文革 E-mail: smlwg@vip163.com

1 材料与方法

1.1 材料

外植体采自福建省永安林业(集团)股份有限公司2001年种植的种源试验林。选择若干优树,通过环割树干基部,促进新芽萌发,以获取幼态材料。待枝条生长至10 cm以上长度,将其剪取带回室内。

1.2 外植体消毒

应用少量洗洁精清洗外植体,并用自来水冲洗干净。将顶芽和叶片剪去,从顶芽处往下剪取带2~3个侧芽的半木质化茎段,根据枝条的木质化程度,分成未木质化(I)、半木质化(II)、木质化(III)3类,采用75%酒精和0.1%升汞(HgCl_2)溶液消毒(具体方案见表1),然后用无菌水冲洗6次以上,每次冲洗振荡时间不少于45 s。稍微晾干后,切成1.0~2.0 cm长、带1~2个腋芽的茎段,斜插于诱导培养基上进行培养。每个方案50瓶,培养7 d后调查消毒效果。

表1 柳桉外植体、消毒时间与消毒效果

消毒方案	外植体		75%酒精消毒时间/s	0.1%升汞消毒时间/min	消毒效果		
	区段号	幼嫩程度			污染率/%	死亡率/%	存活率/%
1	I	未木质化	15	3	40	16	44
2	II	半木质化	15	4	48	0	52
3	III	木质化	30	4	24	0	76
4	I	未木质化	15	5	14	16	70
5	II	半木质化	30	4	8	10	82
6	III	木质化	30	5	16	10	74

1.3 试验设计

1.3.1 腋芽诱导试验 设置 L_2^3 正交试验:基本培养基为3/4MS、 B_5 (MS、 B_5 配方参见文献[5]),6-BA $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2个水平,NAA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2个水平,所有方案均加入20 g白糖(见表2)。将消毒成功的外植体转接至上述培养基。每个方案做50瓶,培养温度为 $25 \pm 2^\circ\text{C}$,初期暗培养,待出芽后开灯光照,光照强度为 $2000 \pm 500 \text{ lux}$,光照时间10~12 h。

1.3.2 继代增殖试验 在预备试验中发现应用MS和 B_5 作为基本培养基,继代增殖效果不甚理想,通过调整K、N、Mg、P、Ca等大量元素的配比,对MS培养基进行了改良。然后设置 L_3^4 正交试验:基本培养基为MS、改良MS、 B_5 等3种,6-BA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 3个水平,NAA $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 3个水平,白糖 $35 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 3个水平(见表3)。每个方案60瓶,培养温度 $25 \pm 2^\circ\text{C}$,经过6~8 d暗培养后开灯光照,光照强度为 $3000 \pm 500 \text{ lux}$,光照时间12~14 h。15~20 d后调查其增殖、生长情况。

1.3.3 生根试验 采用1/2MS培养基,添加不同浓度的ABT1[#]和IBA进行生根培养(见表4)。从继代苗上剪取较粗壮半木质化的枝条垂直接入生根培养基,每个方案做50瓶,每瓶接25株。30 d后调查生根情况。

1.4 炼苗与移栽

待苗木出根后进行炼苗,然后将其移栽至营养袋(基质配比为黄心土:河沙:泥炭土为6:2:2),按照组培苗生产的常规方法进行管理,30 d后调查移栽成活率。

2 结果与分析

2.1 外植体的选择与消毒

外植体经过7~10 d的暗培养后开始萌动,部分外植体在腋芽处萌发出小芽,说明外植体已成活。由表1可知,方案5的消毒效果最佳,即选用木质化程度中等的枝条作为外植体,采用75%酒精消毒30 s,再用0.1%升汞溶液消毒4 min,其侧芽萌动率最高。其次是方案3和方案6消毒效果亦较好。方案4采用

较嫩外植体,用75%酒精消毒易将外植体杀死。总体而言,利用75%酒精消毒15~30 s后再用0.1%升汞溶液消毒4~5 min可获得良好效果,对于幼嫩材料应适当缩短酒精消毒时间。

2.2 腋芽诱导

成活外植体转接到诱导腋芽的培养基上培养5 d后开始发出单芽,再培养7 d左右形成丛芽,叶呈绿色,生长正常。从表2结果分析,方案1显著优于其它方案,效果最佳,即以3/4 MS为基本培养基,添加 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA、 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA、 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 白糖,外植体出芽率最高达76%。

表2 柳桉腋芽诱导方案与出芽率

方案	基本培养基	6-BA/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	NAA/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	白糖/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	出芽率/%
1	3/4MS	0.3	0.2	20	76
2	3/4MS	0.6	0.3	20	10
3	B ₅	0.3	0.3	20	16
4	B ₅	0.6	0.2	20	0

2.3 继代增殖

采用MS、B₅作为基本培养基,继代苗均出现不同程度的水肿或瓶苗在叶色、增殖等方面表现不佳,如芽细小,偏黄色,高生长不明显,增殖系数也达不到工厂化育苗的要求,这说明基本培养基配方对柳桉的组培继代增殖具有较大影响。为此根据桉树组培快繁中的实践经验,重点对培养基配方中的氮源及其他大量元素比例进行了调整,结果表明:在改良MS培养中,降低铵态氮浓度有利于继代增殖,促进瓶苗生长健壮和增殖。当 NH_4NO_3 浓度高于0.7倍MS时,继代瓶苗叶大,微水肿,增殖系数不高。当 NH_4NO_3 浓度在0.45~0.7倍MS之间时,继代苗状态最佳,芽绿,高生长快,增殖系数达到3倍以上。同时,试验对其它大量元素也进行了调整,均衡了 K^+ 、 NH_4^+ 、 PO_4^{3-} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等离子浓度,将K、N、P、Ca、Mg 5个大量元素的离子浓度分别设置了5个浓度水平,具体调整范围为K $18.0 \sim 21.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、N $25.5 \sim 48.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、P $1.5 \sim 3.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、Ca $2.25 \sim 2.83 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、Mg $1.2 \sim 1.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。经过多次试验,确定了5个元素之间比例即为K:N:P:Ca:Mg=13.37:18.02:1.67:1.77:1时继代瓶苗生长最佳。

在上述试验的基础上,以3种培养基以及激素和白糖浓度设置正交试验,筛选最佳继代培养基配方,发现方案4效果最佳,即基本培养基选择改良MS,激素用6-BA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、NAA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,15~20 d转接1次,增殖3倍以上,且芽体健壮,叶色绿,生长正常(见表3)。

表3 柳桉继代培养方案与继代苗生长表现

方案	基本培养基	6-BA/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	NAA/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	白糖/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	继代苗生长情况
1	MS	0.2	0.1	25	叶色绿,微水肿,增殖率1.5倍,高生长2.5~3 cm
2	MS	0.3	0.2	30	叶色绿,苗细小、微水肿,增殖率2.5倍,高生长1.5~2 cm
3	MS	0.5	0.3	35	叶色绿,瓶苗顶芽处易长愈伤组织,增殖率1.5倍,高生长2.5~3 cm
4	改良MS	0.2	0.2	30	叶色绿,增殖率3倍以上,芽体健壮,高生长3~3.5 cm,生长正常
5	改良MS	0.3	0.3	25	叶色绿,增殖率2倍左右,高生长2.5~3 cm
6	改良MS	0.5	0.1	35	叶色绿,增殖率3倍,瓶苗过细弱,高生长为2.3~2.5 cm
7	B ₅	0.2	0.3	30	叶色微黄,微水肿,增殖率1.5倍,高生长2.0~2.8 cm
8	B ₅	0.3	0.1	35	叶色淡绿,增殖率2倍,高生长1.5~2.0 cm
9	B ₅	0.5	0.2	25	叶色淡绿,微水肿,增殖率1.5倍,高生长2.0~2.5 cm

2.4 生根培养

继代苗转接至生根培养基后进行暗培养,7~10 d开始生根,此后进行正常光照培养。表4显示,以1/2 MS为基本培养基,附加ABT1# $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和IBA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,生根效果最佳,生根率可达95%以上,根条数为3~4条,根白且苗木生长健壮。

2.5 移栽与管理

待苗木出根后,将其移出组培室炼苗,经过10~15 d炼苗,苗木抽高生长,木质化程度加强,即可移苗上袋。按照常规方法进行水肥管理与病虫害防治,移栽成活率达92%以上,且根系发达,生长健壮。

表4 柳桉生根诱导方案与生根状况

方案	ABT1 [#] /mg·L ⁻¹	IBA/mg·L ⁻¹	生根率/%	根条数及根生长状况
1	0.4	0.1	70	根1~2条,根系较白,生长正常
2	0.4	0.2	75	根1~2条,根系白,生长正常
3	0.5	0.2	88	根2~3条,根系白,生长正常
4	0.5	0.1	95	根3~4条,根系白,生长正常
5	0.8	0.2	82	根2~3条,根白,根系过粗,基部愈伤组织过多

3 结论与讨论

1)柳桉外植体宜选取木质化程度相对较高的幼态枝条,采用75%酒精消毒15~30 s、0.1%升汞溶液消毒4~5 min的方案进行消毒均能获得良好效果,但以中等幼嫩程度枝条为外植体,采用75%酒精消毒30 s、0.1%升汞溶液消毒4 min的处理效果最佳。

2)柳桉的腋芽诱导较其继代增殖培养容易,应用3/4 MS+0.3 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L⁻¹ NAA培养基进行侧芽诱导,出芽率高达76%。继代培养时采用K、N、P、Ca、Mg 5个大量元素的配比调整为13.37:18.02:1.67:1.77:1的改良MS+6-BA 0.2 mg·L⁻¹+NAA 0.2 mg·L⁻¹+白糖30 g·L⁻¹作为继代培养基,增殖率达3倍以上,且苗木生长健壮。

3)以1/2MS+ABT1[#] 0.5 mg·L⁻¹+IBA 0.1 mg·L⁻¹+白糖20 g·L⁻¹作为生根培养基,生根率达95%以上,苗木生长健壮,生根苗移植成活率达92%以上。

4)研究以优树基部萌条为外植体,成功地解决了柳桉组培快繁技术,其组培方案已经过大规模苗木生产实践检验,单个超净台月正常生产能力达7万株以上,可应用于柳桉优良无性系苗木的工厂化生产。

参考文献:

- [1] 折述雄. 中国桉树:第二版[M]. 北京:中国林业出版社,2002.
- [2] 兰贺胜,丘进清,黄德龙,等. 闽西北适栽桉树树种选择研究[J]. 林业勘察设计,2005(1):1-4.
- [3] 兰明忠. 福建中亚热带东部山地引种柳桉种源的评价与选择[J]. 河南科技大学学报:农学版,2004,24(3):29-34.
- [4] 林睦就,杨民胜,李柏海,等. 湖南耐寒桉树引种试验研究[J]. 湖南林业科技,2003,30(3):27-33.
- [5] 陈健波,项东云,张建明,等. 广西耐寒桉树育种研究现状与对策[J]. 广西林业科学,2003,32(1):7-11.
- [6] 李俊明. 植物组织培养教程:第二版[M]. 北京:中国农业大学出版社,2002.

欢迎订阅《北京农业》——农村实用技术博览

农村实用技术博览主要面向基层农业管理者、农业技术推广人员和农业生产者、农村种养专业户服务。依托北京的科研、信息优势,为您提供新技术、新成果、新品种、新经验。主要栏目有专家论坛、高效益栽培模式、蔬菜世界、果树大观、花卉中草药、食用菌园地、畜牧水产、农业博览和农业科技要闻等。为您进行农业技术推广和农业生产提供丰富的技术信息和市场信息。

国内统一刊号:CN11-2222/S 大16开本 月刊 每月5号出版 每期定价:4元,全年48元。可到当地邮局订阅,邮发代号:2-87。也可直接向杂志社订阅。凡订阅2007年度《北京农业》者都可获得一册科技书或光盘的奖励。

地址:北京市西城区裕民中路6号 邮编:100029

联系电话:(010)62044255 (010)82078183

E-MAIL:bjny_mag@263.net