

文章编号: 100F 1498(2003) 06 0715 05

西南桦以芽繁芽组培快繁研究*

刘英¹, 曾炳山¹, 裘珍飞¹, 谌红辉², 曾杰¹

(1. 中国林业科学研究院热带林业研究所, 广东 广州 510520;

2. 中国林业科学研究院热带林业实验中心, 广西 凭祥 532600)

摘要: 以 8 个月生苗木上采集的枝条作为外植体, 通过激素、大量元素配比等试验, 成功地研发出一套西南桦以芽繁芽组培快繁技术体系。其主要内容包括: 1. 选择邻近顶芽带腋芽的茎段作为外植体, 用 HgCl_2 消毒 3 min 效果最佳, 诱导成功率达 10%; 2. 其侧芽诱导与增殖培养宜选用低浓度 ($0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 IBA 或 NAA; 3. 大量元素配比满足 $\text{K}:\text{Ca} = 1:0.04 \sim 0.08$, $\text{K}:\text{Mg} = 1:0.02 \sim 0.04$, $\text{N}:\text{P} = 1:0.02 \sim 0.03$ 三个比例关系时, 外植体侧芽能正常萌发生长, 并迅速进入增殖状态, 40 d 转接 1 次, 增殖倍数在 4 倍以上; 4. 选用 NAA 浓度为 $0.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 0.4MS 培养基进行生根诱导, 生根率达 97.9%。

关键词: 西南桦; 以芽繁芽; 大量元素配比; 组织培养

中图分类号: S722.3⁺7 文献标识码: A

西南桦(*Betula alnoides* Buch. Ham. ex D. Don) 是我国热带及亚热带地区的速生珍贵用材树种^[1, 2], 天然分布于印度半岛北部、缅甸、印支半岛各国以及我国南部和西南部, 其树干通直、材质优良、用途广泛, 具有很高的经济价值。近几年来, 西南桦在华南、西南地区推广迅速, 人工造林面积已达数万公顷, 已成为我国热带、亚热带地区的主要造林树种之一。西南桦的驯化、栽培研究始于 20 世纪 80 年代。然而其良种选育从“九五”才开始, 中国林业科学研究院热带林业研究所相继开展了包含全分布区 14 个种源的种源筛选试验和 25 个种源约 460 个家系的种源家系联合筛选试验。由于西南桦结实龄需 15 a 以上, 因此在进行群体选优的同时, 通过早期测定或直接从天然林中选择优良无性系, 运用组培快繁技术生产优良无性系苗木造林是推广良种、发展高产优质人工林的快捷而有效的途径之一。

国外对桦木属(*Betula* L.) 植物的组培研究较多, 对垂枝桦(*B. pendula* Roth.) 及其变种、变型的研究尤为广泛^[3~5], 而且成熟的组培技术已应用到其良种繁育研究中^[6, 7]。我国开展了白桦(*B. platyphylla* Suks) 的组培研究, 并获得成功^[8, 9]。国内也有学者开展过西南桦的组培研究, 但尚停留在愈伤组织和胚状体形成的阶段^[10]。本研究通过筛选激素、调整培养基大量元素配比, 旨在突破侧芽诱导等关键技术环节, 成功解决西南桦以芽繁芽组培快繁技术, 为西南桦的良种繁育研究与良种快速推广服务。

收稿日期: 2002 09 12

基金项目: “十五”国家攻关项目“西南桦良种选育与高效栽培研究(2002BA515B0204)”

作者简介: 刘英(1963—), 女, 海南临高人, 工程师。

通讯作者: 曾杰, 传真: 029 87031622, 电话: 87030271, E-mail: zengj@pub.guangzhou.gd.cn.

* 芬兰林业研究所的 Anneli Vihear Aarnio 为本研究提供了许多文献资料, 特致谢忱!

1 试验材料与方法

1.1 试验材料及培养条件

外植体采自热带林业研究所苗圃 8 个月生超级苗, 苗高约 50 cm。按枝条的幼嫩程度, 从顶芽向下按 1.0~ 1.5 cm 长度剪取 4 段, 分段用 0.1% HgCl₂ 进行消毒, 消毒方案见表 1。每个消毒处理至少 75 瓶以上。培养温度为 25 ± 2 °C, 每日光照 10 h, 强度为 2 000 lx。培养 20 d 后调查消毒效果。

1.2 试验设计

1.2.1 侧芽诱导试验 激素试验设置 6 个处理, 在 3/4 MS (Murashige & Skoog, 1962; 大量元素含量为 MS 的 3/4) 培养基中分别加入 6-苄基腺嘌呤(6BA) 2 个水平(1.0、2.0 mg·L⁻¹) 与 0.2 mg·L⁻¹ 的 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)、萘乙酸(NAA)、吲哚丁酸(IBA) 的组合, 以不加入激素为对照(表 2)。大量元素配比试验以 MS(K: Ca= 1: 0.15, K: Mg= 1: 0.08; 均为摩尔比, 下同) 为对照, 保持试验培养基 1/2MS NH₄NO₃、1MS KH₂PO₄ 以及 Ca: Mg= 1: 2 恒定, 设置 K: Ca= 1: 0.02、0.04、0.06、0.08、0.10、0.12、0.14、0.16, K: Mg= 1: 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08 等 8 个处理筛选最佳大量元素配比。

激素和大量元素配比试验的每个处理重复 40 瓶以上, 根据腋芽萌发、生长以及叶色等指标划分 5 个等级, 评定各处理的好坏。5 个等级的具体标准为: 1. 萌发、蹲苗、生长不良; 2. 萌发、生长、生长不良, 不能成苗; 3. 萌发、生长、长势弱、有黄叶, 难成苗或质差; 4. 萌发、生长弱、叶绿, 可少数成苗; 5. 萌发、生长、长势旺, 90% 以上成苗。

1.2.2 生根诱导试验 以 0.4MS 培养基(注: 大量元素为 MS 培养基的 0.4 倍, 其余成分保持不变) 作为生根诱导的基本培养基, 设置 IBA (1.0 mg·L⁻¹)、NAA (0.50 mg·L⁻¹)、NAA (0.25 mg·L⁻¹) 三个处理, 以空白(不加入任何激素) 为对照, 采用单因素试验设计。剪取增殖培养基中长度为 1.5~ 2.0 cm 的芽苗进行生根诱导。根据生根率、基部愈伤率、生根条数以及生长状况等指标评定各处理的生根效果, 从而筛选出最佳的生根培养基配方。

1.3 移植与管理

生根诱导成功后培养至根长 2~ 5 cm 时即进行移植, 按照常规组培移植苗的培育方法进行管理, 调查其移植成活率。

2 结果与分析

2.1 外植体的选择与消毒

西南桦枝细毛多, 客观上存在着需要长时间消毒而又不耐药杀的矛盾, 消毒难度大。从表 1 看出, 4 种外植体的消毒污染率均超过 80%。应用 HgCl₂ 将枝条 III、IV 区段消毒 5~ 9 min, 无菌外植体均被杀死。将枝条 I、II 区段消毒 3~ 5 min, 尽管污染率随着消毒时间的减少而增大, 但无菌外植体的死亡率降低, 诱导成功率升高。可见, 选择枝条 II 区段作为外植体, 应用 HgCl₂ 消毒 3 min 的效果最佳, 诱导成功率高达 10.0%。

表 1 西南桦外植体与消毒时间对消毒成功率的影响

外植体 (区段号)	消毒时间 /min	污染率/ %	无菌外植体	
			死亡率/%	萌动率/%
I	3	87.0	11.3	1.7
I	5	80.0	20.0	—
II	3	88.0	2.0	10.0
II	5	83.0	15.0	2.0
III	5	94.5	5.5	—
III	7	90.7	9.3	—
IV	7	95.0	5.0	—
IV	9	90.0	10.0	—

注: 培养 20 d 后的观察结果。

2.2 激素对侧芽诱导的影响

从6BA与2,4-D、IBA、NAA各种组合的侧芽诱导结果可知(表2),西南桦对生长素反应敏感,在6BA与2,4-D组合的培养基上,外植体基部容易产生大量愈伤组织,褐化严重,侧芽无法抽高生长,很快死亡;而在6BA分别与NAA、IBA组合的培养基上,尽管外植体基部也产生愈伤组织,出现轻微褐化现象,但侧芽能萌发并抽高生长,因此,NAA、IBA可作为西南桦组培快繁的适用生长素。

表2 激素对侧芽诱导的影响

培养基号	大量元素	6BA	2,4-D	NAA	IBA	外植体反应情况
		mg·L ⁻¹				
1	3/4MS	1.0	0.2			产生大量愈伤组织、顶芽变黄、侧芽不抽高生长,很快死亡。
2	3/4MS	1.0		0.2		愈伤组织相对较少,顶芽抽高生长达0.5cm,能展叶。
3	3/4MS	1.0			0.2	基本同上。
4	3/4MS	2.0	0.2			产生大量愈伤组织、侧芽萌发白色,无法生长,很快死亡。
5	3/4MS	2.0		0.2		愈伤组织相对较少,顶芽抽高生长及展叶,侧芽萌发抽高生长达0.5cm。
6	3/4MS	2.0			0.2	基本同上
7	3/4MS					愈伤组织相对较少。侧芽萌发但不抽高生长。

2.3 大量元素对比对侧芽诱导的影响

以MS培养基中大量元素含量为对照,在保持试验培养基1/2MS NH₄NO₃、1MS KH₂PO₄以及Ca:Mg=1:2恒定的前提下,调整K与Ca以及K与Mg的比例(图1)。当K:Ca=1:0.04~0.08, K:Mg=1:0.02~0.04时,侧芽均能萌发并正常抽高生长成苗,而当两种比例超出上述区间时,芽苗则生长不良,出现蹲苗现象而无法进入正常的增殖状态,甚至死亡。

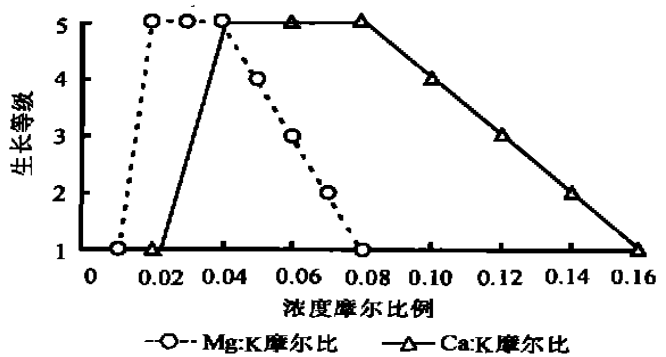


图1 K、Ca、Mg对比对侧芽诱导的影响

在达到上述合理K、Ca、Mg比例时,N与P的比例恰好为1:0.04。此时尽管能够增殖,但生长缓慢,增殖倍数仍低。在保证K、Ca、Mg合理配比的前提下,进一步调整N、P的比例。结果发现,N:P=1:0.02~0.04时均能正常生长和增殖,以N:P=1:0.03时效果最佳,N:P=1:0.02的效果亦远远优于N:P=1:0.04。总而言之,西南桦在K:Ca:Mg=1:0.04~0.08 0.02~0.04, N:P=1:0.02~0.03时,侧芽能够正常萌发,生长速度加快,迅速进入增殖状态。初代40d转接1次,继代30d转接1次,增殖倍数达4倍以上,芽苗绿且粗壮,无黄叶及无效苗产生。若2个月转接,芽苗也未出现缺素现象,因此,运用上述大量元素配比进行侧芽诱导,能够迅速获得大量芽苗,达到工厂化生产的要求。

2.4 生根诱导

试验结果表明(表3、4):西南桦增殖苗极易生根,无生长素的对照培养基生根率达78.5%;西南桦对生长素极其敏感,加入少量生长素,不仅始根期提早5d,出根整齐,生根率

高,而且生根条数增多。当 NAA 达到 $0.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,生根率显著高于对照,生根条数和基部愈伤组织产生率极显著地高于对照。可见,应用 NAA 浓度 $0.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 0.4 MS 培养基诱导西南桦生根的效果较好。

2.5 移植管理

生根诱导培养 2 个星期后,生根高峰期基本上已过,大部分芽苗已生根。此时应及时更换培养环境进行炼苗,提高芽苗木质化程度,准备移植。具体做法如下:以一层 90% 的遮阴网遮荫,光照强度约 $5\ 000 \sim 9\ 000 \text{ lx}$ 的条件下,炼苗 15 d 后即可进行移植。以砂土为介质,移前用 $1/1\ 000$ 的高锰酸钾溶液消毒,移后注意保湿通风。按照常规组培移植苗培育方法进行水肥管理和杂菌控制,1 个月后,移植成活率高达 95% 以上。

3 结论与讨论

(1) 桦木属植物枝细毛多,其茎段外植体消毒成功率低。Jones et al.^[3] 在对垂枝桦进行组培快繁时,其茎段外植体消毒、诱导成功率仅为 22%。对于西南桦而言,宜选择邻近顶芽带侧芽的茎段作为外植体,用 HgCl_2 消毒 3 min 能达到最佳消毒效果,但诱导成功率亦仅 10%。

(2) 由于西南桦茎段对生长素敏感,少量的生长素即能使其产生大量的愈伤组织,因此其侧芽诱导与增殖培养宜选用低浓度($0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 IBA 或 NAA。

(3) 合理的大量元素配比是成功快繁西南桦的技术关键。在广泛使用的 MS 或 3/4MS 培养基上,无法诱导侧芽正常生长与增殖。重新调整大量元素配比,使 $\text{K}:\text{Ca}=1:0.04 \sim 0.08$ 、 $\text{K}:\text{Mg}=1:0.02 \sim 0.04$ 、 $\text{N}:\text{P}=1:0.02 \sim 0.03$ 才得以突破这一难关,增殖倍数达到 4 倍以上,获得大量快繁芽苗。尽管西南桦的侧芽诱导与初代增殖对基本培养基的要求特别严格,然而进入多代增殖培养后的芽苗,重新回到 MS 等常规培养基中培养,对各种基本培养基反应差异不明显,均能旺盛生长。

(4) 西南桦增殖苗容易生根,选用 NAA 浓度为 $0.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 0.4MS 培养基进行生根诱导,生根率达 97.9%。在适宜的光照条件下炼苗,提高芽苗木质化程度,移植后按照常规组培苗管理方法进行管理,移植成活率高达 95%。

(5) 本研究成功地采用以芽繁芽途径进行西南桦组培快繁,避免了愈伤组织再生途径可能导致的遗传不稳定性,更适于种苗工厂化快繁。

表 3 生根诱导观测值的方差分析

观测指标	变异来源	自由度	离差平方和	均方	均方比	$F_{0.05}$	$F_{0.01}$
生根率	培养基	3	0.052 9	0.017 6	3.34	2.93	4.54
	误差	29	0.152 9	0.005 3			
	总和	32	0.205 8				
生根数	培养基	3	2.313 3	0.771 1	8.45	2.93	4.54
	误差	29	2.645 0	0.091 2			
	总和	32	4.958 3				
基部愈伤组织	培养基	3	11.211 6	3.737 2	32.18	2.93	4.54
	误差	29	30.367 7	0.116 1			
	总和	32	14.579 3				

注:百分率数据经过对数变换后再进行方差分析。

表 4 生根诱导观测值的 Duncan 多重比较

培养基	生根率/%	生根数/条	基部愈伤组织/%
I	91.9 ab	4.0 ab	96.4 a
II	97.9 a	6.0 a	100.0 a
III	90.1 ab	4.4 ab	91.5 a
IV	78.5 b	3.0 b	8.6 b

注:同列字母相同表示 0.05 水平差异不显著,不同表示差异显著。

参考文献:

- [1] 曾杰, 郑海水, 翁启杰. 我国西南桦的地理分布与适生条件[J]. 林业科学研究, 1999, 12(5): 479~484
- [2] Zeng J, Zheng H S, Weng Q J. *Betula alnoides* — a valuable tree for tropical and warm sub-tropical areas[J]. Forest Fam, and Community Tree Research Reports, 1999, 4: 60~63
- [3] Jones O P, Welander M, Waller B J, et al. Micropropagation of adult birch trees: production and field performance[J]. Tree Physiology, 1996, 16: 521~525
- [4] Ryyanen L, Ryyanen M. Propagation of adult curly birch succeeds with tissue culture[J]. Silva Fennica, 1986, 20(2): 139~147
- [5] Simola L K. Propagation of plantlets from leaf callus of *Betula pendula* f. *purpurea*[J]. Scientia Horticulturæ, 1985, 26: 77~85
- [6] Viherr-Aamio A, Ryyanen L. Growth, crown structure and seed production of birch seedlings, grafts and micropropagated plants[J]. Silva Fennica, 1995, 29(1): 3~12
- [7] Viherr-Aamio A, Velling P. Micropropagated silver birches (*Betula pendula*) in the field — performance and clonal differences[J]. Silva Fennica, 2001, 35(4): 385~401
- [8] 陶静, 詹亚光, 姜静, 等. 白桦组培再生系统的研究(I)[J]. 东北林业大学学报, 1998, 26(5): 6~9
- [9] 詹亚光, 陶静, 杨传平, 等. 白桦组培再生系统的研究(II)——影响因素及培养程序[J]. 东北林业大学学报, 1998, 26(6): 1~5
- [10] 樊国盛, 邓莉兰. 西南桦组织培养研究[J]. 西南林学院学报, 2000, 20(3): 147~151

In vitro Propagation of *Betula alnoides* by Shoot Proliferation

LIU Ying¹, ZENG Bing-shan¹, QIU Zhen-fei¹, CHEN Hong-hui², ZENG Jie¹

(1. Research Institute of Tropical Forestry, CAF, Guangzhou 510520, Guangdong, China;

2. Experimental Center of Tropical Forestry, CAF, Pingxiang 532600, Guangxi, China)

Abstract: Using branches collected from eight-month-old seedlings, a rapid propagation protocol by shoot proliferation was developed for *Betula alnoides* by adjusting the plant growth regulators and ratios of macro-elements. The main results were as follows: 1. Dipping in solution of 1/1 000 HgCl₂ for 3 minutes was the best way for disinfection of branch explants and up to 10% branches were successfully induced to grow shoot; 2. To prevent branch explants from producing too much callus, only low concentration of auxins, for instance, 0.2 mg·L⁻¹ IBA or NAA, could be supplemented; 3. Ratio of macro-elements was crucial for shoot germination and proliferation, the range of their ratios by mol concentration were K:Ca = 1:0.04~0.08, K:Mg = 1:0.02~0.04, N:P = 1:0.02~0.03; 4. 0.4 MS supplemented with 0.5 mg·L⁻¹ NAA was suitable for rooting, the rooting rate reached 97.9%; and 5. The survival rate of outplanting in nursery was up to 95%.

Key words: *Betula alnoides*; ratio of macro-elements; shoot proliferation; tissue culture