

木荷优良家系的组织培养研究*

周丽华 蓝燕群 何波祥 蔡燕灵 连辉明 张 谦

(广东省森林病虫害生物防治重点实验室, 广东省林业科学研究院, 广东 广州 510520)

摘要 以新选育的木荷 (*Schima superba*) 优良家系为试材, 开展组织培养。结果表明, 木荷适宜的初代培养基为 GD+6-BA $1.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +NAA $0.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 继代培养基为 GD+6-BA $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + IAA $0.30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 生根培养基为 1/4 MS + IBA $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +IAA $0.40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。芽苗增殖倍数为 3.1 倍, 生根率达 96.67%。探索出适宜的驯化、移栽和后期管理技术, 使优良家系生根苗的移栽存活率达到 92.2%。

关键词 木荷; 优良家系; 组织培养

中图分类号: S722.3⁺7

文献标识码: A

文章编号: 1006-4427 (2015) 02-0001-06

Tissue Culture and Micropropagation of Superior Family of *Schima superba*

ZHOU Lihua LAN Yanqun HE Boxiang CAI Yanling

LIAN Huiming ZHANG Qian

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Bio-control for the Forest Disease and Pest,

Guangdong Academy of Forestry, Guangzhou, Guangdong 510520, China)

Abstract A newly-selected superior family of *Schima superba* was used for tissue culture and micropropagation. The explants of stem segments displayed the optimum initial growth on the primary media GD+6-BA $1.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +NAA $0.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, the highest proliferation rate of 3.1 times on subculture GD+6-BA $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +IAA $0.30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, and 96.67% rooting rate on medium 1/4 MS + IBA $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +IAA $0.40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Suitable techniques and procedures were identified for acclimatization, transplantation and later-period management of tissue-cultured plantlets. The survival rate of the superior family was 92.2%.

Key words *Schima superba*; superior family; tissue culture

木荷 (*Schima superba*), 又名荷树、荷木, 为山茶科 (Theaceae) 木荷属常绿阔叶大乔木^[1]。其叶片厚革质、含水量大、含油脂少、燃点较高、萌芽力强, 为我国南方生物防火林带构建的主要树种; 其木材材质坚韧, 结构细致, 是桥梁、船舶、建筑、胶合板、家具等的优良用材^[2-3]。近年来, 木荷已被广泛应用于

* 基金项目: 广东省林业科技创新专项“优良乡土阔叶树种无性快繁关键技术开发与产业化”(2014KJCX002)和“樟树、木荷、黎蒴等重要乡土阔叶树种良种选育及高效栽培技术与示范”(2012/13/14KJCX001)。

第一作者: 周丽华 (1962-), 女, 高级工程师, 主要从事林木生物技术研究, E-mail: lkylzh@163.com。

通信作者: 何波祥 (1966-), 男, 研究员, 主要从事森林培育研究, E-mail: heboxiang@163.com。

亚热带地区山地、丘陵、平原和城镇绿化造林，优质苗木的需求量巨大。目前木荷主要依靠实生苗繁殖造林，但其种子发芽率偏低，繁殖效率不高，同时种子繁殖后代分化严重，子代植株参差不齐，不能保持与母树一致的优良性状^[4]。应用组培技术繁育苗木，可大幅缩短育苗周期，使苗木整齐一致，且保持母本的优良性状。山茶科树种普遍存在组培困难的问题^[5]，15 个属中仅有山茶属、大头茶属和木荷属有组织培养成功的报道，这 3 个属中只有茶树和油茶的组织培养技术趋于成熟，更多的尚处于起步阶段^[6-8]。木荷的组织培养及植株再生仅有徐位力等^[6]报道过，且是用特定遗传材料（基因型）完成的。鉴于植物材料的遗传背景与组织培养密切相关，不同基因型材料的配方差异很大，因此许多研究机构正在开发特定遗传材料的特异型组织培养技术^[8-9]。近 10 年，广东省林业科学研究院一直从事木荷良种选育研究，已初步选育出一批优良种质资源，为了实现良种苗木的规模化生产，本试验以选育的优良木荷家系为材料，开展组织培养技术研究，以期建立木荷特异、高效的离体培养体系。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验于 2014 年 3 月开展，试验材料为广东省林业科学研究院经遗传测定选育的木荷优良家系。试验选当年生的嫩枝做外植体。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体灭菌 嫩枝去掉叶片，在超声波清洗仪中用 0.2% 灭菌净处理 30 min，灭菌水清洗 6 次；用吐温 80+0.1% HgCl₂ 处理 5 min，灭菌水清洗 6 次，随后接种到初代培养基中。

1.2.2 初代培养 完成灭菌后，将枝条切成长 1~2 cm 的茎段或顶梢，茎段带 1 个腋芽，顶梢带 2~3 个腋芽，随后接种到初代培养基中。初代培养的基本培养基分别为 MS、GD^[10]，每个处理 50 瓶，每瓶 1 个外植体。激素组合采用 6-BA 1.50 mg·L⁻¹+NAA 0.50 mg·L⁻¹^[6]。接种后，观察芽的萌动状态，统计萌芽率。

1.2.3 继代培养 待新芽长成后，将其从初代培养基中切下取出，转接到继代培养基中。每次处理 10 瓶，每瓶 5 个单芽。以 GD 为基本培养基，采用 6-BA、NAA、IBA 和 IAA 4 种激素的不同浓度组合进行继代培养基筛选，用 L₉ (3⁴) 正交表设计试验（表 1），接种 25 d 后观察芽苗的生长状况，并统计增殖倍数^[11]，以芽的粗细适中、无愈伤组织、无芽顶尖坏死、无叶片卷曲、无黄叶的芽为生长最佳状态。

表 1 木荷芽增殖试验因素及水平

mg·L⁻¹

水平	6-BA	NAA	IBA	IAA
1	0.50	0.30	0	0
2	1.00	0.15	0.30	0.30
3	1.50	0.00	0.60	0.60

1.2.4 生根培养 待芽苗高超过 1.5 cm 后，将生长健壮的芽苗从继代培养基中取出，转接到生根培养基中，每次处理 10 瓶，每瓶 10 株，以 3 种基本培养基搭配不同浓度的 IBA、IAA 和 NAA，进行生根培养基筛选，用 L₉ (3⁴) 正交试验进行培养基筛选（表 2），接种 10 d 后统计生根情况^[11]。

表 2 木荷生根试验因素及水平

mg·L⁻¹

水平	基本培养基	IBA	NAA	IAA
1	1/2 GD	0.80	0.10	0.40
2	1/4 MS	0.20	0.05	0.80
3	1/2 MS	1.40	0	1.20

1.2.5 培养条件 初代培养、继代培养和生根培养的培养基附加 3.0%的蔗糖和 0.7%的卡拉胶。培养室的光照、温度等培育条件同文献^[9]。

1.2.6 驯化与移栽 完成生根转接后,对试管瓶苗进行驯化。将生根瓶苗置于培养室内培养 10 d,再将生根的瓶苗转移至大棚中炼苗,大棚遮荫 70%,光照度为 1 500 lux。炼苗 30 d后,苗高超过 3 cm,用轻基质进行移栽。移栽基质为 1:5 (V:V) 的珍珠岩+泥炭土混合基质,培养容器为 32 目穴盘,移栽前基质用 0.1%高锰酸钾溶液消毒。栽植在遮荫 70%的大棚中进行,先在轻基质中打好小孔,后将组培苗根系放入孔中,保持根系舒展,深度合适,防止窝根或露根,压实,移栽后立即浇透水。移栽后立即喷洒 800~1 000 倍菌毒清液或多菌灵,以后每 10 d 喷药 1 次。小苗长出新叶时,开始薄施肥,1 个月后,正常进行水肥管理^[1]。统计移栽存活率。

1.3 数据处理

试验数据的初步处理用 Microsoft Excel 软件进行,芽苗增殖倍数与生根率的方差分析和多重比较用 SAS 9.2 软件完成^[9,12]。

2 结果与分析

2.1 初代培养

木荷外植体茎段灭菌后,接种到初代培养基上培养 20~25 d,腋芽开始萌动,并逐步长出新芽。比较观测发现,2 种基本培养基均可诱导腋芽的发生(表 3),且芽的萌发力较强,且 GD 培养基萌芽率为 74%,高于 MS 培养基。另外据观测发现,MS 诱导腋芽出现玻璃化和黄化,芽黄化而死,GD 诱导腋芽无芽黄化现象,芽浓绿,叶片展开,无愈伤组织。由此可知,在本试验中,GD 是最适宜木荷芽培养的基本培养,GD+6-BA 1.50 mg·L⁻¹+NAA 0.50 mg·L⁻¹为木荷的最佳初代培养基。

表 3 木荷 2 种基本培养基对外植体腋芽的诱导效果

基本培养基	萌芽率/%	生长状况
MS	67	无褐化,芽偏黄且透明玻璃化,叶片卷曲,无愈伤组织
GD	74	无褐化,芽浓绿,叶片展开,无愈伤组织

2.2 继代培养

继代培养结果见表 4。9 种处理对木荷的诱导效果存在显著差异 ($P<0.05$),效果最好的是处理 6,即 6-BA 1.00 mg·L⁻¹+IAA 0.30 mg·L⁻¹组合,其芽增殖 3.10 倍,且芽苗叶片舒展,生长健壮。4 种激素对木荷的芽增殖影响程度各异,极差分析发现,作用力顺序为:6-BA>IAA>NAA>IBA。正交 L₉(3⁴) 试验分析结果表明,最优木荷芽增殖配方为 GD+6-BA 1.00 mg·L⁻¹+IAA 0.30 mg·L⁻¹。

表 4 木荷在不同激素组合正交 L₉(3⁴) 试验的芽增殖结果分析

处理号	6-BA	NAA	IBA	IAA	增殖倍数	
					平均值	方差
1	0.50	0.30	0	0	1.93 f	0.25
2	0.50	0.15	0.30	0.30	2.16 ef	0.35
3	0.50	0	0.60	0.60	1.92 f	0.15
4	1.00	0.30	0.30	0.60	2.51 cd	0.31
5	1.00	0.15	0.60	0	2.62 bcd	0.35
6	1.00	0	0	0.30	3.10 a	0.38
7	1.50	0.30	0.60	0.30	2.92 ab	0.18

8	1.50	0.15	0	0.60	2.38 de	0.23
9	1.50	0	0.30	0	2.74 bc	0.18
$\bar{x}_1$	2.00	2.45	2.47	2.43		
$\bar{x}_2$	2.74	2.39	2.47	2.73		
$\bar{x}_3$	2.68	2.59	2.49	2.27		
R	0.74	0.20	0.02	0.46		
最优水平	2	3	3	2		
因素主次	1	3	4	2		

注：表中“ $\bar{x}_1 \sim \bar{x}_3$ ”表示3个因素不同水平的平均数；“ R ”表示不同水平平均数的极差；不同小写字母表示在 $\alpha=0.05$ 水平上差异显著。

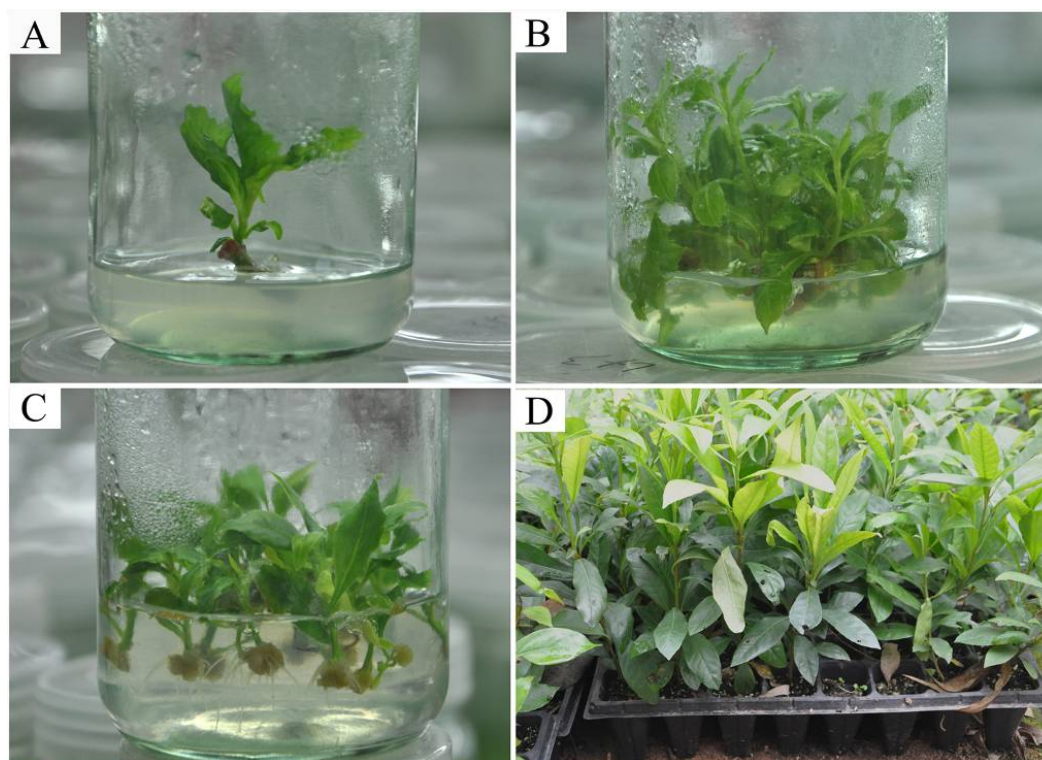
2.3 生根培养

在生根培养中，9种处理对木荷的根诱导差异显著（ $P<0.05$ ），其中生根率最高的是处理2，其组合为1/2 GD+ IBA 1.00 mg · L⁻¹+ NAA 0.05 mg · L⁻¹+IAA 0.80 mg · L⁻¹，生根率高达96.67%；其次是处理5，其组合为1/4 MS + IBA 1.00 mg · L⁻¹+IAA 0.40 mg · L⁻¹，生根率达95.71%。4种因素诱导木荷生根的效果各不相同，其根的诱导效果依次为：IBA >基本培养基> IAA > NAA。生长状况分析发现，在处理2和处理5中，处理5的幼苗生长健壮，无黄叶，无顶芽枯死，生长表现好。综合生根率和生长表现，本试验最优木荷生根配方为1/4 MS+ IBA 1.00 mg · L⁻¹+IAA 0.40 mg · L⁻¹。

表5 木荷在基本培养基与不同浓度不同激素组合正交L₉（3⁴）试验生根结果

处理号	基本培养基	IBA/ (mg · L ⁻¹)	NAA/ (mg · L ⁻¹)	IAA/ (mg · L ⁻¹)	生根率/%	
					平均值	方差
1	1/2GD	0.80	0.10	0.40	86.67 a	11.05
2	1/2GD	1.00	0.05	0.80	96.67 a	4.71
3	1/2GD	1.20	0	1.20	94.00 a	4.90
4	1/4MS	0.80	0.05	1.20	71.43 b	8.16
5	1/4MS	1.00	0	0.40	95.71 a	5.00
6	1/4MS	1.20	0.10	0.80	70.00 b	8.16
7	1/2 MS	0.80	0	0.80	55.00 c	7.64
8	1/2 MS	1.00	0.10	1.20	81.67 ab	8.97
9	1/2 MS	1.20	0.05	0.40	81.67 ab	10.67
$\bar{x}_1$	92.45	71.03	79.45	88.02		
$\bar{x}_2$	79.05	91.35	83.26	73.89		
$\bar{x}_3$	72.78	81.89	81.57	82.37		
R	19.67	20.32	3.81	14.13		
最优水平	1	2	3	1		
因素主次	2	1	4	3		

注：表中“ $\bar{x}_1 \sim \bar{x}_3$ ”表示3个因素不同水平的平均数；“ R ”表示不同水平平均数的极差；不同小写字母表示在 $\alpha=0.05$ 水平上差异显著。



A: 初代培养基 GD+6-BA $1.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +NAA $0.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; B: 继代培养基 GD+6-BA $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +IAA $0.30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; C: 生根培养基 $1/4 \text{ MS} + \text{IBA } 1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{IAA } 0.40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; D: 移栽驯化基质 1:5 (V:V) 的珍珠岩+泥炭土混合基质。

图1 木荷优良家系组培育苗过程

2.4 驯化与移栽

木荷试管苗经上述的方法驯化后,叶片舒展,具光泽,植株直挺,木质化程度提高,植株不易折断,为下步的移栽成活提供良好的基础。组培苗移栽1个月后,调查发现苗木移栽存活率高达92.2%,且苗木长势良好,表明该套方法适宜木荷组培苗的驯化、移栽与管理。

3 结论与讨论

3.1 试验表明,木荷优良家系的最优初代培养基为 GD+6-BA $1.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +NAA $0.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,最优继代培养基为 GD+6-BA $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{IAA } 0.30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,最优生根培养基为 $1/4 \text{ MS} + \text{IBA } 1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{IAA } 0.40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。但在筛选继代培养基和生根培养基时,发现基本培养基和激素浓度均具有不同程度的影响,建议选用各激素的最优浓度,组合形成优化培养基配方,进一步开展继代培养与生根培养试验。

3.2 徐位力等^[6]报道木荷组织培养时,基本培养基采用 MS。本研究发现,MS 培养基的茎段萌芽率仅为 67%,远低于 GD 培养基的 74%,另外 MS 培养基出现芽偏黄且透明玻璃化、叶片卷曲等不良现象, GD 培养基获得的芽浓绿、叶片展开,因此 GD 培养基更适宜本研究的木荷优良家系。造成这种明显差异的原因可能是木荷遗传背景不同,或是激素种类及其浓度的差别,其机理有待于进一步研究^[9]。本研究最优继代培养基的增殖系数为 3.1 倍,与徐位力等^[6]报道的相同,但 96.67% 的生根率和 92.2% 的移栽存活率,均略低于该文献报道的 100% 和 95%,但差异不明显,表明木荷组织培养均较为成功。

3.3 木荷组织培养易于诱导出根,但随着培养时间增长,叶片和顶芽易枯黄,且不同家系表现程度有明显差异。因此,在选育的不同优良家系的组织培养中,其生根培养基还需有针对性的筛选,并做出适当的调整。

3.4 移栽基质为 1 : 5 (V : V) 的珍珠岩 + 泥炭土混合基质, 容器为 32 目穴盘。木荷试管苗采用本试验的驯化、移栽和管理方法效果好, 存活率高, 达到 92.2%。

参考文献

- [1] 广东省林业局, 广东省林学会. 广东省商品林 100 种优良树种栽培技术 [M]. 广州: 广东科技出版社, 2003: 105–108.
- [2] 阮传成, 李振问, 陈诚和, 等. 木荷生物工程防火机理及应用 [M]. 成都: 电子科技大学出版社, 1995.
- [3] 李志勇, 陈建军, 王彦辉. 重庆酸雨区人工木荷林对土壤化学性质的影响 [J]. 植物生态学报, 2008, 32 (3) : 632–638.
- [4] 熊彩云. 江西木荷优良种源选择研究 [D]. 南昌: 江西农业大学, 2011.
- [5] 姜新. 我国木荷研究现状与展望 [J]. 河北农业科学, 2013, 17 (1) : 42 – 45.
- [6] 徐为力, 苏开军, 王伟平, 等. 防火树种木荷和木荷的组织培养及植株再生 [J]. 植物生理学通讯, 2006, 42 (2) : 255.
- [7] 胡莹, 杨柳青. 山茶科植物组织培养研究进展 [J]. 江苏农业科学, 2008 (2) : 6–9.
- [8] 程柳. 茶树组织培养及影响因素 [J]. 安徽农业科学, 2007, 35 (7) : 1960–1963.
- [9] 周丽华, 蔡燕灵, 曾令海, 等. 樟树优良家系的组培育苗技术研究 [J]. 热带作物学报研究, 2013, 34 (1) : 67–73.
- [10] 李胜, 李唯. 植物组织培养原理与技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2007.
- [11] 李春喜, 王志和, 王文林. 生物统计学 [M]. 北京: 科技出版社, 2003: 149–157.
- [12] 黄少伟, 谢维辉. 实用 SAS 编程与林业试验数据分析 [M]. 广州: 华南理工大学出版社, 2001.