

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2014.03.018

张卫华,许丽萍,龚峥,等. 马来沉香组织培养技术研究[J]. 广西植物,2014,34(3):381—386

Zhang WH, Xu LP, Gong Z, et al. Tissue culture propagation technology of *Aquilaria malaccensis*[J]. *Guihaia*, 2014, 34(3):381—386

马来沉香组织培养技术研究

张卫华^{1*}, 许丽萍^{1,2}, 龚 峥¹, 潘 文¹, 朱报著¹

(1. 广东省林业科学研究院, 广州 510520; 2. 普洱市林科所, 云南 普洱 665000)

摘 要: 以马来沉香茎段为外植体, 分别对外植体的消毒、启动培养、增殖培养、壮苗培养、生根培养、炼苗移栽环节进行研究, 着重探索马来沉香组织培养技术各个环节的最佳培养基配方, 为马来沉香的工厂化育苗提供技术指导。结果表明: 马来沉香最佳消毒方法是用 0.1% 升汞消毒 4~5 min; 启动率最高的培养基配方是 1/2 MS+6-BA 0.2 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹+蔗糖 30 g·L⁻¹+琼脂 5.8 g·L⁻¹, 启动率达 70.5%; 增殖系数最高的培养基是 1/2 MS+0.1 mg·L⁻¹6-BA+25 g·L⁻¹蔗糖+5.8 g·L⁻¹琼脂, 增殖系数达 2.9; 最佳壮苗培养基是 1/2 MS+30 g·L⁻¹蔗糖+5.8 g·L⁻¹琼脂; 最佳生根培养基为 1/2 MS+NAA 5.0 mg·L⁻¹+20 g·L⁻¹糖+6 g·L⁻¹琼脂, 培养 2 d 后移入 1/2 MS 培养基继续培养, 生根率为 83%; 马来沉香移栽较难成活, 在泥炭土: 黄土(2:1)的基质上成活率最高, 移栽成活率 65%。

关键词: 马来沉香; 组织培养; 外植体; 生长调节剂

中图分类号: Q943.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2014)03-0381-06

Tissue culture propagation technology of *Aquilaria malaccensis*

ZHANG Wei-Hua^{1*}, XU Li-Ping^{1,2}, GONG Zheng¹, PAN Wen¹, ZHU Bao-Zhu¹(1. *Guangdong Academy of Forestry*, Guangzhou 510520, China; 2. *Pu'er Institute of Forestry*, Pu'er 665000, China)

Abstract: Using the young shoots as explants, the methods including sterilization, induction, propagation, rooting and planting of the *Aquilaria malaccensis* were studied. It was indicated that the best method to sterilize was 4—5 min as 0.1% HgCl₂; 1/2 MS+6-BA 0.2 mg·L⁻¹+NAA 0.1 mg·L⁻¹+sugar 30 g·L⁻¹+ agar 5.8 g·L⁻¹ as the effective medium for adventitious shoot induction, the induction rate was 70.5%; 1/2 MS+0.1 mg·L⁻¹6-BA+sugar 25 g·L⁻¹+agar 5.8 g·L⁻¹ as the suitable propagation medium, and the coefficient was 2.9; the medium of 1/2 MS + sugar 30 g·L⁻¹+ agar 5.8 g·L⁻¹ made the emblings grow strong to cut; 1/2 MS+NAA 5.0+sugar 20 g·L⁻¹+agar 6.0 g·L⁻¹ as the rooting medium, the rooting plantlets would be transferred to the medium with no hormone after two days. The rooting rate was 83%. It was a little difficult to transplant, and the survival rate was only 65% in the medium mixed with peat soil and yellow mud (proportion was 2:1).

Key words: *Aquilaria malaccensis*; tissue culture; explants; germinate regular chemical

沉香属(*Aquilaria*)植物共有 15 种, 属瑞香科(Thymelaeaceae), 具有珍贵的药用用途。其形态为乔木或小乔木, 落叶或不落叶, 分布于缅甸、泰国、

越南、老挝、柬埔寨、印度东北部及不丹、马来半岛、苏门答腊、加里曼丹等热带、亚热带地区。马来沉香(*Aquilaria malaccensis*), 又称容水沉香树, 属瑞香

收稿日期: 2013-06-06 修回日期: 2013-08-15

基金项目: 国家公益性行业专项(201204303); 引进国际先进林业科学技术项目(2008-4-01)。

作者简介: 张卫华(1977-), 女, 河北定兴人, 博士, 高级工程师, 从事组织培养与林木遗传育种工作, (E-mail)zwh523@sinogaf.cn。

* 通讯作者

科沉香属常绿乔木,在热带、亚热带的雨林和荒山野岭中生长。高可达 40 m,胸径为 1.5~2.5 m,开白色小花,马来沉香和同一科的其他几种可产生具有很高药用价值、芬芳浸满树脂的心材,通常被称为琼脂木、沉香木。它还具有广泛适应性,可在沙地、石灰质、水分缺乏的坡地和山脊以及沼泽地,在平均气温为 20~22 °C、海拔 1 000 m 的地域有分布。马来沉香的组织培养研究在国内未见报道,由于同属植物沉香是我国的乡土树种,对其研究相对较多,离体组织培养、建立无性系快繁方面也有报道,何旭君等(2006)对沉香树组织培养快速繁殖技术进行了研究,筛选出了各培养阶段适宜培养基和移栽基质;徐强兴等(2006)对土沉香的组培快繁技术进行了研究,得出 MS+BA 0.2 mg · L⁻¹ 培养基比较适合芽的诱导培养的结论;兰芹英等(2001)对沉香成熟胚的组织培养和植株再生进行了研究。

马来沉香 PK 品系是马来西亚林业科学研究所 Soehartno 博士从 1985 年开始在种源和家系试验基础上选育了 2 个优良品系。马来沉香 PK 品系的树高和胸径生长量比平均高 25% 和 18%,该品系不仅开始结香时间略有提早,结香率高,沉香产量提高在 5% 以上,而且香味浓郁,质量好,价格高,经济效益显著。本文对马来西亚引进的 PK 品系进行了较完善的组织培养研究。

1 材料与方 法

1.1 材 料

以马来西亚林业研究所引进的马来沉香 PK 品系为材料。

1.2 方 法

1.2.1 外植体材料的预处理 取材选在晴天,在取材前一天停止浇水,选择健康、无病虫害的马来沉香实生苗嫩茎,去除叶片,带回试验室,在流水下冲洗,清除明显的污垢,然后再用 1% 左右的洗衣粉液轻柔地涮洗,在流水下冲洗干净,用灭过菌的剪刀将其剪成 1~2 cm 长的带芽茎段,待用。

1.2.2 消毒试验 以 NaClO、HgCl₂ 为消毒剂,消毒剂种类及浓度、时间见表 1。在消毒试验阶段,培养基为 MS+6-BA 0.2 mg · L⁻¹,附加蔗糖 30 g · L⁻¹,琼脂粉 5.8 g · L⁻¹,pH 5.8。将准备好的外植体在表 1 中的处理浸泡后,浸泡的过程边摇晃,用无菌水冲洗 5~6 次,每瓶接种一个外植体,每次 20 瓶,

3 次重复,10 d 后观察污染情况和启动情况。

表 1 消毒剂的种类和浓度

Table 1 Type and concentration of disinfectant

处理 Treatment	消毒剂 Disinfectant	消毒时间 (min) Disinfectant time
I-1	0.1% HgCl ₂	5
I-2	0.2% HgCl ₂	5
I-3	1% NaClO	10
I-4	2% NaClO	10

选出最好的消毒剂,用同样的方法,以 3~8 min 的时间梯度做最佳消毒时间的筛选。

1.2.3 诱导培养基筛选 利用预处理过的外植体为试验材料,以 MS、1/2MS、B5 为基本培养基,添加 6-BA、NAA、KT 3 种植物生长调节剂,其中培养基中含有蔗糖 30 g · L⁻¹,琼脂粉 5.8 g · L⁻¹,采用正交设计方法(表 2)。在超菌工作台上用 1.2.2 筛选出的最佳的外植体消毒方法处理外植体后,接入表 2 中 II-1~II-9 的培养基中,每个处理 30 瓶,每瓶一个外植体,3 次重复,观察启动率,找出最佳的启动培养基配方。

表 2 启动培养正交方案表

Table 2 Orthogonal design of induction test

处理 Treatment	A(培养基) Medium	B(6-BA mg · L ⁻¹)	C(NAA mg · L ⁻¹)
II-1	1(MS)	1(0.2)	1(0.05)
II-2	1	2(0.5)	2(0.1)
II-3	1	3(1.0)	3(0.2)
II-4	2(1/2MS)	1	2
II-5	2	2	3
II-6	2	3	1
II-7	3(B5)	1	3
II-8	3	2	1
II-9	3	3	2

1.2.4 芽增殖培养基筛选 以启动培养试验所获得的无菌嫩芽为试验材料,基本培养基为 1/4 MS、1/2 MS、3/4 MS、MS,附加植物生长调节剂 6-BA 0.05、0.1、0.2、0.5 mg · L⁻¹ 4 种浓度,添加蔗糖 30 g · L⁻¹,琼脂粉 5.8 g · L⁻¹,pH 5.8,增殖培养设计方案见表 3,继代周期为 40 d。每个处理 30 瓶,每瓶一个芽,3 次重复。

1.2.5 不定根诱导培养基筛选 (1) 单次生根诱导试验:以 1/2 MS 为基本培养基,设附加 IBA 0.1、0.5、1.0、1.5、2.0 mg · L⁻¹,NAA 0.1、0.5、1.0、1.5、2.0 mg · L⁻¹;IBA 0.5 mg · L⁻¹ + NAA 0.2 mg · L⁻¹;IBA 0.5 mg · L⁻¹ + GTY 2.0 mg · L⁻¹;IBA 0.5 mg · L⁻¹ + GTY 1.0 mg · L⁻¹;IBA 0.2 mg · L⁻¹ +

表 3 增殖培养正交方案表

Table 3 Orthogonal design of multiplication test

处理 Treatment	A(培养基) Medium	B (6-BA mg · L ⁻¹)
Ⅲ-1	1(1/4MS)	1(0.05)
Ⅲ-2	1	2(0.1)
Ⅲ-3	1	3(0.2)
Ⅲ-4	1	4(0.5)
Ⅲ-5	2(1/2MS)	1
Ⅲ-6	2	2
Ⅲ-7	2	3
Ⅲ-8	2	4
Ⅲ-9	3(3/4MS)	1
Ⅲ-10	3	2
Ⅲ-11	3	3
Ⅲ-12	3	4
Ⅲ-13	4(MS)	1
Ⅲ-14	4	2
Ⅲ-15	4	3
Ⅲ-16	4	4

NAA 0.3 mg · L⁻¹ + GTY 1.0 mg · L⁻¹; IBA 0.3 mg · L⁻¹ + NAA 0.1 mg · L⁻¹ + GTY 2.0 mg · L⁻¹ 等 15 个处理, 切取高约 2 cm、大小基本一致的不定芽接入各种培养基中培养, 每个处理 3 瓶, 每瓶接种 5 株。培养 30 d 后观察各处理组育苗的生根情况。

(2) 二次生根诱导试验: 以 1/2 MS 为基本培养基, 设附加 NAA 3.0、5.0、7.0 mg · L⁻¹ 及 IBA 3.0、5.0、7.0 mg · L⁻¹ 等 6 个处理, 切取大小基本一致、生长正常、高约 2 cm 的不定芽接入各种培养基中, 培养 2 d 后移入不加任何外源激素的 1/2 MS 培养基中继续培养, 每处理 3 瓶, 每瓶接种 12 株。培养 30 d 后观察各处理组育苗的生根情况。

1.2.6 炼苗、移栽 3 月份瓶苗的根多数长于 1 cm 时, 将瓶苗移至大棚进行炼苗, 3 d 后, 将瓶盖拧松, 以后每隔 1~2 d 将盖子拧开少许, 分 3~4 次全部打开, 10 d 后, 进行移栽, 移栽前, 要用清水将培养基洗掉; 用 1 000 倍的根太阳浸泡根部 5 min, 栽至基质中, 基质用蛭石: 珍珠岩: 黄心土(比例为 1: 1: 1)和泥炭土: 黄心土(比例为 2: 1), 用水淋透, 盖上塑料膜和遮荫网。基质在移栽前 3 d 经过太阳晒, 移栽时用 0.1% 高锰酸钾溶液消毒基质, 35 d 后, 统计结果。

1.3 试验数据的记录与处理

材料接种后, 定期观察记录生长情况, 主要统计指标包括: (1) 污染率 = (污染的外植体数/接种外植体总数) × 100%; (2) 死亡率 = (死亡的外植体数/接种的外植体总数) × 100%; (3) 启动率 = (未污染且

成活的外植体数/接种的外植体总数) × 100%; (4) 增殖系数 = (增殖的芽苗数/起始的芽苗数) × 100%; (5) 生根率 = (生根苗数/培养总苗数) × 100%; (6) 移栽成活率 = (成活苗数/移栽苗总数) × 100%。采用 SPSS 统计分析软件进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 消毒剂种类和浓度的筛选

用于消毒处理的化学药剂很多, 一般 NaClO 因其性温和, 杀菌效果好, 而常用于组织培养中外植体消毒; 升汞是一种杀菌效果比较优良的消毒剂, 通过汞离子使蛋白质变性而杀死外植体表面微生物, 尤其能有效杀死细菌。用不同消毒剂处理过的茎段, 接入培养基, 20 d 后统计污染率、启动率、死亡率, 试验结果表明: 0.1% HgCl₂ 消毒效果最好, 其启动率在四个消毒剂中最高, 启动率 55.8%, 污染率 21.3%, 达到了较为理想的效果; 0.2% 的 HgCl₂ 处理 5 min 虽然使污染率下降到 11.7%, 但死亡率很高, 达 46.6%; 1% 的 NaClO 消毒 10 min 后的污染率仍较高; 用 2% 的 NaClO 处理外植体, 对污染率的下降和启动率的提高没有很明显的影 响。最适合的消毒剂是 HgCl₂ (表 4)。

表 4 不同消毒剂消毒效果的比较

Table 4 Comparison of different disinfectant effections

消毒方法 Disinfection method	污染率 Contamination rate	死亡率 Mortality	启动率 Started rate	未污染未启动 Not started
0.1% HgCl ₂ 5 min	0.213	0.219	0.558	0.010
0.2% HgCl ₂ 5 min	0.117	0.466	0.350	0.067
1% NaClO 10 min	0.461	0.090	0.386	0.063
2% NaClO 10 min	0.352	0.183	0.357	0.102

在上一步试验的基础上, 为找出最佳的消毒时间, 以浓度为 0.1% 的 HgCl₂ 为消毒剂, 设计了 3~8 min 的时间梯度试验, 20 d 后观察, 从表 5 可以看出, 随着消毒时间的逐渐增加, 马来沉香污染率、启动率、死亡率呈现有规律地变化, 污染率随时间的增加呈下降趋势, 变化相对缓和, 死亡率随时间的增加呈上升趋势, 启动率先上升后下降, 在 4 min 时达最高值 (62.8%), 4 min 和 5 min 的启动率均超过 50%, 死亡率低于 20%。由此, 马来沉香的最佳消毒方法是用 0.1% 的 HgCl₂ 处理 4~5 min。

2.2 芽的诱导

外植体接入培养基后, 每天观察外植体萌发生

表 5 消毒时间梯度试验

Table 5 Gradient experiment of time level in sterilization

消毒时间 Disinfectant rate (min)	污染率 Contamination rate	死亡率 Mortality	启动率 Started rate	未污染未启动 Unpolluted and not started
3	0.448	0.052	0.463	0.037
4	0.307	0.102	0.628	0.053
5	0.213	0.199	0.558	0.030
6	0.189	0.326	0.426	0.079
7	0.149	0.457	0.311	0.083
8	0.132	0.517	0.271	0.086

长情况,部分外植体萌发生长比较快,最快的 3 d 即有萌发迹象,一个星期后芽有 0.3 cm 长,这和外植体本身的基因型有关,大部分萌发生长较快的外植体较为粗壮。一个星期后,大量外植体开始萌发,两个星期后,统计其启动率,严重玻璃化不计入其内。启动率最高的培养基组合是 II-4 号培养基 1/2 MS + 6-BA 0.2 mg · L⁻¹ + NAA 0.1 mg · L⁻¹,启动率达 70.5%,差异性分析显示 II-4 号和 II-1 号培养基差异性不显著,II-2 号和 II-5 号差异性不显著,II-3 号和 II-6 号差异性不显著,除掉误差,其余各个处理差异性均显著。由此而知,基本培养基的选择对沉香茎段芽的启动影响显著,本试验中 MS 和 1/2 MS 差异性不显著,1/2 MS 最好。6-BA 的影响也较为显著,以低浓度的效果较好。NAA 对沉香茎段培养启动率影响不显著。

表 6 启动试验外植体启动率

Table 6 Results of explant started rate in starting experiment

处理 Treatment	启动率 Started rate				平均值 Mean
	I	II	III		
II-1 MS+6-BA 0.2 mg · L ⁻¹ + NAA 0.05 mg · L ⁻¹	0.633	0.677	0.714	0.675	
II-2 MS+6-BA 0.5 mg · L ⁻¹ + NAA 0.1 mg · L ⁻¹	0.633	0.548	0.571	0.584	
II-3 MS+6-BA 1.0 mg · L ⁻¹ + NAA 0.2 mg · L ⁻¹	0.400	0.419	0.371	0.397	
II-4 1/2 MS+6-BA 0.2 mg · L ⁻¹ + NAA 0.1 mg · L ⁻¹	0.666	0.677	0.771	0.705	
II-5 1/2 MS+6-BA 0.5 mg · L ⁻¹ + NAA 0.2 mg · L ⁻¹	0.566	0.581	0.543	0.563	
II-6 1/2 MS+6-BA 1.0 mg · L ⁻¹ + NAA 0.05 mg · L ⁻¹	0.366	0.452	0.400	0.406	
II-7 B5+6-BA 0.2 mg · L ⁻¹ + NAA 0.2 mg · L ⁻¹	0.333	0.323	0.314	0.323	
II-8 B5+6-BA 0.5 mg · L ⁻¹ + NAA 0.05 mg · L ⁻¹	0.300	0.258	0.314	0.291	
II-9 B5+6-BA 1.0 mg · L ⁻¹ + NAA 0.1 mg · L ⁻¹	0.233	0.258	0.229	0.240	

2.3 芽的增殖壮苗培养

马来沉香在一般 40 d 继代 1 次,增殖倍数在 1.9 ~ 2.7 之间。增殖培养过程中,很容易产生水渍状透明的玻璃芽,严重影响了芽的增殖和质量。不同无机盐浓度培养基试验结果表明,在外源激素 6-BA 添加浓度为 0.1 mg · L⁻¹ 的条件下,不同无机盐浓度对马来沉香的芽增殖和玻璃芽率有不同的影响。其中,全量 MS 和 3/4 MS 培养基易产生玻璃芽,严重阻碍了芽的增殖,不适合增殖培养基;在 1/2 MS 培养基中培养的芽生长正常、健壮,增殖率较高,且玻璃芽率较低,比较适合用于芽的增殖培养;随着无机盐浓度的继续降低,玻璃芽率有下降的趋势,即 1/4 MS 培养基中的玻璃芽率较低,但芽的长势较差,增殖率较低,不适合增殖培养基。增殖芽若连续在全量 MS 培养基中培养,玻璃芽的发生会逐渐加重;而连续在 1/2 MS 培养基中培养,玻璃芽率则保持在较低的水平,说明 1/2 MS 培养基适宜于马来沉香增殖芽的连续培养。

表 7 增殖培养试验结果

Table 7 Results of the proliferation

编号 Code	因子 Factor		平均增殖系数 Mean enhance- ment rate
	A(基本培养基) Minimal medium	B (6-BA mg · L ⁻¹)	
III-1	1/4 MS	0.05	1.9
III-2	1/4 MS	0.1	2.4
III-3	1/4 MS	0.2	1.8
III-4	1/4 MS	0.5	2.2
III-5	1/2 MS	0.05	2.4
III-6	1/2 MS	0.1	2.9
III-7	1/2 MS	0.2	2.6
III-8	1/2 MS	0.5	2.7
III-9	3/4 MS	0.05	2.0
III-10	3/4 MS	0.1	2.5
III-11	3/4 MS	0.2	2.2
III-12	3/4 MS	0.5	2.5
III-13	MS	0.05	1.9
III-14	MS	0.1	2.3
III-15	MS	0.2	2.3
III-16	MS	0.5	2.1

芽增殖对细胞分裂素 6-BA 的浓度要求较低,当 6-BA 浓度小于 0.1 mg · L⁻¹ 时,增殖倍数随着浓度的加大而升高,当 6-BA 为 0.1 mg · L⁻¹ 时,其增殖倍数达到最大值,之后随着 6-BA 浓度的继续升高,增殖倍数反而下降,并且随着 6-BA 浓度的升高,芽玻璃化有加重的趋势。

适宜增殖的培养基为 1/2 MS+6-BA 0.1 mg · L⁻¹ + 5.8 g · L⁻¹ 琼脂粉 + 30 g · L⁻¹ 糖, pH 5.8。

增殖培养得到的芽苗矮小纤弱,木质化程度低,将这些小苗直接转入生根培养基,生根效果不理想,而且容易掉叶,导致生长停滞,所以,还需要进行壮苗培养,树种不一样,所要求的壮苗培养基也不一样,马来沉香的壮苗培养基只要 1/2 MS 基本培养基,不需添加任何激素。将经过继代培养得到的马来沉香芽苗,苗高小于 1 cm 的,切下转入壮苗培养基,即 1/2 MS+30 g·L⁻¹蔗糖+5.8 g·L⁻¹琼脂粉。30 d 后,苗高为 1.5~3 cm。

2.4 生根培养

由表 8 可知,马来沉香总体生根率并不高,最高只有 56.7%,在 1/2 MS 上单独使用 IBA 或 NAA 时,可诱导生根,但生根率较低,在 10%~30% 之间,两者配合使用或再加根太阳效果要好一些。单独使用 NAA 的生根效果比单独使用 IBA 的效果好,其生根率分别为 24.2%、17.9%,相差 6.3%。根太阳对马来沉香诱导生根效果比较好,配合 NAA、IBA 其中一种或三种一起配合加到 1/2 MS 培养基中,生根率明显提高,生根率最好的是 V-14 号培养基,即 1/2 MS+IBA 0.2 mg·L⁻¹+NAA 0.3 mg·L⁻¹+GTY 1.0 mg·L⁻¹。平均根长和生根率呈正相关,平均根长最短的为生根率最低的 V-1 号培养基,即 1/2 MS+IBA 0.2 mg·L⁻¹,平均根长为 0.61 cm。最长的为 V-14 号培养基,1.23 cm。

表 8 生根培养实验结果及分析表

Table 8 Analysis of the rooting culture

编号 Code	处理 Treatment			生根率 Rooting rate (%)	平均根长 Mean root length (cm)
	IBA (mg·L ⁻¹)	NAA (mg·L ⁻¹)	GTY(根太阳) (mg·L ⁻¹)		
V-1	0.1			15.4	0.61
V-2	0.5			17.1	0.54
V-3	1.0			19.9	0.85
V-4	1.5			17.4	0.87
V-5	2.0			19.9	0.76
V-6		0.1		16.2	0.80
V-7		0.5		20.3	0.78
V-8		1.0		26.7	0.89
V-9		1.5		29.6	0.93
V-10		2.0		28.4	1.02
V-11	0.5	0.2		31.5	0.98
V-12	0.5		2.0	51.7	1.17
V-13	0.5		1.0	49.7	1.19
V-14	0.2	0.3	1.0	56.7	1.23
V-15	0.3	0.1	2.0	50.9	1.18

根据单次生根法的结果,采用高浓度的 NAA,诱发原基的形成,然后转入不添加激素的培养基内生长,在二次生根法均出现根萌动,根系较直接生根

法粗壮,15 d 后,单株生根最多条数为 5 条,生根率为 17%~83%,其中最佳生根培养基为 1/2 MS+NAA 5.0 mg·L⁻¹+6 g·L⁻¹琼脂+20g·L⁻¹糖,pH 5.8,培养 2 d 后移入 1/2 MS 培养基继续培养,生根率为 83%。

2.5 移栽

用蛭石:珍珠岩:黄心土(1:1:1)作基质共移植 125 株,成活 55 株,移栽成活率 44.32%,泥炭土:黄心土(2:1)作基质共移植 120 株,成活 78 株,移栽成活率 65%。

3 讨论与结论

(1)外植体消毒是植物组织培养技术关键的一步,控制污染是组织培养技术首要解决的问题,本试验采用 0.1% 升汞消毒 4~5 min,污染率可降低至 20%,而启动率可达 70%。

(2)不同种类的植物,甚至同一种植物的不同组织,对营养的要求也是不尽相同的,因此没有一种能适应于所有种类植物组织和器官的“通用”培养基。目前,木本植物组织培养可供选择的基本培养基较多,如 MS、B5、WPM、DCV、GD、SH 等。本研究选择 MS 和 B5 作为马来沉香启动培养的基本培养基,其结果不论是启动培养速度还是启动率,两种基本培养基存在着显著性差异,MS 的启动速度明显快于 B5;对芽诱导率的诱导两种培养基也存在显著性差异,MS 培养基的芽诱导率比 B5 培养基的芽诱导率高,因此在芽诱导和增殖培养中均选用 MS 作为主要基本培养基。用 MS 和 1/2 MS 基本培养基对启动率的影响不是很大,但玻璃化现象用 MS 的比用 1/2 MS 的明显。以 1/2 MS 为基本培养基,添加 0.2 mg·L⁻¹的 6-BA 和 NAA 0.1 mg·L⁻¹,启动率达 70.5%,外植体一星期左右开始萌发,有的外植体 3 d 即有萌发的迹象。

(3)不同无机盐浓度对马来沉香的芽增殖和玻璃芽率有不同影响。全量 MS 和 3/4 MS 培养基易产生玻璃芽,严重阻碍了芽的增殖,随着无机盐浓度的继续降低,玻璃芽率有下降趋势,在 1/2 MS 培养基中培养的芽生长正常、健壮,增殖率较高,且玻璃芽率较低。芽增殖对细胞分裂素 6-BA 的浓度要求较低,当 6-BA 浓度小于 0.1 mg·L⁻¹时,增殖倍数随着浓度的加大而升高,当 6-BA 为 0.1 mg·L⁻¹时其增殖倍数达到最大值,之后随着 6-BA 浓度的继

续升高,增殖倍数反而下降,并且随着 6-BA 浓度的升高,芽玻璃化有加重的趋势。因此适宜增殖的培养基为 $1/2$ MS+6-BA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 卡拉胶+ $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 糖,pH 5.8。

(4)木本植物的生根普遍较难,马来沉香单次生根的生根率并不高, $1/2$ MS 培养基上单独加 IBA 或 NAA 时,均可以诱导马来沉香生出根来,但生根率非常低,两者配合使用效果要好一点,但顶多能使生根率达到 30%。单独使用 NAA 的效果比单独使用 IBA 的效果好。再加入根太阳能使生根率在 50%以上。不管是生根培养阶段还是移栽阶段,根太阳是一种较好的根诱导剂。单次生根法采用 $1/2$ MS+IBA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +NAA $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +GTy $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基时生根率为 56.7%;二次生根最佳培养基为 $1/2$ MS+NAA $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂+ $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 糖,pH 5.8,培养 2 d 后移入 $1/2$ MS 培养基继续培养,生根率为 83%。

(5)外植体在试管中生长发育形成完整的植株后,能否成为 1 株合格的出圃苗木决定于树种本身的生物学特性、移栽技术和季节等因素的影响。本次移栽是在春季进行,由于空气湿度大,气温适中,用泥炭土:黄心土(2:1)作基质得到较好的效果。在生产过程中应在春季多生长瓶苗,在初夏之前完成移栽,而在广州市一定要冬季移栽应在室内完成,且做好保温措施;掌握合适的根长也有助于提高成活率。

参考文献:

Anderson JAR. 1980. A checklist of trees of Sarawak[M]. Kuching: Sarawak Kuching Forest Department
 Chakrabarty K, Kumar A, Menon V. 1994. Trade in Agarwood [M]. New Delhi: Traffic India and WWF-India
 Eurlings MCM, Gravendeel B. 2005. TmL-trnf sequence data imply paraphyly of *Aquilaria* and *Gyrinops* (Thymelaeaceae) and pro-

vide new perspectives for agarwood identification[J]. *Plant Sys Evol*, **254**: 1-12
 Guo JZ(郭军战), Shu QY(舒庆艳), Wang LL(王丽玲). 2002. The selection and sterilization of explant of *Tetraploids* of *Loest* tree in tissue culture(四倍体刺槐组织培养中的外植体选择和消毒研究)[J]. *J Northwest For Univ*(西北林学院学报), **17**(1): 15-18
 He XJ(何旭君), Cai YD(蔡乙东), Chen YZ(陈永镇), et al. 2006. Tissue culture rapid propagation techniques of *Aquilaria* (沉香树组织培养快速繁殖技术研究)[J]. *For Constr*(林业建设): 10-12
 Keller P, Sidiyasa K. 1994. Trees of Balikpapan-Samarinda Area, East Kalimantan, Indonesia; a manual of 280 selected species [M]. Wageningen: Tropenbos Foundation
 Lan QY(兰芹英), Fang CY(方春妍), He HY(何惠英), et al. 2001. *Aquilaria* mature embryo tissue culture and plant regeneration(土沉香成熟胚的组织培养及植株再生)[J]. *Guangxi Agric & Biol Sci*(广西农业生物科学), **20**(3): 231-232
 Li JM(李俊明), Zhu DY(朱登云). 2005. Tutorial of Plant Tissue Culture(植物组织培养教程)[M]. Beijing(北京): China Agricultural University Press(中国农业大学出版社): 19-20
 Liu JP(刘进平), Cao ZY(曹孜义), Li W(李唯), et al. 2003. Micropropagation of 5 almond cultivars introduced from USA(5 个美国扁桃品种的微繁殖)[J]. *Northern Fruit*(北方果树): **11**: 1-3
 Soehartono T, Mardiatuti A. 1997. The current trade in gaharu in West Kalimantan[J]. *J Ilmiah Biodiv Ind*, **1**: 1-10
 Sun JS(孙敬三), Zhu ZQ(朱至清). 2006. Plant Cell Engineering(植物细胞工程实验技术)[M]. Beijing(北京): Chemical Industry Press(化学工业出版社): 42-43
 Wei XL(魏晓兰). 2003. Analysis of triploid *Populus tomentosa* tissue culture explant sterilization(浅析三倍体毛白杨组织培养中外植体的灭菌)[J]. *J Gansu For Sci Technol*(甘肃林业科技), **28**(2): 54-55
 Xu QX(徐强兴), Wu FH(吴妃华), Zhou LL(周立赖). 2006. *Aquilaria sinensis* tissue culture technique(土沉香的组培快繁技术研究)[J]. *Guangdong Agric Sci*(广东农业科学), **8**: 44-46
 Zhao XM(赵秀梅), Liu F(刘芬), Dong T(董铁). 1998. Mandelic vitro rapid propagation techniques(扁桃离体快速繁殖技术研究)[J]. *Gansu Agric Sci Technol*(甘肃农业科技), (5): 26-27