

史密斯桉组织培养技术及褐变问题研究

饶红欣, 蒋利媛, 彭信海, 夏晓敏, 刘先芳

(湖南省森林植物园, 湖南 长沙 410116)

摘 要: 对史密斯桉(*Eucalyptus smithii*)的组织培养和褐变控制等进行探讨, 结果表明: 初接种采用 MS+BA 0.2 mg/L+IBA 1 mg/L 培养基, 芽诱导率为 40%; 继代采用 MS+BA 0.2 mg/L+IBA 0.8 mg/L 培养基, 增殖系数可达 4, 芽抽茎成苗率 30.1%; 生根采用 MS+IBA 2 mg/L 培养基, 根诱导率 36.7%, 平均生根 2.4 条。培养基中 BA 质量浓度为 0.2~1.0 mg/L, 有利于芽的生长, 但超过 1.0 mg/L 时反而抑制芽的生长。不同培养基添加物减轻褐变的效果不同, 而同种添加物不同浓度的效果也不一样, 加入 50 mg/L PVP 或 100 mg/L V-C 能显著减轻褐变, 褐变率分别降低 10% 和 8.3%。暗培养法虽能有效控制褐变, 但严重影响愈伤组织和芽的生长, 不宜采用。

关 键 词: 史密斯桉; 组织培养; 褐变

中图分类号: S792.39

文献标识码: A

Researches on tissue culture and browning prevention of *Eucalyptus smithii*

RAO Hong-xin, JIANG Li-yuan, PENG Xin-hai, XIA Xiao-min, LIU Xian-fang

(Hunan Provincial Forest Botanic Garden, Changsha 410116, China)

Abstract: Researches on tissue culture and browning prevention of *Eucalyptus smithii* were conducted, and the results showed: initial shoot induction rate for medium, MS+BA 0.2 mg/L+IBA 1 mg/L, was 40% during initial inoculation; shoot multiplication rate and shoot formation rate for medium, MS+BA 0.2 mg/L+IBA 0.8 mg/L, were 4 and 30.1% respectively during subpassage; root induction rate and mean rooting number for medium, MS+IBA 2 mg/L, was 36.7% and 2.4 respectively during rooting period. BA supplemented with concentration 0.2 ~ 1.0 mg/L promoted shooting, but restrained it when higher than 1.0 mg/L on the other hand. Different supplements had different effects in lightening bowing, so was the same kind of but differently-concentrated supplements. 50 mg/L PVP or 100 mg/L V-C could lighten browning significantly by 10% and 8.3% respectively. It's better not to adopt all-dark cultivation because it restrained the growth of callus and shoots badly, in spite that it could prevent browning effectively.

Key words: *Eucalyptus smithii*; tissue culture; browning

史密斯桉(*Eucalyptus smithii*)是桃金娘科桉属植物, 原产澳大利亚, 速生、抗寒, 木材材质好, 芳香油、桉树脑含量高^[1-2], 是营造速生丰产林和短周期工业原料林的理想树种。20世纪90年代以来, 湖南省林业技术推广总站、湖南省森林植物园等单位从原产地气候相似地区系统引进并筛选了一批适合湖南气候条件的桉树优良种质资源, 其中包括

史密斯桉。由于史密斯桉是异花授粉植物, 常易天然杂交, 后代严重分离, 有性繁殖方法很难保持其优良特性。笔者对史密斯桉组织培养技术进行研究, 旨在为其种质资源的试管保存及产业化、工厂化育苗提供技术保障。

1 材料与方法

1.1 外植体的来源与消毒

史密斯桉外植体来自湖南省森林植物园桉树引种试验林。从二年生优株上选取饱满的腋芽作外植体, 用自来水反复清洗30 min后, 再用0.25% HgCl₂消毒, 之后, 在无菌条件下用1%氯化钙浸

收稿日期: 2007-10-18

基金项目: 国家农业成果转化基金(02EFN214300454)

作者简介: 饶红欣(1970-), 女, 湖南长沙人, 湖南省森林植物园副研究员, 主要从事植物组织培养和林木育种研究。

洗3次,每次5 min,再用无菌水冲洗3次。在超净工作台上,将经消毒的外植体接种于诱导培养基,先暗培养一周,再按标准条件培养,30 d时统计污染率。

1.2 培养基的筛选与褐变的评判标准

待外植体产生愈伤组织或腋芽萌发后进行继代和生根培养。培养基筛选和光照条件试验时每处理均为60株带愈伤组织的芽苗,40 d后观察结果;培养基添加物试验时,每处理30株,重复3次,40 d后观察结果。数据均取其算术平均值,并对试验结果进行单因素方差分析和 Q 检验。标准培养条件为:采用MS, 1/2MS或1/4MS作基本培养基,添加不同质量浓度的BA, IBA, NAA;培养基中加入0.7%琼脂, pH5.8, 蔗糖3%;培养温度24~28℃,光照度2 000~3 000 lx,每天光照14 h。试验记录时,将愈伤组织褐变情况分为6种:“1+”表示无明显褐变;“2+”表示较明显褐变;“3+”表示显著褐变,“4+”表示极显著褐变;“5+”表示变黑、死亡。

2 结果与分析

2.1 无菌培养系的建立和诱导

外植体接种后3~5 d即出现污染,6~12 d为污染高峰期,之后逐渐下降,直至1个月时才基本不再出现污染现象。从表1可知,随着消毒时间的延长,外植体的褐变率上升,污染率明显降低,用0.25% HgCl_2 消毒11~15 min均可,但以15 min为最佳。外植体接种7 d后就可观察到颗粒状愈伤组织,之后出现腋芽萌动。在初接种的1个月里,愈伤组织生长较慢,多为黄绿松散状。从表2可知,初接种培养基中,1号只有愈伤组织但无腋芽萌动,2号腋芽萌发率不高,而3号的腋芽萌发率较高(40%),愈伤组织较少且小,可作为初接种诱导培养基。

表1 不同消毒时间的消毒效果
Table 1 Effects of different time on disinfection

消毒时间 /min	接种数	污染数	污染率/%	成功数	褐变数	褐变率/%
11	120	75	62.5	45	5	11.1
13	139	71	51.1	68	11	16.2
15	129	35	27.1	94	16	17.0

表2 培养基对初接种诱导的影响

Table 2 Effects of different medium on initial inoculation induction

编号	培养基	接种数/个	芽萌发数/个	萌发率/%	愈伤组织诱导数/个	愈伤组织诱导率/%
1	MS	60	0	0	41	68.3
2	MS + BA 0.2 mg/L	57	12	21.3	1	1.8
3	MS+BA 0.2 mg/L+IBA 1 mg/L	60	24	40.0	12	20.0

2.2 培养基的系统筛选

2.2.1 继代培养基的筛选

从表3可见,参试培养基芽的增殖系数为2.0~4.0,均有较明显的褐变,其中11号培养基增殖系数

为4,且抽茎成苗的效果好,达30.1%,为最佳继代培养基。另外,4~9号培养基在其他条件不变的情况下,BA质量浓度为0.1~0.5 mg/L时,随着BA质量浓度的升高,芽的增殖系数由2.5增加到4.0;当

表3 继代培养基的筛选

Table 3 Medium selection for subpassage

编号	培养基	芽增殖 系数	抽茎成 苗率/%	叶色	愈伤组织 褐变	生长状况
4	MS+BA 0.1 mg/L +IBA 0.8 mg/L +NAA 0.2 mg/L	2.5	11.7	绿	2+	生长一般
5	MS+BA 0.2 mg/L +IBA 0.8 mg/L +NAA 0.2 mg/L	3.5	15.8	绿	2+	生长较好
6	MS+BA 0.4 mg/L +IBA 0.8 mg/L +NAA 0.2 mg/L	3.7	12.1	绿	2+	生长较好
7	MS+BA 0.5 mg/L +IBA 0.8 mg/L +NAA 0.2 mg/L	4.0	4.3	绿	2+	生长较好,有芽成茎长高
8	MS+BA 1.0 mg/L +IBA 0.8 mg/L +NAA 0.2 mg/L	3.0	2.1	绿,黄绿	2+	生长一般,叶缘褐色
9	MS+BA 2.0 mg/L +IBA 0.8 mg/L +NAA 0.2 mg/L	2.5	1.3	绿,黄绿	2+	生长一般,叶缘褐色
10	MS+BA 0.1 mg/L +IBA 1 mg/L +NAA 0.2 mg/L	2.0	25.8	绿	2+	生长较好,芽抽茎生长较好
11	MS+BA 0.2 mg/L +IBA 0.8 mg/L	4.0	30.1	绿	2+	生长较好,芽抽茎生长较好
12	1/2MS+BA 0.1 mg/L +IBA 0.8 mg/L	3.5	3.3	绿	2+	生长一般
13	1/2MS+BA 0.2 mg/L +IBA 1.5 mg/L	3.5	10.0	绿	2+	生长较好且生长均匀

BA质量浓度达1 mg/L时,芽的增殖系数反而下降,叶缘褐色,出现生长不适;BA质量浓度为2 mg/L时,芽的增殖系数继续下降到2.5.综合其生长情况,笔者认为BA的质量浓度不宜过高,以0.2~1.0 mg/L为宜.

2.2.2 根的诱导

由表4可见,16号培养基根的诱导率为36.7%,

平均生根2.4条,是参试培养基中的最佳培养基,可用于史密斯桉生根培养.1,14,15号培养基均不能诱导出根,其中在15号即1/4MS中生长最差,有部分芽和愈伤组织死亡;在其他以1/4MS为基本培养基的18~21号培养基中,虽可诱导出少量根,但叶色变黄或黄绿,整体生长不佳,因此史密斯桉不宜采用1/4MS为基本培养基.

表 4 根诱导培养基的筛选
Table 4 Medium selection for root induction

编号	培养基	生根诱导率/%	平均生根数/条	叶色	愈伤组织褐变	生长状况
1	MS	0	0	绿	4+	生长不佳
14	1/2MS	0	0	黄绿	4+	生长不佳
15	1/4MS	0	0	黄或黄绿	5+	生长差,部分芽死亡
16	MS+IBA 2 mg/L	36.7	2.4	绿或黄绿	3+	生长较好,根系较发达,有的根从愈伤组织上长出
17	1/2MS+IBA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L	21.7	2.1	绿或黄绿	3+	生长较好,根系较发达,有的根从愈伤组织上长出
18	1/4MS+NAA 0.5 mg/L	1.7	1.0	黄或黄绿	4+	生长不佳,根长,色黄白
19	1/4MS+IBA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L	10.0	1.8	黄或黄绿	4+	生长不佳,根长,须根不多
20	1/4MS+IBA 1.5 mg/L	16.7	1.1	黄或黄绿	5+	生长差,根长、稀、褐变,有单株高但很多芽死亡
21	1/4MS+IBA 1 mg/L+NAA 0.5 mg/L	17.5	1.2	黄或黄绿	4+	生长不佳,根粗短,色黄

2.3 褐变的控制

2.3.1 培养基添加物对褐变的影响

由表5,表6可知,以不加任何添加物的5号培养基为空白对照,分别加入不同浓度的抗氧化剂

表 5 培养基添加物对褐变影响的方差分析

Table 5 Variance analysis on the effect of the browning prevention with different adsorption and antioxidant

差异源	离差平方和	自由度	方差	F	F _α
组间	7 478.727	8	934.840 80	54.836 52	F _{0.05} (8,18)=2.51
组内	306.860	18	17.047 78		F _{0.01} (8,18)=3.71
总计	7 785.587	26			

表 6 培养基添加物对褐变的影响

Table 6 Effects of different adsorption and antioxidant on browning prevention

培养基添加物	添加物质量浓度/(mg·L ⁻¹)	褐变率/%	与对照相比褐变率的变化率/%
对照	0	38.3c C	0.0
V-C	50	36.7cd C	-1.6
V-C	100	30.0d C	-8.3
活性炭	1 500	36.7cd C	-1.6
活性炭	3 000	41.7cd C	+3.4
PVP	50	28.3d C	-10.0
PVP	500	55.0b B	+16.7
Na ₂ S ₂ O ₃	500	83.3a A	+45.0
Na ₂ S ₂ O ₃	1 000	61.7b B	+23.4

V-C,Na₂S₂O₃和吸附剂活性炭及PVP,发现不同添加物减轻褐变的效果不同,且同种添加物不同质量浓度的效果也不一样.50 mg/L PVP防止褐变的效果最好,100 mg/L V-C次之,两处理均能显著减轻褐变,与对照相比分别减轻褐变10%和8.3%;50 mg/L V-C或1 500,3 000 mg/L活性炭减轻褐变的效果均不明显,而500 mg/L PVP或500,1 000 mg/L Na₂S₂O₃反而显著或极显著加重了褐变.

2.3.2 光照对褐变的影响

选择5号培养基分3组进行培养(表7):第一组在标准光照条件下,即光照度2 000~3 000 lx,每天光照时间14 h;第二组在标准光照条件下,加以自然光为辅助;第三组进行暗培养.与标准光照相比,增加辅助光源光源对愈伤组织的褐变、芽的生长与分化无显著影响,但对叶色有较明显的影响.加以

表 7 光照条件对生长和褐变的影响

Table 7 Effects of different light condition on growth and browning

光照条件	芽增殖系数	抽茎成苗率/%	叶色	愈伤组织褐变
标准光照	3.5	15.8	绿	2+
标准光照+辅助光源	3.5	16.3	黄绿,红绿,绿	2+
暗培养	1.8	3.7	黄绿	1+

辅助光源时,叶色易变红或变淡,叶片也较展开。虽暗培养能有效地降低褐变现象,但也降低了芽的分化与增长,芽变细并且叶色变黄。试验结果表明,暗培养20 d时芽明显黄化,愈伤组织颜色黄白;30 d时芽的增长仅为标准光照的1/2;50 d时部分愈伤组织死亡;但若在40 d时恢复正常的标准光照,愈伤组织和芽均又能恢复转绿。

3 问题与讨论

褐变在植物组织培养过程中普遍存在,能否有效控制褐变是植物组织培养能否成功的关键之一^[3-4]。褐变的发生与外植体组织中所含的酚类化合物多少和多酚氧化酶活性有直接关系。不同种植物,同种植物不同类型、不同品种褐变发生的频率、严重程度都存在很大差别,木本植物以及其他单宁、色素含量高的植物易发生褐变^[5]。据报道,核桃单宁含量高,在进行组织培养时难度很大,不仅接种时发生褐变,而且在形成愈伤组织后的继代中还会因为褐变严重而出现死亡^[6]。史密斯桉是一种多酚类化合物含量高的植物,据报道,其树皮单宁的含量就达21%~26%^[2]。纵观史密斯桉的整个培养过程,褐变一直是令人困扰的问题。为此,笔者认为可从如下方面有效防止褐变:

a.接种时清除消毒剂以降低褐变的发生。外植体的消毒和灭菌应采用消毒后能较容易去除的消毒剂,因为消毒剂对植物细胞有杀伤作用,若不去除就会妨碍外植体的正常生长发育。据报道,低浓度的 HgCl_2 消毒效果好,但难以去除^[7],加重褐变。笔者使用低浓度的 HgCl_2 消毒后,用1%氯化钙浸洗,以置换出残留在外植体上的 Hg^{2+} ,从而在降低污染率的同时有效地减轻了外植体的褐变,达到了理想的消毒效果。

b.在培养基中加入添加物,如抗氧化剂或酚类物质吸附剂等。核桃的组织培养中加入 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ^[6],龙眼的组织培养中加入活性炭^[7],柿树的组织培养中加入PVP^[8]均能有效防止褐变。笔者的研究表明,不同添加物减轻褐变的效果不同,而同种添加物不

同浓度的效果也不一样,加入50 mg/L PVP或100 mg/L V-C能显著减轻褐变,但添加物的种类和浓度若选择不当,反而会显著加重褐变。

c.改变光照度以降低褐变的发生。光照度对褐变有影响是因为在酚类化合物的合成和氧化过程中,一部分酶系统的活性是受光诱导的。本试验结果表明,暗培养虽能有效地控制褐变,但严重影响愈伤组织的生长,特别是芽苗的分化。这与Lee和De Fossord报道橙桉愈伤组织在黑暗中培养都没有器官的再生^[9],以及四季桂黑暗处理过长会影响愈伤组织生长^[10]的情况相似。

今后还可探讨如何通过改变培养基状态、降低无机盐等方法来降低史密斯桉的褐变。

参考文献:

- [1] 曾德贤,刘永平,范林元,等.史密斯桉不同种源的引种试验研究[J].西部林业科学,2004,33(3):1-11.
- [2] 康文玲.史密斯桉栽培技术[J].林业科技,2003,24(6):17-18.
- [3] Debergh P C, Zimmerman R H. Micropropagation [M]. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991: 1-13.
- [4] 孔祥生,张妙霞,杜爱玲,等.甜柿离体快繁技术研究[J].华中农业大学学报,1998,17(2):178-186.
- [5] 高国顺.植物组织培养中的褐变问题[J].植物生理学通讯,1999,35(6):501-505.
- [6] 陈正华.木本植物组织培养及其应用[M].北京:高等教育出版社,1986:24-459.
- [7] 杨增海.园艺植物组织培养[M].北京:农业出版社,1987:48-51.
- [8] 张妙霞,孔祥生,郭秀璞,等.柿树组织培养防止外植体褐变的研究[J].河南农业大学学报,1999,33(1):87-90.
- [9] 谢耀坚.桉树组织培养研究进展[J].世界林业研究,2000,13(6):14-19.
- [10] 彭尽辉,吕长平,周晨.四季桂愈伤组织诱导和继代培养[J].湖南农业大学学报:自然科学版,2003,29(2):131-133.

责任编辑:王赛群

英文编辑:罗文翠