

尾叶桉的组织培养与快速繁殖

刘媛^{1,2}, 黄真池^{1,2}, 曾富华^{1,2*}, 贺炜华^{1,2}, 陈信波¹

(1. 湖南农业大学生物科学与技术学院, 湖南长沙 410128; 2. 湛江师范学院生命科学与技术学院, 广东湛江 524048)

摘要 [目的]为尾叶桉资源开发及其转基因研究奠定基础。[方法]以尾叶桉无菌苗的下胚轴为外植体, 研究不同激素种类及配比对其愈伤组织诱导、芽分化和增殖的影响, 并分析不同浓度 IBA 对其生根的影响。[结果]不同激素组合对愈伤组织的诱导形成均有显著影响, 诱导率为 35.0%~95.0%。诱导尾叶桉愈伤组织形成的最适培养基为 MS+6-BA 0.60 mg/L+2,4-D 0.10 mg/L, 诱导芽分化的最适培养基为 MS+NAA 0.10 mg/L+TDZ 2 μmol/L, 诱导芽增殖的最适培养基为 MS+6-BA 0.40 mg/L+NAA 0.05 mg/L。尾叶桉再生苗的最适生根培养基为 1/4 MS+0.50 mg/L IBA。生根苗在自然环境中炼苗 9 d 后再移栽, 其成活率在 90% 以上。[结论]接种初期暗培养 5 d 再转入光照培养和添加 50.00~100.00 mg/L Vc, 均可有效防止尾叶桉愈伤组织的褐化, 提高诱芽率。

关键词 尾叶桉; 再生; 快速繁殖

中图分类号 Q943.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)06-02243-02

Study on the Tissue Culture and Rapid Propagation of *Eucalyptus urophylla*

LIU Yuan et al (College of Bioscience and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128)

Abstract [Objective] The research aimed to lay the foundation for the resource development of *Eucalyptus urophylla* and its transgenic research. [Method] With hypocotyledonary axis in the aseptic seedling of *E. urophylla* as explants, the effects of different kinds of hormones and their matching on the callus induction, bud differentiation and proliferation were studied and the effects of different concentrations of IBA on its rooting were analyzed. [Result] Different hormone combinations all had significant effects on the callus formation with the induction rate of 35.0%~95.0%. The optimum medium for inducing the callus of *E. urophylla* was MS+6-BA 0.60 mg/L+2,4-D 0.10 mg/L. The optimum medium for inducing the bud differentiation was MS+NAA 0.10 mg/L+TDZ 2.00 μmol/L and the optimum medium for inducing the bud proliferation was MS+6-BA 0.40 mg/L+NAA 0.05 mg/L. The optimum rooting medium for the regenerated plantlets of *E. urophylla* was 1/4 MS+0.50 mg/L IBA. When the rooted seedlings were hardened for 9 d in natural environment before transplanting, its survival rate was more than 90%. [Conclusion] Both dark culture for 5 d before light culture in early inoculation stage and adding 50.00~100.00 mg/L Vc could prevent *E. urophylla* from the callus browning and increase the rate of bud induction.

Key words *Eucalyptus urophylla*; Regeneration; Rapid propagation

桉树(*Eucalyptus* spp.)在我国广泛栽培于广东、广西、福建、云南和海南等省区,是我国南方最重要的短周期工业用材林树种^[1]。尾叶桉属桃金娘科桉属,大乔木,树高可达 50 m,干形通直,树冠较开阔,木材紫红色,坚硬耐腐,广泛用于重型结构和桥梁用材^[2]。但是目前青枯病、焦枯病、灰霉病等 33 种病害已严重危害我国桉树林,尤其以栽培面积最大的尾叶桉和巨尾桉发病最严重^[3]。目前,在用化学方法难以防治的情况下,通过转基因技术培育抗病新品种成为一条有效途径。桉树作为含酚类和多糖丰富的木本植物,其再生系统的建立有相当大的难度,但也有些品种取得了突破,树种已能经器官发生途径再生^[4-6]。目前,国内通过桉树愈伤组织得到再生苗的报道并不多,且诱芽率普遍都不高,建立高效的体外再生体系成为利用转基因技术改良桉树性状亟待解决的问题之一。笔者以尾叶桉的种子为材料,探讨了通过愈伤组织诱导成苗的最适培养条件。

1 材料与方法

1.1 材料 供试材料为国家林业局桉树研究开发中心提供的尾叶桉 U6 无性系种子萌发的下胚轴。

1.2 方法

1.2.1 无菌材料的获得。选择较成熟的种子,50~55℃温水浸泡后自然冷却,4~6 h 后无菌水冲洗 2 次,20% (体积比) NaClO 消毒 15 min,无菌水冲洗 5~6 次,接种于不添加激素的 1/2MS 培养基上。1/2MS 培养基附加 0.7% 的琼脂、3.0% 的蔗糖, pH 值 5.8~5.9。培养温度为 (25±2)℃,光照 12

h/d,光照强度 2 000~2 500 lx。

1.2.2 诱导愈伤组织。当种子发育为长 3.0~5.0 cm,仅含 1 对子叶时,去掉顶芽与根部,将下胚轴切成 0.5~1.0 cm 长的小段,接种于不同浓度梯度的 6-BA 和 2,4-D 的 MS 培养基上,暗培养 5 d 后移至光下培养,2 周后统计愈伤组织诱导情况。MS 培养基均附加 0.7% 的琼脂,3.0% 蔗糖。培养条件同上。

1.2.3 诱导芽的分化。将愈伤长势良好的外植体转入 MS 附加不同浓度梯度的 NAA 和 TDZ 组合中,每个处理接种 50 个外植体,40 d 后统计出芽率(发生芽的外植体占无菌外植体总数的百分率)。培养条件同上。

1.2.4 诱导丛生芽的增殖。将芽丛切割成 2~5 株,置于不同浓度梯度的 6-BA 和 NAA 的 MS 培养基上,附加 0.1% 的活性炭,30 d 后统计月增殖倍数(每个茎段上丛生芽数/每个茎段上原有芽数)。培养条件同上。

1.2.5 生根及移栽。将 2.0~4.0 cm 高的丛生芽切成单株后转入附加不同浓度 IBA 的 1/4MS 培养基中,20 d 后统计生根情况,将生根良好的试管苗移至室外自然环境中炼苗 7 d,揭开封瓶膜再炼苗 2 d,小心取出,移栽到已消毒的黄心土中。

2 结果与分析

2.1 不同激素种类及配比对愈伤组织形成的影响 2 周后外植体细胞分裂启动。结果见表 1,不同激素组合对愈伤组织形成的影响显著,诱导率从 35.0% 到 95.0% 不等,随着 6-BA 浓度的增加,诱导率呈上升趋势,说明 6-BA 有利于尾叶桉愈伤组织的诱导,低浓度的 2,4-D 更有利于愈伤组织的产生,且相对于高浓度的 2,4-D,更有利于芽的分化。研究表明,当 6-BA 浓度为 0.60 mg/L,2,4-D 浓度为 0.10 mg/L 时,愈伤组织呈淡绿色,生命力强,褐化比例低,为最适宜愈伤组织

基金项目 广东省科技攻关项目(2006B20101011);广东省自然科学基金项目(5011730)。

作者简介 刘媛(1984-),女,江西宜春人,硕士研究生,研究方向:植物基因工程。*通讯作者,E-mail: zengfuhua@tom.com。

收稿日期 2007-10-19

形成的培养基。尾叶桉下胚轴诱导出的愈伤组织见图 1。

表 1 不同激素组合启动愈伤组织形成情况

Table 1 The growth status callus tissue under different hormones combination

编号 No.	6-BA mg/L	2,4-D mg/L	接种数 No. of inocu lated	出愈数 No. of ants formed callus	诱导率 % Induction rate	2 周后愈伤组织生长情况 The growth status callus tissue after 2 weeks
A1	0.20	0.10	60	45	75.0	慢,呈白色 Slow and white
A2	0.20	0.20	60	30	50.0	慢,白色 Relatively slow, white
A3	0.20	0.30	60	21	35.0	慢,淡红色 Slow and rosiness
A4	0.40	0.10	60	50	83.3	快,淡红色 Rapid and rosiness
A5	0.40	0.20	60	53	88.3	快,灰白色 Rapid and offwhite
A6	0.40	0.30	60	38	63.3	快,淡绿色 Rapid and pea green
A7	0.60	0.10	60	57	95.0	快,淡绿色 Rapid and pea green
A8	0.60	0.20	60	54	90.0	快,淡红色 Rapid and rosiness
A9	0.60	0.30	60	39	65.0	慢,淡绿色 Slow and pea green

注:以上培养基均添加 100.00 mg/L 的 Vc。
Note: 100.00 mg/L Vc was added into medium for each treatment.



图 1 诱导出的愈伤组织

Fig.1 The induction of callus tissue

表 2 不同激素组合诱导芽分化的情况

Table 2 The growth situation of callus tissue under different hormones combination

编号 No.	NAA mg/L	TDZ μ mol/L	接种数 No. of inoculated	出芽数 No. of buds	诱芽率 % Induction rate	生长状况 Growth status
B1	0.05	2.00	50	22	44	++
B2	0.05	3.00	50	14	28	+
B3	0.05	4.00	50	23	46	++
B4	0.10	2.00	50	21	42	+++
B5	0.10	3.00	50	15	30	++
B6	0.10	4.00	50	13	26	+
B7	0.15	2.00	50	19	38	+
B8	0.15	3.00	50	17	34	+
B9	0.15	4.00	50	3	6	-

注:表中数据是培养 40 d 后统计结果。- 为差, + 为一般, ++ 为较好, +++ 为为好。

Note: Data in table was counted up after cultured for 40d. - means weak, + means common, ++ means preferably, +++ means good.

2.2 不同激素种类及对比对愈伤组织分化成芽的影响 外植体培养 15 d 左右,在愈伤组织表面陆续出现嫩绿的芽点,40 d 左右分化出许多 0.5~1.5 cm 高的绿色小苗。结果见表

2。激素水平对芽的分化有较大的影响,B1、B3、B4 不定芽诱导率较高,达 40% 以上,但是 B4 相对来说芽分化较其他两种快,且每个外植体上大都都有多个芽点,能产生丛生芽,芽壮实,生长旺盛,高 1.0 cm 以上。因此,诱导芽分化最适合的培养基为 MS + NAA 0.10 mg/L + TDZ 2.00 μ mol/L。通过尾叶桉愈伤组织再生的芽见图 2。



图 2 不定芽的诱导

Fig.2 The induction of adventitious buds

2.3 不同激素种类及对比对芽增殖的影响 将芽丛切割成 2~5 株的小丛,置于培养基上进行增殖及生长培养。结果见表 3,芽增殖倍数随 6-BA 浓度增高而增大,而随 NAA 浓度增高而减小。当 6-BA 为 0.60 mg/L 时,芽增殖倍数普遍较高,但芽苗平均高偏低,且产生愈伤组织丛生芽,不利于生根。研究表明,当 6-BA 浓度为 0.40 mg/L、NAA 浓度为 0.05 mg/L 时,增殖倍数达到 4.4,且芽苗均高达 2.7 cm,是最适宜的诱导芽增殖的培养基。愈伤组织再生芽的增殖见图 3。

表 3 不同激素组合诱导芽增殖的情况

Table 3 The buds proliferation situation under different hormones combination

编号 No.	6-BA mg/L	NAA mg/L	接种数 No. of inoculated	增殖倍数 Proliferation multiple	芽平均 高//cm Average height of buds
C1	0.20	0.05	50	4.3	2.1
C2	0.20	0.10	50	3.9	2.3
C3	0.20	0.15	50	3.7	1.9
C4	0.40	0.05	50	4.4	2.7
C5	0.40	0.10	50	4.1	2.5
C6	0.40	0.15	50	3.9	2.5
C7	0.60	0.05	50	4.7	2.0
C8	0.60	0.10	50	4.4	1.7
C9	0.60	0.15	50	4.2	1.6



图 3 丛生芽增殖

Fig.3 Proliferation of cluster buds

- biosynthesis[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2000, 275: 36899 - 36909.
- [12] ATANASSOVA R, FAVET N, MARTZ F, et al. Altered lignin composition in transgenic tobacco expressing O-methyltransferase sequences in sense and anti-sense orientation[J]. The Plant Journal, 1995, 8(4): 465 - 477.
- [13] 刘惠荣, 赵华燕, 魏建华, 等. 抑制 CCoAOMT 表达对烟草木质素生物合成的影响[J]. 中国农业科学, 2002, 35(8): 921 - 924.
- [14] 赵华燕, 魏建华, 张景昱, 等. 抑制 COMT 与 CCoAOMT 调控植物木质素的生物合成[J]. 科学通报, 2002, 47(8): 604 - 607.
- [15] DIANJING GUO, FANG CHEN, INOUE K, et al. Downregulation of Caffeic Acid 3-O-Methyltransferase and caffeoyl CoA 3-O-Methyltransferase in transgenic alfalfa: Impacts on lignin structure and implications for the biosynthesis of G and S lignin[J]. The Plant Cell, 2001, 13: 73 - 88.
- [16] ALLINA S M, PRI-HADASH A, THEILMANN D A, et al. 4-Coumarate: Coenzyme A Ligase in hybrid poplar[J]. Plant Physiol, 1998, 116: 743 - 754.
- [17] KAJITA S, HISHIYAMA S, TOMIMURA Y, et al. Structural characterization of modified lignin in transgenic tobacco plants in which the activity of 4-Coumarate: Coenzyme A Ligase is depressed[J]. Plant Physiol, 1997, 114: 871 - 879.
- [18] 杨雪萍, 陆海, 陈雪梅, 等. 反义 4CL 基因转化烟草调控木质素生物合成[J]. 北京林业大学学报, 2003, 25(3): 1 - 5.
- [19] SANCHEZ J P, ULLMAN C, MOORE M, et al. Regulation of arabidopsis thaliana 4-Coumarate: Coenzyme-A Ligase-1 expression by artificial zinc finger chimeras[J]. Plant Biotechnology Journal, 2006(4): 103 - 114.
- [20] JIA CAIHONG, ZHAO HUAYAN, WANG HONGZHI, et al. Obtaining the transgenic poplars with low lignin content through down-regulation of 4CL[J]. Chinese Science Bulletin, 2004, 49(9): 905 - 909.
- [21] LI LAIGENG, ZHOU YIHUA, CHENG XIAOFEI, et al. Combinatorial modification of multiple lignin traits in trees through multiple cotransformation[J]. PNAS, 2003, 100: 4939 - 4944.
- [22] GOICOECHEA M, LACOMBE E, LEGAY S, et al. EgMYB2, a new transcriptional activator from eucalyptus xylem, regulates secondary cell wall formation and lignin biosynthesis[J]. The Plant Journal, 2005, 43: 553 - 567.
- [23] BAUCHER M, HALPIN C, PETIT-CONIL M, et al. Lignin: Genetic engineering and impact on pulping[J]. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 2003, 38: 305 - 350.
- [24] LASKAR D D, JOURDES M, PATTEN A M, et al. The Arabidopsis Cinnamoyl CoA Reductase *irx4* mutant has a delayed but coherent (normal) program of lignification[J]. The Plant Journal, 2006, 48: 674 - 686.
- [25] HALPIN C, KNIGHT M E, FOXON G A, et al. Manipulation of lignin quality by downregulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase[J]. The Plant Journal, 1994, 6(3): 339 - 350.
- [26] PINCON G, CHABANNES M, LAPIERRE C, et al. Simultaneous down-regulation of Caffeic/5-Hydroxy Ferulic Acid-O-Methyltransferase I and Cinnamoyl-Coenzyme A Reductase in the progeny from a cross between tobacco lines homozygous for each transgene. consequences for plant development and lignin synthesis[J]. Plant Physiology, 2001, 126: 145 - 155.
- [27] ABBOTT J C, BARAKATE A, PINCON G, et al. Simultaneous suppression of multiple genes by single transgenes down-regulation of three unrelated lignin biosynthesis genes in tobacco[J]. Plant Physiology, 2002, 128: 844 - 853.
- [28] LAPIERRE C, POLLET B, PETIT-CONIL M, et al. Structural alterations of lignins in transgenic poplars with depressed cinnamyl alcohol dehydrogenase or caffeic acid o-methyltransferase activity have an opposite impact on the efficiency of industrial kraft pulping[J]. Plant Physiology, 1999, 119: 153 - 163.
- [29] BAUCHER M, CHABBERT B, PILATE G, et al. Red xylem and higher lignin extractability by downregulating a cinnamyl alcohol dehydrogenase in poplar[J]. Plant Physiol, 1996, 112: 1479 - 1490.

(上接第 2244 页)

2.4 不同浓度的 IBA 对生根的影响 将 2.5 cm 左右高的丛生芽切成单株后转入生根培养基, 7 d 后在基部开始膨大, 之后陆续生根, 根由茎直接发出, 无愈伤组织形成。结果见表 4, 前 5 种供试培养基均可诱导尾叶桉再生芽苗和根。低浓度的 IBA 有利于根的生长, 表现出生根较多, 根入培养基深而广, 侧根较多, 根毛发达, 适合移栽。研究表明, 最适宜尾叶桉再生苗生根的培养基是 1/4MS + IBA 0.50 mg/L。

表 4 不同激素组合诱导生根的情况

Table 4 The rooting situation under different hormones combination

编号 No.	IBA mg/L	平均生根数//条 Average number of roots	平均根长 cm Average root length	生根状况 Rooting situation
D1	0.103	3.25	1.5 ~ 2.0	根纤细, 根毛较多 Fine root, relatively more root hair
D2	0.30	7.80	1.4 ~ 2.0	根纤细, 根须多 Fine root, many root beard
D3	0.50	16.80	1.5 ~ 2.0	根纤细, 侧根较多, 根系发达 Fine root, relatively more lateral roots and developed roots.
D4	1.00	9.80	0.5 ~ 1.0	根粗壮, 侧根较少 Strong root, less lateral roots
D5	2.00	3.30	0.3 ~ 0.5	根粗壮, 无侧根 Strong root, without lateral root
D6	3.00	0	-	

酚类化合物含量较高, 接种后, 酚类化合物从伤口处分泌出来与多酚氧化酶反应生成褐色的醌类物质, 醌类物质会使外植体的蛋白质聚合, 生长停滞, 最终导致死亡^[7]。结果表明, 接种初期暗培养 5 d 再转入光照培养以及加入 50.00 ~ 100.00 mg/L Vc, 均能有效防止尾叶桉愈伤组织褐化, 提高诱芽率。

(2) 桉树为多年生木本植物, 其细胞返幼状态较差, 诱导愈伤组织和分化有相当大的难度。目前桉树组织培养研究已有很多报道, 但大多数是直接诱导腋芽或不定根成苗。这在工业上有一定的经济效益, 但是对于桉树转基因的研究就需要通过愈伤组织诱导成苗, 目前这类报道较少^[8]。笔者以种子萌发的无菌苗下胚轴为外植体, 对尾叶桉愈伤组织诱导成苗进行了研究, 分别确立了诱导愈伤组织、芽分化、芽增殖和生根的最适培养基配方, 为尾叶桉资源开发及转基因研究奠定了坚实的基础。

参考文献

- [1] 白嘉雨, 徐建民, 周文民, 等. 桉树[M]. 北京: 经济管理出版社, 1999.
- [2] 祁述雄. 中国桉树[M]. 北京: 中国林业出版社, 2006.
- [3] 孙云霄, 刘建峰. 桉树病虫害的发生现状及防治策略[J]. 中国森林病害, 2004, 23(5): 36 - 38.
- [4] SUBBAIAH MM, MINOCHA SC. Shoot regeneration from stem and leaf callus of eucalyptus tereticornis[J]. Plant Cell Rep, 1990(9): 370 - 373.
- [5] WARRAG E, LESNEY MS, ROCKWOOD DJ. Nodule culture and regeneration of eucalyptus grandis hybrids[J]. Plant Cell Rep, 1991(9): 586 - 589.
- [6] TIBOK A, BLACKHALL NW, POWER JB, et al. Optimized plant regeneration from callus derived from seedling hypocotyls of *Eucalyptus urophylla* [J]. Plant Sci, 1995, 110: 139 - 145.
- [7] 谭文澄, 戴策刚. 观赏植物组织培养技术[M]. 北京: 中国林业出版社, 2001.
- [8] 邱璐, 王波, 王志和. 史密斯桉愈伤组织的诱导及分化[J]. 东北林业大学学报, 2006, 34(4): 18 - 21.

2.5 移栽 生根苗在自然环境中炼苗 9 d 后生长较粗壮, 且根系发育良好, 移栽到土中, 成活率可达 90% 以上。

3 结论与讨论

(1) 褐化是桉树组织培养中很难解决的问题。桉树体内