

桉树组培工厂化育苗中培养基调配技术研究

王志洁

(福建省林业科学研究院, 福建 福州 350012)

摘要:对桉树组培工厂化育苗培养基的调配进行了系统的研究,以尾巨桉 DH32-29 优良无性系组培苗为试验材料,探讨了桉树组培工厂化育苗生产中影响的关键因素,结果表明:琼脂成分、激素浓度和种类、大量元素含量对组培苗生长有显著影响。继代培养阶段,培养基中添加琼脂条时变异苗率低且平稳,增殖阶段,培养基中激素 6-BA 和 NAA 的浓度分别在 $0.25 \sim 0.30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.10 \sim 0.15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内时增殖效率最好。壮苗阶段,培养基中激素 6-BA 和 NAA 的浓度分别在 $0.25 \sim 0.27 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.10 \sim 0.15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内时有效出苗率最佳。生根培养阶段,培养基中添加浓度为 40% 的大量元素,其生根率达 95%,且不影响后续生长,生根激素在继代培养 3 代以后可降低为 ABT $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 NAA 为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

关键词:桉树;工厂化育苗;培养基调配技术

中图分类号: S792.390.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-7351(2006)03-0085-03

Adjustment Technique of Culture Medium in Industrialization of Seedling production of Eucalyptus

WANG Zhi-jie

(Fujian Academy of Forestry, Fuzhou 350012, China)

Abstract: Take the tissue culture seedlings of *Eucalyptus urophylla* $\times$ *E. grandis* DH32-29 clone as experiment material, adjustment technique of culture medium and key factors were studied in industrialization of seedling production of eucalyptus in the paper. The result showed that, the composition of agar, the concentration and kinds of hormone, and the contents of macro-element had distinct influence on the growth of tissue culture seedlings. At the subculture phase, the rate of variation seedlings was very low and stable when agar bars was added in the culture medium; at the proliferative phase, the highest proliferative efficiency was gained when 6-BA ($0.25 \sim 0.30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) and NAA ($0.10 \sim 0.15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) was added in the culture medium; at the strength seedling phase, the highest tissue culture seedling yield was produced as added 6-BA ($0.25 \sim 0.27 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) and NAA ($0.10 \sim 0.15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) to the culture medium; And at the rhizogenic phases, the rate of rhizogenesis reached to 95% when adding macro-element with concentration of 40%, and that had no any influence to the future growth. After third generation of subculture, the concentration of ABT and NAA could be decreased to $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ respectively for best rhizogenesis.

Key words: Eucalyptus; Industrialization of seedling production; Adjustment Technique of Culture Medium

桉树是世界上三大速生树种之一,也是我国南方热带、亚热带地区最为重要的速生丰产林造林树种。目前基于对种苗的大量需求,桉树组培工厂化育苗开展得较为普遍。但是,桉树组培工厂化育苗具有一定的年周期性,培养基调配是十分重要的环节之一,在生产实践中,若不根据具体问题对培养基进行及时调整,将会影响继代增殖、有效芽苗率、生根率及后续生长,进而导致成本大幅增加,影响全年生产。本研究通过对尾巨桉 DH32-29 不同生长阶段的组培培养基系统的调控研究,探讨相关因素对桉树组培苗生长状况的影响,以期对桉树组培工厂化育苗生产有一定的指导和借鉴作用。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以福建省林业科学研究院组培室中的尾巨桉 DH32-29 优良单株离体芽器官诱导培养扩繁而来的组培继代苗为试验材料。

1.2 试验方法

1.2.1 基本培养基中添加不同琼脂对继代苗生长的影响 将经相同继代培养的继代苗接入添加 $6.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$

收稿日期: 2006-06-15; **修回日期:** 2006-07-10

基金项目: 福建省林业厅种苗重大攻关项目“桉树良种选育与扩繁技术应用研究”的部分内容

作者简介: 王志洁(1970-),女,新疆乌鲁木齐人,福建省林业科学研究院工程师,从事林木组织培养研究工作。

琼脂条和 $3.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂粉的培养基中,各接种 50 瓶,连续接种 3 代,每次继代接种均剔除变异苗,每隔 30 d 统计 1 次变异苗率。

1.2.2 基本培养基中附加不同浓度激素组合对继代苗生长的影响 基本培养基内附加不同浓度激素组合的 6-BA 和 NAA,每一处理 50 瓶,3 次重复,30 d 统计生长状况。

1.2.3 大量元素浓度对桉树生根率和后续生长的影响 基本培养基中的大量元素浓度按 50%、40%、25%、10% 设置,每一处理 50 瓶,3 次重复,15 d 统计生根率,30 d、40 d、50 d 分别观察 1 次生长状况。

1.2.4 ABT、NAA 对生根及组培苗生长的影响 经基本壮苗培养基 $6\text{-BA}_{0.27} + \text{NAA}_{0.15}$ 三代培养后,在大量元素浓度为 40% 的基础上附加生长素浓度均为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ABT 和 NAA,每处理 50 瓶,3 次重复,15 d 统计生根率、根长、苗高,取平均值。

2 结果与分析

2.1 琼脂类型对继代苗生长的影响

在基本培养基相同的情况下变异苗率随添加琼脂类型的不同而不同。如表 1 所示,添加琼脂条后,不同代数的变异苗率很稳定,从第 1 代到第 3 代分别为 3.3%、2.7% 和 4.0%;而添加琼脂粉后,随着培养代数的增加,变异苗率急剧增加,到第 3 代时高达 35.1%,是第 1 代(4.0%)的 8.8 倍。另外,添加琼脂条和琼脂粉后,经 1 代培养的变异苗率差异不明显,仅为 0.7%,而经 2 代培养后,添加琼脂粉的变异苗率达 11.5%,是添加琼脂条的 4.3 倍,到第 3 代时,添加琼脂粉的变异苗率高达 35.1%,是添加琼脂条的 8.8 倍。从瓶苗的表现看,在添加琼脂粉的培养基中变异苗表现为茎呈压扁状不规则形状,叶片有缺失现象,而在琼脂条中变异苗率很低,大部分苗木表现正常。

表 1 基本培养基中添加琼脂经三代培养的变异苗率

琼脂类型	不同代数的变异苗率/%		
	第 1 代	第 2 代	第 3 代
琼脂条	3.3	2.7	4.0
琼脂粉	4.0	11.5	35.1

2.2 继代培养阶段基本培养基中激素浓度组合的选择与调配

在继代增殖培养过程中选择合适的激素浓度组合是获得理想继代苗的关键。在继代增殖过程中,6-BA 浓度从 $0.25 \sim 0.30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, NAA $0.10 \sim 0.15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 均可,但继代苗生长有所不同。由表 2 可知,试验中观察到 6-BA 浓度超过 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,玻璃苗数量明显增多。在生产过程中,6-BA 浓度采用 $0.27 \sim 0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 可以较快获得理想的增殖继代苗,最好不要超过 3.0,否则玻璃苗数量会明显增多。在继代壮苗阶段可采用 $6\text{-BA}_{0.25} \sim 0.27 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, NAA $0.15 \sim 0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。但在壮苗阶段,1.5 cm 以上的有效苗率有所不同,可以观察到 6-BA 在浓度分别为 $0.27 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,有效苗率差别不大,但继代增殖情况差别明显。在壮苗生根过程中,因为我们采取的方法是边生根边继代,所以在这一阶段的培养基激素浓度调配要十分细致,既要达到有效苗数量比较多,又要有一定的增殖苗可以再次继代,通过实验对比,我们认为 6-BA 浓度以 $0.27 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, NAA 浓度以 $0.15 \sim 0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的配比最好,在生产实践中可以根据具体情况做出相应的调整。

表 2 基本培养基中附加不同浓度激素对继代苗生长的影响

激素浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	芽增殖系数	平均芽高 /cm	有效芽苗率 /%	玻璃化及生长状况
$6\text{-BA}_{0.35} + \text{NAA}_{0.15}$	5.6	1.2	0	大部分玻璃化、叶片不展开
$6\text{-BA}_{0.3} + \text{NAA}_{0.15}$	5.2	1.3	38	部分玻璃化、叶片小、茎较矮
$6\text{-BA}_{0.3} + \text{NAA}_{0.10}$	4.8	1.1	0	大部分玻璃化、叶片不展开
$6\text{-BA}_{0.27} + \text{NAA}_{0.15}$	3.3	2.3	95	无玻璃化、叶片开展、茎较高
$6\text{-BA}_{0.27} + \text{NAA}_{0.10}$	4.1	1.8	93	极少玻璃化、叶片开展、茎中等
$6\text{-BA}_{0.25} + \text{NAA}_{0.15}$	2.2	2.7	98	无玻璃化、分裂少、叶片开展、茎高
$6\text{-BA}_{0.25} + \text{NAA}_{0.10}$	2.8	2.2	98	无玻璃化、叶片开展、茎较高

2.3 生根培养阶段大量元素浓度的选择

在经附加相同种类和浓度的细胞分裂素和生长素的壮苗生长后,生根培养基附加同一种类和浓度的生长素,随着大量元素浓度的降低,组培苗生根率升高,但生根后的后续生长情况有所不同。如表3所示,大量元素浓度为50%的培养基,生根率达90%,接种50 d时仍可保持正常生长,叶片开展且叶色浓绿;大量元素浓度降低到40%时,生根率提高为95%,接种50 d时苗木能正常生长,叶色浓绿,只有极少苗木的叶片可见稍变黄;当大量元素的浓度低于25%时,尽管苗木生根率很高,均在98%以上,但后续生长不佳。对于大量元素浓度为25%的培养基,接种30 d时苗木叶尖部分开始黄化,40 d时叶片大部分枯黄,50 d时苗木枯萎;当浓度降低到10%时,接种30 d时叶片大部分黄化,40 d时苗木已经枯萎。

表3 大量元素浓度对桉树生根率和后续生长的影响

大量元素浓度 /%	生根率 /%	生长状况		
		30 d	40 d	50 d
50	90	叶片开展、浓绿	叶片开展、浓绿	叶片开展、浓绿
40	95	叶片开展、浓绿	叶片开展、浓绿	叶片开展、叶片浓绿,可见极少部分叶尖稍变黄
25	98	叶尖部分黄化	叶片大部分黄化	枯萎
10	99	叶片大部分黄化	枯萎	枯萎

2.4 生根培养阶段激素种类和浓度的调配

壮苗阶段以6-BA 0.27 mg·L⁻¹和NAA 0.15 mg·L⁻¹的配比来得到生根瓶苗,经三代继代培养后,瓶苗生根率明显降低,后调整用ABT 0.5 mg·L⁻¹和NAA 0.5 mg·L⁻¹均可获得较理想的生根率,分别达到94%和96%,根长和苗高生长不同,15 d根长分别为0.8 cm和0.5 cm,苗高分别为1.8 cm和1.5 cm。

表4 基本培养基附加不同浓度和种类激素对生根的影响

激素种类及浓度 /mg·L ⁻¹	生根率 /%	15 d 根长 /cm	15 d 苗高 /cm
ABT 0.50	94	0.8	1.8
NAA 0.50	96	0.5	1.5

* :基本培养基为6-BA_{0.27} + NAA_{0.15}。

3 结论和讨论

在桉树组培工厂化育苗中培养基的调配是一个有机系统,各环节相互联系。为降低育苗成本,在琼脂的选择上生产中常选用琼脂粉,但经多代继代培养后变异苗率会明显增多,可能跟琼脂粉当中所含重金属或其它微量元素有关。在生产中可以选择在继代培养基中添加琼脂条,在生根培养基中添加琼脂粉。

继代培养激素浓度调配可较为粗放,但为了获得较好的继代增殖效率,6-BA浓度在0.30~0.25 mg·L⁻¹,NAA浓度在0.15~0.10 mg·L⁻¹范围内为最好。壮苗阶段的培养基调配兼顾有效苗率和继代增殖两个方面,6-BA浓度为0.27 mg·L⁻¹,NAA浓度在0.15~0.10 mg·L⁻¹范围为最适。

大量元素含量对生根有明显影响,考虑生根率、生长状况及后续生长等综合情况,在生产中可以采用含量为40%、25%的大量元素配比。需要注意的是它们各自的后续生长有所不同,大量元素含量为40%的情况下生根苗可放置较长时间,长达50 d左右,而大量元素含量为25%的情况下生根苗可放置30 d左右,需尽快移栽。大量元素含量为10%的配比不宜采用。

在生根培养过程中,激素浓度对生根影响较大,并且壮苗阶段所采用的激素浓度会对生根有所影响,经3代以后要调整生根激素浓度,否则生根率会较大降低,可选用ABT 0.5 mg·L⁻¹、NAA 0.5 mg·L⁻¹。桉树生产过程中培养基的调配对于组培瓶苗生长具有滞后性,所以要透过组培瓶苗的生长状况,认识到培养基调配中出现的种种问题,予以及时正确调整。

参考文献:

[1] 谭文澄. 观赏植物组织培养技术[M]. 北京:中国林业出版社,1991.

(下转第100页)

度和 Taq 酶量等方面去优化扩增体系。引物的退火温度不但受其 T_m 值的影响,而且与所选用的 PCR 仪的型号也有一定关系,本研究通过优化发现,所选的 19 条引物在 Eppendorf Mastercycler gradient PCR 仪上扩增的最佳退火温度一般都高于 T_m 值的 2~6℃ 不等,平均高于其 T_m 值 3℃。这一结论与在茶叶中有报道的引物适宜退火温度比其 T_m 值平均高 4.5℃^[3] 的结论基本吻合。

通过大量试验,本研究确定的最优 ISSR-PCR 的扩增体系为:20 μ l 体系中含,1 $\times$ Buffer; Mg^{2+} 2.0 mmol·L⁻¹; dNTPs 200 μ mol·L⁻¹; 模板 DNA 50 ng; 引物 200 nmol·L⁻¹; Taq DNA 聚合酶 0.5 U。

在 PCR 反应中, Mg^{2+} 浓度非常重要。 Mg^{2+} 为 Taq 酶的激活剂,它的浓度可以影响到酶的活性、PCR 合成的忠实性、引物与模板的结合效率、扩增产物的特异性、引物二聚体的形成、退火温度、模板 DNA 和 PCR 产物双链的变性温度等很多方面。 Mg^{2+} 浓度过低,酶的活性降低;过高不但会产生非特异性扩增,而且也会抑制酶的活性。在 PCR 反应中的模板、引物、dNTPs 均可与 Mg^{2+} 结合,降低反应体系中的游离 Mg^{2+} 的浓度,因此,一般的 Mg^{2+} 用量为 1.5~2.0 mmol·L⁻¹。本研究共设 5 个 Mg^{2+} 浓度梯度,最终确定的 Mg^{2+} 浓度为 2.0 mmol·L⁻¹。dNTPs 作为 PCR 反应的原料,其浓度直接影响产物的产量、特异性、合成的忠实性。根据前人的研究,dNTPs 的使用浓度一般为 20~200 μ mol·L⁻¹。dNTPs 浓度过高不但会导致酶错误的掺入,还会与酶竞争 Mg^{2+} ,抑制酶活性。本试验根据所选的 5 个梯度,最终确定 dNTPs 的浓度为 200 μ mol·L⁻¹。模板的质量和浓度也是影响 PCR 扩增的主要因素。模板浓度过低,扩增不出;浓度过高,由于纯度有限,因此一些影响 PCR 扩增的物质浓度加大,同样会影响扩增的效果,本试验从所设的 10 个模板浓度来看,50 ng 的模板浓度是最佳的扩增浓度,这一结果和前人的研究基本吻合。引物浓度也是 PCR 扩增成败的关键,前人的引物用量一般在 200~500 nmol·L⁻¹ 之间,本人通过试验发现 200 nmol·L⁻¹ 的引物浓度是樟树 ISSR-PCR 的适宜引物浓度。酶也是 PCR 扩增的主要因素,酶用量偏低会使新链合成效率下降,导致扩增产物减少,扩增谱带太弱,难于辨认带型。本试验通过研究发现,对于宝生物 TaKaRa Taq 酶,0.5 U 的酶量就可以满足 ISSR-PCR 的要求,这与厂家推荐的用量一致。

参考文献:

- [1] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) - anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomics, 1994, 20: 176 - 183.
- [2] 姚明哲,王新超,陈亮,等. 茶叶 ISSR-PCR 反应体系的建立[J]. 茶叶科学, 2004, 24(3): 172 - 176.
- [3] 冯富娟,王凤友,刘彤. 红松 ISSR-PCR 实验系统影响因素[J]. 植物学通报, 2004, 21(3): 326 - 331.
- [4] 姜静,杨传平,刘桂丰,等. 桦树 ISSR PCR 反应体系的优化[J]. 生态学杂志, 2003, 22(3): 91 - 93.
- [5] 邹喻萍,葛颂,王晓东. 系统进化植物学中的分子标记[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 16 - 17.
- [6] Ammiraju JSS, Dholakia BB, Santra DK, et al. Identification of inter simple sequence repeat (ISSR) markers associated with seed size in wheat[J]. Theor Appl Genet, 2001, 102: 726 - 732.
- [7] Luisa MC, Luis G, Cristina O. ISSR analysis of cultivars of pear and suitability of molecular markers for clone discrimination[J]. J Amer Soc Hort Sci, 2001, 126(5): 517 - 522.
- [8] Fang DQ, Roose ML. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers[J]. Theor Appl Genet, 1997, 95: 408 - 417.

(上接第 87 页)

- [2] 张建成,吴国良,屈红征,等. 培养基及培养条件对核桃试管芽苗继代增殖的影响[J]. 山西农业大学学报, 2005, (1): 45 - 48.
- [3] 饶江利,蒋利媛,陈灵,等. 湖南耐寒赤松工厂化育苗组培快繁技术研究[J]. 湖南林业科技, 2002, (2): 4 - 7.
- [4] 欧阳磊. 桉树组培快繁中存在的问题与对策[J]. 福建林业科技, 2006, 33(3): 203 - 206.
- [5] 翁秋媛. 四个桉树无性系组培生根培养适宜生长调节剂水平的筛选试验[J]. 福建林业科技, 2006, 33(2): 148 - 151.