

作者简介:文章编号:1007-6743(2006)02-0071-04

桉树组织培养与再生系统建立研究

王笑春,李峰,蒋湘宁

(北京林业大学生物科学与技术学院,北京 100083)

摘要:本实验通过组织培养手段,以MS、1/2MS、White为基本培养基,利用6-BA、IBA、NAA等生长调节物质进行不同浓度及比例的组合,对以桉树叶片为材料进行愈伤诱导及植株再生的组培再生系统进行了初步尝试,同时对桉树的外植体灭菌、增殖和生根进行了研究。获得了桉树增殖、生根诱导的适宜配培养基和培养条件,初步建立了通过愈伤组织诱导芽器官发生的再生系统。研究发现,以桉树叶片为材料,在1/2MS+6-BA0.5mg/L+IBA1.0mg/L或NAA0.5mg/L培养基上进行愈伤组织诱导,愈伤率在90%以上;以1/2MS+6-BA1.0mg/L+NAA0.1mg/L培养基对形成的愈伤组织进行芽分化培养时,愈伤组织可发生不定芽。

关键词:桉树;组织培养;再生系统**中图分类号:**Q94**文献标识码:**A

桉树(*Eucalyptus*),桃金娘科(*Myrtle family*)桉属,原产澳大利亚的高大乔木。桉树以其生长快、适应性强、用途广而被世界上百余个国家和地区广泛引种栽培,是目前世界上最重要的木纸浆原材料之一。桉树引种我国已有一百多年的历史,是我国南方地区最主要的造林树种,正以每年营造8~10万公顷的速度发展,在我国造纸的木浆生产中都有着极其重要的位置。建立桉树组织培养与再生系统,既可为商品化大规模育苗做准备,又有助于建立转基因系统,为利用转基因手段改良桉树形状奠定良好的基础。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

本实验所采用桉树无菌组培苗及盆栽苗由中国林业科学院提供。

1.2 实验方法

1)外植体的取材与灭菌。选用桉树盆栽苗木上的半木质化萌发茎段做外植体。材料用自来水冲洗15min,之后用0.5%洗衣粉溶液浸泡15min,再用自来水冲洗干净。70%乙醇灭菌时间设置10sec、20sec、30sec、40sec共4个梯度,0.5%的次氯

酸钠灭菌时间设置1min、2min、4min、6min、8min共5个梯度,两次灭菌之间及灭菌之后均用无菌水清洗三次^[1]。灭菌后的材料切成1~2cm长的茎段,每段带1个节接种到基本培养基为MS附加BA0.5mg/L和IBA0.25mg/L的培养基上诱导不定芽的萌发,至于光强3000lx,温度为25℃的条件下进行培养。

2)桉树组织培养体系的建立。参考文献[5]选用MS为桉树增殖培养的基本培养基,附加6-BA0.5mg/L和IBA0mg/L、0.25mg/L、0.5mg/L进行正交试验。选取带一个腋芽的茎段接种到培养基上,置于光照强度2500lx,温度25℃的条件下进行增殖培养。在测试不同培养基及激素水平对生根诱导的影响试验中,将经过继代培养的茎粗大于1mm的无菌苗剪成数段,每段高于1.5cm,接种于1/2MS或改良White附加IBA0.5mg/L、1.0mg/L或NAA0.5mg/L的培养基上,培养条件同上。

3)桉树再生体系的建立。参考文献[3]选择生长健壮的桉树组培苗的叶片,剪成5mm×5mm的大小,接种于1/2MS附加6-BA0.2~1.0mg/L和IBA0.2~1.0mg/L或NAA0.1~0.5mg/L的培养基上诱导愈伤组织,温度25℃,暗培养。

愈伤组织分化出芽诱导试验分两步进行。第一步,从愈伤组织诱导实验结果中选用结构、大小较为一致,生长情况良好的愈伤组织块转到1/2MS

收稿日期:2006-02-27

作者简介:王笑春(1981-),男,河北宁晋人,硕士研究生。从事植物生物技术的研 究。

附加 6-BA 0.5~1.0mg/L 和 NAA 0.01~0.08mg/L 的培养基上诱导芽的分化,置于光照强度 3 000lx, 温度 25℃ 的条件下进行培养。第二步,在以上实验结果的基础上,测试在 6-BA/NAA = 10 的水平下,不同激素浓度对愈伤组织出芽的影响。将发育良好的愈伤组织接种到 1/2MS 附加 6-BA 0.4~1.2 mg/L 和 NAA 0.04~0.12 mg/L (6-BA/NAA = 10) 的培养基上诱导芽的分化,培养条件同上。

将生长健壮的桉树组培苗的叶片剪成数片,分别接在附加 Km 0~100mg/L 的愈伤组织诱导培养基 1/2MS + 6-BA 0.5mg/L + NAA 0.5mg/L 上进行培养,观察生长情况。

2 结果与分析

表 1 酒精与次氯酸钠对外植体活力的影响

灭菌时间 (sec)	污染率(%) / 成活率(%)					
	0.5% 次氯酸钠 (min)					
	1	2	4	6	8	
10	100/0	85/5	70/10.5	56/12	41/5	
70% 乙醇	20	100/0	75/17	42/41	31/57	22/33
30	100/0	70/22	37/56	25/63	14/47	
40	100/0	50/20	25/35	17/23	0/10	

2.1 外植体的取材与灭菌

试验结果(表 1)表明,当灭菌时间为乙醇 20~30s,次氯酸钠 4~6min 时,外植体的污染率降低到 35% 左右,同时成活率达到 55% 以上,灭菌后的外植体生长良好。实验结果同时还表明,延长乙醇灭菌时间可以有效降低外植体的污染率,但过长的灭菌时间会对外植体起到明显的伤害作用,使外植体出现严重褐化,导致其死亡。延长次氯酸钠的灭菌时间也可以明显降低污染率,但过长时间的灭菌会导致黄花及白花现象,降低外植体的成活率。试验中还发现,使用次氯酸钠灭菌时,将一次较长时间灭菌过程分成两次较短时间灭菌过程(中间使用无菌水清洗三次),对黄花、白化现象有一定抑制作用,灭菌效果不变。

2.2 桉树组织培养体系的建立

在桉树增殖培养实验中,在只附加 6-BA 的 MS 培养基上,组培苗只有腋芽的伸长,没有丛生芽的分化。附加 IBA 后,丛生芽分化明显增加。当 IBA 浓度为 0.25mg/L 时,增值率最高。因此,桉树增殖培养较为合适的培养基为 MS + 6-BA

0.5mg/L + IBA 0.25mg/L。

表 2 不用培养基对桉树苗生根的影响

培养基	接种茎 段数	生根茎 段数	生根率
1/2MS + NAA0.5	25	20	80%
1/2MS + IBA0.5	25	25	100%
1/2MS + IBA1.0	25	17	68%
改良 White + NAA0.5	25	21	84%
改良 White + IBA0.5	25	25	100%
改良 White + IBA1.0	25	19	76%

在生根诱导培养实验中,将茎段接种到生根培养基上,经过 8~10d 后可见部分材料开始生根,2 周后大部份材料开始生根。由生根结果(见表 2)表明,使用 0.5mg/L 的 IBA 与 1/2MS 和 White 培养基配合时,对桉树苗的生根诱导均可达到 100%,较使用相同浓度的 NAA 时效果更佳。改良 White 培养基的生根苗发枝少,茎段和顶端的叶片稍红,主根、须根发达,全部从茎段上长出,适合移栽。1/2MS 培养基的生根苗发枝较多,全部为绿色,根系主要从愈伤组织上长出,移栽时容易脱落,成活率低。因此,诱导桉树苗生根的最佳培养基为改良 White + IBA 0.5mg/L。

2.3 桉树再生体系的建立

表 3 不同激素水平对桉树愈伤组织诱导的影响

激素水平 (mg/L)	愈伤组织诱导率(%)				
	6-BA (mg/L)				
	2.0	1.0	0.5	0.2	
IBA	1.0	52	65	95	79
	0.5	43	61	74	65
	0.2	39	53	56	56
NAA	0.5	61	64	98	76
	0.5	50	62	78	63
	0.1	47	51	52	55

1) 叶片愈伤组织诱导培养结果。试验结果如表 3 所示,可以看到,在试验激素浓度范围内,愈伤组织诱导率与生长素(NAA 或 IBA)浓度呈同方向变化。在相同生长素浓度水平下,6-BA 浓度为 0.5mg/L 时,愈伤诱导率最高,浓度过高或过低都影响愈伤组织的发生。分裂素 6-BA 与生长素 NAA 或 IBA 组合并在试验浓度范围内时,大部分叶片均能诱导出愈伤组织。但产生的愈伤组织在颜色、质地、活力上有很大差异。当分裂素与生长素的浓度比相对较大时,诱导出的愈伤组织体积较小,质地紧密,褐化现象严重,活力较低。当浓

度比减小时,愈伤组织体积明显增大,呈肿瘤状膨大,颜色呈粉红、黄白、黄绿等,活力旺盛,适合作为出芽分化培养的材料。较合适的组合有 1/2MS + 6 - BA 0.5mg/L + IBA 1.0mg/L 或 1/2MS + 6 - BA 0.5mg/L + NAA 0.5mg/L。

2)愈伤组织分化出芽培养结果。第一步试验结果如表 4,可以看到,当分裂素与生长素的浓度比大于 20 时,愈伤组织褐化情况很严重,这可能是由于过高的激素浓度比导致愈伤组织中萘醌类物质大量产生,抑制了芽器官的发生,导致愈伤组织褐化死亡。当激素浓度比为 10 左右时,褐化情况明显改善,且部分愈伤组织诱导出芽。

基于以上试验结果,在 6 - BA/NAA = 10 的基础上,设计一组激素浓度梯度进行对比试验,结果如表 5 所示。当培养基为 1/2MS + 6 - BA 1.0mg/L + NAA 0.1mg/L 时,愈伤组织分化出芽率最高,达到 25% 左右。通过愈伤组织诱导分化出芽的再生途径,愈伤材料的挑选时很关键的一步。试验观察表明:质地致密,表面光滑,晶莹鲜嫩,光泽明显,淡绿色或浅黄色或粉色且颗粒状结构的愈伤组织获得胚状体发生的频率较高,再生芽也多,其中在生芽中一部分由胚状体发生芽器官,另一部分则是胚性细胞愈伤组织分化形成不定芽。这些分生型组织,细胞活力旺盛,分化能力强。

3)桉树对 Km 敏感性试验。经过 4 周的培养,叶片愈伤组织的形成既出现明显差异。当附加 Km

达到 30mg/L 时,叶片愈伤形成就受到抑制,当 Km 达到 60mg/L 时,叶片受到 Km 的影响而白化死亡。当 Km 达到 50mg/L 时,叶片仍可部分保持绿色,很少形成愈伤。因此,Km 选择压应为 60mg/L。通过 Km 对桉树的影响的试验,研究桉树抗 Km 的临界浓度,主要用于转基因桉树的筛选。转化成功的植株有抗 Km 基因的表达,能够在 Km 较大的浓度下生长,而未转化的植株则受到 Km 的抑制而死亡。

3 结束语

本实验以目前所掌握的桉树组培技术为基础,进行了建立桉树再生系统的初步探索,获得了一定的成果,但总体上植株的再生率还不够高。国外在桉树再生系统研究中除使用 MS 培养基外,还大量采用了 WPM、G22、GBA 等培养基,生长调节剂部分使用了 TDZ、激动素、玉米素等^[6-9]。下一步在进行侵染的同时,将尝试利用不同的培养基和生长调节剂,进一步提高再生率。

在愈伤组织诱导和芽分化培养时,过高的温度和过长的培养时间也会造成一定的褐化现象。所以,培养时要严格控制组培室的温度,培养时间不宜超过四周。如出现褐化,应及时将褐化部分切除,并更换新的培养基,减小毒害作用,提高成活率。

表 4 不同激素水平对愈伤组织分化出芽的影响

6 - BA(mg/L)	NAA(mg/L)	6 - BA/NAA	出芽率 (%)	备 注
1.0	0.01	100	0	无出芽,愈伤膨大,褐化严重
1.0	0.03	33.3	0	无出芽,愈伤膨大,褐化严重
1.0	0.05	20	5.6	个别愈伤出芽,生长缓慢,由黄化现象,其他仍褐化
1.0	0.08	12.5	12.5	部分愈伤组织出芽,生长正常,其他愈伤褐化情况减弱
0.5	0.01	50	0	无出芽,愈伤膨大,褐化严重
0.5	0.03	16.7	9.2	个别愈伤出芽,生长较慢,颜色偏黄
0.5	0.05	10	15.7	部分愈伤组织出芽 1-2 棵,生长良好
0.5	0.08	6.25	7.9	个别愈伤出芽,生长缓慢,其他愈伤膨大,褐化得到控制

表 5 相同 6 - BA/NAA 激素水平对愈伤组织分化出芽的影响

6 - BA(mg/L)	NAA(mg/L)	6 - BA/NAA	出芽率 (%)	备 注
1.2	0.12	10	19.4	出芽较多,生长细高
1.0	0.1	10	25.5	部分愈伤有出芽,生长情况差异较大
0.8	0.08	10	15.3	出芽矮小
0.6	0.06	10	17.3	出芽较多,生长较低矮
0.4	0.04	10	10.4	出芽矮小,愈伤有褐化

参考文献:

- [1] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程(第二版)[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [2] 宋永芳. 我国桉树资源的利用与展望[J]. 林业化工通讯, 1998, (4): 12 - 15.
- [3] 谢耀坚. 桉树组织培养研究进展[J]. 世界林业研究, 2000, (12): 14 - 19.
- [4] 沈孝善, 黄萍. 当今转基因再生植物和转基因技术研究进展[M]. 贵州农业科学, 1999, 27(6): 49 - 61.
- [5] MBONGA J M, DRURZAN D C. 树木组织培养[M]. 北京: 中国林业出版社, 1998.
- [6] IAIN E, DAVID A. Regeneration of plants from leaf explants of micropropagated clonal [J]. *Eucalyptus grandis*. Plant Cell Reports, 1994, (13): 473 - 476.
- [7] MULLINS K V, LLEWELLYN D J. Regeneration and transformation of *Eucalyptus camaldulensis* [J]. Plant Cell Reports, 1997, (16): 787 - 791.
- [8] MURALIDHARAN E M, MASCARENHAS A F. In vitro plantlet formation by organogenesis in *Eucalyptus citrildora* [J]. Plant Cell Reports, 1987, 6: 256 - 259.
- [9] SUBBALAH M M, MINOCHA S C. Shoot regeneration from stem and leaf callus of *Eucalyptus tereticornis* [J]. Plant Cell Reports, 1990, (9): 370 - 373.

The establishment of tissue culture regeneration system of *Eucalyptus*

WANG Xiao-chun, LI Feng, JIANG Xiang-ning

(School of Biological Science and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: In this study, different protocols for *Eucalyptus* micropropagation system and regeneration system were obtained. Shoots were stimulated from *Eucalyptus* explants on MS medium with 6 - BA0.5mg/L and IBA0.25mg/L. Nearly 100% of rooting ratio were obtained on modified White medium plus IBA0.5mg/L. Leaf explants cultured on half strength MS medium with 6 - BA0.5mg/L plus IBA1.0mg/L or NAA 0.5mg/L for 4 weeks can induced callus tissue effectively, and adventitious buds can be induced from these callus tissue on half strength MS medium with 6 - BA1.0mg/L and NAA0.1mg/L. The transplanted *Eucalyptus* can be selected on medium plus Km 0.6mg/L.

Key words: *Eucalyptus*; tissue culture; regeneration system

(责任编辑 刘存英)