

邓恩桉组培中影响继代增殖条件的研究

马英 刘友全 欧阳磊

(中南林学院生命科学与技术学院)

摘要:探讨抗寒树种邓恩桉组培快繁中影响其继代培养的因素。实验表明,继代培养以改良 MS 为基本培养基,随继代次数的增加逐渐减少细胞分裂素 BA 和生长素 NAA 的浓度。最初几次继代,BA 的浓度为 0.5 mg/L,NAA 的浓度为 0.2 mg/L。然后 BA 的浓度逐渐降低到 0.1~0.3 mg/L,NAA 的浓度逐渐降至 0.05~0.1 mg/L,继代 5~6 次后,BA 的浓度保持在 0.1~0.3 mg/L,NAA 的浓度保持在 0.05~0.1 mg/L。继代周期随季节而不同,夏季为 15~25 d,春秋为 20~35 d,冬季为 40~50 d,芽的月增殖系数为 3~5 倍,满足工厂化育苗的要求。组培苗的玻璃化和遗传变异等异常现象很少,节间长度适中,有利于生根。

关键词:邓恩桉;组培;继代培养;增殖系数

A Study on Factors Affecting Clump Shoot Induction in Tissue Culture of *Eucalyptue Dunnii* // MA Ying, LIU You-quan, OU Yang-lei

Abstract: The factors that affect clump shoots induction in tissue culture of *Eucalyptue dunnii* were discussed in this paper. The appropriate basic medium for subculture of *E. dunnii* was the amended MS, and the concentration of hormone BA and NAA should be reduced with the increment of subculture generation. The suitable concentrations of BA and NAA were 0.5 mg/L and 0.2 mg/L respectively at the initial stage of subculture, then gradually reduced from 0.1 to 0.3 mg/L and from 0.05 to 0.1 mg/L respectively during the followed several generations, and kept on 0.3 mg/L and 0.1 mg/L respectively after 5~6 generations. The subculture period varied with seasons, 15~25d in Summer, 20~35d in Spring and Autumn, and 40~50d in winter. The monthly multiplication coefficient of shoots varied from 3 to 6 times which could meet the demands of factory production. The vitrification of plantlet was rarely exhibited in this experiment. These plantlets could be easily transplanted because of the optimal bud burls length.

Key words: *Eucalyptue dunnii*; Tissue culture; Subculture; Multiplication coefficient.

Author's address: Division of Life Science and Technology, Central South Forestry College, 410004, Changsha, China

邓恩桉在澳洲原产地为窄域分布种,仅限于新南威尔士东北,昆士兰洲东南角,南纬 28°04'~30°09',东经 152°20'~152°54' 的有限区域内,在当地是生长最快的树种之一,高达 50 m 以上。在中南美洲商业化种植表明是最抗寒的树种之一,在南非的种植也显示,邓恩桉的耐霜冻耐旱能力均优于巨桉,在津巴布韦旱季长达 6 个月,5 a 生邓恩桉高 21 m,平均胸径 18 cm^[1]。邓恩桉在我国广西、湖南、福建、云南、贵州等地引种都较成功,显示了速生和抗寒的优良特性,桂林 11 a 生邓恩桉平均高 19.53 m,平均胸径 20.09 cm^[2],湖南株洲 10 a 生邓恩桉平均高 15.6 m,平均胸径 19.5 cm。同年定植的邓恩桉优株高 27 m,胸径 40.6 cm,并承受了 -7.9℃ 低温的考验^[3]。邓恩桉木

材密度、纤维含量和纤维长度均适合制浆,也适合作实木利用的大径材培养,在我国南方速生丰产林基地建设中,是很有潜力值得重点开发利用的树种之一。

由于邓恩桉在澳洲自然分布有限,产种量不多,种子价格昂贵,很难买到,而目前国内还不能生产邓恩桉种子,因此如何利用无性繁殖的方法来加快邓恩桉种苗生产,对扩大邓恩桉栽培利用很有意义^[4]。几年来笔者利用芽苗、1 a 生苗、根萌苗、当年生枝条茎段进行组培,采用了 MS、1/2MS、B5 等培养基,进行诱导、继代、生根培养等方面研究取得了突破性进展,基本解决了邓恩桉无性系繁殖生根难的问题,现就组培中继代培养条件的研究结果作一报道。

1 材料与方法

1.1 实验材料

采用本实验室邓恩桉诱导培养出的有效芽进行继代培养。

1.2 继代培养基的选择和优化

将诱导的有效芽分别接入 MS、1/2MS、改良 MS、

收稿日期:2005-11-15

基金项目:湖南省自然科学基金“耐寒桉树的分子分类及鉴定”(编号:00JJY2003)资助。

第一作者简介:马英(1981-),女,硕士生,从事生物工程及生物信息学研究。通讯作者:刘友全(1946-),男,教授,博士生导师。

各接入了30个新芽茎段,连续培养3代。统计各实验的新芽个数、芽均高,筛选出最合适的继代增殖培养基。将MS培养基中的大量元素 NH_4NO_3 、 KNO_3 、 CaCl_2 、 MgSO_4 、 KH_2PO_4 各设计2个水平1.0倍和0.5倍,进行2水平、7因子的正交试验 $L_8(2^7)$,通过分析找出最大影响因子,经调整为改良的MS培养基。

1.3 继代培养激素的选择和配比

以改良MS为基本培养基。固定细胞分裂素BA 0.5 mg/L,生长素NAA设置0.01 mg/L、0.05 mg/L、0.2 mg/L、0.5 mg/L 4个处理,各接种30个新芽茎段,继代培养3代后,统计各试验的新芽个数、芽均高,分析生长素对芽继代增殖的作用。固定生长素NAA 0.1 mg/L,细胞分裂素设置0.1 mg/L、0.3 mg/L、0.5 mg/L、1.0 mg/L 4个处理,各接种30个新芽茎段,继代培养3代后,统计各试验的新芽个数、芽均高,分析细胞分裂素对芽继代增殖的作用。

1.4 继代培养条件的研究

将在相同培养基接种的新芽段置于不同光照强度下继代培养,统计自然光照、半遮荫、遮荫下各处理的芽均高、芽节间长度、是否有玻璃化的现象发生和对生根的影响。

在春、夏、秋、冬不同季节里分别统计继代转培的时间间隔,分析不同温度季节对芽生长的影响,找出最适合的转培时间。

2 结果与分析

2.1 不同培养基对继代增殖的影响

诱导培养中不适合芽生长的B5、White、N6和改良H培养基在继代培养中也不适合继代增殖,接种于其中的继代苗芽茎段很容易萎蔫死亡。表1是对改良MS(对MS培养基中的大量元素进行了调整)、MS和1/2MS(大量元素减半的MS培养基)进行试验得出的结果。从表1可以看出,3种培养基都比较适

合邓恩桉芽茎段的继代增殖,MS培养基在芽生长和增殖上优于1/2MS培养基,但与改良MS培养基相比较,无论在芽生长还是在继代增殖上都不及改良MS培养基。

表1 不同培养基对继代增殖的影响

| 培养基 | 改良 MS | MS | 1/2 MS |
|-------------|-------|------|--------|
| 接种时芽个数 | 10 | 10 | 10 |
| 接种时芽均高/cm | 1 | 1 | 1 |
| 继代3次后芽个数 | 287 | 248 | 235 |
| 继代3次后芽均高/cm | 2.63 | 2.48 | 2.31 |
| 芽增值指数 | 3.59 | 3.30 | 2.94 |

通过正交试验和单因子试验对MS培养基中大量元素调整得出更适合继代苗木生长的改良MS如表2。从表2改良MS和MS培养基的大量元素的比较可以看出:

(1)降低铵态氮的含量和提高钾的含量能改善芽的生长,培养基中铵态氮的含量太高对培养物有一定的毒害和抑制作用,但培养基中不能缺乏铵盐,否则培养基的pH值会向碱性方向漂移,硝酸盐中加入少量的铵盐则会阻止这种漂移:钾是主要的阳离子,对细胞的新陈代谢有重要的作用,在许多植物的组培中的用量有逐渐提高的趋势。

(2)磷是植物的必需元素之一,参与植物生命活动中核酸和蛋白质的合成、光合作用、呼吸作用以及能量的贮存、转化与释放等重要生理生化过程,在组培中适当提高磷的含量有利于培养物的生长。

(3)钙离子在细胞膜的运输中起着重要作用,并在信号传递过程中起第二信使的作用,对植物的新陈代谢和许多生理生化过程起着重要作用,增加钙离子的含量有利于继代丛生苗的生长。

(4)减少氯离子有利于继代丛生苗的生长,氯离子过量对组织和细胞有不利的影响,如抑制组织的分化和细胞的新陈代谢以及植物的生理生化过程。

表2 改良MS和MS大量元素的比较

| 培养基 | 硝态 N | 铵态 N | 全 N | P | K | Ca | Mg | Cl | 合计 |
|-------|--------|--------|--------|-------|--------|--------|-------|--------|---------|
| MS | 288.75 | 551.90 | 840.65 | 38.96 | 783.57 | 119.52 | 36.49 | 211.48 | 2030.40 |
| 改良 MS | 438.35 | 192.50 | 630.85 | 47.80 | 968.43 | 173.45 | 36.49 | 96.23 | 1953.22 |

2.2 生长素浓度对继代增殖的影响

从表3可以看出,生长素NAA对芽的继代增殖倍数影响很少,对芽的生长有一定的影响。随着NAA浓度的升高,继代丛生苗的平均高有所增加,NAA的浓度超过一定的浓度后继代丛生苗的均高开始呈下降趋势,整个曲线呈正态分布。NAA在0.01~0.10的范围都比较适合继代丛生苗的生长,随继

代次数的不同而有所变动。

2.3 细胞分裂素浓度对继代增殖的影响

从表4可以看出:随着BA浓度的增加继代苗的月增殖系数明显增大,芽均高在加少量BA时有所增加,然后随着BA浓度的继续增加而逐渐减少。当BA的浓度在0.5 mg/L以上时芽的生长明显减慢,月增殖倍数显著增加,继代苗中的玻璃化苗现象增多,

应用研究

甚至造成无性系的异常现象增多。BA 的浓度在 0.1 ~ 0.5 mg/L 时比较适合继代丛生苗的生长, 继代增值倍数满足工厂化育苗的要求, 苗的玻璃化和遗传变异现象少。随着继代次数的增多必需适当减少 BA 的浓度, 因为 BA 随着继代次数的增多在继代苗中逐渐积累, 若每代培养基中加入 BA 的浓度不变, 也会导致继代苗中的玻璃化和遗传变异现象增多。但培养基中不能缺少细胞分裂素, 缺少细胞分裂素的培养基中的继代苗生长缓慢, 很快就萎蔫死亡。

表 3 生长素(NAA)浓度对继代增值的影响

| NAA /mg·L ⁻¹ | 继代 3 次 后芽个数 | 月增值 倍数 | 继代 3 次后 芽均高/cm |
|-------------------------|----------------|-----------|-------------------|
| 0.00 | 274 | 3.42 | 2.03 |
| 0.01 | 283 | 3.54 | 2.21 |
| 0.05 | 278 | 3.48 | 2.34 |
| 0.20 | 277 | 3.46 | 2.37 |
| 0.50 | 281 | 3.51 | 2.26 |

注: BA 浓度均为 0.5mg/L, 样本数为 10 个, 接种时芽均高 1.5 cm。

表 4 细胞分裂素(BA)浓度对继代增值的影响

| BA /mg·L ⁻¹ | 继代 3 次 后芽个数 | 月增值 倍数 | 继代 3 次后 芽均高/cm |
|------------------------|----------------|-----------|-------------------|
| 0.01 | 213 | 2.66 | 2.51 |
| 0.1 | 267 | 3.34 | 2.67 |
| 0.3 | 293 | 3.66 | 2.46 |
| 0.5 | 324 | 4.05 | 2.13 |
| 1.0 | 383 | 4.79 | 1.68 |

注: NAA 浓度为 0.1 mg/L, 样本数 10 个, 接种时芽均高 1.5 cm。

2.4 继代培养条件的研究

在不同的季节, 温度和湿度有很大差异, 继代丛生苗的生长速度和节间长度有很大不同。由表 5 可以看出: 在夏季, 由于气温较高、湿度较大, 继代丛生苗的生长速度很快, 丛生苗的玻璃化现象较其他季节多, 由于节间长度很大以及丛生苗由于生长快而比较幼嫩, 生根比较困难。在春秋两季, 气温和湿度都比较适合植物的生长, 继代苗的生长速度一般, 继代的时间间隔为 30 d 左右, 继代苗的玻璃化现象很少, 生长速度适中, 节间长度接近正常水平, 继代苗的生根比较容易。在冬季, 气温很低, 不适合继代丛生苗的生长, 继代苗生长速度很慢, 节间很短, 不利于生根。所以春秋两季是生产组培苗的最好季节。

光照对绿色植物的生长有着非常重要的作用, 绿色植物以光合作用制造有机物, 满足植物生长和新陈代谢的需要。由表 6 可以看出: 在较强的自然光条件下, 继代苗生长较快, 叶片浓绿、伸展, 继代苗中几乎没有玻璃化现象。随着光线的减弱, 继代苗的生长速度减慢, 叶片卷缩、肥厚, 逐渐出现玻璃化现象。当把

出现玻璃化现象的苗移到光线较强的自然光下继代培养一、二代后, 玻璃化的继代苗可恢复为正常的继代苗, 但苗的生根率降低很多, 所以较强自然光是继代丛生苗生长的必需条件。

表 5 不同季节对继代增值的影响

| 季节 | 继代时 间/d | 继代苗节间 平均长度/mm | 玻璃化 现象 | 继代苗 生根 |
|----|------------|------------------|-----------|-----------|
| 春季 | 25~35 | 3.1 | 很少 | 容易 |
| 夏季 | 15~21 | 6.3 | 较多 | 较难 |
| 秋季 | 20~30 | 4.6 | 较少 | 较易 |
| 冬季 | 40~60 | 2.3 | 最少 | 较难 |

表 6 光照对继代增值的影响

| 光照 强弱 | 接种时芽 均高/cm | 30 d 后芽 均高/cm | 继代苗的特点 |
|----------|---------------|------------------|------------------------------|
| 较强自然光 | 2.0 | 3.6 | 生长速度较快, 叶片浓绿、伸展继代苗中几乎没有玻璃化现象 |
| 中等自然光 | 2.0 | 2.7 | 生长速度一般, 叶片较绿、伸展, 继代苗的玻璃化现象很少 |
| 较弱自然光 | 2.0 | 2.1 | 生长速度较慢, 继代苗的玻璃化现象较多 |

3 结论

继代培养基为改良的 MS + BA(0.1 ~ 0.3 mg/L) + NAA(0.05 ~ 0.1 mg/L), 继代培养的时间为夏季 15 ~ 25 d, 春秋两季为 20 ~ 35 d, 冬季为 40 ~ 50 d。较强自然光是继代丛生苗生长的必需条件而春秋两季继代苗生根容易, 是生产组培苗的最好季节。

参考文献

- [1] 罗建中. 耐寒桉树良种——邓恩桉[J]. 桉树科技, 2002, (2): 1-7.
- [2] 张建明. 广西桂林耐寒桉树引种试验[J]. 桉树科技, 1996, 48(1): 44-50.
- [3] Liu Youquan, Li Zhihui, Ou yanglei. Potential of Eucalyptus dunnii at the Northern Limit of Eucalypt Introduction in China[J]. ACIAR PROCEEDINGS 2003, 4. (111): 245-246.
- [4] 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.

(通讯地址: 410004, 长沙市韶山南路 498 号)

