

邓恩桉组培生根影响因子的研究

欧阳磊

(福建省林业科学研究院, 福建福州 350012)

摘要: 对耐寒桉树邓恩桉的组培生根问题进行了系统的研究。以7个邓恩桉优良无性系组培苗为试验材料, 研究了ABT、IBA、NAA, 活性炭, 生物素, 基本培养基(大量元素, 微量元素, 有机物), 蔗糖, 温度, 光照及继代次数等对组培苗生根的影响, 结果表明, 不同无性系的生根率差异非常显著, 其中激素种类和浓度、基本培养基种类及其大量元素的含量、蔗糖浓度和继代次数对生根有显著性的影响; 光照对生根有一定的影响; 活性炭和生物素对生根基本没有作用。组培苗的生根采用两步生根法, 在培养基S + IBA $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 蔗糖2% 暗培养9 d后转接到不含激素的培养基上进行光照培养, 其中24、25号无性系的生根率达到80%以上, 试验取得了较大的突破, 基本解决了邓恩桉组培苗难生根的问题。

关键词: 邓恩桉; 组织培养; 生根

中图分类号: S792.390.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-389X(2006)01-0078-05

Studies on effects of different factors on *Eucalyptus dunnii* in vitro culture

OU YANG Lei

(Fujian Academy of Forestry, Fuzhou 350012, China)

Abstract: In this paper, the effects of different factors on *Eucalyptus dunnii* in vitro culture, a cold-resisting species, were systematically studied. The experiment materials were collected from clump shoots of 7 excellent clones of *E. dunnii*, and the factors included numbers of subculture, IAA, IBA, NAA, AC, VH, basic media, the ingredients of basic media (macroelement, microelement and organic compound), saccharose, temperature and illumination. The effects were as follows: the difference of rooting rate was very distinct among 7 clones, effects of numbers of subculture, IAA, IBA, NAA, basic media, the ingredients of basic media (macroelement, microelement and organic compound) and that of illumination on rooting were distinct; that of illumination was relatively distinct; that of VC and VH were little. Two-step rooting method was adopted, the efficient seedlings were cultured for 9 d without illumination in rooting media with IBA $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ first, and then cultured in rooting media without IBA in natural light. And solving the hard problem of rooting in breeding *E. dunnii* via vitro culture. The experiment was valued by extending the utilization of *E. dunnii* through asexual propagation.

Key words: *Eucalyptus dunnii*; tissue culture; rooting

随着木材天然资源的日益减少和地球生态环境的恶化, 以及全世界人们对环境生态保护意识的加强, 天然林的利用被限制, 许多国家和地区都转向利用人工速生丰产林来满足人们对木材资源的需求。在中国, 近年来也加大了天然林的保护力度, 正在大面积发展人工林, 寻找适应不同地区气候的新的树种和种源以满足市场的需求, 桉树已成为中国南方首选树种^[1]。因为缺乏优良的耐寒树种, 广东北部和福建等地的桉树常常受到冬季低温的威胁, 更限制了在其它地区种植桉树。因此, 要发挥桉树的速生优势、有效扩大桉树的发展规模, 选择耐寒树种是当务之急^[2]。在中国已经较为广泛推广的桉树中, 尾叶桉及其杂交种非常速生, 但耐寒能力差, 只能在南部地区发展; 蓝桉、亮果桉、多枝桉、谷溪桉等树种都较耐低温, 但或表现差或适宜的生长条件苛刻, 很难大规模发展^[3]。经过较长时间的研究和测定, 最近筛选出一个较优秀的耐寒树种——邓恩桉(*Eucalyptus dunnii*), 但种子少、无性繁殖困难^[4]。如果能突

基金项目: 福建省林业厅种苗重大攻关项目(2003-06)。

作者简介: 欧阳磊(1978-), 男, 湖南郴州人, 助理工程师, 从事林木遗传育种研究。

收稿日期: 2005-06-16; 修回日期: 2005-09-27。

破无性繁殖这一关,特别是解决邓恩桉的组培苗生根问题,对扩大桉树的栽植范围和为中南地区提供桉树优良种苗有重要意义。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

以离体芽器官诱导培养的7个邓恩桉速生优良单株组培苗为试验材料,这7个优良单株选自湖南省资兴市林业局营建的5年生邓恩桉试验林,种子从澳大利亚引进,种源号为0621。

1.2 试验方法

1.2.1 基本培养基的选择和优化 将壮苗后的新芽茎段接入添加 IBA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的大量元素减半的 MS、B5、White、N6 和改良 H 培养基中,蔗糖浓度均为 2%,共 5 个处理,每处理接种 40 个新芽茎段,试验重复 3 次。统计生根时间和生根率,筛选基本培养基。对筛选出来的培养基中的大量元素、维生素、有机物及蔗糖进行 4 因素 3 水平的正交试验 $L_9(3^4)$,大量元素、微量元素、有机物各设置 3 个水平:0.25、0.5、1.0 倍,蔗糖设置 3 水平为 10、20、30 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,共 9 个处理,每处理接种 40 个新芽茎段,试验重复 3 次。30 d 后统计生根率、平均根条数和平均根长,取平均值,进行直观分析和正交方差分析^[5]。

1.2.2 IBA、ABT 和 NAA 对生根的影响 以优化的生根培养基为基础,分别添加 IBA 0.1、0.5、1、3、5, ABT 0.1、0.5、1、3、5, NAA 0.1、0.5、1、3、5,共 15 个处理,每处理接种 40 个新芽茎段,试验重复 3 次。30 d 后统计生根率、平均根条数和平均根长,取平均值,进行单因子分析。

1.2.3 两步生根对生根的影响 以优化的生根培养基为基础,分别添加 IBA 1、2、3、4、5 或 ABT 1、2、3、4、5,暗培养 7-10 d 后转入无激素的培养基中进行光照培养,共 10 个处理,每处理接种 40 个新芽茎段,试验重复 3 次。30 d 后统计生根率、平均根条数和平均根长,取平均值,进行单因子分析^[6]。

1.2.4 不同无性系对生根的影响 在两步生根的基础上,对 3、10、13、15、24、25 和 40 号无性系进行试验,分别接入相同的培养基中,共 7 个处理,每处理接种 50 个新芽茎段,试验重复 3 次。30 d 后统计生根率、平均根条数和平均根长,取平均值,进行单因子分析。

2 结果与分析

2.1 基本培养基对生根的影响

不同培养基对邓恩桉组培苗的生根影响见表 1,从表 1 可以得出:各处理的生根率都很低,在 5 种基本培养基中,MS、B5 和改良 H 中的茎段基部产生了愈伤组织,少数愈伤组织上长出不定根。White 和 N6 培养基中的组培苗基部变黑,大部分苗萎凋死亡,基部没有愈伤组织产生,也没有根形成。比较而言 MS 培养基的生根率最高,比较适合作为邓恩桉的生根培养,但是生根率还很低,根从愈伤组织中长出,需要作进一步调整。

表 1 不同培养基对生根的影响

Table 1 Effects of different media on rooting culture

培养基	接种数	生根率/%	根系特征
1/2MS + 蔗糖 2% + IBA 1.0	40	15	茎段基部有大量愈伤组织,少数根从愈伤组中长出
1/2B5 + 蔗糖 2% + IBA 1.0	40	5	少数茎段基部有愈伤组织和根,有些茎段基部变黑
1/2 改良 H + 蔗糖 2% + IBA 1.0	40	2.5	少数茎段基部有愈伤组织和根,很多茎段基部变黑
1/2White + 蔗糖 2% + IBA 1.0	40	0	茎段基部变黑,芽萎凋死亡,没有愈伤组织。
1/2N6 + 蔗糖 2% + IBA 1.0	40	0	茎段基部变黑,芽萎凋死亡,没有愈伤组织。

2.2 大量元素、有机物及蔗糖对生根的影响

由于 MS 培养基比较适合邓恩桉组培苗的生根,对 MS 培养基中的大量元素、有机物和蔗糖进行了 3 因素 3 水平的正交试验,组培苗在接种 10 d 后,基部膨大,出现愈伤组织,15 d 后不定根从愈伤组织

长出。在试验设计的9个处理中,各处理的生根率、平均根数和平均根长均有较大的差别,根据各处理对邓恩桉组培苗生根影响的综合指标得出表2。为了能直观判断所研究的3种因素对生根的影响程度的相对大小,分别计算出各列水平之和结果相差的最大值—极差,得到各因素的主次顺序(R值)。从直观上看各因素对试验结果的影响程度: C > A > B。参照表2的结果, A₂B₁C₂ 为最佳培养基配方,即基本培养基 MS 中大量元素 0.5 倍、有机物 0.25 倍、蔗糖 2%。对生根影响因子进行方差分析得出表3,从表3可知:大量元素和蔗糖对生根的影响达到显著水平(P=0.1),说明大量元素和蔗糖对邓恩桉组培苗的生根有重要作用。在所试验的3水平中,大量元素 0.5 倍时较好;大量元素 1 倍时抑制了根系的形成和生长,导致了愈伤组织的增多;大量元素 0.25 倍时,可能造成营养缺乏,组培苗生长不良,有萎焉甚至死亡现象发生。蔗糖含量为 2% 时生根率最高,根数较多且长度适中。蔗糖作为植物生长发育所需的碳源和能源,可维持一定渗透压,对植物的生理产生一定的影响,对邓恩桉组培苗生根的影响也较大。

表2 大量元素、有机物和蔗糖对生根的影响

Table 2 Effects of macroelement, organic compound and saccharose in MS media on rooting culture

处理	大量元素 A	有机物 B	蔗糖 C/g·L ⁻¹	生根率/%	平均根数/条	平均根长/cm	综合指标
1	0.25	0.25	10	0.070	2.6	0.8	3.47
2	0.25	0.5	20	0.150	4.7	2.3	7.15
3	0.25	1	30	0.127	2.1	2.1	4.33
4	0.5	0.25	20	0.197	4.8	4.2	9.20
5	0.5	0.5	30	0.143	2.9	2.5	5.54
6	0.5	1	10	0.107	2.0	1.6	3.71
7	1	0.25	30	0.093	2.3	2.1	4.49
8	1	0.5	10	0.057	2.7	0.6	2.76
9	1	1	20	0.117	4.5	0.9	5.52
K ₁	4.983	5.720	3.313				46.17
K ₂	6.150	5.150	7.290				
K ₃	4.257	4.520	4.787				
R	1.893	1.200	3.977				

根据基本培养基中3因素(大量元素、有机物和蔗糖)对生根率、平均根条数和平均根长的影响进行极差和方差分析,所得的结果与根据综合因素分析所得的结果基本一致。影响生根率因素的主次顺序为蔗糖、大量元素和有机物,蔗糖和大量元素对生根率的影响达到显著水平,从对生

根率影响的角度考虑,大量元素 0.5 倍、有机物 0.25 倍、蔗糖 2% 为最佳理论配方;影响平均根条数因素的主次顺序为有机物、蔗糖和大量元素,有机物对平均根条数的影响达到显著水平,从对平均根条数影响的角度考虑,大量元素 0.5 倍、有机物 0.25 倍、蔗糖 1% 为最佳理论配方;影响平均根长因素的主次顺序为大量元素、蔗糖、有机物,大量元素和蔗糖对平均根长的影响达到显著水平,从对平均根长的角度考虑,大量元素 0.5 倍、蔗糖 2%、有机物 0.25 倍为最佳理论配方。由此可见,大量元素浓度降低后,组培苗的生根率提高,愈伤组织减少。蔗糖浓度在 2% 时比较好,有机成分对生根的影响不很明显。在各处理中,根系基本还是从愈伤组织中长出的,不是直接从组培苗的基部长出的,仍需对培养基中大量元素进行调整。

2.3 培养基中大量元素配比的优化

通过正交试验对 MS 培养基的大量元素进行了调整,得出比较适合生根的基本培养基(用 S 表示),有效的减少了愈伤组织的形成,提高了组培苗的生根率。其结果如表 4。主要是调整了硝态 N 和铵态 N 的比例,减少了 CaCl₂ 而补充了 Ca(NO₃)₂, 降低了 Cl 的含量,提高了 Ca 的含量,此外,还降低了 K 的含量,提高了 P、Mg 的含量。

表3 正交方差分析

Table 3 Orthogonal variance analysis

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
大量元素	5.474	2	10.588	9.000	*
有机物	2.162	2	4.182	9.000	
蔗糖	24.251	2	46.907	9.000	*
误差	0.52	2			

表 4 生根 MS 和 S 比较

Table 4 The comparison of macronutrient accumulation in different media

培养基	硝态氮/g	铵态氮/g	总氮/g	磷/g	钾/g	钙/g	镁/g	氯/g	总含量/g
MS	288.75	551.90	840.65	38.96	783.57	119.52	36.49	211.48	2 030.40
S	148.65	0	148.65	124.67	435.24	178.63	58.31	102.26	1 047.76

2.4 生根培养激素的选择和调配

植物的生根多数都是用生长素单独实现的, 对大多数植物来说, IBA 具有较好的促进生根的作用^[7]. 用幼年状态的材料在低浓度生长素的培养基中进行一步生根时, 生根效果明显优于含高浓度生长素的培养基; 当尝试用不含生长素的培养基一步生根时, 观察到幼年状态的材料仍有一定的生根效果. 这说明生长素完成诱导后, 它们在培养基中存在对新根发生有抑制作用^[8]. 通过单因子试验研究得出 IBA、ABT 和 NAA 对邓恩桉组培苗生根的影响如图 1.

从图 1 可知: 在添加不同浓度 IBA、ABT 和 NAA 的生根培养基中, 生根率都是随着激素浓度的升高而升高, 激素浓度为 $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 生根率达到最大值, 当激素浓度继续升高时, 生根率开始下降. 从根部形成的愈伤组织多少来看, 添加的激素浓度越高, 基部形成的愈伤组织越多. 所以, 含高浓度激素的培养基生根效果不好, 既抑制根系的形成且刺激基部产生大量愈伤组织. 从 3 种激素对组培苗生根的作用效果来看, 添加 IBA 的生根培养基优于添加 ABT 和 NAA 的生根培养基, 生根率高且形成的愈伤组织相对较少, 生根率达到 80% 以上.

2.5 两步生根法的研究

由于一步生根造成大量愈伤组织的产生, 根系从愈伤组织长出, 根与茎连接不紧密, 从根吸收的营养物质不能很好的运输到茎叶等组织中, 组培苗的移栽成活率低. 为有效抑制苗基部愈伤组织的形成, 提高生根率和平均根条数, 木本植物的生根培养一般采用两步生根法: 即先在富含生长素的培养基上进行根的诱导, 然后转到无任何生长调节物质的培养基上进行根的伸长生长.

通过两步生根法对邓恩桉继代苗进行生根试验, 先将组培苗接种在含有 IBA 分别为 1、2、3、4 和 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基上, 培养 7-10 d 后转入不含 IBA 的培养基中; 以一步生根作为对照结果如图 2. 从图 2 可以看出: 一步生根时茎段基部产生很多愈伤组织, 根系从愈伤组织长出, 生根率较低; 进行两步生根时, 抑制了愈伤组织的形成, 根系直接从茎段基部长出, 生根率提高. 在两步生根中, IBA 的浓度为 $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时生根效果最好、生根率最高, 有效生根率达 80% 以上.

2.6 无性系对生根的影响

在两步生根和暗培养的基础上, 对 3、10、13、15、24、25 和 40 号无性系进行试验, 共 7 个处理, 得出图 3. 从图 3 可以看出: 各无性系之间的生根率差别较大, 24、25 号无性系的生根率达到 80% 以上, 而 15 和 42 号无性系的生根率不到 30%, 3 号和 10 号无性系的生根率为 65% 左右.

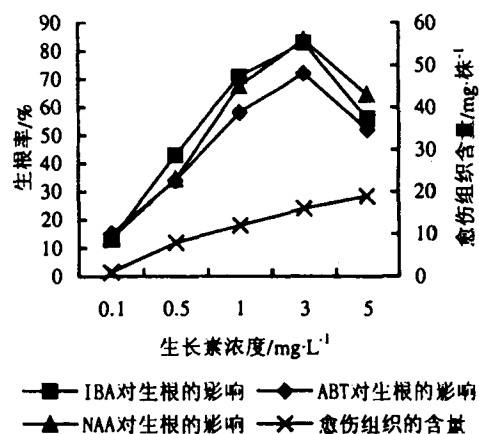


图 1 生长素对生根的影响

Figure 1 Effects of IBA, ABT, NAA on rooting

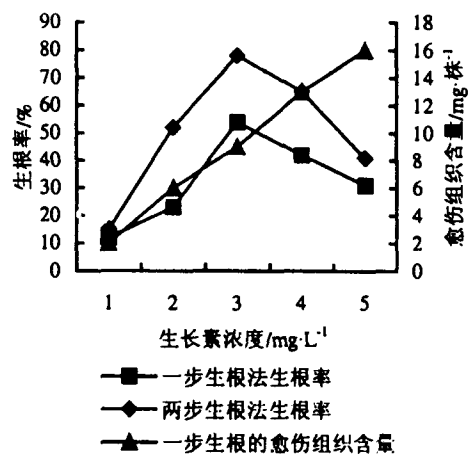


图 2 两步生根法对生根的影响

Figure 2 Effects of two-step rooting method on rooting

3 结论与讨论

不同无性系之间的生根率差别非常大. 有的无性系如 24、25 号生根率达 80% 以上, 而无性系如 15、40 号生根率非常低, 分别为 22% 和 16%, 说明材料本身的基因型是影响生根的最主要因素. 不同种源、家系、个体之间由于本身基因型的不同, 所要求的培养基和培养条件有一定的差异^[9].

基本培养基、培养基各成分的含量和蔗糖浓度对生根有较大影响. MS 比较适合邓恩桉的组培生根, MS 培养基中, 大量元素对生根的影响达到显著水平, 有机物对生根影响较小, 未达到显著水平. 蔗糖作为植物生长发育所需的碳源和能源, 同时也可维持一定的渗透压, 对植物的生理会产生较大的影响, 蔗糖浓度为 2% 时, 比较适合邓恩桉组培苗的生根.

激素的种类和含量对生根的影响很大. 添加 IBA 的生根培养基优于添加 ABT 和 NAA 的生根培养基, 生根率高且形成的愈伤组织相少. 采用两步生根法(培养基 S + IBA $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 蔗糖 2% 暗培养 9 d 后转接到不含激素的培养基上进行光照培养)可以明显减少愈伤组织的形成和提高生根率.

继代次数、活性炭及生物素对生根影响进行试验, 所得结果表明: 继代次数不同组培苗的生根率不同, 继代次数对生根有显著性影响, 生物素对生根没有显著影响; 活性炭对生根有负面影响, 在添加活性炭的生根培养基中, 茎段基部产生愈伤组织较少, 苗长势不旺, 有萎焉现象发生.

外界环境对生根也有一定的影响. 光照对生根的影响较大, 组培苗接种后先在弱光或黑暗条件下培养 7-10 d, 然后转移到光照条件下进行, 可以减少基部愈伤组织的形成, 有效提高组培苗的生根率. 温度对生根的影响较小, 主要在生根的所需时间方面, 夏季温度较高时, 生根时间较短, 冬季温度低, 生根时间较长^[10].

邓恩桉组培与其它桉树相比有其自身的特殊性. 1) 生根难. 需要对大量元素、有机物作出较大的调整, 而其它桉树组培苗生根一般采用没有经过改良的 1/2MS 或 1/4MS 培养基; 2) 对激素特别敏感. 即使加入低浓度单一生长素邓恩桉的组培苗基部也会产生愈伤组织, 必须采用两步生根的方法, 去掉培养基里的生长素后, 才能使组培苗直接从基部产生根系, 其它桉树大多加入 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA、IBA 或 ABT 就可以直接产生根系; 3) 继代增殖培养必须添加一定浓度的细胞分裂素. 其它桉树一般可以通过去掉细胞分裂素和生长素或在原来的培养基上添加活性炭进行壮苗培养, 以提高生根率. 邓恩桉的继代增殖不能去掉细胞分裂素或添加活性炭进行壮苗培养, 只能在继代培养过程中适当降低细胞分裂素和生长素的浓度以提高组培苗的生根率.

参 考 文 献:

- [1] 王明麻. 林木遗传育种学[M]. 中国林业出版社, 2001.
- [2] 罗建中. 耐寒桉树良种——邓恩桉[J]. 桉树科技, 2002(2): 1-7.
- [3] 张建明, 陈庚元. 邓恩桉种源和家系试验研究[J]. 桉树科技, 1999(2): 37-41.
- [4] 祁述雄. 中国桉树[M]. 北京: 中国林业出版社, 1989.
- [5] 林宗铿, 黄德贵. 应用正交设计方法探讨蝴蝶兰丛生芽生根壮苗的条件[J]. 福建热作科技, 2002, 27(1): 4-11.
- [6] 石可为, 李素珍, 张贵生. 二步生根法对芦笋组织培养生根的影响[J]. 浙江农业科学, 1995(2): 64-66.
- [7] 崔丽华. 植物生长调节物质对组织培养中不定芽不定根的作用[J]. 辽宁师范专科学校学报, 2000, 2(2): 97-99.
- [8] Rodriguez H G. Water relation and accumulation of organic and inorganic solutes in roots of maize seedlings during salts trees [J]. Plantphysiol, 1997, 113: 881-893; 12-15.
- [9] 韩美丽, 陆荣生. 林木生物技术研究现状与发展趋势[J]. 广西林业科学, 1996, 25(2): 213-217.
- [10] 福建省林木种苗总站. 福建省耐寒桉树遗传改良项目进展[J]. 桉树科技, 1999(2): 12-15.

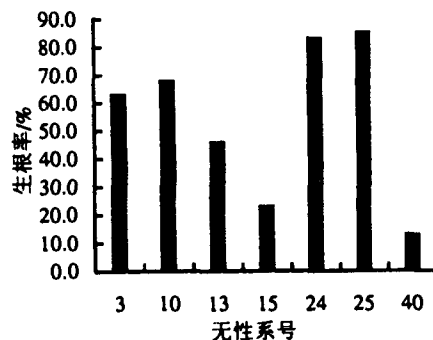


图 3 无性系对生根的影响

Figure 3 Effects of different clones on rooting