

邓恩桉组织培养技术研究

林彦, 谢耀坚

(国家林业局桉树研究开发中心, 广东 湛江 524022)

摘要: 邓恩桉是一种优良的耐寒桉树, 它在我国的推广利用因受无开花结实所限, 邓恩桉组培生根困难, 为使其能尽快得以推广本文进行了邓恩桉的组培生根试验, 试验结果表明: 6-BA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 是最适于启动邓恩桉丛生芽的发生。激素组合 6-BA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 6-BA $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的交替使用可用于邓恩桉的继代培养, IBA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 可用于邓恩桉的生根培养, 在生根试验中观察到温度低于 15°C 时邓恩桉根尖变黑, 组培苗植株上下部停止生长。大量元素对邓恩桉生根的影响最大, 其次是微量元素和有机物, 对其影响最小的是蔗糖。

关键词: 邓恩桉; 组织培养; 培养基

中图分类号: S722.3+7 **文献标识码:** A

Study on Tissue Culture Technology of *Eucalyptus dunnii*

LIN Yan, XIE Yao-jian

(China Eucalypt Research Centre, Guangdong Zhanjiang 524022)

Abstract: *E. dunnii* is a cold-tolerant species, because it has difficulties in flowering and seeding, and its clone propagation is also difficult in rooting; all these limit its plantation development in China. The experiment had been carried out to solve the rooting problem of *E. dunnii* in culture medium. The results showed that $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA was fit for the stimulation of adventitious buds, the plant growth regulator combinations of $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA and $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA + $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA were used alternatively in the proliferation of *E. dunnii*. $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA was helpful to rooting, but the root-tips of plantlet got black when the temperature was under 15°C , and the whole plantlet stopped growing. Compared with the effect of culture medium elements on the *E. dunnii* rooting from high to low, the first was macro-element, the next was micro-element and organic compound, the last was sucrose.

Key words: *E. dunnii*; tissue culture; culture medium

邓恩桉(*Eucalyptus dunnii*)是桉树属-双蒴盖亚属(subgenus symphyomyrtus)-蓝桉组(section Maidenaria)-多枝桉系(series Viminalis)中的一个种, 澳大利亚俗名为邓恩白桉(Dunn's White Gum), 形态特征和柳桉(*E. saligna*)、巨桉(*E. grandis*)相似,

树体在桉树中属中等偏大, 原产地成熟植株树高可达 50 m, 胸径 1-1.5 m, 枝下高 30-35 m; 树干通直, 分枝少; 人工林中的干形比巨桉的好。邓恩桉抗寒能力极强, 心材白色, 木材纹理通直、制浆漂白容易, 是优质的纸浆材树种。通过在我国湖

收稿日期: 2006-12-31

基金项目: 国家“十一五”科技计划课题“桉树和相思速生丰产林培育关键技术研究与示范(2006BAD24B02)”、“高产优质桉树速生材新品种选育”与“抗风折植物材料筛选与快繁技术研究”(2006BAD03A0107)的部分内容。

作者简介: 林彦(1977-), 女, 硕士研究生, 助理工程师, 主要研究方向: 林木遗传育种

南、广西和江西等地的试验结果证明邓恩桉能耐-5℃低温,95年湖南在进行桉树种源选择研究中认为国外引进的邓恩桉是湘中丘岗区中试推广的优良种源,它生长速度快,适应性强,干形优^[1]。但目前大面积种植邓恩桉的主要障碍是:从长势好的天然林中收集优质种子相当困难,而且天然林的种子产量不稳定,树龄结构严重趋于年轻化且呈零星分布^[2],因此种子昂贵。目前,国内还不能生产邓恩桉种子,广西引种栽培10多年的邓恩桉尚无开花结果迹象。因此依靠大量进口种子是不切实际的,为此也进行了邓恩桉组培繁殖,虽然建立了3个邓恩桉无性系的无菌体系,但继代苗生根问题未能有效解决^[3]。本研究对邓恩桉组培苗生根进行了研究,试图解决其生根难的问题,以实现邓恩桉苗木的快速繁殖和推广利用。

1 材料和方法

1.1 实验材料

采自湖南省资兴市半年生优选邓恩桉实生苗,植物生长调节剂为6-BA、KT、ZT、NAA和IBA。

以MS为基本培养基,植物生长调节剂按实验设计需要进行添加。诱导及继代培养基均添加

蔗糖30 g·L⁻¹,生根培养基添加蔗糖15 g·L⁻¹,pH值5.8。所有培养基均在卧式高压灭菌锅内进行高0.11 MPa,高温121℃下灭菌20 min。

1.2 实验方法

1.2.1 分裂素对不定芽诱导的影响

将6-BA(0.2、0.5、0.8 mg·L⁻¹)、ZT(0.2、0.5、0.8 mg·L⁻¹)、KT(0.2、0.5、0.8 mg·L⁻¹)三种分裂素与它们的三种浓度用于诱导邓恩桉不定芽的发生,以期筛选出最适于邓恩桉诱导不定芽的分裂素种类与浓度。试验测定指数为芽增殖系数和芽高。

1.2.2 激素比对邓恩桉继代培养的影响

试验将6-BA 0.5、0.3、0.1 mg·L⁻¹与NAA 0.1、0.2、0.3 mg·L⁻¹各配比应用于邓恩桉的继代培养,筛选出适于邓恩桉继代培养的最佳激素配比。

1.2.3 IBA对邓恩桉生根的影响

从IBA 0.05、0.1、0.2、0.5、1.0 mg·L⁻¹及对照(CK)等6个试验中筛选出适合邓恩桉生根的IBA浓度。

1.2.4 大量元素、微量元素、有机物和蔗糖对邓恩桉生根的影响

按表1设计正交试验。

表1 正交试验设计因素和水平表

水平	大量元素 A(mg·L ⁻¹)	微量元素 B(mg·L ⁻¹)	有机物 C(mg·L ⁻¹)	蔗糖(g·L ⁻¹)
1	1.00	1.00	1.00	15.00
2	0.50	0.50	0.50	20.00
3	0.25	0.25	0.25	25.00

注:添加的激素种类和水平为IBA 0.5 mg·L⁻¹。

1.3 培养条件

温度25±2℃,除外植体的诱导和组培苗的生根进行暗培养外,其它培养过程均在光照下进行,光照12 h·d⁻¹,光照强度1000-3000 Lux。

1.4 外植体选取与处理

选取洁净、无病虫害的粗壮枝条,去除叶片和顶芽,剪取顶芽下第一和第二个无侧芽长出的半木质化茎段作为外植体,长度为1.5 cm左右,先泡

在一个装有水的塑料烧杯中,防止茎段萎蔫。剪取完毕后,在塑料烧杯中加入洗洁精至饱和,充分搅拌3 min,于自来水龙头下冲洗30 min,冲洗完毕即可拿到接种室进行消毒,而后接种。外植体在70%酒精(其量要能没过外植体)浸泡30 s后立即用无菌水冲洗,再在0.1%升汞溶液中轻摇40 s-1 min,无菌水冲洗4-6次后,将外植体的上部和下部切除接种于丛生芽诱导培养基中。

表 2 分裂素对不定芽诱导的影响

分裂素种类	浓度 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	样本 数(个)	外植丛生芽 发生数(个)	丛生芽 发生率(%)	平均芽高 (cm)
6-BA	0.2	15	5	33	0.425
6-BA	0.5	15	11	73	0.263
6-BA	0.8	16	10	67	0.171
ZT	0.2	15	4	27	0.383
ZT	0.5	15	2	13	0.559
ZT	0.8	14	1	8	0.605
KT	0.2	15	0	0	0.501
KT	0.5	14	4	33	0.178
KT	0.8	14	0	0	0.338

2 结果与分析

2.1 分裂素对不定芽诱导的影响

丛生芽发生率(发丛生芽外植体数/接种数)高说明该分裂素种类和浓度有利于丛生芽的发生,由表 2 中的丛生芽发生率可知,总体上分裂素 6-BA 的丛生芽发生率较 ZT 和 KT 高,说明该分裂素种类适于用来启动邓恩桉丛生芽的发生,而 6-BA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的丛生芽发生率最高为 73%,说明 6-BA

$0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 是最适于启动邓恩桉丛生芽的发生浓度。由表 2 中的平均芽高可知,细胞分裂素 6-BA 的生理作用在邓恩桉的侧芽萌发中表现得较为明显,具有诱导芽的分化、促进侧芽萌发生长、促进细胞的分裂与扩大、使茎增粗、抑制茎伸长作用^[4]。随 6-BA 浓度的提高邓恩桉的平均芽高下降,而其它两种分裂素的生理作用在邓恩桉的侧芽萌发中表现得不是很明显,所以不适合用来启动邓恩桉的侧芽萌发。

2.2 激素对比对邓恩桉继代培养的影响

表 3 激素对比对邓恩桉继代培养的影响

试验号	6-BA + NAA ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	接种芽数(个)	增殖总芽数(个)	增殖系数	平均芽高 (cm)
1	0.5+0.3	16	48	3.0	1.31
2	0.5+0.2	16	35	2.2	1.04
3	0.5+0.1	16	43	2.7	1.01
4	0.3+0.3	16	115	7.2	1.47
5	0.3+0.2	16	99	6.2	1.42
6	0.3+0.1	16	43	2.7	1.34
7	0.1+0.3	16	88	5.5	1.61
8	0.1+0.2	16	86	5.4	1.55
9	0.1+0.1	16	47	2.9	1.54

注:继代 2 次后(一个继代周期为 20 d)。

由表 3 可知,6-BA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 添加 NAA 三个不同浓度对邓恩桉无性系的增殖系数和芽高均没有太大影响,平均增殖系数最高的仅为 1.5 倍,增殖出的苗节间短,茎的颜色为白色,叶子小呈黄绿色。但将 6-BA 浓度降低到 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以后,邓恩桉无性系经两次继代后其平均增殖系数随 NAA

浓度的提高而提高,NAA $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时平均增殖系数为 3.6 倍,达到所有处理的最高值,其次为 NAA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 平均增殖系数为 3.1 倍。平均芽高也是随 NAA 浓度的升高而上升,邓恩桉在 4 号培养基上不仅具有最高的平均增殖系数,而且芽也长得比较长、粗壮,芽茎为浅绿色,叶子稍大并有

所舒展,所以4号培养基最适于用作邓恩桉的继代、增殖培养基。当6-BA浓度在 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时苗长都普遍较高,平均增殖系数和芽高随NAA浓度的升高而上升,苗茎伸长,呈绿色,叶子大而充分舒展,呈深绿色。但在7、8、9这三号培养基上继代两次后芽顶长出少量愈伤组织,8号培养基上的芽顶部长愈伤组织的苗比其它两个的要多,顶部长愈伤组织后芽不再生长。4号和9号培养基的激素比例都是1:1,但对邓恩桉的增殖影响不尽相同,这说明芽的增殖与激素含量有很大关系。芽在诱导培养基中激素浓度较高,繁殖率大,芽肥厚,节短,不可能长到足够的高度进行生根培养,而且长期在高浓度的诱导培养基中,会有大量玻璃化苗出现。因此,在继代培养中采用高、低浓度细胞分裂素和低、高浓度生长素配比交替使用,既可促使

芽增殖,又可促使芽长长^[5]。无性系长期在6-BA $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 培养基上继代,繁殖率大,芽肥厚,节短,呈白色,叶子肥而小,呈浅黄绿色,不适于进行生根培养,但将分裂素浓度降低到 $0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,生长素浓度提高到 $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,芽开始长长,叶子逐步舒展变大,颜色也逐渐由浅黄绿色转变为绿色,但是,邓恩桉无性系在这个培养基上长期继代容易使芽由于伸长而细化。试验证明:邓恩桉无性系经两种激素组合交替使用后既保持了较高的增殖率,也保证了有足够长度的有效芽转入生根培养。所以激素组合6-BA $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和6-BA $0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的交替使用可用于邓恩桉的继代培养。

表4 IBA对邓恩桉生根的影响

IBA浓度($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	接种株数(株)	生根率(%)	平均根条数(条)	生根状况
0(CK)	67	22.4	1-2	根细且短,根尖黑色
0.05	68	33.8	1-2	根稍粗而短,根尖黑色
0.1	55	54.5	1-2	根稍粗而短,根尖黑色
0.2	58	41.4	1-2	根细,长度稍长,白色
0.5	61	62.3	1-2	根壮,表被白色绒毛,根最长
1.0	50	45.2	1-2	根多且长,由愈伤组织发出

2.3 IBA对邓恩桉生根的影响

由表4看出,随着IBA浓度的升高,邓恩桉的生根率在上升,根的长度也在增长,根的粗壮度也在提高,生根条数都为1-2条。IBA $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以下各浓度培养基上根的粗细差别不大,但 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时所生的根就比前面几个浓度的粗很多,在长度上差别也比较明显,生根率也较高,到 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时愈伤组织明显增多,且根由愈伤组织中发出。在本次试验中,所有处理发出的根根尖都变黑,根尖变黑后根系就停止生长,没有侧根生长,植株上部没有任何生长。在前五种浓度培养基上邓恩桉芽底部的愈伤组织少,根都由芽茎直接发根不是从愈伤组织上发根,根本不存在愈伤组织阻滞上下输导问题,其主要原因是温度,此次试验接种季节是在冬季,接种后置于室外散射光下培养,室外

温度在 15°C 左右,低于植物根系生长的最适温度 $26-28^{\circ}\text{C}$ 。在适宜的温度条件下,试管苗根系发达,苗生长迅速,叶片大小适中,叶片着色好。在温度回升的情况下重复IBA $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 这一处理观察到,温度在 $20-30^{\circ}\text{C}$ 时,邓恩桉发根正常,粗壮并伸长,根被白色绒毛,有次级根,植株上部生长良好,所以IBA $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 可用于邓恩桉的生根培养。

2.4 大量元素、微量元素、有机物和蔗糖对邓恩桉生根的影响

由表5可知,极差R最大的因素是大量元素,其水平变化对邓恩桉生根率的影响最大,是影响邓恩桉生根率的主要因素。本试验中,极差最大的是大量元素A,其次是微量元素B和有机物C,最小的是蔗糖D,所以4个因素对邓恩桉生根率影响的

表5 不同大量元素、微量元素、有机物和蔗糖因素水平对邓恩桉生根的影响

处理号	大量元素 A (mg · L ⁻¹)	微量元素 (mg · L ⁻¹)	蔗糖 D (mg · L ⁻¹)	有机物 (mg · L ⁻¹)	生根率 (%)
3	1(1)	3(0.25)	3(25)	3(0.25)	28.6
4	2(0.5)	1(1)	2(20)	3(0.25)	25.0
5	2(0.5)	2(0.5)	3(25)	1(1)	28.1
6	2(0.5)	3(0.25)	1(15)	2(0.5)	20.5
7	3(0.25)	1(1)	3(25)	2(0.5)	48.6
8	3(0.25)	2(0.5)	1(15)	3(0.25)	47.1
9	3(0.25)	3(0.25)	2(20)	1(1)	48.6
K ₁	104.7	113.6	107.6	116.7	
K ₂	73.6	111.3	109.7	105.2	
K ₃	144.3	97.7	105.3	100.7	
K ₁ 平均	34.9	37.9	35.9	38.9	
K ₂ 平均	24.5	37.1	36.6	35.1	
K ₃ 平均	48.1	32.6	35.1	33.6	
R	23.6	5.3	1.5	5.3	

主次关系为:大量元素(主)→微量元素和有机物→蔗糖 euk (次)。从实验结果可见9个处理中以第7和第9号处理即 A₃B₁C₃D₂ 和 A₃B₃C₂D₁ 为最好,生根率均为48.6%,经极差分析后,因素A以A₃水平为好,B以B₁为好,C以C₂为好,D以D₁为好,极差分析的结果表明4个因素的最佳水平组合为A₃B₁C₂D₁,

3 结论与讨论

3.1 6-BA 0.5 mg · L⁻¹ 是最适于启动邓恩桉丛生芽的发生浓度。

3.2 激素组合 6-BA 0.5 mg · L⁻¹ + NAA 0.1 mg · L⁻¹ 和 6-BA 0.5 mg · L⁻¹ + NAA 0.1 mg · L⁻¹ 的交替使用可用于邓恩桉的继代培养。

3.3 所有处理发出的根根尖都变黑,根尖变黑后根系就停止生长,没有侧根生长,植株上部没有任何生长。陈江平做不同植物生长素对不同桉树生根的研究时,观察到愈伤组织存在阻滞上下输导之间的畅通,导致养分、水分上下之间运输困难,有的不见长根或长出不到0.5 cm 后便停止生长,没有侧根或很少不定根,并且在根尖处变黑^[6]。在前五

种浓度培养基上邓恩桉芽底部的愈伤组织少,根都由芽茎直接生根不是从愈伤组织上生根,根本不存在愈伤组织阻滞上下输导问题,其主要原因可能是温度,此次试验接种季节是在冬季,接种后置于室外散射光下培养,室外温度在15℃左右,低于植物根系生长的最适温度。国外有研究表明大多数林木树种根诱导的适宜温度范围是26-28℃^[7]。根系温度过低,不仅影响植物吸收功能,而且易造成“锈根”或引起生理病害,温度过高,根系易衰老,严重者整株苗枯死。在温度太低的情况下,不利于生根,同时长苗的速度也十分缓慢;而温度太高,对生根效果也有不良影响,苗有徒长现象。在适宜的温度条件下,试管苗根系发达,苗生长迅速,叶片大小适中,叶片着色好。在温度回升的情况下重复 IBA 0.5 mg · L⁻¹ 这一处理观察到,温度在20-30℃时,邓恩桉发根正常,粗壮并伸长,根被白色绒毛,有次级根,植株上部生长良好。所以 IBA 0.5 mg · L⁻¹ 可用于邓恩桉的生根培养。

3.4 大量元素、微量元素、有机物和蔗糖对邓恩桉生根影响主次关系为:大量元素(主)→微量元素和有机物→蔗糖(次)。经极差分析后,因素A以A₃水平为好,B以B₁为好,C以C₂为好,D以

D₁为好,极差分析的结果表明4个因素的最佳水平组合为A₃B₁C₂D₁,这与实验结果不相一致,下一步可补做A₃B₁C₃D₂, A₃B₃C₂D₁, A₃B₁C₂D₁, 搭配的对比较试验,以确定哪个组合最佳^[8]。如果结果都好,那么三种搭配都为最佳搭配。

参考文献

- [1] 李志辉,沈中翰. 湘中丘岗区桉树种源选择的研究[J]. 林业科技通讯,1995,(6):12-14
- [2] R L 阿诺尔德(李天会译). 邓恩桉种源变异和遗传保存[J]. 桉树科技,1994,11(2):61-63
- [3] 陈健波,项东云,张建明,等. 广西耐寒桉树育种研究现状与对策[J]. 广西林业科学,2003,(1):7-11
- [4] 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,1991
- [5] 黄华艳,吴耀军. 柳隆桉芽器官离体培养研究[J]. 广西林业科学,2003,32(1):27-28
- [6] 陈江平. 不同植物生长素对桉树不同无性系组培生根影响的试验[J]. 广西林业科学,2003,32(1):50-55
- [7] George E F. Plant propagation by tissue culture[M]. Part 2. Exegetics Limited, Edington, Wilts. England, 1996:639-695.
- [8] 廖桂宗,彭世揆. 试验设计与抽样技术[M]. 北京:中国林业出版社,1993,124-327