史密斯桉愈伤组织诱导与分化的进一步研究

邱 璐[1],王 波[1],苏开美[2],谢 辉[2],康文玲[2],
黄 静[1],杨启国[1],吕加燕[1],杨福锁[1]

(1 云南省楚雄师范学院 生化系,云南 楚雄 675000;2 云南省楚雄州林业科学研究所,云南 楚雄 675000)

[摘 要] 为了优化史密斯桉愈伤组织诱导与分化系统,为史密斯桉的无性繁殖和转基因研究提供参考。通过建立无菌苗,研究不同品种、外植体部位、激素种类及其配比、不同质量浓度 2,4-D 与 NAA 对史密斯桉愈伤组织诱导的影响,激素种类及配比、基本培养基种类、6-BA 质量浓度、NAA 质量浓度、不同转种周期对史密斯桉愈伤组织分化成芽的影响以及激素种类及其质量浓度对史密斯桉不定芽分化成根的影响。结果表明,使用 1.54 mol/L NaClO 对史密斯桉种子消毒 30～50 min 建立的无菌苗效果较好;史密斯桉形成愈伤组织的能力在品种间有显著差异,品种 9 的愈伤形成率最高;不同外植体部位形成愈伤组织的能力从大到小依次为:子叶、真叶、下胚轴、来源于种子的幼茎、种子、老树幼茎、根;0.5～1.0 mg/L 2,4-D 对史密斯桉愈伤组织的形成是必要的,1.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/L NAA 组合对史密斯桉愈伤组织诱导效果最好,愈伤形成率最高;NAA 与 6-BA 的质量比为 1∶1 时,有利于史密斯桉愈伤组织的形成,质量比为 1∶5 时有利于茎段的快速生长,质量比为 1∶10 时有利于不定芽的形成;单独使用 0.5～1.0 mg/L 2,4-D 或 2,4-D 与 NAA 组合有利于愈伤组织的形成;单独使用0.5 mg/L 的 NAA 或 IBA 有利于史密斯桉根的形成,其中 NAA 的效果较好;在 MS 培养基中苗高、苗的长势及腋芽萌发成苗的能力均较其他培养基有显著优势;转种 20 d 的愈伤分化成芽率相对较高。说明史密斯桉愈伤组织诱导与分化系统易于优化。

[关键词] 史密斯桉;愈伤组织;不定芽;诱导;分化

[中图分类号] S797.39;Q813.1+2 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9387(2007)09-0103-07

Advanced study on callus induction and differentiation of Eucalyptus smithii L.

QIU Lu[1], WANG Bo[1], SU Kai-mei[2], XIE Hui[2], KANG Wen-lin[2], HUANG Jing[1],
YANG Qi-guo[1], LV Jia-yan[1], YANG Fu-suo[1]

(1 *Chemistry-biology Department, Chuxiong Normal University, Chuxiong, Yunnan* 675000, *China*;
2 *Institute of Chuxiong Forestry Science, Chuxiong, Yunnan* 675000, *China*)

Abstract: The objective of this experiment is to optimize the system forming and differentiation of callus, and offer reference for asexual reproduction and genetic transformation. The asepsis seedling and callus are set up and induced differently to form bud and root by using different breeds, different explants, different hormone category and combination, and different mediums, 2,4-D, NAA, 6-BA and cycle of turning. The effect of forming no-germ seedling is the best by using 1.54 mol/L NaClO disinfecting seeds for 30 - 50 min. There is marked difference in the ability of forming callus between different breeds. The ability of forming callus is different between out-plants. The abilities of cotyledon and leaf are stronger than young stem and hypocotyls; young stem and hypocotyls are stronger than stem from old tree; stems from old tree are stronger than seed; seed is stronger than root. 0.5 - 1.0 mg/L 2,4-D is important in callus forming.

[收稿日期] 2006-07-25
[基金项目] 云南省林业厅资助项目(080102)
[作者简介] 邱 璐(1965 -),女,重庆市人,副教授,硕士,主要从事植物组织培养及转基因研究。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

0.5 - 1.0 mg/L ZT or 2ip is the best for axillary bud bourgeoning and growing and multiplicat. The callus forms easily when the proportion of auxon and cytokinin is 1 ∶1. Adventitious bud and stem can grow rapidly when the proportion is 1 ∶5. Adventitious bud can form easily when the proportion is 1 ∶10. The callus forms easily when using singly auxon 0.5 - 1.0 mg/L 2,4-D or 2,4-D and with NAA. Root can form easily when using singly auxon 0.5 - 1.0 mg/L NAN and IBA or IAA. MS is the best in all mediums. It has marked advantage in seedling high, growing power and bud forming rate. Conclusion can be drawn that the system of forming and differentiating callus from *Eucalyptus smithii* L. has been easily optimized.

Key words: *Eucalyptus smithii* L.; callus; adventitious bud; induction; differentiation

史密斯桉(*Eucalyptus smithii* L.)是桃金娘科桉树属植物,是我国从澳大利亚引进的优良树种。其生长迅速,树干笔直,材质好,抗寒性和适应能力强,且芳香油含量高、品质好[1]。与蓝桉和直杆桉相比,史密斯桉在树高、胸径、材积、产叶量、出油率等方面均有显著优势,是绿化荒山、营造速生丰产林及短周期工业原料林的首选树种[2],除直接用于生产木材外,主要被用来生产芳香油,用于医药、化妆品、食品和工业用油等[3-4]。目前,史密斯桉种苗供不应求,种子价位高,每千克纯种子售价 10.0 万元,带杂花的种子每千克售价 1.0 万元[5]。目前,除了作者对史密斯桉愈伤组织诱导及分化进行了报道外[6],有关史密斯桉转基因的研究国内外还尚未见报道。本试验对史密斯桉无菌苗的建立、愈伤组织的形成与诱导及其影响因素进行了研究,以期为史密斯桉资源开发及转基因研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

史密斯桉种子从澳大利亚进口,外植体取自云南省楚雄州林业科学研究所。

1.2 方 法

1.2.1 无菌苗的建立 使用 1.54 mol/L NaClO 消毒史密斯桉种子,消毒时间分别设为 10,20,30,40 和 50 min;同时使用 0.1 mol/L $HgCl_2$ 消毒种子,消毒时间分别设为 2,3,4 和 5 min。消毒前均使用洗涤剂清洗种子 5 min,消毒后均用无菌水清洗种子 5～10 次,泡种 5～10 h 后接种。每处理 100 粒种子,每处理重复 3 次。

1.2.2 不同史密斯桉品种对其愈伤组织诱导的影响 以 1/2 MS 培养基为基本培养基,以 0.5 mg/L 奈乙酸(NAA) + 0.5 mg/L 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)为激素配比,以史密斯桉 1～9 号品种 3 年生树基部断面的萌生枝条幼茎为外植体,以 0.1 mol/L $HgCl_2$ 为消毒剂对外植体消毒 2～3 min,对史密斯桉 1～9 号品种形成愈伤组织的能力进行比较。培养基内含琼脂 7.5 g/L,蔗糖 30 g/L,pH 值 5.8,培养温度 24～28 ℃,光照强度 2 000～3 000 lx,暗培养 20 d 后统计愈伤诱导率及长势,每处理 20 个外植体,重复 3 次,下同。

1.2.3 外植体部位对史密斯桉愈伤组织诱导的影响 以 1/2 MS 培养基为基本培养基,以 1.5 mg/L NAA + 1.5 mg/L 2,4-D 为激素配比,以史密斯桉种子萌发形成的无菌苗根、下胚轴、来源于种子的幼茎、子叶、真叶及 3 年生树基部断面的萌生枝条幼茎(老树幼茎)和种子为外植体进行试验,以筛选出史密斯桉形成愈伤组织的最佳部位。

1.2.4 激素种类及其配比对史密斯桉愈伤组织诱导的影响 以史密斯桉种子萌发形成的无菌苗茎段为外植体,以 1/2 MS 培养基为基本培养基,以单独使用1.0 mg/L 2,4-D 及 1.0 mg/L 2,4-D 分别与 1.0 mg/L 6-苄基腺嘌呤(6-BA)、糠基腺嘌呤(KT)、玉米素(ZT)、异戊烯基腺嘌呤(2ip)和 NAA 组合,另设 1.0 mg/L BA + 1.0 mg/L NAA 共 7 组激素配比试验,以筛选出适合史密斯桉形成愈伤组织的最佳激素种类与配比。

1.2.5 不同质量浓度 2,4-D 与 NAA 配比对史密斯桉愈伤组织诱导的影响 以史密斯桉种子萌发形成的无菌苗茎段为外植体,以 MS 培养基为基本培养基,设置 1.5 mg/L 2,4-D + 1.5 mg/L NAA、1.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/L NAA、0.5 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L NAA 和 0.1 mg/L 2,4-D + 0.1 mg/L NAA 4 组不同浓度的 2,4-D 与 NAA 配比试验,以筛选出适宜史密斯桉愈伤组织诱导的最佳 2,4-D 与 NAA 质量浓度。

1.2.6 激素种类及其配比对史密斯桉不定芽分化形成的影响 以史密斯桉种子萌发形成的无菌苗茎段为外植体,以 1/2 MS 培养基为基本培养基,将 0.1 mg/L NAA 分别与 1.0 mg/L 的 6-BA、KT、ZK 和 2ip 进行配比,以筛选出适合史密斯桉愈伤

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

组织分化成芽的最佳激素配比。暗培养 1 周后进行光照培养,30～60 d 后统计苗高和苗生长速度,观测苗的长势及愈伤褐变情况。

1.2.7　基本培养基种类对史密斯桉不定芽分化形成的影响　以史密斯桉种子萌发形成的无菌苗茎尖为材料,以 1.0 mg/L ZT + 0.2 mg/L NAA 为激素配比,以 MS、1/2 MS、1/4 MS、1/8 MS、Read、改良 Read、Anderson、MccoNn、SH、White 为基本培养基进行试验[6],以筛选出适合史密斯桉增殖的最佳基本培养基。接种 30 d 后统计苗的生长情况。

1.2.8　不同质量浓度 6-BA 对史密斯桉不定芽分化形成的影响　以愈伤组织分化形成的芽丛块和来源于种子的组培无菌苗茎段为材料,以 1/2 MS 培养基为基本培养基,以 1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA、0.7 mg/L 6-BA + 0.07 mg/L NAA、0.5 mg/L 6-BA + 0.05 mg/L NAA、0.3 mg/L 6-BA + 0.03 mg/L NAA、0.1 mg/L 6-BA + 0.01 mg/L NAA 为激素配比,以筛选出芽增殖的最佳 6-BA 质量浓度。

1.2.9　不同质量浓度 NAA 与 6-BA 组合对史密斯桉不定芽分化形成的影响　以愈伤组织分化形成的芽丛块和来源于种子的组培无菌苗茎段为材料,以 1/2 MS 培养基为基本培养基,以 0.5 mg/L 6-BA 分别与 0.5、0.3、0.1、0.05 和 0.01 mg/L NAA 的激素配比,以筛选出芽增殖的最佳 NAA 与 6-BA 质量比。

1.2.10　不同转种周期对史密斯桉愈伤组织分化成芽的影响　以 1/2 MS 培养基为基本培养基,以 1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA 为最佳激素配比,以老茎萌发形成的幼茎及种子形成的幼茎为材料,以接种 10、20、30 和 40 d 形成的愈伤组织为材料进行试验,以筛选出最佳的转种周期。

1.2.11　激素种类及其质量浓度对史密斯桉不定芽分化成根的影响　以来源于种子的无菌苗茎段为材料,以 1/2 MS 培养基为基本培养基,设 0.5 mg/L IBA 和 0.5 mg/L IAA 及 0.1、0.3、0.5 和 1.0 mg/L NAA 6 组处理,以筛选出不定芽分化成根的最佳激素种类及其质量浓度。培养基中附加蔗糖 20 g/L,光照强度 3 000～4 000 lx,接种 2 周后统计平均生根数、根平均长度和根径。

1.3　数据处理与统计方法

使用 SPSS 13.0 软件进行差异显著性分析和多重比较统计分析。

2　结果与分析

2.1　不同消毒剂及消毒时间对史密斯桉无菌苗建立的影响

由表 1 可知,用 1.54 mol/L NaClO 或 0.1 mol/L $HgCl_2$ 对史密斯桉种子消毒,总体上无菌率均较高,但 NaClO 和 $HgCl_2$ 2 种消毒剂对种子萌发率的影响差异较大。用 1.54 mol/L NaClO 对种子消毒 30～50 min,萌发率为 90 %～100 %;而用 0.1 mol/L $HgCl_2$ 对种子消毒 2～5 min,萌发率为 0 %～15 %。

表 1　不同消毒剂及消毒时间对史密斯桉无菌苗建立的影响

Table 1　Influence of different disinfector and disinfecting time on asepsis seeding to form

消毒剂 Kinds of disinfectors	消毒时间/min Disinfecting time	接种数 Explant number	未污染数 Unpolluted number	成活数 Living number	无菌率/% Asepsis rate	萌发率/% Bodrgeon rate
1.54 mol/L NaClO	10	20	5	5	25	25
	20	20	11	11	55	55
	30	20	16	18	90	90
	40	20	19	19	95	95
	50	20	20	20	100	100
0.1 mol/L $HgCl_2$	2	20	12	3	60	15
	3	20	16	1	80	5
	4	20	20	0	100	0
	5	20	20	0	100	0

2.2　不同史密斯桉品种对其愈伤组织诱导的影响

由表 2 可知,史密斯桉愈伤组织形成能力在品种间差异较大。品种 9 愈伤形成率最高,品种 2、5、3 次之,并优于品种 6 和 7,品种 8、1、4 最低。方差分析结果表明,不同品种间愈伤形成率差异达显著($P < 0.05$)或极显著水平($P < 0.01$)。

2.3　外植体部位对史密斯桉愈伤组织诱导的影响

从表 3 可以看出,由史密斯桉种子萌发形成无菌苗的子叶和真叶,形成愈伤的能力均最强,愈伤形成率均最高,达 100 %;史密斯桉下胚轴、来源于种子幼茎形成愈伤的能力次之;根形成愈伤的能力最低。

由表 3 还可看出,老树幼茎与来源于种子的幼茎形成愈伤的能力差异较大,老树幼茎形成的愈伤褐化严重,褐化死亡率较高,愈伤形成率较低;来源于种子的幼茎愈伤形成率较高,但愈伤长势差。方

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

差分析结果表明,不同外植体部位愈伤形成率的差异达显著($P < 0.05$)或极显著水平($P < 0.01$)。

表 2 不同史密斯桉品种对其愈伤组织诱导的影响

Table 2 Influence of different breed on callus inducing

品种号 Number	愈伤形成时间/d Forming time	愈伤形成率/% Callus rate	愈伤长势 Growing power	愈伤形态 Callus shape	愈伤褐变 Callus browning
1	7	24 Aa	+	绿色瘤状 Green nubble	不明显 Undistinct
2	3	90 Bb	+ + + + +	绿色瘤状 Green nubble	不明显 Undistinct
3	3	85 Bb	+ + + +	绿色瘤状 Green nubble	轻度褐变 Hight browning
4	8	20 Cc	+	绿色瘤状 Green nubble	轻度褐变 Hight browning
5	3	88 Dd	+ + + +	绿色瘤状 Green nubble	褐变 Browning
6	3	75 De	+ +	绿色瘤状 Green nubble	褐变 Browning
7	3	60 De	+ +	绿色瘤状 Green nubble	轻度褐变 Hight browning
8	6	27 Df	+	绿色瘤状 Green nubble	褐变 Browning
9	3	95 Eg	+ + + + +	除绿色瘤状外,叶脉处有放射状白色坚实愈伤 Green nubble and stability write	不明显 Undistinct

注:+ + + + +.表示长势或速度最好;+ + + +.表示长势或速度较好;+ + +.表示长势或速度一般;+ +.表示长势或速度差;+.表示长势或速度较差。同列数据后标不同大写字母者表示差异极显著($P < 0.01$),标不同小写字母者表示差异显著($P < 0.05$)。下表同。

Note: + + + + + expresses that growing power or rapidity is the best. + + + + expresses that growing power or rapidity is better. + + + expresses that growing power or rapidity is good. + + expresses that growing power or rapidity is bad. + expresses that growing power or rapidity is worse. The next table is same. Difference capital letter behind every columns expresses that the difference is terribly notability($P < 0.01$). Difference small letter expresses that the difference is notability($P < 0.05$).

表 3 不同外植体部位对史密斯桉愈伤组织诱导的影响

Table 3 Influence of different parts of explants on callus inducing

序号 Number	外植体部位 Parts of explant	愈伤形成率/% Callus rate	愈伤长势 Growing power	愈伤褐变 Callus browning
1	根 Root	50 Aa	+	不明显 Undistinct
2	下胚轴 Hypocotyl	89 Bb	+ + +	不明显 Undistinct
3	来源于种子的幼茎 Young stem from seed	86 Bb	+ + +	不明显 Undistinct
4	子叶 Cotyledon	100 Bc	+ + + + +	不明显 Undistinct
5	真叶 Leaf	100 Bc	+ + + + +	不明显 Undistinct
6	老树幼茎 Young stem from old tree	60 Cd	+ +	褐化严重 Severity
7	种子 Seed	80 Ae	+ +	不明显 Undistinct

2.4 激素种类及其配比对史密斯桉愈伤组织诱导的影响

表 4 表明,2,4-D 对史密斯桉愈伤组织的形成是必要的,2,4-D 与 NAA 组合具有最好的诱导效果,愈伤形成率最高,达 100%;另外,2,4-D 与 ZT 或 KT 组合对诱导密斯桉愈伤形成也有较好效果;2,4-D 单独使用对诱导愈伤组织形成虽有较好效果,但愈伤易老化死亡。方差分析结果表明,不同激素种类及其配比间的愈伤形成率差异达显著($P < 0.05$)或极显著水平($P < 0.01$)。

表 4 激素种类及其配比对史密斯桉愈伤组织诱导的影响

Table 4 Influence of different hormone category and combination on callus inducing

序号 Number	激素种类及配比 Hormone category and combination	愈伤形成率/% Callus rate	愈伤长势 Callus growing power	愈伤褐变 Callus browning
1	1.0 mg/L 2,4-D	66 Aa	+ + +	无 No
2	1.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/L 6-BA	64 Aa	+ +	无 No
3	1.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/L KT	75 Aa	+ + + +	无 No
4	1.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/L ZT	78 Aa	+ + + +	无 No
5	1.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/L 2ip	60 Aa	+ +	无 No
6	1.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/L NAA	100 Bb	+ + + + +	无 No
7	1.0 mg/L BA + 1.0 mg/L NAA	50 Ac	+	无 No

2.5 不同质量浓度 2,4-D 与 NAA 组合对史密斯桉愈伤组织诱导的影响

由表 5 可以看出,0.5 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L NAA 组合诱导史密斯桉形成愈伤组织的效果最好,愈伤诱导率较高,愈伤长势好,褐化轻;1.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/L NAA 组合的诱导效果次之;1.5 mg/L 2,4-D + 1.5 mg/L NAA 组合的愈伤诱导率虽较高,但褐化严重,愈伤死亡率较高。方差分析结

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

果表明,除了 0.1 mg/L 2,4-D + 0.1 mg/L NAA 组合外,其他不同质量浓度的 2,4-D 与 NAA 组合的愈伤形成率差异不显著($P > 0.05$)。

表 5　不同质量浓度 2,4-D 与 NAA 组合对史密斯桉愈伤组织诱导的影响

Table 5　Influence of different density of 2,4-D and NAA on callus inducing

序号 Number	激素种类及配比 Hormone category and combination	愈伤形成率/ % Callus rate	愈伤长势 Callus growing power	愈伤褐化 Callus browning
1	1.5 mg/L 2,4-D + 1.5 mg/L NAA	85 Aa	+ + + +	褐化严重,愈伤老化,愈伤死亡率高 Browning and death severity
2	1.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/L NAA	96 Aa	+ + + + +	褐化严重,愈伤老化、死亡 Browning and death
3	0.5 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L NAA	95 Aa	+ + + + +	褐化轻 Hight browning
4	0.1 mg/L 2,4-D + 0.1 mg/L NAA	70 Ab	+ + +	褐化轻 Hight browning

2.6　激素种类及其配比对史密斯桉不定芽分化形成的影响

由表 6 可以看出,ZT 诱导的史密斯桉苗高、苗生长速度、苗的长势均最好; 2ip 的诱导效果次之; 6-BA 与 KT 的诱导效果均较差。方差分析结果表明,6-BA 和 KT 与 ZT 和 2ip 处理苗高的差异达极显著水平($P < 0.01$)。

表 6　激素种类及其配比对史密斯桉不定芽分化形成的影响

Table 6　Influence of different hormone category and combination on adventitious bud differentiating.

序号 Number	激素种类及配比 Hormone category and combination	苗高/ cm Seedling height	苗生长速度 Growing rapidity	苗的长势 Growing power	愈伤褐变 Browning
1	1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA	2.0 Aa	慢 Slow	+ +	不明显 Undistinct
2	1.0 mg/L KT + 0.1 mg/L NAA	2.0 Aa	慢 Slow	+ +	不明显 Undistinct
3	1.0 mg/L ZT + 0.1 mg/L NAA	5.0 Bb	最快 Rapidest	+ + + + +	不明显 Undistinct
4	1.0 mg/L 2ip + 0.1 mg/L NAA	4.5 Bc	快 Rapid	+ + + +	不明显 Undistinct

2.7　基本培养基种类对史密斯桉不定芽分化形成的影响

由表 7 可知,史密斯桉茎尖在 MS 培养基中,苗高、苗的长势、腋芽萌发成苗的能力均较其他培养基有明显优势。在 Anderson 和 MccoNn 培养基中,苗高、苗的长势、腋芽萌发成苗的能力虽不如 MS 培养基,但效果也较好;在 1/2 MS、Read、SH 和 White 培养基中,苗的长势均较差。史密斯桉在 MS 培养基中早期有明显的玻璃化现象,但后期不明显,无明显的不适应。

表 7　不同基本培养基对史密斯桉不定芽分化形成的影响

Table 7　Influence of different medium on adventitious bud differentiating

序号 Number	基本培养基种类 Medium	苗高 Seedling height / cm	苗的长势 Growing power	腋芽萌动状况 State of axillary bud	不定芽形成数 Number of adventitious bud	褐变 Browning	玻璃化现象 Glass bead
1	MS	7.0 Aa	+ + + + +	较好 Better	6～8	不明显 Undistinct	早期明显 Early distinct
2	1/2 MS	2.5 Bb	+ + +	一般 Commonly	2～3	不明显 Undistinct	不明显 Undistinc
3	1/4 MS	2.5 Bb	+ + +	一般 Commonly	2～3	不明显 Undistinct	无 No
4	1/8 MS	3.0 Bb	+ + +	一般 Commonly	2～3	不明显 Undistinct	无 No
5	Read	2.5 Bb	+ +	一般 Commonly	2～3	不明显 Undistinct	不明显 Undistinc
6	改良 Read Improving Read	3.0 Bb	+ + +	稍好 Good	2～3	不明显 Undistinct	不明显 Undistinc
7	Anderson	4.0 Bb	+ + + +	较好 Better	5～6	不明显 Undistinct	无 No
8	MccoNn	3.5 Bb	+ + + +	较好 Better	5～6	不明显 Undistinct	无 No
9	SH	2.0 Bc	+ +	差,苗生长速度慢,有枯叶出现 Bad and slow ,dread leaf	2～3	不明显 Undistinct	无 No
10	White	2.0 Bc	+ +	好,苗生长速度慢,有枯叶现象 Good and slow ,dread leaf	2～3	不明显 Undistinct	无 No

2.8　不同质量浓度 6-BA 对史密斯桉不定芽分化形成的影响

表 8 表明,低质量浓度的 6-BA 有利于不定芽的形成和不定芽的生长。当 6-BA 质量浓度为 0.1～0.5 mg/L 时,有利于史密斯桉不定芽的形成和生长,尤其当 6-BA 质量浓度为 0.1 mg/L 时,不仅不定芽长势好,而且茎段生长速度快,苗健壮;当 6-BA 质量浓度达到 0.7 mg/L 时,苗生长慢、纤细;

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

当6-BA质量浓度高达 1.0 mg/L 时,苗不仅纤细,而且出现畸形。

表 8 不同质量浓度 6-BA 对史密斯桉不定芽分化形成的影响

Table 8 Influence of different dense of BA on adventitious bud differentiating

激素种类及配比 Hormone category and combination	丛生芽切块形成不定芽数 Number of adventitious bud	不定芽长势 Growing power of adventitious bud	无菌苗茎段生长速度 Growing rapidity of stem
1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA	2～3	+ +	慢,苗较纤细,出现畸形 Slowly, thin, abnormal
0.7 mg/L 6-BA + 0.07 mg/L NAA	5～7	+ + +	慢,苗纤细 Slowly, thin
0.5 mg/L 6-BA + 0.05 mg/L NAA	5～6	+ + +	快 Fastly
0.3 mg/L 6-BA + 0.03 mg/L NAA	5～6	+ + +	快,苗壮 Fastly, strong
0.1 mg/L 6-BA + 0.01 mg/L NAA	7～10	+ + + +	最快,苗壮 Fastly, strong

2.9 不同质量浓度 NAA 与 6-BA 组合对史密斯桉不定芽分化形成的影响

由表 9 可知,NAA 与 6-BA 质量比为 1 ∶10 时,有利于史密斯桉不断形成不定芽,不定芽长势较好;NAA 与 6-BA 质量比为 1 ∶5 时,有利于史密斯桉茎段的快速生长,但不定芽长势一般。由此可知,NAA 与 6-BA 的质量比为 1 ∶10 时,对史密斯桉愈伤组织分化形成不定芽的效果最好。

表 9 不同质量浓度 NAA 与 6-BA 组合对史密斯桉不定芽分化形成的影响

Table 9 Influence of different dense of NAA and BA on adventitious bud differentiating

激素种类及配比 Hormone category and combination	m(NAA) : m(6-BA)	丛生芽切块形成不定芽数 Number of adventitious bud	不定芽长势 Growing power	无菌苗茎段生长速度 Growing rapidity of stem
0.5 mg/L NAA + 0.5 mg/L 6-BA	1 ∶1	5～6	+ + +	稍快 fastly
0.3 mg/L NAA + 0.5 mg/L 6-BA	3 ∶5	7～10	+ + +	慢 slowly
0.1 mg/L NAA + 0.5 mg/L 6-BA	1 ∶5	6～7	+ + +	最快 most fastly
0.05 mg/L NAA + 0.5 mg/L 6-BA	1 ∶10	7～10	+ + + +	慢 slowly
0.01 mg/L NAA + 0.5 mg/L 6-BA	1 ∶50	7～8	+ + +	稍快 fastly

2.10 不同转种周期对史密斯桉愈伤组织分化成芽的影响

由表 10 可知,接种 20 d 的愈伤分化成芽率最高,不定芽长势较好,褐化较轻;接种 10 d 的愈伤褐化不明显,但不定芽长势一般;接种 30 d 或 30 d 以上的愈伤组织褐化严重,愈伤死亡率高,愈伤分化成芽率低。方差分析结果表明,不同转种周期间的愈伤分化成芽率差异极显著($P < 0.01$)。

表 10 不同转种周期对史密斯桉愈伤组织分化成芽的影响

Table 10 Influence of different cycle of turning on adventitious bud differentiating

转种周期/d Cycle of turnning	愈伤分化成芽率/% Bud forming rate	不定芽长势 Bud growing power	愈伤褐变 Browning
10	15	+ + +	不明显 Undistinct
20	25	+ + + +	轻 Hight
30	5	+ +	严重 Severity
40	1	+	极严重 Most severity

2.11 激素种类及其质量浓度对史密斯桉不定芽分化成根的影响

由表 11 可知,在 1/2 MS 培养基中附加相同质量浓度 IBA、IAA 和 NAA,其中以 NAA 诱导不定芽分化成根的效果最好,不论是平均生根数,还是根的平均长度均优于 IBA 和 IAA 的诱导效果;IBA 的效果次之,IAA 效果最差。对不同质量浓度 NAA 诱导史密斯桉不定芽分化成根的效果进一步试验发现,以 1.0 mg/L NAA 的诱导效果最好。

表 11 激素种类及质量浓度对史密斯桉不定芽分化成根的影响

Table 11 Influence of different hormone category and thinkness on root forming

激素种类与浓度 Hormone category and thinkness	平均生根数 Number of roots	根平均长度/cm Length of roots	根径/cm Degree of finish
0.5 mg/L IBA	2	0.5	0.20
0.5 mg/L IAA	1	0.3	0.10
0.5 mg/L NAA	3	0.8	0.10
1.0 mg/L NAA	4	1.2	0.15
0.3 mg/L NAA	1	0.4	0.15
0.1 mg/L NAA	0.3	0.1	0.15

3 讨 论

史密斯桉种子较小,种皮较薄,对 $HgCl_2$ 较为敏感,用 0.1 mol/L $HgCl_2$ 作为消毒剂虽无菌率较高,但萌发率极低,仅为 0 %～15 %。用 1.54 mol/L NaClO 对史密斯桉种子消毒 30～50 min,不仅无菌率高,而且种子萌发率较高,最高可达 100 %。进一步的观察与研究发现,NaClO 有助于种皮软化、脱落,从而促进了种子的萌发[7]。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

本研究中,使用史密斯桉种子作外植体或用来源于种子的无菌苗茎段诱导愈伤组织或不定芽形成,褐化现象不明显,成功率较高,丛生芽切块形成的不定芽数高达 7～10。邱璐等[6]在史密斯桉愈伤组织诱导与分化中用老树萌枝幼茎作外植体,或用老树萌枝的幼茎诱导愈伤组织或不定芽,褐化死亡率高达 45 %～72 %,愈伤组织分化成苗率不超过 20 %,大量材料因褐化而死亡。这进一步说明,种子返幼状态好,不仅褐化不明显,而且细胞易于脱分化形成愈伤组织,再分化形成不定芽;而老树幼茎返幼状态差,不仅褐化严重,而且细胞难以脱分化形成愈伤组织,难以再分化形成不定芽[8]。

在本研究的基本培养基试验中,来源于史密斯桉种子的无菌苗茎段在 MS 培养基中苗高、苗的长势、腋芽萌发成苗的能力明显优于 Anderson 和 MccoNn 培养基[9],Anderson 和 MccoNn 培养基的效果明显优于 1/4 MS、1/8 MS、改良 Read 和 1/2 MS 培养基, Read、SH 和 White 培养基的效果最差,说明:(1)史密斯桉对大量元素的需求较高,更适合在高盐溶液中生长。MS 培养基中大量元素含量较高,是高盐培养基;Anderson 和 SH 是中盐培养基,相当于 1/2 MS 培养基; MccoNn、改良 Read、White、1/4 MS 和 1/8 MS 是低盐培养基。(2)史密斯桉对还原态氮 NH_4^+ 的需求量较高,其在 NH_4^+ ∶NO_3^- = 1 ∶2 的 MS 培养基中生长最好,在 NH_4^+ ∶NO_3^- = 1 ∶3 的 Anderson 培养基中生长次之,而在 NH_4^+ ∶NO_3^- = 1 ∶10 的 SH 培养基和只有 NO_3^- 不含 NH_4^+ 的 White 培养基中生长最差。(3)史密斯桉对 Ca^{2+}、Cl^- 的需求偏低,改良 Read 培养基的效果优于 Read 培养基,而改良 Read 培养基中的 $CaCl_2$ 含量(96 mg/L)仅为 Read 培养基中(440 mg/L)的 1/4。(4)史密斯桉对 Cu^{2+}、Co^{2+}、Mg^{2+}、Na^+ 和 S^{2+} 的需求量偏低,SH 和 White 培养基对史密斯桉不定芽分化的效果最差,而 SH 培养基中的 Cu^{2+}、Co^{2+} 含量是 MS 培养基的 5 倍;White 培养基中 S^{2+} 含量是 MS 培养基的 4 倍,Na^+ 含量是 MS 培养基的 10 倍,Mg^{2+} 含量是 MS 培养基的 3 倍[4]。由以上分析可知,在史密斯桉愈伤组织的诱导与分化中,建议使用改良 MS 培养基,将 $CaCl_2$ 含量由 440 mg/L 降为 96 mg/L,其他成分不变。

在植物组织培养中,6-BA 具有促进芽生长的作用,NAA 具有促进根生长的作用,NAA 与 6-BA 质量比的高低对外植体的发展起着决定性作用[10]。本研究中,当 NAA 与 6-BA 的质量比为 1 ∶1 时,有利于史密斯桉愈伤组织的形成;当 NAA 与 6-BA 的质量比为 1 ∶5 时,有利于史密斯桉茎段的快速生长,但不定芽长势一般;当 NAA 与 6-BA 的质量比为 1 ∶10 时,有利于史密斯桉不定芽的形成。单独使用生长素 2,4-D 或 2,4-D 与 NAA 组合,有利于愈伤组织的形成,单独使用生长素 NAA 或 IBA 时,有利于史密斯桉根的形成。

[参考文献]

[1] 曾德贤,刘永平,李　明,等. 史密斯桉不同种源的引种试验研究[J]. 西部林业科学,2004,33(3):1-11.

[2] 云南省林业种苗站. 史密斯桉种源实验林的生物量及桉油测定分析[J]. 西南林学院学报,2002,21(2):65-67.

[3] 李思广,张荣贵,蒋云东,等. 史密斯桉优良家系的早期选择研究[J]. 云南林业科技,2002,98(3):1-4.

[4] 康文玲. 史密斯桉栽培技术[J]. 林业科技,2003,24(6):17-18.

[5] 林雪坚,吴光金,程淑华,等. 桉树愈伤组织抗病性的测定及其快速繁殖研究[J]. 中南林学院学报,2003,23(6):117-120.

[6] 邱　璐,王　波,王志和,等. 史密斯桉愈伤组织诱导及分化[J]. 东北林业大学学报,2006,34(4):18-21.

[7] 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.

[8] 潘瑞炽. 植物组织培养[M]. 广州:广东高等教育出版社,2003:60-68.

[9] 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,1988:371-388.

[10] 颜昌敬. 植物组织培养手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1990:320-340.

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net