

NAA 与 6-BA 对黑金丝柚木组织培养的影响

李学东¹, 华 帅², 刘长安²

(1. 西双版纳州国家级自然保护区勐仑管护所, 云南 勐腊 666303; 2. 中国科学院西双版纳热带植物园热带植物资源可持续利用重点实验室, 云南 勐腊 666303)

摘 要: 通过对黑金丝柚木 *Tecton grandis* 带潜伏芽茎段的组织培养, 研究不同浓度配比 6-BA 和 NAA 对组培苗生长的影响。结果表明, 黑金丝柚木不定芽分化最佳培养基为 MS + 0.3 mg·L⁻¹ 6-BA + 0.6 mg·L⁻¹ NAA + 30 g·L⁻¹ 蔗糖 + 12 g·L⁻¹ 琼脂; 生根适宜培养基为 MS + 0.8 mg·L⁻¹ 6-BA + 0.5 mg·L⁻¹ NAA + 30 g·L⁻¹ 蔗糖 + 12 g·L⁻¹ 琼脂; 继代培养的最佳培养基为 MS + 0.5 mg·L⁻¹ 6-BA + 0.5 mg·L⁻¹ NAA + 30 g·L⁻¹ 蔗糖 + 12 g·L⁻¹ 琼脂。

关键词: 黑金丝柚木; 组织培养; 生长调节剂; 分化增殖

Doi: 10.3969/j.issn.1009-7791.2017.04.016

中图分类号: Q943.1

文献标识码: A

文章编号: 1009-7791(2017)04-0379-04

Effects of NAA and 6-BA on Tissue Culture of *Tecton grandis*

LI Xue-dong¹, HUA Shuai², LIU Chang-an²

(1. Menglun Administration of Xishuangbanna State Reserve, Mengla 666303, Yunnan China; 2. Key Laboratory of Tropical Plant Resources and Sustainable Use, Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Mengla 666303, Yunnan China)

Abstract: In this study, effects of different concentration of 6-BA and NAA on the growth of *in vitro* *Tecton grandis* seedlings were explored. The results showed that the optimum culture medium for adventitious bud differentiation was MS + 0.3 mg·L⁻¹ 6-BA + 0.6 mg·L⁻¹ NAA + 30 g·L⁻¹ sugar + 12 g·L⁻¹ agar; the best medium for rooting was MS + 0.8 mg·L⁻¹ 6-BA + 0.5 mg·L⁻¹ NAA + 30 g·L⁻¹ sugar + 12 g·L⁻¹ agar; and the optimum medium for subculture was MS + 0.5 mg·L⁻¹ 6-BA + 0.5 mg·L⁻¹ NAA + 30 g·L⁻¹ sugar + 12 g·L⁻¹ agar.

Key words: *Tecton grandis*; tissue culture; growth regulator; differentiation proliferation

黑金丝柚木 *Tecton grandis* 原产缅甸中部, 落叶大乔木, 高达 40 m, 树干光泽美丽、纹理通直, 耐朽, 芳香, 是世界最著名商用木材之一, 享有“万木之王”称号, 被缅甸称为“国宝”^[1]。蔡希陶教授于 1964 年从缅甸将黑金丝柚木引入我国, 目前在海南、云南、广东、广西、福建等省(区)有一定规模的种植。

黑金丝柚木的传统繁殖方式为种子繁殖, 但其种子产量较低, 且发芽率仅 5%, 天然林资源也日益枯竭, 导致其成为国内外市场上最短缺的珍贵木材之一^[2]。黑金丝柚木也可采取扦插和嫁接的方式进行苗木生产, 但繁殖系数较小, 且苗木生根率和成活率受季节影响较大。此外, 营养繁殖多代后, 常造成种性退化, 甚至病毒积累, 影响树木的生长和材质。利用组织培养技术培育优良无性系, 不仅能保持母本的优良特性, 而且可在短期内获得大量整齐均匀的健壮种苗。同时采用茎尖脱毒培养技术也可诱导无病毒植株, 提高良种的种性和生活力, 对黑金丝柚木优良遗传资源的保存有重要作用。

至今, 国内在柚木采种、育苗、造林和遗传改良等方面进行了 40 多年探索与研究, 其中“柚木栽培技术”和“柚木良种选育及配套技术”等多项成果已得到推广应用^[3]。但在组培中, 关于不同浓度配比的 6-BA (6-Benzylaminopurine) 和 NAA (1-Naphthylacetic acid) 对组培苗生长的影响尚未有报道。

收稿日期: 2017-07-26; 修回日期: 2017-09-08

基金项目: 国家自然科学基金(31470639)

作者简介: 李学东, 大专, 工程师, 从事林地生态学研究。E-mail: m13708610214@163.com

注: 华帅为通信作者。E-mail: huashuai@xtbg.org.cn

1 材料与方法

1.1 材料

从种植在中国科学院西双版纳热带植物园内的黑金丝柚木 *Tecton grandis* 中选取优良单株, 取其嫩芽作为外植体进行组织培养。

1.2 方法

1.2.1 外植体消毒 首先用 70%乙醇表面消毒 1 min, 再用高锰酸钾溶液浸泡 20 min, 用 75%乙醇浸泡 30 s, 然后用 0.2%氯化汞(吐温 2~3 滴)溶液浸泡 3 min, 最后用无菌水冲洗 4~5 次^[4]。

1.2.2 培养基 初代培养基: 按照配方将培养基各组分混合(MS + NAA + 蔗糖 + 琼脂), 熬煮后用 NaOH 溶液将 pH 值调至 5.8, 然后按照每瓶 20 mg 培养基分装至各培养瓶中, 高压灭菌(121 °C)后备用。

继代培养基: 在 MS 培养基中添加不同浓度配比的 6-BA 和 NAA。分别设计两组实验, A 组: NAA 为 0.5 mg·L⁻¹, 6-BA 浓度设置 5 个梯度 0、0.2、0.5、0.8 和 1.1 mg·L⁻¹; B 组: 6-BA 为 0.3 mg·L⁻¹, NAA 设置 5 个浓度梯度 0、0.2、0.6、1.0 和 1.4 mg·L⁻¹(表 1)。每梯度 10 瓶, 两组共 100 瓶。

培养基中均添加蔗糖 30 g·L⁻¹, 琼脂 12 g·L⁻¹。

1.2.3 培养条件 初代培养: 培养温度(31 ± 1)°C, 相对湿度 70%~80%, 光照时间 10 h·d⁻¹, 光照强度 1800~2000 lx。继代培养: 培养基 pH 为 5.7 ± 0.2, 培养温度(25 ± 2) °C, 相对湿度 70%~80%, 光照时间 12 h·d⁻¹, 光照强度 1800~2000 lx。

1.2.4 接种 初代培养: 将消毒外植体接于无菌培养基中, 每瓶 4 个, 每处理接种 10 瓶。

继代培养: 选取优良的无菌黑金丝柚木幼苗, 切取 2 cm 左右带潜伏芽的茎段接种于培养基中, 每瓶接种 4 个茎段, 每处理接种 10 瓶, 每 30~40 d 继代一次。

2 结果与分析

2.1 不同生长调节剂对比对愈伤组织诱导的影响

外植体接种 40 d 后观察愈伤组织诱导形成情况。在不同浓度 6-BA 处理中, A1 配方有利于组培苗增殖, 诱导率高达 82.5%(表 1); A3 配方生长较好, 愈伤组织疏松、大, 颗粒状较多, 有大量白色愈伤组织, 少量褐色与绿色愈伤组织, 诱导率 80.0%, 适合继代培养(表 1, 图 1: A)。在不同浓度 NAA 处理中, B3 配方愈伤组织比较疏松、大, 颗粒状较多, 绿色愈伤组织, 诱导率达 82.5%(表 1, 图 1: B)。

表 1 不同浓度 6-BA 和 NAA 对愈伤组织的影响
Table 1 Effects of different concentrations of 6-BA and NAA on callus

编号	生长调节剂浓度/mg·L ⁻¹		接种数 /个	诱导数 /个	诱导率 /%	愈伤组织形态
	NAA	6-BA				
A1	0.5	0.0	40	33	82.5	愈伤组织比较疏松、较大、颗粒状多, 大量的褐色愈伤组织, 少量的绿色愈伤组织
A2	0.5	0.2	40	30	75.0	愈伤组织比较密、小、颗粒状少, 褐色愈伤组织
A3	0.5	0.5	40	32	80.0	愈伤组织疏松、大、颗粒状多, 有大量的白色愈伤组织, 少量褐色与绿色愈伤组织
A4	0.5	0.8	40	25	62.5	愈伤组织致密、大、颗粒状多, 有大量的褐色和白色愈伤组织
A5	0.5	1.1	32	19	59.4	愈伤组织疏松、大、颗粒状多, 有大量的褐色愈伤组织
B1	0.0	0.3	36	22	61.1	愈伤组织致密、小、颗粒状少, 褐色愈伤组织
B2	0.2	0.3	40	27	67.5	愈伤组织疏松、小、颗粒状多, 白色愈伤组织
B3	0.6	0.3	40	33	82.5	愈伤组织比较疏松、大、颗粒状多, 绿色愈伤组织
B4	1.0	0.3	40	31	77.5	愈伤组织比较疏松、较大、颗粒状多, 大量褐色愈伤组织, 少量白色愈伤组织
B5	1.4	0.3	40	26	65.0	愈伤组织比较致密、较小、颗粒状较小, 褐色愈伤组织

注: A5 处理有 2 瓶污染, 有效接种数为 32 个, B1 处理有 1 瓶污染, 有效接种数为 36 个。

2.2 不同生长调节剂对比对不定芽分化的影响

继代培养 40 d 后, 在不同浓度 6-BA 处理中, A5 培养基不定芽分化数量最少, A1 培养基不定芽

分化数量最多(表 2, 图 1: C)。在不同浓度 NAA 处理中, B1 培养基不定芽分化数量最少, B3 培养基不定芽分化数量最多(表 2, 图 1: D~F)。

2.3 不同生长调节剂对比对幼苗生长和生根的影响

继代培养 40 d 后, 在不同浓度 6-BA 处理中, A3 培养基幼苗生长健壮, 叶色草绿, 根粗长, 生根适中, 为最佳培养基。A4 号培养基生根量多, 但幼苗纤细, 移植时不易成活(表 3, 图 1: G~H)。

在不同浓度 NAA 处理中, B1 培养基幼苗生长健壮, 叶色草绿, 根系短粗, 生根少, 适合移植易成活。B2 培养基适宜进行增殖培养。B3、B4、B5 培养基幼苗纤细, 无根系, 不适于分化和增殖培养(表 3, 图 1: I~K)。

表 2 不同浓度 6-BA 和 NAA 对不定芽分化的影响
Table 2 Effects of different concentrations of 6-BA and NAA on adventitious bud differentiation

编号	生长调节剂浓度/mg·L ⁻¹		接种数 /瓶	不定芽分化数 /个
	NAA	6-BA		
A1	0.5	0.0	10	49
A2	0.5	0.2	10	43
A3	0.5	0.5	10	46
A4	0.5	0.8	10	34
A5	0.5	1.1	8	25
B1	0.0	0.3	9	34
B2	0.2	0.3	10	42
B3	0.6	0.3	10	54
B4	1.0	0.3	10	51
B5	1.4	0.3	10	43

注: A5 处理有 2 瓶污染, 有效接种瓶数为 8 瓶; B1 处理有 1 瓶污染, 有效接种瓶数为 9 瓶。

表 3 不同浓度 6-BA 和 NAA 对苗和根的影响

Table 3 Effects of different concentrations of 6-BA and NAA on seedlings and roots

编号	生长调节剂浓度/mg·L ⁻¹		生根率 /%	苗和根的生长情况
	NAA	6-BA		
A1	0.5	0.0	0.0	苗生长健壮, 叶色草绿, 无根系
A2	0.5	0.2	45.0	苗生长健壮, 叶色草绿, 根细长
A3	0.5	0.5	65.0	苗生长健壮, 叶色草绿, 根粗长, 生根适中
A4	0.5	0.8	75.0	苗纤细, 叶色淡绿, 根细长, 生根量多
A5	0.5	1.1	60.0	苗纤细, 矮小, 叶色淡绿, 根细长
B1	0.0	0.3	37.5	苗生长健壮, 叶色草绿, 根系短粗, 生根少
B2	0.2	0.3	0.0	苗生长健壮, 叶色草绿, 无根系
B3	0.6	0.3	0.0	苗矮小, 茎粗, 叶色淡绿, 无根系
B4	1.0	0.3	0.0	苗矮小, 茎粗, 叶色草绿, 无根系
B5	1.4	0.3	0.0	苗矮小, 叶色墨绿, 无根系

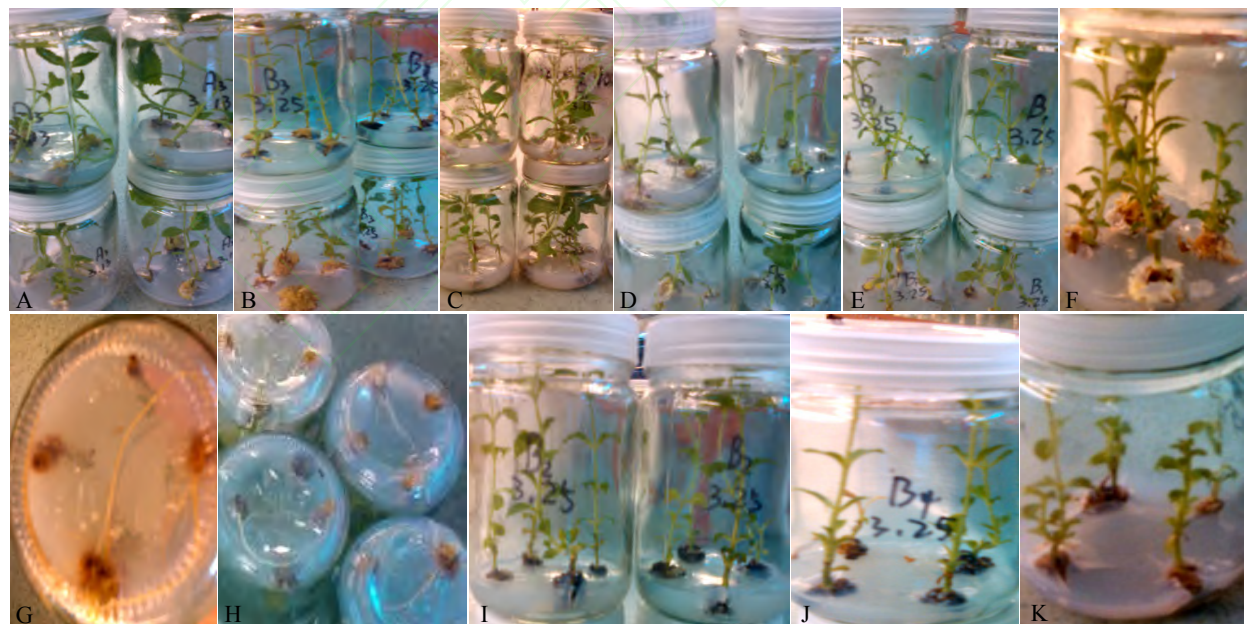


图 1 不同浓度 NAA 和 6-BA 对比对黑金丝柚木组织培养的影响

Fig. 1 Effects of 6-BA and NAA combination on callus initiation, bud differentiation and rooting in tissue culture of *Tecton grandis*

A. 0.5 mg·L⁻¹ NAA + 0.5 mg·L⁻¹ 6-BA 诱导愈伤组织; B. 0.6 mg·L⁻¹ NAA + 0.3 mg·L⁻¹ 6-BA 诱导愈伤组织; C. 0.5 mg·L⁻¹ NAA 不定芽分化; D. 0.5 mg·L⁻¹ NAA + 1.1 mg·L⁻¹ 6-BA 的不定芽分化; E. 0.3 mg·L⁻¹ NAA + 0.3 mg·L⁻¹ 6-BA 的不定芽分化; F. 0.6 mg·L⁻¹ NAA + 0.3 mg·L⁻¹ 6-BA 的不定芽分化; G. 0.5 mg·L⁻¹ NAA + 0.5 mg·L⁻¹ 6-BA 的生根; H. 0.5 mg·L⁻¹ NAA + 0.8 mg·L⁻¹ 6-BA 的生根; I. 0.2 mg·L⁻¹ NAA + 0.3 mg·L⁻¹ 6-BA 的生根; J. 1.0 mg·L⁻¹ NAA + 0.3 mg·L⁻¹ 6-BA 的生根; K. 1.4 mg·L⁻¹ NAA + 0.3 mg·L⁻¹ 6-BA 的生根

3 讨论

外植体消毒时间的确定是组织培养的关键环节。合适的消毒时间既能保证杀灭微生物又尽可能多的保存活组织细胞。如果接种材料大部分被污染,说明外植体的消毒时间不足,或是消毒剂浓度偏低;若接种材料虽然没有污染,但材料已经发黄,组织变软,表明消毒时间过长,组织被破坏死亡;接种材料若没有出现污染,且生长正常,即可认为消毒时间合适。本研究中经过消毒处理的培养材料在培养过程中并未出现污染过多或者发黄变软的情况,说明采用的消毒处理时间是适宜的。

影响柚木组织培养的因素主要有基本培养基、植物生长调节剂、培养条件等,其中植物生长调节剂是植物组织培养不定芽诱导和器官分化的关键因素,调节其水平和配比已成为提高组织分化频率的有效手段^[5-7]。6-BA主要作用是促进芽的形成、茎叶生长,也可诱导愈伤组织发生;NAA能促进细胞分裂与扩大,诱导形成不定根。本研究发现,MS + 0.3 mg·L⁻¹ 6-BA + 0.6 mg·L⁻¹ NAA + 30 g·L⁻¹ 蔗糖 + 12 g·L⁻¹ 琼脂培养基有利于不定芽分化;MS + 0.5 mg·L⁻¹ NAA + 30 g·L⁻¹ 蔗糖 + 12 g·L⁻¹ 琼脂培养基有利于组培苗增殖;MS + 0.8 mg·L⁻¹ 6-BA + 0.5 mg·L⁻¹ NAA + 30 g·L⁻¹ 蔗糖 + 12 g·L⁻¹ 琼脂培养基有利于培养组织生根;MS + 0.5 mg·L⁻¹ 6-BA + 0.5 mg·L⁻¹ NAA + 30 g·L⁻¹ 蔗糖 + 12 g·L⁻¹ 琼脂培养基有利于继代培养。

参考文献:

- [1] 吴征镒. 云南植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1977: 414—415.
- [2] 梁坤南,白嘉雨,周再知,马华明. 珍贵树种柚木良种繁育发展概况[J]. 广东林业科技, 2006,22(3): 85—90.
- [3] 马华明,梁坤南,周再知. 我国柚木的研究与发展[J]. 林业科学研究, 2003,16(6): 768—773.
- [4] 陈雄庭, Chee Kheng Hoy,郑学勤, Emilia Farida. 柚木离体快速繁殖技术[J]. 热带作物学报, 2001,22(3): 59—63.
- [5] 邓正正,王力华,王庆礼. 植物生长调节剂对水曲柳组培苗生长及内源激素的影响[J]. 东北林业大学学报, 2009,37(12): 10—13.
- [6] 宋玉霞,马洪爱,郭生虎,黄慧. 银河 I 号杨叶外植体不定芽再生体系的建立[J]. 西北植物学报, 2002,22(3): 661—666.
- [7] 詹祥灿. 植物体细胞胚状体与器官发生的激素调节[J]. 植物生理学报, 1983,9(3): 317—323.