

几种因子对邓恩桉组培中不定芽培养影响的研究*

王以红, 吴幼媚, 蔡 玲
(广西林业科学研究院, 广西 南宁 530001)

摘要: 以不同来源的外植体, 组培中采用不同的光源及光照强度、培养基加入抗氧化剂等为试验因子, 研究它们对邓恩桉组培中不定芽培养所产生的影响。研究结果表明, 以邓恩桉伐桩及干基环剥萌芽条作外植体, 其组培中初始不定芽的萌动率比用树冠新梢为外植体的高 54 % ~ 48 %。在邓恩桉组培中以采用自然光照而适宜其不定芽的继代培养。每次于 800 ~ 1 000 lux 弱光照下 7 ~ 10 天后再于 2 500 ~ 3 000 lux 强光照下培养, 不定芽生长良好。培养基中加入浓度为 10 ~ 15 mg/L 的抗坏血酸 Vc 和 15 ~ 20 mg/L 核黄素 VB₂, 有利于减缓或抑制其不定芽的褐化。不同的邓恩桉优树间, 其组培中不定芽的增殖生长有一定的差异, 培养 25 天时 5 株邓恩桉优树 GLD₁、GLD₂、GLD₃、GLD₄ 和 GLD₆ 不定芽的增殖系数为 2.8 ~ 3.4。

关键词: 邓恩桉; 组培; 不定芽培养

中图分类号: S 792.39 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-8246 (2008) 01-0025-05

Effects of Several Factors on Adventitious Bud Induction of *Eucalyptus dunnii*

WANG Yi-hong, WU You-mei, CAI Ling
(Guangxi Forestry Research Institute, Nanning Guangxi 530001, P. R. China)

Abstract: Experiments were conducted to study the effect of different explants, light source, light intensity and antioxidant on adventitious bud induction of *Eucalyptus dunnii*. The experimental results indicated that the bud germination ratio of sprouting branches was higher than that of crown new shoot. Natural illumination was good for the subsequent generation, the light of 800 ~ 1 000 lux (7 ~ 10d), then change to light of 2 500 ~ 3 000 lux was suitable for the growth of adventitious bud. Vc (10 ~ 15 mg/L) and VB₂ (15 ~ 20 mg/L) were helpful for slowing or restraining buds from getting brown. Adventitious buds from different superior plants exhibited differently in growth and multiplication, the multiplication rate of GLD₁, GLD₂, GLD₃, GLD₄ and GLD₆ was 2.8 ~ 3.4 times in 25d.

Key words: *Eucalyptus dunnii*; tissue culture; adventitious bud induction

邓恩桉 (*Eucalyptus dunnii*) 原产澳大利亚, 为桃金娘科桉属 (*Eucalyptus*) 的一种常绿乔木树种。20 世纪 80 年代末我国才在广西、福建、湖南和江西等省 (区) 对该树种进行系统的引种栽培测试, 是一种经引种筛选出的耐寒、速生的优良桉树树种。邓恩桉树干通直, 其木材材性好, 木质粗细中等而均匀, 纹理直, 主要用作纸浆材, 其次是锯

材。然而我国种植的邓恩桉开花结实率低, 难获大量种子进行实生繁殖, 而作扦插繁殖时, 其插条的生根又较难, 故国内的生产造林用种一直靠从国外原产地购进, 不仅价格昂贵且遗传性状不稳定, 严重制约了该树种的发展。为了解决造林上严重缺乏优良种苗的供需矛盾, 除应积极开展邓恩桉的早实丰产技术的研究外, 进行突破邓恩桉组织培养技术

* 收稿日期: 2007-08-21

广西科技厅科技攻关项目 (桂科攻 0235017-5), 耐寒桉良种邓恩桉脱毒及组培快繁技术研究。

第一作者简介: 王以红 (1957-), 女, 湖南人, 高级工程师, 主要从事林木生物技术方面的研究。

难关的研究也是当务之急。

Regina R Termignoni 等最早于 1996 年报道了邓恩桉的组织培养, 是以该树种的 3 日生种苗为材料, 在 B₅ 培养基上用 2, 4-D 等生长素以及水解酪蛋白诱导了其体细胞胚胎的发生。国内陈研华、易敏、欧阳磊、马英、王以红等相继对邓恩桉的组织培养做了研究, 主要是从其组培适用的基本培养基和植物激素两个方面来进行试验的。然而在邓恩桉组培的过程中, 还有诸多因子如光照、温度、维生素等会对其外植体不定芽的培养效果产生影响。为了进一步完善邓恩桉的组培快繁系列技术, 我们在基本完成邓恩桉组培再生植株研究的基础上, 针对不同外植体来源, 组培过程中的不同光源及光照强度、培养基中抗氧化剂的使用等几个因子, 研究了它们对邓恩桉组培不定芽的分化、增殖和生长所造成的影响。

1 试验内容与方法

试验材料: 为邓恩桉的伐桩萌芽条, 树基环割萌芽条, 树冠嫩梢, 组培的不定芽。

1.1 外植体的选制

从 9 年生的邓恩桉林木上, 分别以其树冠上部的新梢、树干伐后的留桩萌芽条以及在树干基部约 20 cm 处经半环割后而萌生的萌芽条, 作为本项组培试验的外植体材料, 将其剪切成带 1~2 个腋芽、长约 1.5~2.0 cm 的茎段, 用 70% 的乙醇消毒 10 s 后, 又用 0.1% HgCl₂ 再次消毒 10 min, 接种后获得无菌活外植体。

1.2 试验内容

(1) 不同来源外植体的初始不定芽诱导效应试验 以改良 B₅ + 6-BA0.5 mg/L + NAA0.2 mg/L 为诱导培养基, 将树冠新梢、伐桩萌芽条和环割萌芽的无菌活外植体分别作斜插式接种, 各接种 50 段, 培养 15 天时进行其初始不定芽萌动率的统计。

(2) 不同光源及光照强度对不定芽增殖效应试验 以自然光、日光灯和汞灯为参试的 3 种光源, 分设强度为 1 500~2 000 lux、2 000~2 500 lux、2 500~3 000 lux、3 000~3 500 lux 和 3 500~4 000 lux 共 11 个处理。以 500 mL 三角瓶为继代培养瓶, 每处理优树 GLD₁ 不定芽 2 瓶, 重复 3 次, 共 6 瓶。连续培养不定芽两个周期 (代), 每周期 25 天, 研究不同光源及其光照强度对邓恩桉组培过程的不定芽增殖效应。

(3) 抗氧化剂抑制不定芽褐化的效应试验

本项试验所用的抗氧化剂为抗坏血酸 Vc 和核黄素 VB₂, 此两种抗氧化剂的浓度配比分别为: 0 mg/L + 0 mg/L (对照 CK), 5 mg/L + 10 mg/L, 10 mg/L + 15 mg/L, 15 mg/L + 20 mg/L, 共设计 4 个处理, 每个处理优树 GLD₁ 不定芽 5 瓶, 重复 3 次, 共 15 瓶。以连续继代培养不定芽两个周期 (代), 每周期 25 天, 研究在培养基中加入不同浓度配比的抗坏血酸 Vc 和核黄素 VB₂ 对不定芽褐化的抑制效应。

(4) 不同优树不定芽培养效应对比试验

以改良 B₅ + 6-BA0.18 mg/L + NAA 0.14 mg/L + Vc10 mg/L + VB₂15 mg/L 为培养基, 将邓恩桉优树 GLD₁、GLD₂、GLD₃、GLD₄ 和 GLD₆ 的不定芽切割成单芽, 每瓶水平向接种 10 个, 每株优树计 5 瓶共 50 个单芽, 培养 25 天时以能切割剥离且长大于 0.5 cm 的单芽为计数标准, 统计芽的增殖系数, 并观察芽的生长状况。

1.3 培养条件

在设定的诱导培养基中添加蔗糖 30 g/L、琼脂 4 g/L, 用 NaOH 或 HCl 调节其 pH 值为 6.5~6.8, 在恒温 120℃ 和恒压 1.1 个大气压下消毒灭菌 15 min。培养室温度 26℃ ± 2℃, 多采用自然光照, 冬季因阴天自然光照不足时补充人工光照, 光照强度 800~3 000 lux, 接种前期于 800~1 000 lux 弱光下培养 7~10 天。

2 结果与分析

2.1 不同来源外植体的初始不定芽诱导效应

以 9 年生邓恩桉树冠上部的新梢、树干伐后留桩萌芽条以及树干基部环割萌芽条的茎段为外植体, 进行初始不定芽诱导培养试验, 培养 15 天时观察结果如表 1。

表 1 不同来源茎段外植体的初始诱导效果比较

Tab. 1 Adventitious bud induction of different explants

材料来源	外植体段数/段	污染、褐化、死亡段数/段	初始不定芽萌动段数/段	未萌动段数/段	萌动率/%
树冠新梢	50	15	5	30	10
伐桩萌芽条	50	11	32	7	64
环割萌芽条	50	14	29	7	58

表 1 的试验结果显示：源于林木不同部位的邓恩桉茎段外植体，或者是以不同方式获得的外植体，其初始不定芽的诱导效果存在着较大的差异。以树干伐后留桩萌芽条为外植体的诱导效果较好，培养 15 天时其初始不定芽的萌动率为 64 %，其次是以树干基部环割后的萌芽条作外植体者，其初始不定芽的萌动率为 58 %，诱导效果最差的是以 9 年生树冠上部新梢作外植体者，其初始不定芽的萌动率仅为 10 %。前两种外植体不定芽的萌动率比树冠新梢为外植体的高出 54 % ~ 48 %。此邓恩桉林木不同部位茎段外植体初始不定芽诱导效果的试验结果与巨尾桉树的以其树冠上部和下部枝条为外植体材料诱导培养的萌动效果极为相似。外植体来源于伐桩萌芽条或环割萌芽条，其初始不定芽的萌动率明显高于树冠新梢，分析认为这是不同外植体的成熟作用和位置效应表现之故。林木年龄越大，衰老越深，结实了的枝条再生作用降低，对组培分化不利。伐桩萌芽条与环割萌芽条的生理年龄比树冠新梢幼态，用其作外植体有利于初始不定芽的萌动和分化。再者，树干伐后其庞大的根系所吸收的大量养分促进了萌芽条的生长，使之长势旺盛，枝条粗壮。故用其萌芽条作组培的外植体初始的诱导效果就佳。而树干基部环割或半环割产生的萌芽条，由于其营养供给和分配受到制约，萌芽条生长较纤弱，用其作外植体初始芽的诱导效果稍微偏低，但与伐桩萌芽条为外植体的差异不大。

2.2 不同光源及光照强度对不定芽分化、生长的效应

以 3 种不同来源的光照及不同的光照强度进行了邓恩桉不定芽的培养试验，连续继代培养 2 代，每代 25 天共 50 天，其试验结果如表 2。

试验结果显示，不同来源的光照和光照强度对邓恩桉组培过程中不定芽的分化和生长影响很大，有利于不定芽分化、生长和增殖培养的光是自然散射光，由汞灯或日光灯制造的人工光照不太适宜其不定芽的生长，即使这两种光源的光照强度与自然光相同也是如此。在自然散射光照下，随着光照强度的增强，不定芽的质量也相应得到提高，表现为不定芽生长健壮，茎呈淡红色，叶片舒展，极少出现水肿玻璃化苗。分析认为，由于邓恩桉属阳性植物，此特性决定了该树种对光的需求和选择，使其的不定芽在形态上对自然光具有适宜性。然而，当自然光光照强度超过 3 500 lux 时，也会给其不定芽的培养带来不利影响，使芽过早的半木质化，茎

节粗短而难于抽长，长于 1 cm 的芽也呈下降趋势，有时因光照过强还会对芽造成日光灼伤。

表 2 不同光源和光照强度对不定芽培养的效应
Tab. 2 Effect of different light source and light intensity on adventitious bud induction

光源	光照强度 /lux	优质芽 /株·瓶 ⁻¹ ·	生长状态
日光灯	1 500 ~ 2 000	10	芽纤弱，叶片薄，不舒展，茎叶淡绿
汞 灯	1 500 ~ 2 000	13	芽纤弱，叶片薄，不舒展，茎叶淡绿
自然光	1 500 ~ 2 000	23	芽较弱，叶片舒展，茎叶淡绿
日光灯	2 000 ~ 2 500	28	少量芽出现玻璃化，顶芽叶片细小，不舒展
汞 灯	2 000 ~ 2 500	31	少量芽出现玻璃化，顶芽叶片细小，不舒展
自然光	2 000 ~ 2 500	54	极少出现玻璃化，芽生长正常，叶片舒展
日光灯	2 500 ~ 3 000	29	芽生长较好，叶片舒展，茎半木质化较低
汞 灯	2 500 ~ 3 000	32	芽生长较好，叶片舒展，茎半木质化较低
自然光	2 500 ~ 3 000	77	芽健壮，茎淡红，半木质化好，叶片舒展
自然光	3 000 ~ 3 500	65	芽健壮但粗短，茎淡红，叶片舒展
自然光	3 500 ~ 4 000	41	芽特别粗短，茎淡红，叶片舒展

注：* 为培养瓶为 500 mL 三角烧瓶；芽高 1 ~ 1.5 cm 半木质化的芽为优质芽。

2.3 抗氧化剂对不定芽褐化的抑制效应

邓恩桉组培的不定芽在接种操作及其培养过程中，从切口处分泌出的多酚化合物往往容易被氧化，使培养基变成褐色而改变营养成分；或形成不利于芽生长的有毒物质；或阻碍芽对其营养的吸收；而使芽失去活力导致生长不良；或随着培养时间的延长不定芽的顶部、叶片出现褐化而成为无效芽，严重时还会导致芽丛死亡。为了减缓或抑制不定芽发生褐化，在培养基中加入一定量的抗氧化剂，使芽能在继代培养周期内正常生长。其不定芽在添加不同浓度的抗坏血酸 Vc 和核黄素 VB₂ 的培养基上，连续继代培养 2 代，每代周期 25 天，不定芽的生长状况如表 3。

试验结果表明，进行邓恩桉的组培时在培养基中加入一定量的抗坏血酸 Vc 和核黄素 VB₂ 抗氧化

剂,对减缓培养基和不定芽的褐化是非常有利的,其不定芽褐化的时间和程度明显好于不加抗氧化剂的对照(CK),尤以加入 Vc、VB₂ 而浓度配比为 10 mg/L + 15 mg/L 和 15 mg/L + 20 mg/L 的效果最佳,其对延缓或抑制不定芽褐化和培养基褐化的作用十分明显。研究还发现,此间光照强度大会加快抗坏血酸 Vc 和核黄素 VB₂ 的功能失效,从而削弱抗氧化剂对不定芽褐化的抑制作用,因此在邓恩桉组培继代培养的前一个星期内,以较弱光照培养,有利于延长其抗氧化剂的作用从而达到减轻或抑制不定芽褐化的效果。

表 3 抗氧化剂抑制不定芽褐化的效应

Tab. 3 Effect of antioxidants to slow or restrain from getting brown

Vc + VB ₂ /mg · L ⁻¹	褐化程度	不定芽生长状况
5 + 10	++	培养第 5 天,部分芽丛切口处发褐,第 10 天培养基开始变褐,第 13 天,部分芽丛芽尖或叶尾开始并渐渐褐化。
10 + 15	+	培养第 12 天,未见培养基变褐,第 15 天极个别芽尖或叶尾轻度褐化,但芽丛生长健壮。
15 + 20	+	培养第 12 天,未见培养基变褐,培养第 17 天极个别芽尖或叶尾轻度褐化,但芽丛生长健壮。
CK	+++	培养第 3 天,芽丛切口处发褐,第 7 天培养基开始变褐,第 12 天芽尖或叶尾开始并渐渐褐化,20 天时半数芽褐化。

注: + 为轻度, ++ 为较严重, +++ 为严重。

2.4 不同优株不定芽继代培养的增殖效应

分别将邓恩桉 5 株优树 GLD₁、GLD₂、GLD₃、GLD₄和 GLD₆ 的不定芽切割成单芽,于改良 B₅ + 6-BA0.18 mg/L + NAA 0.14 mg/L + Vc10 mg/L + VB₂15 mg/L 条件下进行继代培养,其不定芽的生长和增殖效果见表 4。

邓恩桉 5 株优树在其组培的继代培养过程中,各优树间无论是不定芽的增殖系数还是生长表现未有较大的差异。在 25 天继代周期内,优树 GLD₁、GLD₂、GLD₃ 和 GLD₄ 不定芽的增殖系数较高,分别为 3.1、3.3、3.4 和 3.0,只有 GLD₆ 不定芽的增殖系数较低,为 2.8。不定芽的生长状况以 GLD₁ 和 GLD₂ 的最好,叶色绿,叶片舒展,芽生长健壮,GLD₄ 和 GLD₆ 的不定芽次之,叶片比较薄,叶色淡绿,不定芽生长较纤细的是 GLD₃,其

茎节稍长,叶片略小。

表 4 不同优树不定芽的生长和增殖效果

Tab. 4 Adventitious bud growth and multiplication of different superior plants

优树 序号	芽接种 数/颗	芽增殖 数/颗	增殖 系数	不定芽生长状况
GLD ₁	50	155	3.1	芽生长健壮,叶片舒展
GLD ₂	50	165	3.3	芽生长健壮,叶片舒展
GLD ₃	50	172	3.4	芽生长较细弱,节间稍长,叶片小
GLD ₄	50	150	3.0	芽生长较健壮,节间较短,叶片较薄
GLD ₆	50	142	2.8	芽生长较健壮,叶片较大、较薄

3 结论与讨论

(1) 源于邓恩桉树桩萌芽条或环割萌芽条的外植体,其组培初始不定芽的萌动率明显高于用邓恩桉树冠新梢作外植体。以前两种萌芽条作外植体者,其初始不定芽的萌动率分别为 64 % 和 58 %,而以树冠新梢作外植体者其初始不定芽的萌动率仅为 10 %。此由外植体材料自身的成熟作用和位置效应等生理因素所决定。从实际出发最好是将邓恩桉优树进行树干环割,以获取其萌芽条作为组培外植体材料,此举既可保留下邓恩桉的优树,又可获得组培不定芽萌动率较高的萌芽条。

(2) 与人工光照相比,自然散射光更适宜邓恩桉组培过程中不定芽的分化、生长和增殖培养。其不定芽的生长质量总体上是随着光照强度的增强而相应地提高,芽生长健壮,极少出现水肿玻璃化苗,优质芽的数量也增加。分析认为由于邓恩桉属阳性喜光植物而决定了自身对光的选择和需求。但当自然光照强度超过 3 500 lux 时,会使其组培不定芽的培养带来不利的影响,使芽过早的半木质化,在形态上表现为茎节短,粗壮矮小,给接种时的切割操作带来不便,更不利于不定芽的继续培养,因此邓恩桉组培过程中,不定芽的生长和增殖宜在弱光照与强光照交替下进行,即在每周继代培养中,前期 7 ~ 10 天于 800 ~ 1 000 lux 弱光照下培养,使不定芽适度地抽生长,后期于 2 500 ~ 3 000 lux 强光照下培养,使不定芽生长健壮。

(3) 在行植物组织培养中有部分植物容易产

生不定芽褐化现象。邓恩桉组培中不定芽在继代培养时也会出现褐化。建议除采取如解剖刀要锋利,加快转管频率,缩短培养周期等常规措施外,在作邓恩桉的组培时,可在其培养基中加入一定量的抗氧化剂如抗坏血酸 Vc 和核黄素 VB₂,对抑制其不定芽的褐化非常有利。以混合加入 10~15 mg/L 的抗坏血酸 Vc 和 15~20 mg/L 核黄素 VB₂ 比较适宜,对抑制其不定芽的褐化及培养基褐化的作用十分明显,培养第 15 天虽有极个别的芽丛上部或叶尾出现轻度褐化,但不影响芽丛的正常生长和增殖。较强的光照会加速抗氧化剂的失效,因此建议一是培养基消毒后置于暗光下冷却存放,二是在继代培养前期于弱光照下培养,这正好与使不定芽抽生长生长的目的相一致。

(4) 由邓恩桉不同优树所建立的组培无性系之间,其不定芽的分化、生长和增殖表现有一定的差异,但差异不十分明显。在 25 天继代培养周期内,优树 GLD₁、GLD₂、GLD₃ 和 GLD₄ 不定芽的增殖系数较高,分别为 3.1、3.3、3.4 和 3.0,只有 GLD₆ 不定芽的增殖系数较低为 2.8。其存在的差异是由邓恩桉优树各自的遗传特性和生理活性不同而决定的,因此在进行邓恩桉组织培养时,为了获

得最佳的培养效果,对不同的无性系还需作培养基的全面调试和进行主要影响因子的研究。

参考文献:

- [1] 黄绿荷,何增明. 邓恩桉引种栽培及繁殖研究进展[J]. 作物研究,2004(5):448-450.
- [2] 李志辉,刘跃进. 湖南桉树引种研究与推广应用[J]. 湖南林业科技,2003,30(3):16-19.
- [3] 陈研华,林文革,李海花,等. 邓恩桉的组培技术[J]. 林业科技开发,2004,18(1):34-35.
- [4] 易敏,冉隆贤,汤历. 邓恩桉的组织培养技术研究[J]. 广东林业科技,2005,21(2):19-21,25.
- [5] 欧阳磊. 邓恩桉组培生根影响因子的研究[J]. 福建林学院学报,2006,26(1):78-82.
- [6] 范贤熙,胡秀,王奇,等. 木本切花植物极美泰洛泊的组织培养研究[J]. 西部林业科学,2006,35(2):86-89.
- [7] 马英,刘友全,欧阳磊. 邓恩桉组培中影响继代增殖条件的研究[J]. 林业科技开发,2006,20(1):16-18.
- [8] 王以红,吴幼媚,蔡玲. 邓恩桉下胚轴培养和植株再生的研究[J]. 广西林业科学,2005,34(4):167-169,178.