

4个桉树无性系愈伤诱导和分化

裘珍飞¹, 曾炳山¹, 李湘阳¹, 刘英¹, 查志刚²

(1. 中国林业科学研究院热带林业研究所, 广东 广州 510520; 2. 安徽黄山市森林病虫害防治检疫站, 安徽 黄山 245000)

关键词: 桉树; 愈伤诱导; 再生率

中图分类号: S723.1

文献标识码: A

Induction and Differentiation of Four *Eucalyptus* Clones *in vitro* Culture

QIU Zhen-fei¹, ZENG Bing-shan¹, LI Xiang-yang¹, LIU Ying¹, ZHA Zhi-gang²

(1. Research Institute of Tropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Guangzhou 510520, Guangdong, China;

2. Huangshan Forest Pest Control Quarantine Station, Huangshan 245000, Anhui, China)

Abstract: The *in vitro* plantlet leaves and stems of 4 elite *Eucalyptus* clones commonly cultivated in production were used as explants to study the callus induction and differentiation under different callus induction time, in order to establish an effective callus regeneration system. The results showed: The clones Eg5 and DH201-2 leaf callus induced for 45 d were suitable for differentiation of adventitious buds, with the highest regeneration rate of 70.0% and 63.3% respectively. 20 d and 15 d were the best induction times for leaf callus inducing and stem callus inducing of clone GL9, with the regeneration rates of 66.7% and 63.3% respectively. The best regeneration rate of DH3229 was 16.7% from stem callus induced for 30 d. There were significant differences in regeneration rate among the 4 clones. Clones Eg5, DH201-2, and GL9 were easy to regenerate compared with DH3229. No obvious difference was found in regeneration rate of leaf callus and stem callus from same clone.

Key words: *Eucalyptus*; callus induction; regeneration rate

桉树 (*Eucalyptus* L'Hérit.) 是世界三大树种之一, 随着生物技术的发展, 桉树转基因研究正以前所未有的速度发展, 而不同的种、无性系胚性愈伤诱导的难易和植株再生能力的强弱直接影响转基因工程实施的进程。尾巨桉 (*E. urophylla* S. T. Blake × *E. grandis* W. Hill ex Maiden) 无性系 DH3229、巨尾桉 (*E. grandis* × *E. urophylla*) 无性系 GL9、巨桉 (*E. grandis* W. Hill ex Maiden) 无性系 Eg5 和尾赤桉 (*E. urophylla* × *E. camaldulensis*) 无性系 DH201-2 是我国南方地区广泛推广应用的桉树无性系, 因其高产, 高效, 适应性广, 为社会创造了巨大的经济效益。经过长期的生产实践, 同时也反映出各无性系的缺

点和不足, 如 DH201-2 易感枝瘿姬小蜂, Eg5、GL9 和 DH3229 抗寒性有待提高。桉树用作纸浆材, 需要降低木质素, 增加纤维素含量, 这些问题急需通过转基因的技术实现解决。愈伤组织再生技术的突破是开展转基因实践的重要环节。关于桉树愈伤再生, 国内外已有较多成功的研究。欧阳权等^[1]以改良 H + 2,4-D1.0 mg · L⁻¹ + KT1.0 mg · L⁻¹ + 蔗糖 40 g · L⁻¹ 为诱导培养基, 改良 H + 6BA0.2 mg · L⁻¹ + NAA0.5 mg · L⁻¹ 为分化培养基, 获得雷林 1 号胚状体再生芽; 石大兴等^[2]以改良 H + 2,4-D1.0 mg · L⁻¹ + 6BA1.0 mg · L⁻¹ + NAA0.5 mg · L⁻¹ 获得巨桉下胚轴 8% 的愈伤再生; 谭德冠等^[3]以改良 H +

6BA0.5 mg · L⁻¹ + NAA0.5 mg · L⁻¹ 获得刚果1号 (*E. 12ABL*) 54% 再生;宛淑艳等^[4]以 MS + IAA20 mg · L⁻¹ + NAA 0.5 mg · L⁻¹ 获得尾叶桉 (*E. urophylla* S. T. Blake) 43% 的再生;巴西 Luis 等^[5]以 MS + TDZ 0.44 mg · L⁻¹ 培养基诱导愈伤,以 SP + 6BA 1.13 mg · L⁻¹ + NAA 0.09 mg · L⁻¹ 为分化培养基获得巨尾桉子叶 50% 以上的再生,美国 M. M. Subbaiah 等^[6]以 B 5 mg · L⁻¹ + BA 0.5 mg · L⁻¹ + NAA 3 mg · L⁻¹ 培养基诱导愈伤,以修改 WP + BA 0.5 mg · L⁻¹ + PVP 500 mg · L⁻¹ + 10% 椰乳获得细叶桉 (*E. tereticornis* Smith.) 愈伤再生。以上研究主要集中在基本培养基和外源激素的筛选上,而影响桉树愈伤再生的因素还有基因型、外植体类型、培养条件等多种因素,本试验在筛选基本培养基和外源激素的基础上^[7-9],进一步深入研究愈伤诱导时间对愈伤再生率的影响,为提高再生率,实施转基因研究打下良好基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

材料选自中国林业科学研究院热带林业研究所组培室大规模生产的 DH3229、GL9、Eg5 和 DH201-2 无性系组培苗,生根培养 20 d,茎段和叶片的选取依从范春节等^[7]试验结果,叶片选取从顶端数第 2~3 片叶,切去叶尖,保留叶柄,茎段选取中上部节间,切除带腋芽的节。

1.2 试验方法

1.2.1 基本培养基和培养条件 生根培养基为 1/2 MS + ABT1 号 1 mg · L⁻¹,愈伤诱导培养基为改良 MS + TDZ 0.04 mg · L⁻¹ + IBA 0.1 mg · L⁻¹,愈伤分化培养基为改良 MS + 6 BA 0.2 mg · L⁻¹,所有培养基添加蔗糖 30 g · L⁻¹,卡拉胶 7.0 g · L⁻¹。试验培养温度(25 ± 2) °C,光照强度 2 500 lx,光照时间 10 h · d⁻¹。

1.2.2 试验材料培养和生长状况比较 选取生长状态相似,高 1.0~1.5 cm 的 4 个无性系增殖苗单芽接入生根培养基上,每无性系接种 60 瓶,每瓶接种 20 株。生根培养 20 d,每无性系随机抽取 6 瓶,调查株高及顶端第 2~3 片叶长和最宽处叶宽,其余生根苗为提供叶片、茎段诱导愈伤之用。

1.2.3 叶片、茎段愈伤诱导 分别切取 Eg5、DH201-2、GL9 和 DH3229 叶片、茎段接入愈伤诱导培养基,放入培养室诱导培养 15、20、25、30、35、40、

45 d,取出培养获得的愈伤组织块,用自来水漂洗表面附着的培养基,滤纸吸干表面水分,称量愈伤组织的质量。

1.2.4 叶片、茎段愈伤分化培养 切取 Eg5、DH201-2、GL9 和 DH3229 叶片、茎段接入愈伤诱导培养基,按 15、20、25、30、35、40、45 d 诱导培养时间,分别把叶片、茎段愈伤材料转入分化培养基,每处理分化培养 30 d 后调查再生率。

再生率 = 产生芽的材料数/接种材料数 × 100 %。

1.3 数据统计与分析

叶片、茎段愈伤诱导和分化试验每瓶培养基接种 6 个材料,每处理 5 瓶,共 30 个材料,重复 3 次。数据利用 SAS 分析软件进行处理,文中百分率数据分析时经过反正弦变换。

2 结果与分析

2.1 参试材料的生长状况

4 个无性系的苗木在生根培养基上都获得正常的生长,发根时期集中于接种后 5~10 d,发根后苗木进入快速生长期,20 d 时达到生长高峰,表现为苗秆挺拔,叶片宽大、平展。4 个无性系在株高和最宽处叶宽无显著差异 ($P_r = 0.25$ 和 0.14),说明容易获得基本一致的茎段材料,第 2~3 片叶长存在显著差异 ($P_r < 0.001$),叶长差异通过切割叶尖获得大小一致的叶片材料。试验用材为苗木中上部茎段和顶部第 2~3 片叶,是植株中最长茎段和最宽叶片,这样选材既有利于愈伤培养和再生,也十分利于接种操作。

2.2 叶片、茎段愈伤诱导

4 个无性系叶片、茎段接种在相同的愈伤诱导培养基上,获得 100% 的愈伤诱导率。在诱导培养 15 d 后,通过每 5 d 称量 1 次愈伤质量,获得 4 个无性系 0~45 d 的叶片、茎段愈伤生长量(图 1、2)。4 个无性系叶片愈伤的生长表现为:首先在叶柄和叶尖锐切口形成愈伤,后在叶片内部产生愈伤,最后整叶形成愈伤组织。比较 4 个无性系叶片愈伤生长量:15、20 d 时,无显著差异 ($P_{r_{15d}} = 0.21$, $P_{r_{20d}} = 0.57$),说明在选材基本一致的前提下,叶片愈伤早期生长无性系间差异不显著。25 d 后愈伤生长分化为 2 种类型,即 Eg5、DH201-2 增速较缓,GL9 和 DH3229 增速较快,到 45 d 时,DH3229 和 GL9 的愈伤生长量显著大于 Eg5 和 DH201-2 ($P_{r_{45d}} = 0.0009$)。

茎段愈伤生长表现为:首先两端切口逐渐膨大,

形成黄色紧密型的愈伤小球,后逐渐长大形成块状愈伤。比较4个无性系茎段愈伤的生长量可得:15、20 d时,Eg5和DH201-2的生长量大于DH3229和GL9($Pr_{15d}=0.03, Pr_{20d}=0.01$),25、30、35 d时Eg5和DH201-2愈伤生长量增速平缓,DH3229和GL9增速加快,致使25~35 d时4个无性系愈伤生长量的差异不显著,而40、45 d时,DH3229和GL9愈伤

继续快速生长,显著大于Eg5和DH201-2的生长量($Pr_{40d}=0.003, Pr_{45d}=0.0006$)。

愈伤生长与接种方式有关,叶片以背面接触培养基,平坦放置在培养基表面愈伤生长较快,茎段也以平行放置在培养基表面,切口容易生长愈伤,而插入培养基的切口不容易生长愈伤。

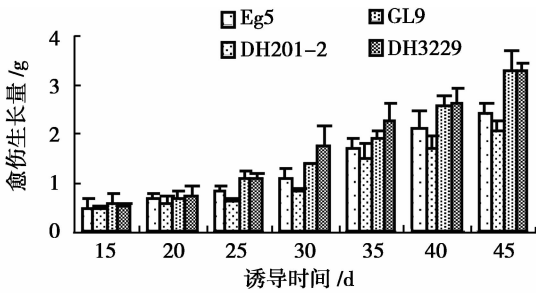


图1 4个无性系叶片愈伤生长量

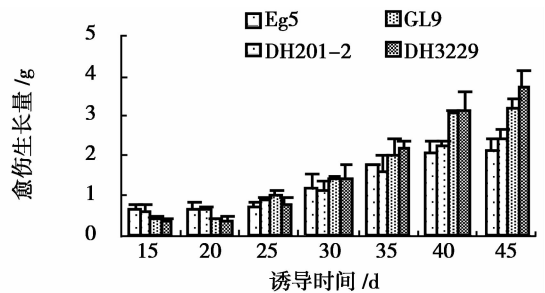


图2 4个无性系茎段愈伤生长量

2.3 愈伤诱导时间对分化率的影响

15~45 d不同诱导时间获得的愈伤转入分化培养基,30 d后调查分化率,结果(表1)表明:愈伤诱导时间不同对4个无性系叶片、茎段愈伤再生率有显著影响。叶片愈伤再生中:Eg5各诱导时间都能获得一定的再生率,但以诱导45 d再生率最高,达70.0%;DH201-2愈伤分化规律为在诱导15~20 d时愈伤再生率为0,诱导25 d以上的愈伤开始分化,并随诱导时间增加,再生率提高,45 d时获得最高为63.3%的再生率;GL9愈伤分化规律为诱导15~20 d的愈伤容易分化,再生率高达

53.3%~66.7%,而诱导时间超过25 d,愈伤完全失去分化能力;DH3229只有在诱导30 d时获得3.3%的少量分化,其它各时期再生率为0。茎段愈伤再生中:Eg5除诱导40 d愈伤没有分化,其它诱导时间都获得一定的再生率;DH201-2以诱导15~20 d再生率较低,25 d以上的愈伤再生率提高;GL9以诱导15 d获得的愈伤再生率最高,达63.3%,随着诱导时间增加,再生率降低,45 d时为0;DH3229茎段愈伤除在15 d诱导时间没有分化外,其它都能获得少量分化,并以诱导30 d再生率最高为16.7%。

表1 4个无性系不同愈伤诱导时间的再生率

诱导时间 /d	叶片愈伤再生率/%				茎段愈伤再生率/%			
	Eg5	DH201-2	GL9	DH3229	Eg5	DH201-2	GL9	DH3229
15	53.36b	0.0c	53.3b	0.0a	30.0a	3.3b	63.3a	0.0b
20	46.7bc	0.0c	66.7a	0.0a	29.2a	3.3b	50.0a	10.0ab
25	36.7c	56.7a	0.0c	0.0a	6.7ab	33.3a	3.3b	3.3ab
30	46.7bc	30.0b	0.0c	3.3a	20.0a	30.0a	6.7b	16.7a
35	36.7c	46.7a	0.0c	0.0a	3.3ab	26.7a	3.3b	3.3ab
40	43.3bc	60.0a	0.0c	0.0a	0.0b	23.3a	3.3b	3.3ab
45	70.0a	63.3a	0.0c	0.0a	16.7a	40.0a	0.0b	10.0ab

注:表中数据为平均值;同列数据后不同小写字母表示不同诱导时间下再生率的差异($Pr < 0.01$)。

2.4 4个无性系再生率差异性比较

选择每个无性系叶片、茎段最佳诱导时间获得的最高再生率进行双因子方差分析,结果(表2)表明:4个无性系间愈伤再生能力差异显著,而同一无性系叶片和茎段间差异不显著。总体上4个无性系再生能力可划分为3个等级,其中Eg5最高再

生率达70.0%,各诱导时间的愈伤都能分化,属容易再生基因型,GL9和DH201-2最高再生率分别为66.7%和63.3%,但对愈伤诱导时间有严格的要求,属比较容易再生的基因型,DH3229最高再生率为16.7%,且叶片再生率多为0,属难以再生基因型。比较相同无性系叶片、茎段愈伤再生能

力,存在一定的规律性,即容易再生的无性系,叶片愈伤再生率略高于茎段,难以再生的无性系,茎段愈伤再生率高于叶片。

表2 4个无性系叶片、茎段再生率方差分析

变差来源	自由度	平方和	均方	F 值	Pr > F
模型	7	6 650.3	950.1	8.23	0.000 3
无性系间	3	5 030.2	1 676.7	14.5	<0.000 1
叶片、茎段间	1	247.7	247.7	2.15	0.16
误差	16	1 846.6	115.4		
总计	23	8 496.9			

3 结论与讨论

基本培养基和激素的筛选决定能否诱导愈伤和实现愈伤再生芽,愈伤诱导时间筛选能进一步优化愈伤再生体系,提高愈伤再生率。与前人的试验结果相比,DH201-2 无性系叶片最佳诱导时间的再生率从 48.3%^[7] 提高到 63.3%,GL9 无性系最佳诱导时间的再生率从 20.2%^[9] 提高到 66.7%,Eg5 无性系最佳诱导时间的再生率达 70.0%,这为转基因研究打下了良好的基础。DH3229 无性系再生率较低,这可能是由基因型决定,本实验室对其开展了多种其它试验,未获得再生率更高突破,也可能还未找到适合其愈伤再生的培养方法和条件,有待进一步研究。

大部分研究者采用间接再生的方法建立桉树的再生体系^[1-3,5-6,9],即在诱导培养基上诱导愈伤,在分化培养基上再生芽;也有人采用直接再生^[4,7],即在诱导培养基上完成愈伤诱导和分化。试验中也发现部分在诱导培养基上愈伤再生出芽的现象,特别是 Eg5 和 DH201-2 无性系,在愈伤诱导 45 d 时,有 10% 以上的直接再生率。直接再生实验过程简单,但再生出芽时间长且不够统一,对再生率随诱导时间增加而降低的基因型不适合采用。间接再生出芽时间短且统一,再生率稳定性高,还可以通过在分化培养基中添加耶乳^[6]、氯化钴^[9] 等物质进一步提高再生率。

GL9 叶片、茎段愈伤和 DH3229 叶片愈伤生长量随诱导时间增加快速增长,而再生率随诱导时间增加快速下降,说明诱导时间超过 25 d 后快速生长的愈伤为非胚性愈伤,非胚性愈伤的快速发展一方面容易掩埋前期产生的胚性愈伤,另一方面可能是较长时间的 TDZ 诱导对 GL9 胚性愈伤产生不可逆转的再生抑制^[9]。

参考文献:

- [1] 欧阳权,曾炼武,李洁汉. 桉树组培育苗新技术[J]. 广西科学, 1994,1(3):49-59
- [2] 石大兴,石铁松,王米力,等. 巨桉下胚轴诱导不定芽与植株再生的研究[J]. 四川农业大学学报, 2002,20(3):184-187
- [3] 谭得冠,庄南生,黄华孙. 刚果 12 号桉愈伤组织的诱导与再生植株快繁体系的构建[J]. 热带作物学报,2005,26(3):24-28
- [4] 宛淑艳,陈文渊,何晓玲. 尾叶桉茎段再生系统建立[J]. 基因组学与应用生物学,2010,29(5):937-942
- [5] Luis P B C, Adriane C M G, Silvia B R C. Plant regeneration from seedling explants of *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla* [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1999, 56: 17-23
- [6] Subbaiah M M, Minocha S C. Shoot regeneration from stem and leaf callus of *Eucalyptus tereticornis* [J]. Plant Cell Reports, 1999,9: 370-373
- [7] 范春节,曾炳山,裘珍飞,等. 尾赤桉叶片及茎段的离体培养与植株再生[J]. 福建林学院学报,2009,29(1):74-78
- [8] 范春节,曾炳山,裘珍飞,等. 尾赤桉 DH201-2 遗传转化体系建立的研究[J]. 浙江林业科技,2009,29(4):15-20
- [9] 裘珍飞,曾炳山,李湘阳,等. TDZ 对巨尾桉(GL9)胚性愈伤组织诱导和再生的影响[J]. 林业科学研究,2009,22(5):740-743