

贝克桉组织培养的初步研究

张兆合¹, 逯 昀², 孙景梅^{2,3}, 侯 佳³

(1. 商丘中等专业学校, 河南 商丘 476000; 2. 商丘职业技术学院, 河南 商丘 476000 3. 西南林学院 资源学院, 云南 昆明 650224)

摘 要:以贝克桉(*Eucalyptus baker*)无菌苗的半木质化带未萌发腋芽的茎段为试验材料, 用不同消毒处理对贝克桉外植体进行灭菌, 并进行愈伤组织及丛生芽产生的初步研究。结果表明: 贝克桉茎段外植体洗刷干净后使用 75%乙醇溶液灭菌 30 s, 无菌水冲洗 3 次, 每次 3 min; 后再用 0.1% HgCl₂ 分二步消毒, 每次处理 2 min, 每次消毒后用无菌水冲洗 3 次, 每次 3 min。这种处理方法污染率相对较低, 褐变程度最小。在改良 MS+6-BA 0.2 mg/L+IBA 0.2 mg/L+蔗糖 30 g/L+卡拉胶 6 g/L+AC 2 g/L 的培养基上培养 1 个月后可诱导贝克桉茎段愈伤组织的生成。

关键词: 贝克桉; 灭菌方法; 褐变

中图分类号: S 792.39 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001—0009(2010)13—0151—03

桉树(*Eucalyptus*)为桃金娘科(Myrtle family)桉属, 原产澳大利亚和印度尼西亚及菲律宾几个岛屿的高大乔木。因其生长快、适应性强、用途广而被世界上百余个国家和地区广泛引种栽培, 是目前世界上最重要的木纸浆原材料之一, 也是我国南方沿海地区最主要的造林树种及发展速生丰产林的战略树种。作为当今世界上三大速生树种之一, 它的特点主要表现在: 材质坚硬, 是造纸、造船的良好材料; 繁殖容易, 速生丰产; 种类多, 抗逆性强, 较耐贫瘠。除上述特点外, 桉树的叶子可用于生产桉叶油, 树皮可用于提取树脂, 残渣培养食用菌后还可当肥料, 而花是良好的蜜源^[1]。

桉树的组培技术具有能保持母体的优良特性, 繁殖系数大, 生长期短等特点, 尤其在种源缺少的条件下能很快地满足市场需求, 因而是桉树快速繁殖的一个重要途径。但组培技术要求严格的无菌操作, 使得成本比较高, 对大面积造林不利于产出经济效益, 因此目前生产通常使用组培方法培育扦插母株作为扦插的扩大材料, 然后通过扦插繁殖生产大量苗木营造速生丰产林。桉树组培的成功, 对解决一些难以生根或无法采用扦插方法增繁无性系的树种的繁殖问题有重要借鉴作用。

但是桉树茎段的组培也存在着外植体灭菌不彻底, 易发生褐变等问题。桉树茎段接种后, 切口处易产生褐色渗出物, 使茎段周围的培养基变成棕褐色, 插入培养基里的基部褐变而失去生命力, 导致外植体死亡^[2]。

贝克桉, 作为桉树的一种, 具有桉树的主要特点, 并主要用于生产桉叶油, 所以该试验在探讨不同消毒处理

第一作者简介: 张兆合(1955-), 男, 河南商丘人, 本科, 高级讲师, 现主要从事果树栽培的教学与研究工作。E-mail: zhang3101588@126.com。
收稿日期: 2010-03-05

Study on the Conditions of 2-DE Analysis of Proteome in Grape Leaves

ZHANG Yu-jie ZHANG Jun-ke, LUO Shi-xing

(College of Horticulture, Northwest Agricultural and Forestry University; Key Lab of Northwestern Horticultural plant Germplasm Resource Application of Ministry of Agriculture, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract: The method system of 2-dimensional electrophoresis (2-DE) of protein in grape leaves was studied, the results of 2-dimensional electrophoresis from different procedures of isoelectric focusing, different immobilized pH gradients strips and with different SDS-PAGE gel concentration were compared. The results showed that isoelectric focusing procedure B, immobilized pH gradients (IPG) strip with the linear range of pH 4~7 and 12% SDS-PAGE gel were the better choice, more than 143 protein spots were separated in one run.

Key words: grape; proteome; two-dimensional electrophoresis

对贝克桉外植体灭菌程度及褐变程度影响的前提下,对贝克桉的组织培养进行了初步的研究,为贝克桉通过组织培养手段增繁无性系的后续试验奠定了一定的基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 外植体材料 以半木质化但未萌发腋芽的茎段为外植体。

1.1.2 培养基 试验使用的培养基为改良的 MS 培养基(蔗糖 30 g/L、卡拉胶 6 g/L、AC 2 g/L、pH 5.8)。使用的生长调节剂物质有:6-BA、IBA。

1.1.3 主要仪器设备 高压灭菌锅,无菌超净台,干燥箱,电子天平及相关的玻璃器皿和药品等。

1.2 试验材料

将挑选好的茎段除去部分叶片和顶芽后,剪切成带 1~2 个腋芽、长约 1.5~2.0 cm 的小段,先用清水将附着于枝条表面的泥土等清洗干净,然后用沾有肥皂粉或洗洁精的软毛刷刷洗 2 min,后置于纱布里放在自来水下冲洗 1 h。

1.3 试验设计

1.3.1 试验方法 以改良后的 MS 为基本培养基,附加 IBA 0.2 mg/L 和 BA 0.2 mg/L,在 25℃暗培养条件下进行丛生芽产生及愈伤组织诱导的初步研究。同时,在所有试验中的培养基附加蔗糖含量 30 g/L,卡拉胶含量 6 g/L,AC 含量 2 g/L, pH 5.8。

1.3.2 试验设计方案 将处理好的茎段在超净工作台上先用 75%乙醇浸泡 30 s,无菌水清洗 3 次,每次 3 min;再用 0.1% HgCl₂ 消毒。试验设计 2 种处理,每种处理分 2 次消毒:即 0.1% HgCl₂ 消毒 1 min+1 min,0.1% HgCl₂ 消毒 2 min+2 min;每次消毒后用无菌水清洗 3

次,每次 3 min,后用滤纸吸干表面水分并将茎段及叶的切口端剪去一部分后接入诱导培养基中。每瓶培养基中接种 3 个外植体,每种处理共接种 45 个外植体,每种处理重复 2 组。具体设计见表 1。不定期地对外植体的污染、褐化动态进行观察记录,接种 30 d 后统计外植体的污染率、褐化死亡率和无菌活外植体存活率。污染率%=(污染外植体数/总外植体数)×100%;褐化率%=(褐化外植体数/总外植体数)×100%;存活率%=(成活外植体数/总外植体数)×100%。

表 1 试验设计

处理	0.1% HgCl ₂ 消毒 / min	接种培养基/瓶	
		I	II
1	1+1	15	15
2	2+2	15	15

2 结果与分析

2.1 不同消毒方法对贝克桉外植体灭菌效果的影响

表 2、3 结果表明,处理 1 和处理 2 对贝克桉外植体灭菌均有一定的效果,且处理 2 的消毒效果比处理 1 的消毒效果稍好,但差距不大;而 2 个重复组的差距较大,说明这 2 种消毒方法对贝克桉外植体灭菌效果无显著差异性影响,而试验材料的选择对贝克桉外植体灭菌效果有一定的影响。此外,这 2 种消毒方法对贝克桉茎段组培褐变都表现出很好的抑制作用。

表 2 不同消毒方法对贝克桉外植体灭菌效果的影响

处理	灭菌效果					
	污染率 %		褐化率 %		存活率 %	
	I	II	I	II	I	II
1	53.3	26.7	0.0	0.0	46.7	73.3
2	60.0	13.3	0.0	0.0	40.0	86.7

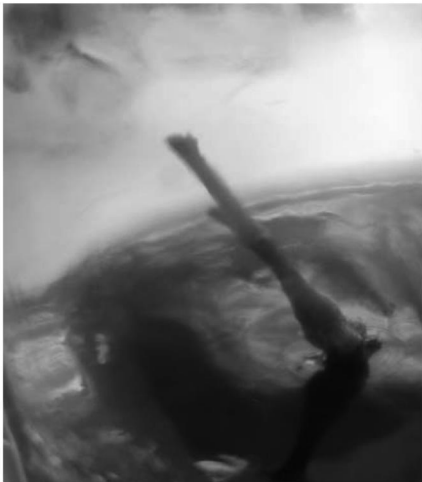


图 1 贝克桉茎段愈伤组织

表 3 不同消毒方法对贝克桉每个处理
每组的外植体灭菌的影响

	处理 1	处理 2	I	II
总污染率/ %	80.0	73.3	113.3	40.0
平均污染率/ %	40.0	36.7	56.7	20.0

2.2 改良 MS 培养基对丛生芽产生及愈伤组织诱导的影响

经过 1 个月的培养发现,在改良 MS 培养基+IBA 0.2 mg/L+6-BA 0.2 mg/L+蔗糖 30 g/L+卡拉胶 6 g/L+AC 2 g/L 上外植体茎段的基部发生膨大,变黄,有愈伤组织生成(如图 1 所示)。

3 小结与讨论

改良 MS 培养基+IBA 0.2 mg/L+6-BA 0.2 mg/L+蔗糖 30 g/L+卡拉胶 6 g/L+AC 2 g/L 虽没有表现出对丛生芽产生的诱导作用,但使得外植体茎段的基部发生膨大,产生黄色的愈伤组织,为今后进一步研究由贝

克桉茎段诱导愈伤组织的生成奠定了基础。

2 种消毒处理,即 0.1% HgCl₂ 消毒 1 min+1 min, 0.1% HgCl₂ 消毒 2 min+2 min 对贝克桉茎段外植体消毒均有一定的效果,但二者没有显著差异性影响,而重复组之间差异较大,说明试验材料的选择对贝克桉外植体灭菌效果有一定的影响。另外这 2 种消毒方法对贝克桉茎段组培褐变都表现出很好的抑制作用。

试验也说明了以贝克桉茎段为外植体诱导丛生芽的产生确实有一定的困难,但试验中出现的类似愈伤组织也说明了以贝克桉茎段为外植体诱导愈伤组织的生成是可能的。

参考文献

[1] 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.
[2] 祁述雄. 中国桉树[M]. 北京: 中国林业出版社 2002.

Preliminary Study of Tissue Culture of *Eucalyptus baker*.

ZHANG Zhao-he¹, LU Yun², SUN Jing-me^{2,3}, HOU Jia³

(1.Shangqiu Secondary School, Shangqiu, Henan 476000; 2. Shangqiu Vocation and Technology College, Shangqiu, Henan 476000; 3. College of Resource Sciences of Southwest Forestry, Kunming, Yunnan 650224)

Abstract: Taking the non-vaccines half lignification belt of not sprouted the axial bud and the stem section of *Eucalyptus baker*, the pile cutted down with the spiral spring and the no-sprouteing axial bud of the branch of *Eucalyptus dunnii* as the material, processed with the different disinfection to the explant of *Eucalyptus baker* to carry on antiseptically, and carried on the preliminary study of recovering the wound to organize and to grow thickly which the bud produces. The result indicated: after the explant of *Eucalyptus baker* scrubbing cleanly, used 75% ethyl alcohol solution antiseptic 30 s, the sterilized water flushed three times, each time 3 minutes; Latter used 0.1% HgCl₂ to divide two steps again to disinfect, each time processed 2 minutes, after each time disinfecting, flushed with the sterilized water three times, each time 3 minutes. the pollution rate of this kind of processing method was relatively low, the browning degree was the lowest. Raised one month later, the culture medium of the improved MS+6-BA 0.2 mg/L+IBA 0.2 mg/L+sucrose 30 g/L+Kara rubber 6 g/L+AC 2 g/L might induce the production of the injury-organization of the stem section from *Eucalyptus baker*.

Key words: *Eucalyptus baker*; sterilization methods; browning