

# 大戟科主要木本油料植物组培快繁中 初代诱导研究进展

冯邦朝<sup>1</sup>, 黄艳<sup>2</sup>, 朱镜如<sup>2</sup>, 罗克明<sup>2,3</sup>

(1. 百色学院 化学与生命科学系, 广西 百色 533000; 2. 西南大学 生命科学学院 资源植物研究所, 重庆 400715;  
3. 西南大学 生命科学学院, 三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆 400715)

**摘要:**从组培快繁工厂化育苗的角度, 通过查阅相关文献资料, 从外植体、基本培养基、外源激素以及培养条件等方面, 对油桐、乌桕、麻疯树的组织培养快繁技术中的初代芽诱导进行了综述和分析, 概括总结出适合工厂化生产的初代芽诱导的技术特点, 并提出初代诱导中尚需解决的问题, 为建立成熟、稳定、高效的组培快繁体系提供参考。

**关键词:**大戟科; 木本油料植物; 初代诱导

**中图分类号:**Q 813. 1<sup>+</sup>3 **文献标识码:**A **文章编号** 1001—0009(2012)23—0196—04

大戟科是产油植物的大科, 从草本到大乔木都有油料植物, 其中研究最多、生产上比较重要的是油桐、乌桕、麻疯树三大木本植物。组织培养快繁技术是目前大戟科植物研究的一项重要内容。用组织培养法繁殖植物具有繁殖周期短、繁殖速度快, 能够进行苗木脱毒, 培养条件可以人为控制并进行工厂化育苗, 因而其应用越来越广泛<sup>[1]</sup>。组织培养快繁技术环节中, 初代芽的诱导

是关键性的环节, 诱导出的初代芽苗的质量、数量决定着整个组培快繁流程的效率与产品质量。现通过查阅相关文献资料, 从外植体、基本培养基、外源激素以及培养条件等方面, 对油桐、乌桕、麻疯树的组织培养快繁技术中的初代芽诱导进行了综述和分析, 试图概括总结出适合工厂化生产的初代芽诱导的技术特点, 并提出初代诱导中尚需解决的问题, 为建立成熟、稳定、高效的组培快繁体系提供参考。

## 1 外植体的选择

### 1.1 外植体的种类

无性繁殖是保持品种优良特性的必要途径。经过有性阶段、愈伤组织阶段产生的植物器官, 容易产生变异, 所以生产上一般采用优良株系的营养器官做外植体。初代芽诱导的方法有 2 种, 1 种是外植体原有的芽直接萌动形成芽苗, 包括顶芽和腋芽; 另 1 种外植体诱导出不定芽。不定芽再生有直接途径和间接途径。直接途径是在外植体组织上直接分化出不定芽, 不经过愈

**第一作者简介:**冯邦朝(1966-), 男, 广西靖西人, 本科, 农艺师, 现主要从事资源植物的教学与科研工作。E-mail: fbch66@163. com.

**责任作者:**罗克明(1974-), 男, 重庆潼南人, 博士, 教授, 博士生导师, 现主要从事转基因植物基因的删除及植物转录因子调控及林木育种等研究工作。E-mail: luokeming@hotmail. com.

**基金项目:**人事部留学回国人员科技活动择优资助项目; 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(XDJK2009B018); 重庆市自然科学基金资助项目(2009BA1004); 重庆市自然科学基金“直通车”资助项目(CSTC, 2009BB004)。

**收稿日期:**2012—08—31

## The Applied Research Progression of SSR in Studying Parentage Relationship of *Pyrus* L.

LU Min<sup>1</sup>, TANG Hao-ru<sup>2</sup>, LUO Ya<sup>2</sup>, ZHANG Yong<sup>2</sup>, LIU Ze-jing<sup>2</sup>

(1. College of Agriculture, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025; 2. College of Horticulture, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014)

**Abstract:** SSR markers have been utilized extensively in study of parentage relationship of *Pyrus* L., including parentage relationship in the genus, in the species, and in the cultivated varieties. It's of great importance in study of parentage relationship in *Pyrus* L. .

**Key words:** *Pyrus* L. ; SSR; parentage relationship

伤组织阶段。间接途径先产生愈伤组织,再分化出不定芽,这种方法容易发生变异。初代芽诱导2种方法的直接途径,因为不经过愈伤组织阶段,能够保持母株的性状,是工厂化生产普遍采用的方法。

不同的外植体类型,离体诱导的成功率有很大的差异。一般认为,材料愈年幼进行营养繁殖就愈容易。所以一般选择当年生嫩枝、幼叶或者未成熟种子,容易诱导成功。现阶段乌桕、麻疯树、油桐的组织培养所用的外植体种类较多,有①成龄树半木质化茎段,如带腋芽茎段、顶芽、茎尖及叶片;②种子及离体胚萌发的小苗的幼叶、顶芽、茎段、上胚轴、下胚轴、胚根;③离体胚、胚乳、子叶、子叶柄;④花药。第②~④类外植体都经过有性阶段,不适宜作为工厂化育苗的外植体。所以,工厂化育苗采用的外植体为优良品种(品系)的茎段、顶芽、茎尖及叶片,通过以芽生芽及直接诱导出不定芽的方式,获取具有母株优良性状的初代芽苗,作为增殖继代的材料。有试验证明,以8a生乌桕优树母株枝条腋芽茎段为外植体,直接以芽生芽的方式培养,芽诱导率可达85.4%,繁殖系数跟经过愈伤组织培养后再诱导分化出芽苗的方式类似<sup>[2]</sup>。不定芽诱导难度较顶芽及腋芽的诱导难度大,但可选的外植体来源丰富,叶片、叶柄、茎、根等都能进行切段培养产生大量的不定芽。

## 1.2 茎段的年龄和着生部位

到目前为止,有关成龄树无性材料外植体直接诱导出芽的试验不多。陈剑勇等<sup>[3]</sup>、郅亚微等<sup>[4]</sup>认为,乌桕萌孽条中部未木质化部分的茎段是理想的外植体材料。刘均利等<sup>[5]</sup>的试验证实,在春季(3月)对麻疯树树干基部进行截干处理,萌发的半木质化枝条是最适宜的外植体材料,平均萌芽率为30.1%;越靠近树干基部的枝条,萌芽率越高,树干上部的萌芽率,仅20.2%。张淑华等<sup>[6]</sup>认为,以顶芽与含节茎段进行微体繁殖,茎段的丛生芽再生率与芽体增殖率都高于顶芽,培养21d,平均每个茎段可产生4.7~5.2个丛生芽,最多可产生10个以上。抽出的芽体在适当培养基培养上10d可发根,且完全没有愈伤组织产生,可解决一般麻疯树发根伴生大量愈伤组合而影响苗木品质的问题。李化等<sup>[7]</sup>以成龄树1~2cm茎尖作外植体,效果也令人满意。

## 2 外植体灭菌

茎段及叶片的灭菌流程:先用加入洗洁精或洗衣粉的自来水浸泡10~30min,自来水冲洗1~2h,再用75%酒精消毒,接着用0.1%升汞消毒,无菌水冲洗3~5次。掌握好酒精消毒和升汞处理的时间,是消毒成功的关键。幼嫩的材料相对较老的材料更容易受消毒液的毒害,同时,幼嫩组织材料积累的菌类比老组织少,因而,以幼嫩组织为诱导材料时,理论上应尽量缩短消毒时间,减少毒害。较老的材料积累的外生菌和内生菌较

多,不易消毒,消毒时间应延长。随着消毒剂处理时间的增加,污染率呈下降趋势的,但因消毒液对组织细胞的毒害作用,存活率和萌芽率也下降了。因此,应根据外植体的成熟成度,综合考虑成活率和污染率来决定合适的消毒时间。一般酒精处理时间为30s,影响消毒效果与存活率的最主要因素是升汞处理时间。

### 2.1 酒精处理后0.1%升汞1次处理

郅亚微等<sup>[4]</sup>则认为,乌桕半木质化茎段先用70%酒精消毒30s,再用0.1%升汞处理时间10min最佳,污染率可以降到26.5%,而存活率达到50.0%,李建科等<sup>[8]</sup>进行同样的处理,结果显示,0.1%升汞灭菌10min的污染率(12.5%)比处理8min的(27.5%)低2倍多。郅亚微<sup>[9]</sup>在另文中又认为,乌桕带芽幼嫩茎段仅以0.1%升汞处理8min的,效果不如先以70%酒精30s,再用0.1%升汞处理8min的。蒋泽平等<sup>[2]</sup>用70%的酒精对带芽茎段消毒30s,再用0.1%升汞处理时间11min时,污染率可降到18.5%,存活率最高达80.1%。但当处理时间达到13min时,植物组织细胞受到伤害,组织死亡率增加、存活率下降。以油桐叶片作外植体时,可用75%的酒精消毒5min,再用0.1%升汞处理8min<sup>[10]</sup>。

### 2.2 酒精处理后0.1%升汞2次处理

刘均利等<sup>[5]</sup>认为,以麻疯树优株萌条为外植体,先用75%酒精浸泡20s,再用0.1%升汞连续2次消毒(3+3)min为适宜方法(升汞3min,无菌水冲洗3次,再用升汞处理3min,冲洗5次,污染率13.8%,褐化率8.4%)。韩珊等<sup>[11]</sup>也认为,乌桕茎段先用70%酒精消毒30s,再用0.1%升汞灭菌时,分2次共处理8min效果好,污染率为40.7%,较1次处理8min的(81.1%)降低了近1倍。陈剑勇等<sup>[3]</sup>则认为,茎段消毒以6%次氯酸钠20min与0.1%升汞8min溶液交替使用效果最好,外植体褐化程度轻,存活率高(77.5%);0.1%升汞分2次消毒共15min效果次之,单纯用0.1%升汞一次消毒15min效果最差,存活率仅为29.17%。

### 2.3 其它消毒方法

陈金洪等<sup>[12]</sup>取麻疯树茎段用自来水冲洗1~2h后,直接用75%酒精浸泡10min,不需升汞处理。卢彰显等<sup>[10]</sup>则将油桐茎段和叶柄冲洗后,不经过酒精浸泡,直接用2.5%的次氯酸钠消毒20min,叶片则用75%的酒精消毒5min,再用0.1%升汞处理8min。蒋祥娥等<sup>[13]</sup>采取的乌桕茎段消毒方法则是,在70%酒精溶液中表面消毒30s,再用3%次氯酸钠溶液消毒15~20min。这些方法,均未见污染率及成活率说明。

## 3 基本培养基的选择

常用的基本培养基为MS、1/2MS、WPM、B5。刘均利等<sup>[5]</sup>认为,基本培养基对麻疯树茎段芽的启动影响很

大,在 MS、1/2MS、B5 之间进行比较,以 1/2MS 上萌芽率最高(40.1%),其次为 MS 培养基(27.4%),最差的是 B5 培养基(17.6%)。MS 培养基上虽然芽体青绿,但基部均有变黑现象,芽苗出现了较明显的褐化现象。B5 培养基上的芽苗同样存在这样的问题。说明 1/2MS 比 MS 更适于麻疯树的芽诱导。蒋泽平等<sup>[2]</sup>、鄢亚微等<sup>[4]</sup>认为,基本培养基对乌柏茎段腋芽诱导率的影响极其显著,3 种基本培养基(WPM、MS、B5)中,以 WPM 基本培养基效果最好,其次为 MS,最差为 B5。以上的结果虽略有差异,但都说明茎段芽诱导以 WPM、1/2MS 为基本培养基效果较好,B5 不适宜做为茎段诱导的基本培养基。

#### 4 外源激素对芽的诱导的影响

不同外植体的出芽诱导,对外源激素的组合和浓度配比的要求是有差异的。对茎段芽形成的诱导,不必添加外源激素,即有较高的出芽率(75.0%),说明茎段的内源激素已足以诱导芽的形成。IBA 对茎段芽的形成不是必需的,含 6-BA 而无 IBA 的培养基可诱导芽的产生。在基本培养基中添加 6-BA,可使诱导芽正常生长,没有停止生长和死亡现象,这说明芽的继续生长还需要添加一定的外源激素,以补充消耗的内源激素<sup>[12]</sup>。目前试验中使用的浓度范围为:6-BA 0.5~2.5 mg/L, NAA 0.03~0.2 mg/L, IBA 0.1~0.5 mg/L。茎段芽诱导,6-BA 与 IBA 的比值为(10~25):1,6-BA 与 NAA 的比值为(5~25):1。叶片不定芽诱导,6-BA 与 NAA 的比值为 33:1。

##### 4.1 茎段直接诱导出芽

4.1.1 在不含生长素的培养基中诱导 陈金洪等<sup>[12]</sup>取 20 a 麻疯树的嫩枝茎段作外植体,MS 基本培养基利于不定芽的诱导与形成,不必添加外源激素,即有较高的出芽率,出芽率可达 75.0%,但是,所产生的芽很细小,生长缓慢,如在原来培养基中继续培养,有部分芽甚至枯竭死亡。含 6-BA 而无 IBA 的培养基可诱导芽的产生,可能是因为不同外植体的内源激素也有很大的区别。刘均利等<sup>[5]</sup>的试验表明,成龄麻疯树带芽茎段,启动培养的最佳培养基是 1/2 MS+6-BA 0.5 mg/L,萌芽率为 45.8%。张姗姗等<sup>[14]</sup>取油桐无菌苗茎段在 MS+6-BA 1.5 mg/L + KT 0.5 mg/L 和 MS+6-BA 1.0 mg/L+KT 0.2 mg/L 上培养 60 d,每个茎段周围产生的丛生芽平均为 5 个,丛生芽粗短、健壮。以上培养基都不含生长素,这也证明 IBA 对茎段芽的形成不是必需的。

4.1.2 在含有生长素的培养基中诱导 诱导乌柏腋芽萌发有效芽的最佳培养基配方为 WPM+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L,加入 GA<sub>3</sub> 2.0 mg/L,可有效增加腋芽萌发的长度。幼嫩的茎段还可以诱导不定芽,在培养基

MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L 下培养,诱导率可达 51.9%<sup>[9]</sup>。蒋祥娥等<sup>[13]</sup>认为,以成年乌柏树当年萌发的新梢茎段作外植体进行初代诱导,最佳培养基为 WPM+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L,顶芽腋芽萌发,基部的愈伤组织形成丛状不定芽,成活率达 90%。以 8 a 生乌柏优树母株的腋芽茎段作外植体,芽诱导最佳培养基为 WPM+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L,30 d 后的诱导率可达 85.4%<sup>[2]</sup>。麻疯树茎段芽的诱导,MS+6-BA 2.5 mg/L+IBA 0.1~0.5 mg/L 是最佳的芽增殖激素组配<sup>[12]</sup>。李化等<sup>[7]</sup>认为,麻疯树茎段作外植体时,以 MS+6-BA 2.0 mg/L+IBA 0.05 mg/L+AgNO<sub>3</sub> 1.0 mg/L 的组合最好,单个外植体单增殖率为 6.05%,加入硝酸银是为了防止褐化,减少畸形苗,促进芽的分化。

##### 4.2 叶片不定芽的诱导

唐军荣等<sup>[15]</sup>认为,在 MS 培养基中,单独使用分裂素 6-BA 或者 KT 与生长素 NAA 的组合诱导叶片产生不定芽的效果都不好。MS+6-BA 1.00 mg/L+KT 1.00 mg/L+NAA 0.03 mg/L 的组合对不定芽的诱导效果最好,诱导率达 90%。

#### 5 培养条件的选择

##### 5.1 温度

初代培养的温度范围为 25~28℃,大多数试验采用(25±2)℃。光照强度足够时,在一定温度范围内,芽苗会随温度的增高而逐步健壮。

##### 5.2 光照

常用的光照强度为 1 500~3 000 lx,光照时间为 12~16 h/d。刘均利等<sup>[5]</sup>认为,成龄树的带芽茎段,腋芽诱导的光照强度在 2 000~3 000 lx 时,平均芽增殖倍数为 3.5,显著高于 1 500~2 000 lx 时的 3.1。在 800~1 500 lx 的弱光条件下,芽苗均会出现变黄和玻璃化现象。红叶乌柏成龄树茎段,接种后暗培养 1 周后再转入光照培养,成活率最高、褐化最低。直接光照培养褐化最高,成活率最低<sup>[11]</sup>。

#### 6 问题与展望

从目前的研究进展看,油桐、乌柏、麻疯树组织培养技术中的初代诱导环节仍是快繁体系中的瓶颈,使得工厂化育苗在实际操作中有很大局限性。今后应该加强研究的关键问题,一是外植体污染率控制;二是外植体褐化及芽苗玻璃化现象的研究及克服;三是提高外植体消毒后的存活率;四是提高外植体增殖率;五是加强无性系材料不定芽直接诱导的研究。

##### 参考文献

- [1] 李胜. 植物组织培养原理与技术[M]. 北京:化学工业出版社,1987.
- [2] 蒋泽平,倪竞德,张敏,等. 乌柏优选单株的离体快速繁殖技术研究[J]. 江苏林业科技,2011,38(5):7-10.



- [3] 陈剑勇,李宝银,周俊新,等. 乌柏茎段诱导组培快繁技术研究[J]. 福建林业科技,2009,36(2):259-262.
- [4] 鄢亚微,徐有明,李学琴,等. 能源林树种乌柏茎段离体培养与快速繁殖[J]. 东北林业大学学报,2009,37(12):8-9.
- [5] 刘均利,郭洪英,陈炙,等. 麻疯树茎段组织培养研究[J]. 四川林业科技,2011,32(3):23-31.
- [6] 张淑华,何政坤. 生物质能源植物麻疯树之组织培养[J]. 林业研究专讯,2009,16(2):57.
- [7] 李化,唐琳,陈放. 快速繁殖麻疯树幼苗及生根苗的方法[P]. 中国:ZL 200610020449. X,2008. 8. 6.
- [8] 李建科,杨静慧,刘太林,等. 野生乌柏的组培和再生[J]. 北方园艺,2010(13):164-166.
- [9] 鄢亚微. 能源林树种乌柏组织培养技术体系的研究[J]. 武汉:华中农业大学,2008.
- [10] 卢彰显,刘丽娜,郭文丹,等. 油桐愈伤组织的诱导[J]. 经济林研究,2010,28(2):111-113.
- [11] 韩珊,石大兴,王米力,等. 红叶乌柏茎段离体培养的研究[J]. 四川农业大学学报,2006,24(3):300-302.
- [12] 陈金洪,高敏,黄记生. 麻疯树茎段离体培养及快速繁殖研究[J]. 广西农业科学,2006,37(3):221-223.
- [13] 蒋祥娥,欧阳绍湘,黄发新,等. 乌柏的组织培养及植株再生研究[J]. 湖北林业科技,2010(1):20-22.
- [14] 张姗姗,陈益存,汪阳东. 油桐的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2009,45(10):1008.
- [15] 唐军荣,胥辉,马焕成,等. 青桐叶片再生植株体系的建立[J]. 安徽农业科学,2010,38(8):4190-4192.

## Research Progress on Main Woody Oil Plant of Euphorbiaceae for Tissue Culture and Rapid Propagation Technique of Inducing Culture

FENG Bang-chao<sup>1</sup>, HUANG Yan<sup>2</sup>, ZHU Jing-ru<sup>2</sup>, LUO Ke-ming<sup>2,3</sup>

(1. Department of Chemistry and Life Sciences, Baise University, Baise, Guangxi 533000; 2. Institute of Resources Botany, School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715; 3. Key Laboratory of Eco-Environments of Three Gorges Reservoir Region of Ministry of Education, School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715)

**Abstract:** In view of tissue culture industrialized breeding, from the main factors (explant, basic medium, exogenous hormones and so on) in terms of tissue culture and rapid propagation, the early bud induction in tissue culture of tungoil tree, Chinese tallow tree, *Jatropha curcas* were summarized and analyzed by referring relevant literature, hoping to summarize the technical characteristics suitable for industrial production in the early bud induction. Some problems to be solved in early induction were also pointed out to provide a mature, stable and efficient tissue culture.

**Key words:** Euphorbiaceae; woody oil plant; inducing culture

## 选购地膜六步走

地膜覆盖栽培能获得早熟、优质、高效的良好效果。由于现在市场上的地膜来自不同的厂家,厚度、价格都有较大区别,质量也良莠不齐,有些地膜存在质量问题,所以农民朋友在购买时一定要选择质量好的地膜。

**一看合格证和生产日期** 购买地膜时,不仅要看产品合格证,而且还要看清保质期,农用薄膜有效质量保证期为1a,尽量选购离生产日期较近的地膜。因为农用薄膜库存时间久了会老化,缩短使用寿命甚至失去应有的防护作用。

**二看外观质量** 市场上有些地膜由于生产设备老化,原材料不合格、技术不过关等原因,导致地膜出现厚薄不均匀现象,在使用过程中薄的地方容易出现破损,影响保温效果;有的地膜在生产中会出现水纹或云雾状斑纹现象,甚至有气泡、穿孔、破裂等破损。质量好的地膜整卷匀实,呈银白色,透明度一致,外观平整、明亮,厚度均匀,横向和纵向的拉力都较好。

**三看地膜的宽度** 要量一下地膜的宽度。因为不同的作物,不同的覆盖方式需要不同宽度的地膜,过宽浪费,过窄无法使用。

**四看厚度** 应选用薄的地膜。因为地膜的厚薄与增产效果关系不大,选择厚的地膜会增加投资成本,为降低投资成本应选用薄的地膜。

**五听地膜用户的反映** 在购买地膜时,要注意购买用户普遍反映使用效果良好、名牌厂家有质量保证的品牌的的地膜。购买地膜时,应索要发票,并保存好,用于发生意外时维权。

**六算用量** 一些农民朋友购买地膜时,靠经验估算,但由于地膜的规格不一样,同时不同农作物的覆盖率不同,因此,往往难以正确估算出该买多少地膜。为避免盲目购买,需根据地膜的密度、厚度、土地面积和覆盖率等因素来计算用量。

计算公式如下: $G = \rho h s k$ ,公式中: $G$  = 地膜用量(kg); $\rho$  = 地膜密度(kg/dm<sup>3</sup>); $h$  = 地膜厚度(dm); $s$  = 土地面积(dm<sup>2</sup>); $k$  = 地膜覆盖率(%),为地膜实际覆盖面积与土地面积之比。例如覆盖西瓜,用的地膜是聚乙烯料薄膜,其密度为0.91 kg/dm<sup>3</sup>,若所用的地膜厚度是0.008 mm,覆盖率为80%,西瓜地面积为1 333.4 m<sup>2</sup>,其地膜用量: $G = \rho h s k = 0.91 \times 666.7 \times 2 \times 100 \times 0.00008 \times 80\% = 7.76$ (kg)。

(信息来源:河北农民报)