

巴西橡胶树离体茎段培养研究

邓柳红¹, 罗明武² (1. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海南海口 571101; 2. 海南大学材料与化工学院, 海南儋州 571737)

摘要 [目的] 诱导橡胶树茎段腋芽分化增殖, 为橡胶树栽培提供大量优良的新型无性系种植材料。[方法] 以橡胶树优良单株带芽茎段作外植体, 以 MS 为基本培养基, 研究不同激素配比的培养基对橡胶树腋芽分化增殖的影响。[结果] 以多菌灵 2.0 g/L + 青霉素 400.0 mg/L 预处理 + 0.1% HgCl₂ 表面消毒, 污染率降至 29%; 以 MS + 6-BA 2.0 mg/L 为启动培养基, 腋芽萌动率达 85%。以 MS + 6-BA 3.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L 为生长增殖培养基, 萌动腋芽生长发育正常。[结论] 多菌灵和抗生素预处理, 可以明显降低外植体污染率和死亡率。6-BA 对腋芽的萌动和生长起重要作用, 而添加 2,4-D 则抑制腋芽萌发及生长。

关键词 巴西橡胶树; 茎段; 腋芽萌动生长; 组织培养

中图分类号 S722.3⁺7 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)32-15711-02

Study on the Vitro Stem Proliferation of Rubber (*Hevea brasiliensis* L.)

DENG Liu-hong et al (Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101)

Abstract [Objective] To explore the optimum matching for shoot differentiation and proliferation of *Hevea brasiliensis*. [Method] The stem with axillary buds as explants and with MS as the basic medium, effects of different medium of hormone proportions on axillary bud differentiation proliferation of *Hevea brasiliensis*. were studied. [Result] Carbendazim 2.0 g/L + penicillin 400.0 mg/L pretreatment + 0.1% HgCl₂ surface disinfection, and pollution rate decreased to 29%. The initial medium was MS + 6-BA 2 mg/L, germinating rate of axillary bud was 85%. The growth enrichment medium was MS + 6-BA 3.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L, the growth of germinating axillary bud was normal. [Conclusion] Pretreatment of carbendazim and antibiotics can significantly reduce the contamination rate of fungi and bacteria. 6-BA played an important role on germinating and growth of axillary bud, can induced axillary buds differentiation and proliferation. Suitable concentration of co-culture medium can promote shoot differentiation and proliferation while 2,4-D can inhibit it.

Key words *Hevea brasiliensis*; Stem segment; Shoot differentiation and proliferation; Tissue culture

巴西橡胶树 (*Hevea brasiliensis*) 是目前天然橡胶的主要来源, 具有重要的经济价值。现今巴西橡胶树优良品种繁殖的主要方法是嫁接。花药培养是巴西橡胶树组织培养中研究较早和较多的一个方向, 但是花药植株诱导再生率较低, 并且来源于愈伤组织有可能发生遗传变异的风险, 影响到造林后的遗传增益^[1-3]。

近几十年来, 许多研究者都在进行橡胶树优良单株带芽茎段的离体繁殖研究, 其通过腋芽出苗和腋生枝丛生芽出苗途径进行大量繁殖, 不经过发生愈伤组织而再生, 使得无性系后代保持母本的优良性状, 是更能使无性系后代保持原品种特性的繁殖方式, 在生产中可能有很大的潜在应用价值。但是由于橡胶树外植体污染严重, 而且成年态茎段十分难分化, 进展十分缓慢, 至今仍未见成功的报道^[1]。目前只有采用种子实生苗茎尖或嫩茎作为外植体获得再生植株。但是由于橡胶树是异花授粉植物, 其后代是高度杂合的个体, 这种实生苗再生植株不能保持其亲本的优良性状, 没有经济价值^[4-6]。

笔者以巴西橡胶树成年茎段的腋芽作为外植体, 通过腋生枝丛生芽途径, 成功获得了再生植株, 该研究结果为组培工厂化橡胶育苗快繁体系建立奠定了基础。

1 材料与方

1.1 材料 试验材料取自中国热带农业科学院橡胶种质资源圃, 为当年萌发处于变色期的巴西橡胶树高产品系热研 73397 带侧芽茎段。

1.2 无菌材料的获得 以带 1~2 个腋芽的茎段为外植体,

流水清洗 30 min 后进行预处理(各组合浓度见表 1), 再用无菌水漂洗, 然后用浓度 0.1% HgCl₂ 表面消毒 10 min, 再用无菌水漂洗, 将消毒后的茎段随机接种在启动培养基上。

1.3 启动培养 将消毒后的茎段接种于启动培养基上, 基本培养基为 MS, 培养基附加激素组合浓度如下: ①6-BA 1.0 mg/L + 2,4-D 2.0 mg/L; ②6-BA 2.0 mg/L; ③6-BA 3.0 mg/L + 2,4-D 1.0 mg/L; ④6-BA 1.0 mg/L + 2,4-D 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L; ⑤6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L + 2,4-D 2.0 mg/L; ⑥6-BA 3.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L; ⑦6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L; ⑧6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L + 2,4-D 1.0 mg/L; ⑨6-BA 3.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L + 2,4-D 2.0 mg/L。每处理接种 20 瓶, 每瓶 1 个外植体, 30 d 后统计结果。培养条件为温度 (27 ± 2) °C, 光照强度 2 000 lx。

1.4 生长与增殖培养 将萌芽后的茎段接种于生长和增殖培养基上, 基本培养基为 MS, 培养基附加激素组合浓度如下: ①6-BA 1.0 mg/L + 2,4-D 1.0 mg/L; ②6-BA 2.0 mg/L; ③6-BA 3.0 mg/L + 2,4-D 0.5 mg/L; ④6-BA 1.0 mg/L + 2,4-D 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L; ⑤6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L + 2,4-D 0.1 mg/L; ⑥6-BA 3.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L; ⑦6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L; ⑧6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L + 2,4-D 0.5 mg/L; ⑨6-BA 3.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L + 2,4-D 1.0 mg/L。每处理接种 6 瓶, 每瓶 1 个外植体, 40 d 后统计结果。培养条件为温度 (27 ± 2) °C, 光照强度 2 000 lx。

2 结果与分析

2.1 无菌材料的获得 通过在常规消毒前先进行 X6 组合预处理, 即多菌灵 2.0 mg/L + 青霉素 400.0 mg/L 浸泡, 再进行常规消毒, 即浓度 0.1% HgCl₂ 消毒 10 min, 无菌水漂洗 4 次, 污染率和死亡率最低(表 1), 为 29%, 而对照(只用浓度

基金项目 中国热带农业科学院科技基金项目 (Rykj0420)。

作者简介 邓柳红(1972-), 女, 广西柳州人, 博士, 副研究员, 从事植物基因工程方面的研究。

收稿日期 2009-07-13

0.1% HgCl₂ 的常规消毒法)污染率和死亡率高达 96%。

表 1 不同预处理组合对茎段污染率的影响

Table 1 Effects of different pretreatment combinations on the pollution rate of stem segment

处理组合 Treatment combination	多菌灵 mg/L Carbendazim	青霉素 mg/L Penicillin	庆大霉素 mg/L Gentamicin	污染率//% Pollution rate
1	0	400.0	400.0	69
2	0	500.0	300.0	71
3	1.0	500.0	0	37
4	1.0	0	400.0	40
5	2.0	0	300.0	32
6	2.0	400.0	0	29

2.2 不同激素浓度对比对萌芽和生长增殖的影响 试验结果表明,培养基②(MS + 6-BA 2.0 mg/L)的启动培养效果较好,接种后 15 ~ 25 d 腋芽即开始萌发,且腋芽生长发育正常(图 1)。培养基⑥(MS + 6-BA 3.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L)的增殖和生长培养效果较好(图 2)。



图 1 橡胶树茎段腋芽诱导

Fig. 1 Rubber shoot initiation of Rubber

3 结论与讨论

巴西橡胶树是多年生木本植物,经过传统的消毒方法后,茎段接种时真菌和细菌污染还是十分严重,有时甚至高达 100%。在常规消毒前用多菌灵和抗生素进行预处理,可以明显降低茎段污染率和死亡率。

启动培养基以 MS + 6-BA 2.0 mg/L 为好,腋导萌动率可达 85%;以 MS + 6-BA 3.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L 为生长增殖培养基较好。低浓度的 6-BA 有利于腋芽萌发,高浓度的 6-BA



图 2 橡胶树再生植株

Fig. 2 Rubber plantlet of Rubber

有利于生长,添加 2,4-D 不利于腋芽萌发及生长。试验中还发现适量椰乳有利于腋芽萌发和生长,顶部茎段易产生愈伤组织,但少量的愈伤组织对腋芽的生长无影响。

在组培成苗过程中如果经过愈伤组织阶段,会导致遗传不稳定,这种现象称作体细胞无性系变异。体细胞无性系变异在后代中出现的频率可达 15% 或更高,高频率的变异会严重影响到造林后的遗传增益,在生产中的应用具有局限性^[2]。该试验是通过腋芽萌动出苗途径,不经过发生愈伤组织而再生,这种途径遗传稳定性好,能够保持品种的优良性状,在生产中具有很大的应用价值。通过切取无菌苗顶芽或带腋芽的茎段不断增殖,可以为橡胶树嫁接苗提供大量的优良无性系接穗材料,为组培工厂化橡胶育苗体系建立奠定基础。

参考文献

- [1] 谭德冠,孙雪飘,张家明. 巴西橡胶树的组织培养[J]. 植物生理学通讯,2005,41(5):674-678.
- [2] 许智宏. 植物组织培养[M]. 上海:上海科技出版社,1994:244-260,273-283.
- [3] 王泽云,吴胡蝶,陈雄庭. 橡胶花药体细胞植株的优良性状[J]. 热带作物学报,1989,10(2):17-22.
- [4] CARRON M P, ENJALRIC F, LARDET L, et al. Rubber (*Hevea brasiliensis* Mull. Arg.) [J]. Biotechnol Agr Forest, 1989(5):228-245.
- [5] MENDANHA A B L, TORRES R A A, FREIR A B. Micropropagation of rubber trees (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) [J]. Genet Mol Biol, 1998, 21(3):395-398.
- [6] HUANG T D, LI W G, HUANG H S. Micropropagation of shoot apex and shoot stem with axils of cotyledon of *Hevea brasiliensis* [C]. Kunming, China: Proceedings of the International Rubber Conference, Parallel Session 2, 2004.

(上接第 15671 页)

次性进行多达 240 个样本的连续分析,检测结果由分析软件自动计算,1 个样本的检测时间仅需要 90 s,将其用于稻米直链淀粉含量的检测,简化了国标法等烦琐的操作过程,降低了检测人员操作技术对测试结果的影响程度。省去了人工移液,添加指示剂、乙酸、蒸馏水,定容摇匀,分光光度计下的比色和数据计算过程,减少了试剂和试样的消耗量,实现了显色、比色和数据处理同时进行,可节约大量的人力成本和时间,同时克服了常规测试方法在微量测试时,由于样本量少而使定容比色难于操作和不能进行平行测试的缺点,可减少操作误差,提高测试准确度,是一种快速、准确,重现性好的测定稻米直链淀粉含量的较理想方法。用于大批量样本和

样本量非常少的珍稀样本测定,更显示了常规法无法比拟的优越性,为稻米品质研究提供了便利技术。

参考文献

- [1] 方向元,胡培松,王海莲,等. 水稻品种直链淀粉含量、糊化温度和蛋白质含量的稳定性分析[J]. 中国农业科学,2005,38(1):1-6.
- [2] 肖文. 直链淀粉的含量决定淀粉的用途[J]. 农产品加工,2009(2):22.
- [3] 明东风,马均,马文波,等. 稻米直链淀粉及其含量研究进展[J]. 中国农学通报,2003,19(1):68-71.
- [4] 杨洁,余绍金,汪莲爱,等. 应用流动注射法测定稻米的直链淀粉含量[J]. 湖北农业科学,2007(9):828-830.
- [5] 王仪春,张小明,石春海. 稻米直链淀粉含量测定方法的探讨[J]. 中国农学通报,2001,17(5):30-32.
- [6] 法国 Alliance 公司. FUTURA 全自动流动分析仪操作手册[Z]. 2008.
- [7] 国家技术监督局稻米直链淀粉含量的测定(GB-T 15683-1995) [S]. 北京:中国标准出版社,1996.