维普资讯 http://www.cqvip.com

第23卷 第1期
2006年6月
桉树科技
EUCALYPT SCIENCE & TECHNOLOGY
Vol.23 No.1
Jun.2006

尾叶桉的组织培养及植株再生

马生健，潘清梅*，吴志华，曾富华
（湛江师范学院生物系，广东 湛江，524048）

摘 要：研究了以尾叶桉（*Eucalyptus urophylla*）优树（U_6 无性系）无菌苗的叶子和茎段作为外植体诱导愈伤组织、丛生芽发生以及植株再生的过程。通过多种生长调节剂不同浓度组合的对比试验，确定了 U_6 快繁体系的最适宜培养条件：(1) 愈伤组织诱导培养基：MS + 1 - 2 mg/L 2,4 - D；(2) 芽增殖培养基：MS + 0.5 mg/L 6 - BA；(3) 生根培养基：1/2 MS + 2.0 mg/LNAA。

关键词：尾叶桉；组织培养；植株再生

Tissue Culture and Plantlet Regeneration of *Eucalyptus urophylla*

MA Sheng-jian, PAN Qing-mei, WU Zhi-hua, ZENG Fu-hua
(1. *Department of Biology, Zhanjiang Normal College, Zhanjiang, Guangdong* 524048;
2. *China Eucalypt Research Centre, Zhanjiang Guangdong* 524022)

Abstract: Callus induction, shoot organogenesis and plantlet regeneration from leaf and sprout explants of *E. urophylla*'s asepsis seedling were studied in the paper. The optimal culture conditions were established by the comparative experiments of different concentration combinations of many growth regulators as follows: (1) callus induction media: MS + 1 - 2mg/L 2,4 - D; (2) shoot multiplication culture medium: MS + 0.5mg/L 6 - BA; (3) rooting culture medium: 1/2 MS + 2.0mg/L NAA.

Keywords: *Eucalyptus urophylla*; tissue culture; plantlet regeneration

桉树是世界上主要产材树种之一，其人工造林已占世界人工造林的五分之一。桉树组织培养是林木组织培养研究最早、最多的一大类，目前全世界已对60种桉树进行了组织培养技术的研究[1]。早在1965年，Sussex即由赤桉实生苗外植体获得过愈伤组织。此后不少国内外学者先后利用桉树木质块茎、节间、下胚轴、叶、成年桉树嫩枝段等不同器官组织培养诱导完整植株成功[2]。

尾叶桉（*Eucalyptus urophylla*）原产于印尼，我国自1976年开始引种。由于具有速生丰产，木材易漂白且得浆率高等特性，尾叶桉在我国的栽培面积迅速扩大，目前在两广和海南省的种植面积已达十几万 hm^2。U_6 无性系是在尾叶桉实生林中选育出的一个优良无性系，其树干圆满通直、林相整齐，抗逆性强及速生丰产，已成为我国桉树人工林的主要当家树种。由于桉属树种多，种间极易杂交，后代分化严重，用有性繁殖方法很难保持优树特性。扦插繁殖法虽然能解决这个问题，但是由于扦插母苗缺乏，使得生产规模受到限制。因此，生产上迫切需要大量组培苗作母苗，以便取材扦插，培养扦插苗，供应大田种植。本试验以 U_6 的继代培养芽为材料，对 U_6 无性系的组织培养进行了研究，为其快速繁殖技术

收稿日期：2005 - 10 - 17
基金项目：广东省科技计划项目（2002A2070402），湛江师范学院科研项目（L0416）。
作者简介：马生健（1977—），男，硕士生，讲师，主要研究方向：植物基因工程。

维普资讯 http://www.cqvip.com

提供了一定的实验依据。

1 试验材料与试验方法

1.1 试验材料

国家林业局桉树研究开发中心提供的尾叶桉 U_6 无性系继代培养的芽。

1.2 试验方法

1.2.1 愈伤组织的诱导

当无菌芽长壮后，以叶、幼茎及带芽茎段作为外植体，接种于用 MS 作为基础培养基，分别附加了 2,4-D 1.0、2.0、4.0、6.0 mg/L 配制成的 4 类培养基上，以探讨 2,4-D 对愈伤组织形成的影响。所有培养基中均附加 3%蔗糖、0.3% Phytagel 和 5 mg/L 的抗坏血酸，pH 5.8-6.0（下同），培养温度为 25±2℃，置于暗处培养。

1.2.2 芽的诱导

当芽长到 1 cm 左右，切取带腋芽茎段诱导分化丛生芽。以 MS 为基础培养基，接种在分别添加不同浓度的 6-BA、ZT、TDZ 的培养基上，以探讨不同细胞分裂素及浓度对丛生芽诱导的影响。

1.1.3 生根培养

当丛生苗长到 2-3 cm 高时，切断移入生根培养基内培养。生根培养基采用 1/2MS 为基础培养基，并附加不同组合的 NAA、IAA、6-BA 等。接种后先放在暗处培养 6-8 d 后再转入自然光照下培养，培养 25d 后观察。

1.1.4 幼苗移栽

当幼苗长到 3-5 cm 高，根系生长良好，苗木已木质化，生长健壮时可移栽，先炼苗后再移栽。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的诱导

所有外植体在诱导培养基上暗培养 5-7d 后，在其切口部位长出淡黄色的松散型的愈伤组织。随着培养时间的延长，叶、带腋芽茎段诱导出的愈伤组织多为结构致密、质地脆硬、颗粒状、色泽浅黄，生长较快；茎段诱导的愈伤组织多为结构较为疏松、质地水浸状、色泽为半透明或浅黄色，生长较慢（见表1）。

表1 不同浓度 2,4-D 对不同外植体愈伤组织诱导的影响

外植体类型	2,4-D 浓度/(mg/L)	外植体数（个）	愈伤组织诱导率(%)	愈伤组织形成最早时间/d	愈伤组织生长情况
叶	1.0	13	100	5	快速生长，干燥，愈伤组织多且好。
	2.0	14	100	5	快速生长，干燥，愈伤组织较多。
	4.0	13	92.3	7	缓慢生长，愈伤组织少。
	6.0	15	80	7	缓慢生长，愈伤组织极少。
茎	1.0	14	100	5	快速生长，水浸状，长势好。
	2.0	18	100	5	较快生长，长势一般。
	4.0	18	72.2	6	缓慢生长，水浸状，长势差。
	6.0	16	25	6	缓慢生长，愈伤组织极少
带腋芽茎段	1.0	23	100	5	快速生长，长势好。
	2.0	16	100	6	较快生长，长势好。
	4.0	18	100	7	较快生长，愈伤组织少
	6.0	16	100	7	缓慢生长，愈伤组织少。

从表1可看出，以叶和茎为外植体的，随着 2,4-D浓度的增高，愈伤组织形成的时间变长，诱导率逐渐降低，形成愈伤组织的数量、质量也下降；而以带腋芽茎段为外植体的，在不同浓度下的诱导率均为 100%，但愈伤组织的生长速度随着 2,4-D 浓度的升高而变缓慢，长势逐渐变差。试验结果表明：

维普资讯 http://www.cqvip.com

选用带腋芽茎段作为外植体,诱导率比较高(见图版Ⅰ-1)。不同的外植体诱导愈伤组织的2,4-D浓度均以1-2 mg/L为宜,高浓度则产生抑制作用。

2.2 芽的诱导

不同细胞分裂素对尾叶桉芽的影响结果见表2,从表2可以看出,6-BA、ZT、TDZ三种细胞分裂素均有促进外植体腋芽萌发的作用。总而言之,添加ZT的培养基中腋芽萌发时间短,新芽生长快,生长旺盛;添加6-BA的培养基中分化的芽数量多,增殖系数大,芽的长势良好,但不及添加ZT的好。TDZ虽然也能使芽分化,但效果很差,随着时间的推移,大部分的芽停止生长,基部膨大形成愈伤组织(见图版Ⅰ-2)。总体来看,6-BA的基本效应是显著促进腋芽的分化和形成,这与其他桉树该方面的研究结果是一致的[3];玉米素的基本效应是促进腋芽分化、显著促进茎的伸长(见图版Ⅰ-3);TDZ的基本效应则是促进愈伤组织的生成及芽的增殖[4]。

不同浓度的6-BA对萌芽率及芽的增殖系数影响较大。随着6-BA浓度升高,腋芽的萌发率降低,新芽生长减慢,芽的增殖系数降低。当6-BA浓度达到2.0 mg/L时,外植体出现枯死现象,浓度升至3.0 mg/L时,外植体枯死率达45%,且抽生的芽短小。因此,在培养初期,较高的6-BA浓度不利于从芽的诱导,芽容易枯死,同时,较高浓度的6-BA会导致一些不正常的生长现象出现:丛生芽虽然能分化伸长,但小苗表现为叶片变小,匍匐状;少数叶片长出颗粒状愈伤组织。在本实验中,6-BA为0.5 mg/L时,芽的萌发率、增殖系数及生长状况均达到较高水平。初步认为,较低浓度的6-BA(见图版Ⅰ-4)有利于U_6的芽诱导。

不同浓度的ZT对芽的萌发影响不是很大,当ZT为0.5 mg/L时,萌发率较高,新芽的生长快而且粗壮,叶大而伸展,是最适合诱导芽的ZT浓度。考虑到6-BA的价格比ZT低得多,在工厂化育苗中为降低成本具有优势,因此选用6-BA诱导芽更好。

表2 不同细胞分裂素对芽诱导的影响

激素类型	浓度(mg/L)	外植体数	萌芽率(%)	芽的生长情况
6-BA	0.5	19	95	芽壮实,抽生快,90%的单芽分化成2-3芽。
	1.0	14	85.7	芽壮实,抽生较快,约75%的单芽分化成2-3芽。
	2.0	13	76.9	芽壮实,抽生较快,25%的单芽分化成2-3芽,少量枯萎。
	3.0	14	64.3	芽短,抽生较慢,单芽分化少,枯死现象加重。
	4.0	13	23.1	芽短,抽生较慢,少数叶片长出愈伤组织,枯死严重。
ZT	0.2	17	88.2	芽壮实,腋芽分化一般,长势好。
	0.5	17	94.1	芽壮实且长,分支多,生长旺盛,苗修长。
	1.0	15	80	芽矮而壮,分化一般。
TDZ	0.5	24	80.9	芽分化差,基部逐渐长成愈伤组织,小部分芽仍正常生长。

2.3 生根培养

在无菌苗中切取2-3 cm左右的嫩梢接种于附加各种激素浓度水平的1/2 MS生根培养基中培养,先在室内弱光照条件下培养6-8 d左右,然后逐渐加强光照。30 d后观察。

2.3.1 不同激素及其组合对生根培养的影响

不同激素及其组合对生根培养的影响结果见表3,从表3可知,从再生植株的途径看,不同激素水平组合对愈伤组织诱导、根的生成起着重要的作用。添加了IAA的有的基部长出愈伤组织,有的不见长根或长出不到1cm后便停止生长;而添加了6-BA有少量或没有愈伤组织,但也不能诱导生根,即使与NAA、IAA配合使用也无根系发生,但是其植株生长很好,腋芽分化也多。可见,6-BA可以显著促进芽分化,但是可能抑制长根。部分试管苗基部形成愈伤组织,而愈伤组织会阻滞上下疏导之间的畅通,导致发出的根和茎之间无维管组织的直接联系[5,6],养分水分上下之间运输困难,因此移栽后可能不能成活。试验中用NAA作生根剂效果较佳(见图版Ⅰ-5),苗的基部没有或形成极少愈伤组织,生根率高,

维普资讯 http://www.cqvip.com

根健壮,有利于移栽。

2.3.2 不同浓度NAA对生根培养的影响

以1/2 MS为基础培养基,附加不同浓度的NAA进行生根培养,寻找最适合 U_6 生根的NAA浓度。培养20d后观察,结果如表4。

表3 不同激素及其组合对生根培养的影响

试验处理(mg/L)	生根状况
NAA 0.5	生根时间短,切口有少量愈伤组织形成,根健壮。
IAA 0.5	根少且无根须,小部分植株的切口处形成愈伤组织,生长缓慢。
6-BA 0.5	无根系发生,切口处不膨大,腋芽分化一般。
NAA 0.5+6-BA 1.0	无根系发生,基部不膨大,腋芽分化多,90%的单个腋芽分化出1-2个小芽。
NAA 0.5+IAA 0.2	少量根长出,切口处形成大量愈伤组织,苗顶端枯萎严重。
NAA 0.2+IAA 1.0+6-BA 0.5	无根系发生,切口处膨大,少量愈伤组织,腋芽分化最多。

表4 不同浓度NAA对生根培养的影响

浓度(mg/L)	接种株数	生根株数	生根率(%)	生根状况
0.2	17	5	29.4	切口无愈伤组织形成,根系少。
0.5	15	5	33.3	切口处有少量愈伤组织。
1.5	15	10	66.7	切口无愈伤组织形成,根由茎直接发出,根多,苗生长好。
2.0	14	11	78.6	部分切口形成少量愈伤组织,小部分根由茎发出,大部分根由叶缘处长出,根系多且粗壮,但是苗生长一般。
2.5	15	8	53.3	切口有少量愈伤组织形成,根系较少,少数植株枯死。

从表4可看出:低浓度的NAA只会有少量或没有愈伤组织,但不利于生根;高浓度的NAA可导致愈伤组织的形成和芽的早衰[7]。随着NAA浓度的增加,生根率也不断升高,当NAA浓度达到2.0 mg/L时,生根率达到最高水平,达80%。从试验结果看,小部分的根是由茎直接发出,发根数较少,平均根数2-5条;大部分的根是从接触到培养基的叶片边缘处长出,其生根状况极佳,平均根数达5-10条,根系质量好,叶缘长根的内部机理还需进一步的研究。通过比较分析,选择2.0 mg/L NAA对生根诱导最佳(见图版I-6)。

2.4 幼苗移栽

组培苗的移栽是瓶苗从无菌、光照温度恒定、湿度饱和的培养条件下,直接转移到一个有菌、光、温、湿不恒定的环境下,一是霉菌容易感染,二是缺乏抵抗力而导致死亡[8]。为了提高移栽成活率,必须缩小自然环境和瓶内环境的差异,尽可能地制造适宜于瓶苗生存的环境。生根培养30 d后,小苗茎部木质化,叶片舒展,颜色浓绿,根系伸长,此时将培养瓶打开,炼苗5-7 d后,再将幼苗根部培养基冲洗掉,移栽到花盆里。移栽后,浇足定根水,最初10-15 d设置透明塑料罩保湿(90%以上),同时在塑料罩上打洞以利于气体交换[7]。1周后逐渐揭膜锻炼,30 d后可长成健壮的出圃苗,成活率达90%。

3 讨论

3.1 在 U_6 愈伤组织诱导的试验中,不同部位的外植体都能够诱导出愈伤组织,诱导率比较高,表明桉树愈伤组织的诱导具有普遍性。三种外植体以带芽茎段培养效果最好,它不但出愈率高,而且愈伤组织状况比较好。不同的外植体诱导愈伤组织的2,4-D浓度均以1-2 mg/L为宜,超过4 mg/L,则产生抑制作用,这与王米力等[9]的研究结果是一致的。

3.2 在 U_6 茎芽培养中,较高的6-BA浓度不利于从芽的诱导,芽容易枯死,这与徐强兴[10]的研究结果是一致的。同时,在培养过程中,出现了不正常的

维普资讯 http://www.cqvip.com

生长现象:比如叶子变小或叶表面上出现颗粒状愈伤组织,类似情况在其它桉树如山桉、大桉、红花桉、巨桉、刚尼桉中也有报道[7],这种情况的产生,可能与树种本身的生物学特征有关,也可能与外植体的起源、生理、生殖潜力及对离体培养中各种条件的反应有关,其成因很复杂,尚无定论。石大兴等[11]在研究巨桉离体培养中指出,叶表面产生颗粒状愈伤组织,认为可能是外源激素引起的异常反应,采用无激素培养多代,多数情况表现正常。

3.3 Skoog 和 Miller (1957) 提出,植物的器官分化是受两类激素(生长素和细胞分裂素)的相互作用控制的,即当细胞分裂素对生长素的比率较高时,可促进茎芽的形成,当生长素对细胞分裂素的比率较高时,有利于根的分化[12]。而李浚明[12]指出,外植体对外源激素的要求取决于该植物体系内源激素的水平,而内源激素的水平随组织、植物类型和植物的生长时期而变化,在若干情况下,单一的细胞分裂素或生长素就足以促进器官的分化。本研究通过单因子试验,筛选出了 U_6 较适宜的芽增殖培养基为 MS + 0.5 mg/L 6 - BA; 生根培养基为 1/2 MS + 2.0 mg/L NAA,20 d 生根率就达到 80%。

3.4 在以 NAA 调节生根培养的试验中,大部分接触培养基的叶子的叶缘能够发出较多而且质量优良的根系,能否通过叶片诱导成完整植株还需进一步的研究。

3.5 本研究中,U_6 试管苗的叶子或茎段等在含细胞分裂素或生长素的培养基上能够高频率的诱导愈伤组织、芽和形成根系,这为 U_6 无性系的快速繁殖技术奠定了一定的基础。

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] MBonga J M, Drurzan D C.树木组织培养[M].北京:中国林业出版社,1988,55 - 138,202 - 322.

[3] 佘下涵.直杆蓝桉组织培养繁殖育苗试验研究[J].福建林业科技,2002,29 (3) :26 - 29.

[4] 王关林,方宏筠.高活性细胞激动素 TDZ 在植物组织培养中的应用[J].植物学通报,1997,14 (3) :32 - 35.

[5] 陈江平.不同植物生长素对桉树不同无性系组培生根影响的试验[J].广西林业科学,2003,32 (1) :50 - 55.

[6] 欧阳权,彭海忠.桉树的组织培养[M]//陈正华主编.木本植物组织培养及其应用.北京:高等教育出版社,1986,196 - 213.

[7] 谢莉萍.桉树的微繁殖和组织培养[J].广西林业科学,1994,23 (1) :32 - 39.

[8] 陈研华,林文革,李海花,等.邓恩桉的组培技术[J].世界林业研究,2001,14 (3) :23 - 24.

[9] 王米力,石大兴,曾平安,等.尾叶桉胚状植株诱导与增殖研究[J].四川林业科技,1996,17 (2) :9 - 13.

[10] 徐强兴,潘学峰.尾叶桉 U_6 无性系组培快繁技术研究[J].造林绿化,2002,30 (3) :22 - 24.

[11] 石大兴,王米力,石铁送,等.巨桉芽器官离体培养与快繁体系建立的研究[J].林业科学,2003,39 (1) 71 - 74.

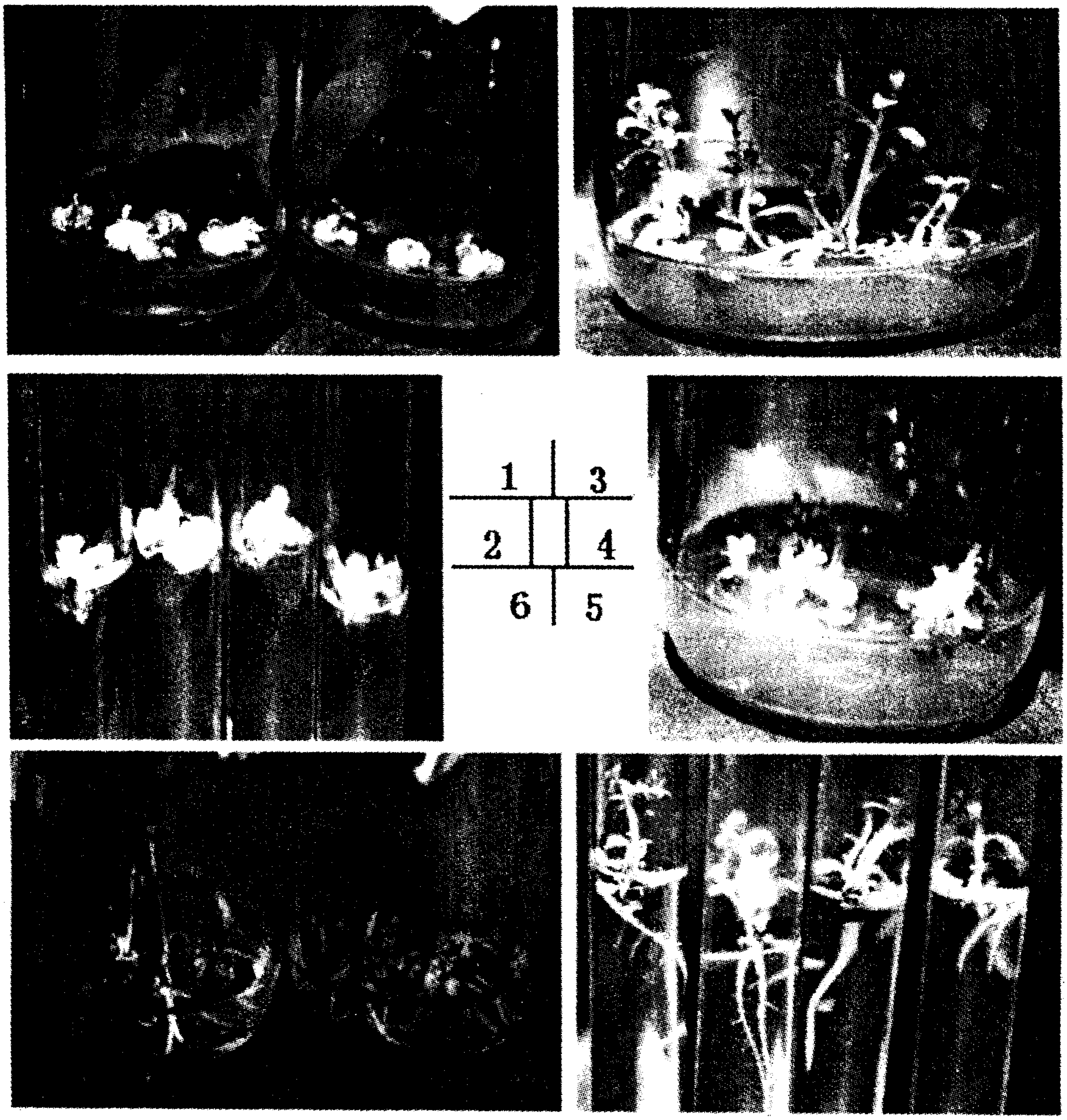
[12] 李浚明.植物组织培养教程[M].北京:中国农业大学出版社,1996.324 - 349.

[13] 朱建华,彭士勇.植物组织培养实用技术[M].北京:中国计量出版社,2002.78 - 79.

[14] 潘瑞炽.植物组织培养 (第三版)[M].广州:广东高等教育出版社,2003.1 - 102.

[15] 王小青,李玲.植物生长调节剂在植物组织培养中的应用[M].北京:化学工业出版社,2002.

维普资讯 http://www.cqvip.com



图版 I 尾叶桉的组织培养及植株再生

图版说明

图版 I 尾叶桉的组织培养及植株再生

1. 带芽茎段在含 1.0 mg/L 2,4 - D 的培养基上暗培养 20 d 后诱导出浅黄色颗粒状愈伤组织；

2. 带芽茎段在含 0.5 mg/L TDZ 的培养基上暗培养 6 - 8 d 后转入自然光下培养，25 d 后诱导出浅黄颗粒状愈伤组织；

3. 带芽茎段在含 0.5 mg/L ZT 的培养基上暗培养 6 - 8 d 后转入自然光下培养，25 d 后诱导出的丛生芽；

4. 带芽茎段在含 0.5 mg/L 6 - BA 的培养基上暗培养 6 - 8 d 后转入自然光下培养，20 d 后分化出大量的芽；

5. 幼苗在含 0.5 mg/L NAA 的培养基上自然光下培养，20 d 后诱导出的根；

6. 幼苗在含 2.0 mg/L NAA 的培养基上自然光下培养，20 d 后诱导出大量的根。