

# 桉树组培快繁中存在的问题与对策

欧阳磊

(福建省林业科学研究院, 福建 福州 350012)

**摘要:** 通过对各种桉树的组培技术流程的观察与研究, 对桉树组织培养过程中存在的4个主要问题: ①污染的发生, ②外植体的褐化, ③继代苗的玻璃化, ④组培苗的遗传变异, 进行了深入的分析, 并相应提出了解决对策, 对桉树的组织快繁和工厂化育苗具有一定的意义。

**关键词:** 桉树; 组培; 存在问题; 解决对策

**中图分类号:** S792.390.5      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1002-7351(2006)01-0203-04

## Discussion and Settlement on Problems of Eucalyptus Tissue Culture

OU Yang-Lei

(Fujian Academy of Forestry, Fuzhou 350012, China)

**Abstract:** Analysis on the 5 major existing problems (pollution, browning of explant, vitrification of clump shoots, inherit and variation of clump shoots) of Eucalyptus tissue culture was deeply carried out by studying and observing all kinds of tissue culture methods of Eucalyptus in this paper, and the corresponding solution strategies were brought forward. This is important for Eucalyptus tissue culture and producing large numbers of Eucalyptus clone seedlings.

**Key words:** Eucalyptus tissue culture exist problem solution

随着木材天然资源的日益减少和地球生态环境的恶化, 人工林生产木材和木制品的重要性日益被人们所认识。近年来, 天然林的利用被限制, 许多国家和地区包括中国都转向利用人工速生丰产林来满足人们对木材资源的需求, 寻找适应不同地区气候的新的树种和种源以满足市场的需求。在中国南方, 桉树已成为首选树种, 不断地选择出桉树优良品种, 研究无性快繁技术, 营造速生丰产的桉树速生人工林, 对解决当前木材资源短缺问题将起到事半功倍的作用。然而, 桉树组培作为桉树无性快繁中重要的一环, 其影响因素复杂多变, 如何解决桉树组培过程中存在的问题已成了桉树优良无性系推广利用的关键。鉴于此, 笔者对桉树组培过程中存在的问题进行了分析和探讨, 以期对桉树组培工厂化提供依据。

## 1 桉树组培问题与解决措施的探讨

### 1.1 污染问题发生及控制

污染一般分为真菌性污染和细菌性污染, 其来源可分成3大类: ①材料带菌, ②接种污染, ③培养过程感染<sup>[1]</sup>。污染是桉树组织培养过程中的难题, 特别在春夏季高温高湿季节组培苗的污染率相当高, 对组培苗的工厂化生产造成很大的损失, 如何控制桉树组培的污染问题已成了桉树组培工厂化育苗的关键。

**1.1.1 外植体消毒与接种** 诱导培养的关键在于外植体是否消毒彻底以及被损伤, 这取决于以下几个方面。①外植体的自身生理情况。桉树的初代培养一般以带芽茎段作为外植体来诱导腋芽萌发, 选取木质化程度适中、生命力旺盛的枝条, 桉树无性系采穗圃里当年生的健壮枝条, 或成年植株的基部萌条作为外植体, 诱导容易, 成活率可达到70%~80%以上; ②消毒剂的选择及消毒时间的长短。桉树带芽茎段的消毒大多选用0.1%升汞和75%酒精相结合的消毒方式, 茎段的木质化程度不同, 酒精和升汞消毒的时间不一样, 一般酒精消毒的时间为10~60 s, 升汞消毒的时间为1~10 min。对于很嫩的带芽茎段酒精消毒的时间低于10 s, 即茎段在75%酒精里浸泡5 s左右时马上倒入无菌水进行清洗, 然后用0.1%升汞消毒40 s左右; 对于很老的茎段酒精消毒达1~2 min, 升汞消毒达10~15 min。③外植体的采集时间。枝条的

**收稿日期:** 2005-09-05; **修回日期:** 2005-10-31

**作者简介:** 欧阳磊(1978-), 男, 湖南郴州人, 福建省林业科学研究院硕士, 从事林木遗传育种研究。

采集一般在晴天中午进行较好,空气湿度低,病虫害及病菌较少,比较容易消毒且诱导成活率较高;④外植体消毒的流程和无菌操作。枝条采回后,先将枝条剪成 1 cm 左右的带芽茎段,用洗洁精清洗 1 min,流水冲洗 40 min 左右,然后移至超静台上用酒精和升汞进行消毒。外植体由外界移入超静台时要特别的注意操作人自身和超静台的消毒,严格按照无菌操作进行。

对于比较难以消毒和诱导的桉树,在采集穗条前进行预处理效果会更好,预处理的方式:在采集穗条前 2 d 用低浓度的高锰酸钾、托布津或多菌灵溶液喷洒枝条,然后用透气透光的袋子套住与外界隔离。其次,采用重复消毒的方法,延长流水冲洗的时间至 2~3 h 或整夜,都可以有效的降低外植体污染率,提高诱导成活率。第三,接种外植体时,尽量把茎段的长度减少。如将邓恩桉带芽茎段的长度由 1.0 cm 减少到 0.3 cm,污染率降低了 18.5%,诱导率提高了 10%。

**1.1.2 继代增殖培养污染的控制** 继代增殖培养过程中的污染会导致组培苗生产成本的大大提高,对桉树工厂化育苗造成很大的经济损失,所以控制增殖培养的污染显得尤为重要。增殖苗污染有真菌性污染和细菌性污染,真菌性污染主要是接种室、培养室内空气不清洁、超静台过滤不理想及操作不慎所引起;细菌性污染主要是接种工人的操作和材料的带菌所引起。控制增殖污染的措施主要为:①接种室和培养室定期用高锰酸钾和甲醛熏蒸,一般为每周熏蒸 1 次,每次工人进入接种室接种前接种室内用紫外灯照射,如果接种室较长时间没有使用,则紫外灯照射时间至少要 30 min 以上。②接种前超静台面用 75% 酒精擦洗,台内用酒精喷洒,接种工人接触瓶苗进行无菌转接前手先用酒精消毒,严格按照无菌操作进行。③增殖苗移入接种室前,瓶苗表面用酒精擦洗并在接种室内进行紫外灯照射 15 min。

## 1.2 外植体褐化

变褐(Browning)是材料伤口处分泌出的酚类化合物引起的。褐化一般分为 2 种形式:一由于细胞受胁迫条件或其它不利条件影响所造成的细胞死亡(称为坏死)而形成的褐化现象,不涉及酚类物质的产生。诸多不利条件(如温度)都可以造成细胞的程序化死亡。二是因为酚类物质所引起。酚类物质在多酚氧化酶作用下可以转变为褐醌,并可以逐渐扩散到培养基中积累起来,产生的褐化类物质扩散到培养基中,使培养基的组织发生褐化。

**1.2.1 影响褐化的因素** 影响外植体褐化的因素很多,主要有以下几种:①桉树树种本身的基因型。桉树种源和无性系不同,芽诱导和继代苗增殖的褐化程度不一样,如柳桉的茎段比较容易褐化,而杂交桉 U<sub>6</sub> 的茎段褐化程度比较轻;邓恩桉 25、13 号无性系褐化程度比较轻,而 24 号无性系褐化比较严重,甚至在多次继代培养后还会出现褐化现象。②外植体的大小。带芽茎段的长度越大,茎段切口的面积与整个茎段的体积比小,由褐化造成茎段死亡的比率越小,但同时增大了茎段的污染率。③外植体的消毒。消毒剂不同,消毒时间不同,外植体的褐化程度不同,一般是消毒时间越长,褐化率越高。④培养基。诱导培养基中各元素及其含量不同,外植体褐化程度的不一样,对一般桉树来说,大量元素和外源激素的浓度增大都会造成褐化程度的加重,有些桉树种在培养基中加入适量的活性炭能减轻外植体的褐化。⑤培养条件。光照和温度对外植体的褐化有一定的影响,一般来说,高温会增加褐化率,把接好的不同桉树品种外植体分别培养在高温(23~27℃)和低温(16~20℃)条件下得出,高温培养可明显促使褐化的发生,褐化率达 52.7%,而低温条件下褐化率仅为 29.8%;在同等条件下,外植体经过 7 d 左右的暗培养,褐化率得到不同程度的降低。

**1.2.2 减少褐化的方法** 褐化在桉树的初代培养中发生较多且褐化率较高,有时甚至达到 100%,继代和生根培养也会有少量发生,除了个别无性系(如邓恩桉 24 号)外,一般不会对接树组培苗工厂化产生影响。褐化问题的研究主要集中在初代培养,但褐化问题至今还没有得到彻底解决,有待于进一步深入研究,根据前人的研究结果和笔者的大量试验,得出控制褐化的几种方法如下:①枝条的预处理。在采集穗条的前几天,用黑色塑料袋将枝条套住,减少光线的照射,可以有效降低外植体诱导的褐化率,通过邓恩桉离体芽诱导对比试验褐化率减少了 22.8%。②对外植体进行预处理。低温处理有助于减轻褐化,巨桉带芽茎段在 5℃ 低温下处理几天后褐化率有所减少<sup>[8]</sup>,外植体在抗氧化剂如抗坏血酸、柠檬酸等或吸收剂如活性炭(AC)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)中进行预处理也能有效的减轻褐化,邓恩桉的带芽茎段切割后在抗坏

血酸稀溶液中浸泡 5~10 min 能有效提高诱导成活率。③选择和优化基本培养基。桉树组培一般使用 MS 培养基,但不同种源和无性系所适应的元素浓度不同,研究表明,培养基中的无机物可能是一些氧化酶合成及进行生理生化作用所必需的,对基本培养基的无机物进行调整有利于提高诱导率、减少褐化死亡,邓恩桉诱导培养在经过改良的 MS 培养基中培养比在未经改良的培养基中效果要好,褐化死亡率有所降低。高浓度的细胞分裂素和生长素有可能刺激桉树外植体的氧化,巨桉和邓恩桉带芽茎段在高浓度的外源激素中进行诱导褐化率较高,而在低浓度的外源激素中诱导褐化率减少。④在培养基中加入抗氧化剂或吸附剂。在培养基中加入抗坏血酸、EDTA 等影响酚氧化酶活性的物质,或加入硫脲、亚硫酸氢钠、二乙基二硫代氨基甲酸钠等影响酚类化合物与酶结合部位的物质,都能有效的减轻褐化的发生,这种是桉树组培中最常用的减轻褐化的方法<sup>[3]</sup>。⑤热击。在植物体中多酚氧化酶活性与多酚含量是平行的,热击可以影响植物多酚氧化酶类活性,进而影响酚类化合物的形成,有助于减少由于酚类物质而引起的褐化。

### 1.3 继代苗的玻璃化

植物试管苗玻璃化(vitrification)是指试管苗呈半透明状,与正常试管苗相比,玻璃苗在形态学上发生显著的变化,可分为外观形态明显异常和基本无异常 2 种类型。玻璃化是植物组织培养中所特有的现象,在自然环境中的陆生植物未见有玻璃化现象存在。众多研究表明<sup>[4]</sup>,玻璃苗绝大多数来自茎尖或茎切段培养物的不定芽,仅极少数玻璃苗来自愈伤组织的再生芽。

1.3.1 玻璃化苗形成的原因 玻璃苗是在人工提供的培养基和培养条件下形成的产物。玻璃化的发生是从茎尖、分生组织开始的,比较茎尖、茎段处于离体培养和整体植株处于自然生长环境的差异,主要在茎尖、茎段培养时切断了与根的联系而丧失了由根承担的对离子选择吸收和原来由根供应的细胞分裂素和脱落酸,这些在一定程度上改变了茎尖、茎段的离子平衡状况和激素平衡状况,从而导致玻璃化现象的产生;其次,试管培养光照弱、培养容器内相对湿度接近饱和、氧气供应不足等都易造成继代苗的玻璃化;第三,培养基中的营养元素不协调。

1.3.2 克服玻璃化苗形成的措施 试管苗玻璃化后偶尔可在延长期间恢复正常,但通常玻璃苗恢复正常的比例很低,且玻璃苗的分化能力低下,生理功能异常,难以增殖生根成苗及移栽成活,所以,控制试管苗玻璃化是桉树组培快繁的关键环节。

控制玻璃化苗形成的措施有:①适当提高光照强度,延长光照时间。把已经玻璃化的桉树继代苗转移到靠近窗口光照强的地方,玻璃苗可以转化成正常苗。②注意通气以尽可能降低培养容器内的空气相对湿度和改善氧气供应状况,可以有效的降低试管苗的玻璃化。③适当降低培养基中的  $\text{NH}_4^+$  浓度,提高培养基中的  $\text{P}^{3+}$  和  $\text{Ca}^{2+}$  浓度,桉树继代苗的玻璃化程度有所缓和,特别是邓恩桉 40 号无性系继代苗的玻璃化得到有效降低。④注意碳源种类和浓度的选择,试验分析表明玻璃化苗的总可溶性糖含量较高而蔗糖含量明显较低,故玻璃苗的糖代谢异常,在桉树组培中一般采用蔗糖,浓度在 2%~4%。⑤适当添加 IAA、 $\text{GA}_3$ 、ABA,减少 BA。一般认为 IAA 对桉树幼茎、叶柄等组织木质化的分化有直接作用<sup>[5]</sup>, $\text{GA}_3$  对蛋白酶、核酸、淀粉酶的生物合成有促进作用, $\text{GA}_3$ 、IAA 的急剧下降可能诱发木质素、蛋白质以及核酸等物质的合成失调,而 ABA 的适当含量是维持植物正常生长所必需。⑥在高温季节,培养室内必须有降温设施,控制温度不超过 32℃,温度高,继代苗的生长过快,玻璃化苗增多。

### 1.4 继代苗的遗传变异

组培过程中,如果经过愈伤组织途径诱导完整植株,就会导致遗传不稳定性,这种现象就称作体细胞无性系的变异。桉树的组织培养中,均采用离体芽器官诱导的方式培养完整植株,这种途径既使后代保持了优树的优良遗传特性,同时不易发生变异,所造的子代试验林林相整齐。

影响桉树继代苗遗传变异的因素中,培养基是最重要最复杂的因素。其中基本培养基不适合,营养元素不协调和不足均会对细胞有丝分裂发生干扰,导致继代苗生长不正常。植物生长调节剂的浓度和种类对再生植株的变异影响也很大,在高浓度的激素作用下,细胞分裂和生长加快,不正常分裂频率增加,再生植株的变异也增多。有些桉树速生良种(如  $\text{U}_6$ )经过几年的组培后,由于继代培养中所用的细胞分裂素浓度较高,继代苗逐渐变异,由组培快繁和工厂化育苗所生产的苗木逐渐失去了原来生长速度快、林相整齐

的特点,渐渐变得生长迟缓、林相参差不齐,造成一定的经济损失。所以调整培养基的成分,特别是大量元素的比例以及生长调节物质的浓度等对继代苗的正常生长至关重要,能减少组培苗的异常现象。

## 2 小结与讨论

1)污染问题是一直困扰桉树的组培快繁及工厂化育苗,特别是外植体的消毒,因为外界环境的千变万化和材料本身生理特点的不同,导致很难掌握外植体处理的方法和消毒时间的长短。一般桉树的诱导培养在冬春季节比较好,采集根部萌条,用酒精和0.1%升汞配合进行消毒,诱导成功率高;在秋夏季节不宜进行诱导培养,由于气温较高,周围环境的病虫害和病菌较多,消毒很困难,枝条本身处于生长的旺盛时期,顶端优势明显,腋芽难以萌发,且容易褐化。继代苗的污染主要由接种室和培养室空气不清洁以及工人接种造成,只要对接种和培养环境进行严格的消毒,工人操作严格按照无菌操作进行,继代污染问题就容易得到解决。

2)褐化主要由外植体本身的生理活性引起,外植体消毒时间过长,组织受损伤也会导致褐化。诱导培养褐化问题的解决措施有:对要采集的枝条提前3~5 d进行遮光预处理;对取回来的外植体茎段用抗氧化剂浸泡一段时间;暗培养10 d左右再进行光照培养;连续将外植体茎段转接到新培养基上;有针对性的添加活性炭和抗氧化剂。

3)玻璃化苗主要是由培养基和培养环境不适合继代苗的生长所引起。培养基中的营养元素不协调,激素种类和浓度不适合,瓶内的湿度过高,光照不足或光质不良等都会造成玻璃化苗的产生。降低试管苗玻璃化的措施主要是改良基本培养基,调整激素种类、浓度和增强光照。

4)继代苗的遗传变异是一个非常复杂的问题。引起遗传变异的因素相当多,主要是材料本身的基因型,遗传稳定性好的基因型不容易变异;其次是培养环境,培养基的营养元素不协调,激素种类和浓度不适合,光照、温度、湿度等都会引起植株的遗传变异现象的发生;第三是培养途径,通过愈伤组织途径培养完整植株发生变异的频率较高,通过离体芽器官诱导途径培养完整植株发生变异的频率较低。实践表明,通过愈伤组织途径培养的桉树组培苗在同一立地条件生长不一致,而通过离体芽器官诱导培养的桉树组培苗在同一立地条件下生长比较一致,林相整齐。

## 参考文献:

- [1] J.J. Le roux, J. Van staden. 桉树的微繁殖和组织培养[J]. 广西林业科学, 1994, 23(1): 32-40.
- [2] 彭海信, 宾秋实. 植物组织培养在林木遗传育种中的应用[J]. 经济林研究, 1998, 16(2): 54-55.
- [3] Piyarak Tanprasert, Barbara M Reed. Detection and ideatification of bacterial coatamination of strawberry runner explants[J]. Plantcell, Tissue and organ culture, 1998, (52): 53-55.
- [4] 周俊辉. 植物快速繁殖中存在的问题与对策[J]. 仲恺农业技术学院学报, 1999, 12(4): 64-70.
- [5] 吴林森. 植物组织培养污染问题的研究及其控制措施[J]. 江苏林业科技, 2005, 32(1): 28-31.
- [6] 杜雪玲, 张振霞, 余如刚, 等. 植物组织培养中的污染成因及其预防[J]. 草业科学, 2005, 22(1): 24-27.
- [7] 郑文静, 赵海岩, 杨立国. 植物组织培养操作过程中的常见问题及其解决办法[J]. 辽宁农业科学, 2001, (2): 49-91.
- [8] 姚洪军, 罗晓芳, 田砚亭. 植物组织培养外植体褐变的研究进展[J]. 北京林业大学学报, 1999, 21(3): 78-84.
- [9] Devi S R, Prasad M N V. Ferulic acid mediated changes in oxidative enzymes of maize seedlings implication in growthV [J]. Nature, 1996, 38(3): 387-395.
- [10] Phan, Leshem, Sachs. Relationship between calcium and agar on vitrification and shoot - tip necrosis of quince shoots in vitro [J]. Plant Cell, Tissue and organ culture, 1990, 23(2): 135-142.
- [11] Bagatharia S B, Chanda S V. Changes in peroxidase and IAA oxidase activities during cell elongation in Phaseolus hypocotyls [J]. Acta Physiol Plant, 1998, 20(1): 9-13.