

# 桉树组培育苗新技术

## New Techniques of Culturing *Eucalyptus* Plantlets by Tissue Culture

欧阳权 曾炼武 李洁汉

Ouyang Quan Zhen Lianwu Li Jiehan

(钦州地区林科所 钦州市傍钦路 535000)

(Forestry Research Institute of Qinzhou Prefecture, Pangqin Road, Qinzhou, Guangxi, 535000)

**摘要** 全面介绍桉树组织培养试验研究成果。通过筛选出改良 H、B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 基本培养基,成功地从桉树愈伤组织诱导发生胚性细胞团,分化出根苗齐全、遗传性状稳定、频率很高的胚状体苗,成苗系数高达 10<sup>11</sup>;用杂交优势种的芽器官离体培养,不经过愈伤组织途径,避免脱分化过程易引起染色体变异的弊端,以芽繁芽,以苗繁苗成功,年繁殖系数 3.5<sup>12</sup>,解决了桉树组织培养的一系列技术关键。

**关键词** 桉树 组织培养 胚状体 以芽繁芽

**Abstract** The experimental results on tissue culture of *Eucalyptus* are overall introduced. Through selecting improved H, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> basic medium, the embryonic cell aggregates were induced successfully from *Eucalyptus* callus. The embryoid plantlets were differentiated, and with complete root, stable genetic character and high frequency. The coefficient of plantlets can be up to 10<sup>11</sup>. The method of propagating bud organ of hybrid dominant in vitro (without callus culturing) can be used to avoid chromosome variation during differentiation. Propagating buds by using buds and propagating plantlets by using plantlets were successfully carried out, and the annual propagation coefficient can be 3.5<sup>12</sup>. A series of technical matters of *Eucalyptus* tissue culture have been solved.

**Key words** *Eucalyptus*, tissue culture, embryoid, propagating buds by using buds

桉树是世界上三大主要产材树种之一,人工造林已占世界人工造林的五分之一。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。早在 1965 年, Sussex<sup>[1]</sup>即由赤桉实生苗外植体获得过愈伤组织。此后不少国外学者先后利用桉树木质块茎、节间、下胚轴及子叶、茎节、成年桉树嫩枝段等不同器官组织培养诱导完整植株成功<sup>[2]</sup>。

1979 年上海园林科学研究所和复旦大学生物系合作,已从葡萄桉、灰桉、王桉和柠檬桉繁殖出大量苗木<sup>[3]</sup>。江西省赣州地区林科所从上海引种葡萄桉试管苗,已繁殖大量苗木上山造林<sup>[4]</sup>。广东省雷州林业局林科所也于 1979 年开始对雷林 1 号优良桉树进行组织培养,现已诱导出一批完整植株和进行育苗移栽<sup>[5]</sup>。

1978 年,我们开始林木组培研究,至 1979 年 2 月用雷林 1 号桉、窿缘桉、柠檬桉嫩茎和萌芽条顶梢

诱导,从愈伤组织中获丛生型萌芽,转移培养成完整植株,移栽成活;同年 6 月,用雷林 1 号桉优树种子及无菌苗诱导,分化出根苗齐全的胚状体苗<sup>[6]</sup>,从柳桉×窿缘桉及巨桉×窿缘桉的杂交 F<sub>1</sub> 代种子诱导出胚状体苗,并能大量繁殖苗木,上山造林。1986 年以来,选择具有杂种优势的巨尾桉进行芽器官离体培养,试验采用成年芽器官不经过愈伤组织途径,取得成功。至目前为止,据不完全统计,国内已有 18 家桉树组培工厂,其中有 6 家是用钦州地区林科所转让的技术<sup>[7]</sup>。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

1.1.1 优树幼化了的器官;最佳杂交组合 F<sub>1</sub> 代的种子或器官;优树在根莖部环状剥皮处长出的嫩芽;树冠上部嫩枝埋入土中长出的萌芽。

1.1.2 桉树不定芽的诱导用怀特 (White, 1963)、B<sub>6</sub> (Gamborg, 1968)、H (Hildebrand, 1972)、N<sub>6</sub> (朱至

清, 1975) 和 MS (Murashige 和 Skoog, 1962) 等基本培养基; 胚状体的诱导用 B<sub>5</sub>、H 及 White 改良等基本培养基。

为了保证铁离子的供应, 以 FeSO<sub>4</sub> 与 Na-EDTA (螯合剂) 先行混合, 其用量是 27.8 mg FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 配合 37.3 mg Na-EDTA, 然后将此混合液加入到 1 L 的培养基中。诱导桉树不定芽的附加成分主要有吲哚乙酸 (IAA) 0.5~2 mg/L、萘乙酸 (NAA) 0.01~2 mg/L、吲哚丁酸 (IBA) 0.5~1 mg/L、2, 4-二氯苯氧乙酸 (2, 4-D) 0.5~2 mg/L、6-苄基嘌呤 (BA) 0.5~2 mg/L、椰乳 (CM) 10% 等。桉树胚状体诱导用的附加成分: 诱导愈伤组织为激动素 (KT) 0.8~1 mg/L、2, 4-D 2 mg/L、蔗糖 40~50 g/L、琼脂 6.5 g/L; 诱导胚状体分化的为 BA 0.2~1 mg/L、NAA 0.5 mg/L、蔗糖 50 g/L、琼脂 6.5 g/L, 或 IBA 0.5~1 mg/L、蔗糖 30 g/L、琼脂 7 g/L。培养基配置后, pH 调至 5.8~6.5, 分瓶加塞包扎, 经 1~1.5 kg/cm<sup>2</sup> 高压灭菌 20 min。

### 1.3 操作程序

1.3.1 材料是种子: 用湿纱布包 10 余小时, 然后置 75% 乙醇中浸泡 10~15 s, 转入 1% 升汞溶液中浸泡 10 min, 用无菌水冲洗 4~5 次, 吸干水分, 接种于培养基 (琼脂 7 g/L) 上, 5~7 d 即可长出幼苗, 待苗高 0.5~2 cm 时, 将苗切成 0.2~0.3 cm 的小段, 接种于诱导培养基上。

1.3.2 材料是嫩茎段等器官: 在清水中冲去泥沙等附着物, 再用洗涤剂刷洗, 又经清水冲洗后放在无菌室的超净台上, 用 70% 乙醇进行表面消毒 1 min, 后

表 1 因子、水平表  
Table 1 Factors and levels

水平 Level	因素 Factors			
	品系 Species	基本培养基 Basic medium	蔗糖 Sucrose	生长素 Growth hormone
	A	B	C(g)	D(mg/L)
1	A <sub>1</sub> 窿缘桉嫩茎 <i>E. exserta</i> young stem	B <sub>1</sub> MS	C <sub>1</sub> 50	D <sub>1</sub> 2, 4-D <sub>2</sub>
2	A <sub>2</sub> 柠檬桉嫩茎 <i>E. citriodora</i> young stem	B <sub>2</sub> N <sub>6</sub>	C <sub>2</sub> 40	D <sub>2</sub> 2, 4-D <sub>4</sub>
3	A <sub>3</sub> 柳桉嫩茎 <i>E. salina</i> young stem	B <sub>3</sub> White	C <sub>3</sub> 30	D <sub>3</sub> IAA <sub>2</sub>
4	A <sub>4</sub> 雷林 1 号桉嫩茎 <i>E. Leilin</i> No. 1 young stem	B <sub>4</sub> B <sub>5</sub>	C <sub>4</sub> 20	D <sub>4</sub> IAA <sub>4</sub>

\* 生长素下标数字为用量 The lower number marks of growth hormone are contents.

用 10%~13% 漂白粉过滤液消毒 20 min, 再经无菌水冲洗 4~5 次后, 接种于固体培养基上。培养时室温 25~29℃, 荧光灯辅助光照每天 12~14 h, 光照度为 1000~1500 lx。

## 2 胚状体的繁殖

### 2.1 培养基筛选

具体做法是: 运用多因子正交设计方法, 配以简单对比试验。按 L<sub>16</sub> (4<sup>4</sup>) 正交设计诱导愈伤组织的程序如表 1、表 2、表 3。

表 2 试验结果

Table 2 Experimental results

试验号 Expt. no.	品系 Species	培养基 Medium	蔗糖 Sucrose	生长素 Growth hormone	接种块数 No. inoculations	产生愈伤组织数 No. callus	频率 Frequency Z (%)
	A	B	C	D			
1	窿缘桉 <i>E. exserta</i>	MS	50	2, 4-D <sub>2</sub>	260	39	15
2	窿缘桉 <i>E. exserta</i>	N <sub>6</sub>	40	2, 4-D <sub>4</sub>	210	147	70
3	窿缘桉 <i>E. exserta</i>	White	30	IAA <sub>2</sub>	200	56	28
4	窿缘桉 <i>E. exserta</i>	B <sub>5</sub>	20	IAA <sub>4</sub>	210	189	90
5	柠檬桉 <i>E. citriodora</i>	MS	40	IAA <sub>4</sub>	248	30	12
6	柠檬桉 <i>E. citriodora</i>	N <sub>6</sub>	50	IAA <sub>4</sub>	219	22	10
7	柠檬桉 <i>E. citriodora</i>	White	20	2, 4-D <sub>2</sub>	243	2	1
8	柠檬桉 <i>E. citriodora</i>	B <sub>5</sub>	30	2, 4-D <sub>4</sub>	221	3	1
9	柳桉 <i>E. salina</i>	MS	30	IAA <sub>4</sub>	189	10	5
10	柳桉 <i>E. salina</i>	N <sub>6</sub>	20	IAA <sub>2</sub>	204	61	30
11	柳桉 <i>E. salina</i>	White	50	2, 4-D <sub>4</sub>	200	120	60
12	柳桉 <i>E. salina</i>	B <sub>5</sub>	40	2, 4-D <sub>2</sub>	200	108	54
13	雷林 1 号桉 <i>E. Leilin</i> No. 1	MS	20	2, 4-D <sub>4</sub>	190	1	1
14	雷林 1 号桉 <i>E. Leilin</i> No. 1	N <sub>6</sub>	30	2, 4-D <sub>2</sub>	201	20	10
15	雷林 1 号桉 <i>E. Leilin</i> No. 1	White	40	IAA <sub>4</sub>	200	200	100
16	雷林 1 号桉 <i>E. Leilin</i> No. 1	N <sub>5</sub>	50	IAA <sub>2</sub>	200	97	49

试验结果表明:①蔗糖浓度的变化,影响最显著。其中又以窿缘桉这组搭配最优,最好的配方是 B<sub>5</sub>加 KT<sub>0.8</sub>、IAA<sub>4</sub>、蔗糖20 g/L、琼脂74 g/L。②除柠檬桉外, B<sub>5</sub>培养基适用于桉树的诱导。③将柠檬桉嫩枝组织接种于 B<sub>5</sub>培养基上,附加 KT<sub>0.8</sub>、2, 4-D<sub>4</sub>、蔗糖30 g/L、琼脂74 g/L,经过50余天诱导,出现“S”形绿苗1株;

表3 方差分析

Table 3 Analysis of variance

变异来源 Variation source	自由度 Degree of freedom	离差平方和 Deviation sum of squares	均方 Mean square	F 值 F value	F <sub>0.10</sub>	F <sub>0.05</sub>	F <sub>0.01</sub>
A	3	4440.5	1480.16	5.3	5.39	9.28	29.5
B	3	4255.5	1416.5	5.07	5.39	9.28	29.5
C	3	4662.0	155.4	5.56	5.39	9.28	29.5
D	3	2046.5	682.16	2.44	5.39	9.28	29.5
E	3	837.5	279.16				
总差异 Total difference	15	16242					

表5 试验结果

Table 5 Experimental results

试验号 Expt. no.	重复1 Repetition 1				重复2 Repetition 2			
	材料 Material	接种块数 No. inoculations	愈伤块数 No. callus	频率 Frequency (%)	材料 Material	接种块数 No. inoculations	愈伤块数 No. callus	频率 Frequency (%)
1	枝 Branch	184	164	89	枝 B ranch	240	158	66
2	枝 Branch	177	159	88	枝 Branch	193	157	81
3	叶 Leaves	244	144	59	叶 Leaves	210	104	50
4	枝 Branch	226	92	40	叶 Leaves	225	71	31.5
5	枝 Branch	196	112	60	枝 Branch	200	200	100
6	叶 Leaves	208	28	13.5	叶 Leaves	227	187	82.4
7	叶 Leaves	239	87	36.4	叶 Leaves	224	10	5
8	叶 Leaves	229	14	6	枝 Branch	230	124	54

表6 雷林1号桉嫩枝诱导

Table 6 Induction of *E. Leilin* No. 1 young branch

试验号 Expt. no.	培养基 Medium	效果 Result
1	H + BA <sub>2</sub> + NAA <sub>2</sub> + 蔗糖3%	大部分产生愈伤组织,经27 d 培养,直接分化出绿苗,分化率15% Most produce callus. Through 27 d culturing, green plantlets were directly differentiated. 15% differentiation rate.
2	B <sub>5</sub> + KT <sub>0.8</sub> + 2,4-D <sub>2</sub> + 蔗糖4%	大部分产生愈伤组织,出现3、4条根,经100余天增大仍不能分化出茎叶 Most produce callus and three or four roots can be seen. After 100 days, leaf and stem can not be differentiated.
3	MS + KT <sub>0.8</sub> + 2,4-D <sub>2</sub> + 蔗糖5%	同试验号2 Same as Expt. no. 2.

接种于 White 培养基上,附加 KT<sub>0.8</sub>、2,4-D<sub>4</sub>、蔗糖20 g/L、琼脂74 g/L,经过100 d 诱导,出现绿苗2株,说明这样的培养基虽可启动分化,但频率太低,需要在以上试验的基础上,反复对 B<sub>5</sub>培养基进行验证,用 L<sub>8</sub> (4×2<sup>4</sup>) 正交设计诱导愈伤组织(表4、表5)。

表4 排列设计

Table 4 Arrangement design

试验号 Expt. no.	培养基 Medium	KT (mg/L)	生长素 Growth hormone (mg/L)	蔗糖 Sucrose (%)
1	B <sub>5</sub>	0.8	2, 4-D <sub>2</sub>	3
2	B <sub>5</sub>	0.8	IBA <sub>2</sub>	7
3	MS	1	2, 4-D <sub>2</sub>	7
4	MS	1	IBA <sub>2</sub>	3
5	B <sub>5</sub>	1	IBA <sub>2</sub>	4
6	B <sub>5</sub>	1	2, 4-D <sub>2</sub>	5
7	MS	0.8	IBA <sub>2</sub>	4
8	MS	0.8	2, 4-D <sub>2</sub>	5

表5说明 B<sub>5</sub>培养基确实适合桉树嫩枝培养,而且在诱导培养基中的蔗糖浓度用4%~7%,在分化培养基中降至3%也是恰当的。

最后用 L<sub>16</sub> (4<sup>3</sup>) 正交设计表,筛选了另外4种基本培养基,发现 H 培养基的效果接近 B<sub>5</sub>培养,简单对比试验如下:

从表6来看, B<sub>5</sub>或 MS 培养基,附加 KT<sub>0.8</sub>、2,4-D<sub>2</sub>、蔗糖4%~5%,是桉树外植体诱导愈伤组织较好方案,但要转移培养才能分化出芽; H 培养基,附加 BA<sub>2</sub>、NAA<sub>2</sub>、蔗糖3%,不仅愈伤组织好,而且能直接分化出绿苗。

表7显示,以 H 及 B<sub>5</sub>培养基,附加 BA<sub>1</sub>、NAA<sub>0.5</sub>,能使桉树细胞生活并促进器官建成,但分化频率低,需调整基本培养基,提高 H 培养基中的含氮量(表

8), 发现若使硝态氮与氨态氮的差值保持在170左右时, 绿苗诱导频率可达100%; 而两种氮源差值过大, 超过200时, 则会抑制绿苗的分化; 差值低于130, 则会推迟绿苗分化的时间。

用 N<sub>6</sub> 及 B<sub>5</sub> 培养基很难分化出绿苗, 用 H 培养基要30余天才能分化出绿苗, 改良 H 培养基10余天就可以分化出绿苗。同时还发现, 激动素浓度过高, 易使愈伤组织增长快, 结构松散, 抑制不定芽的生长发育。只在细胞分裂素 (BA) 0.5 mg/L、生长素

表7 分化培养基对比表

Table 7 Comparison of media for differentiation

试验号 Expt. no.	材料 Material	培养基 Medium	愈伤组织 块数 No. callus	出现绿苗数 No. green plantlets induced	频率 Frequency (%)
260	雷林1号桉嫩枝 <i>E. Leilin</i> no. 1 young branch	H+BA <sub>1</sub> +NAA <sub>0.5</sub>	5	12 (3)	60
170	雷林1号桉嫩枝 <i>E. Leilin</i> no. 1 young branch	B <sub>5</sub> +BA <sub>1</sub> +NAA <sub>0.5</sub>	44	20	45.5
259	雷林1号桉嫩枝 <i>E. Leilin</i> no. 1 young branch	H+BA <sub>1.5</sub> +NAA <sub>1</sub>	5	1 (1)	20
182	雷林1号桉嫩枝 <i>E. Leilin</i> no. 1 young branch	H+BA <sub>2</sub> +NAA <sub>0.2</sub>	14	8 (3)	21.4
185	柳枝嫩枝 <i>E. salina</i> young branch	H+BA <sub>2</sub> +NAA <sub>0.2</sub>	33	12 (5)	15
186	柳枝嫩枝 <i>E. salina</i> young branch	MS+BA <sub>0.5</sub> +NAA <sub>0.1</sub>	43	14 (3)	7
169	柳枝嫩叶 <i>E. salina</i> young branch	H+BA <sub>0.5</sub> +NAA <sub>0.5</sub>	47	7	15
168	柳枝嫩叶 <i>E. salina</i> young branch	N <sub>6</sub> +KT <sub>1</sub> +NAA <sub>0.5</sub> +IBA <sub>0.5</sub>	51	愈伤组织老化	0

括号内数字为分化出绿苗的愈伤组织块数 Values in Brackets are nos. of cellus with green plantlets.

表8 氮源含量对比

Table 8 Comparison of nitrogen contents

项目 Entry	总含氮量 Total nitrogen content	氨态氮 Amino group nitrogen		硝态氮 Nitro group nitrogen		差值 Difference value
		NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	KNO <sub>3</sub>	
N <sub>6</sub>	489.1892		97.0016		392.1876	295.1860
B <sub>5</sub>	378.1809		28.0134		350.1675	322.1541
H	382.5734	125.4552		125.4552	131.6630	131.6630
改良 H Improved H	521.7475	174.2433		174.2433	173.2609	173.2609

(NNA) 1 mg/L 的情况下, 愈伤组织结构才不紧不松, 对不定芽的启动有显著效果。

## 2.2 诱导发生胚性细胞团

将灭菌后的杂交 F<sub>1</sub> 桉树优良种子, 接种于7%的琼脂培养基上, 5~7 d, 待苗高0.5~2 cm 时, 在无菌条件下切成0.2~0.3 cm 的碎段, 接种于诱导培养基, 或者用无菌种子直接接种于诱导培养基, 配方为: B<sub>5</sub> 或 H 或改良 H, 加KT<sub>0.8-1</sub>+2, 4-D<sub>2-4</sub>+蔗糖40~50 g/L+琼脂6~7 g/L。

接种3~4 d 后, 愈伤组织产生, 20余天内愈伤组织迅速增殖, 红带白色, 趁新鲜结实时, 及时转入分化培养基中, 配方为: H 或改良 H, 加BA<sub>0.2-1</sub>+NAA<sub>0.05</sub>+蔗糖30~50 g/L+琼脂6~7 g/L。

这时愈伤组织增殖较慢, 培养1~2周, 逐渐呈粉红色, 表面光滑, 结构致密, 非常新鲜, 4~8周, 表面更加光滑, 湿润, 呈紫红色或淡红色, 颗粒状, 凹凸不平。这时, 愈伤组织已分化出胚性细胞团, 这种胚性细胞团能分化出许多胚状体。再经10~30 d 培养, 就能大量长出根苗齐全的单生型小苗。在芽和胚苗周围的基部边缘, 能长出新的细胞团及聚集的胚状体。可以看出, 下胚轴是产生胚状体的主要部位。然而, 出现胚状体后, 能否分化出芽和根, 还取决于激动素和生长素的恰当配比(表10)。

从表10看, 5个试验号都长出了大量的绿苗, 但只有3个试验号长根, 2个试验号只长苗不长根, BH<sub>0.2</sub> 与NAA<sub>0.5</sub> 是最好的搭配。如果由于分化培养调剂不当, 绿苗多, 发根少, 则可转入 H 或改良 H+IBA<sub>0.5-1</sub>+蔗糖

30 g/L+琼脂6~7 g/L的培养基中；如果发根很多，不长绿苗，则说明培养基中的生长素浓度过高，再转移培养，也很难获得苗根齐全完整植株。

表9 改良H基本培养基的组分

Table 9 Component of improved H basic medium

组成 Component	含量 Content (mg/L)	组成	含量 Content (mg/L)
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1000	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.1
KNO <sub>3</sub>	1250	Na <sub>2</sub> EDTA	37.3
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	166	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.8
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370	NaSO <sub>4</sub>	50
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	150	肌醇 Inositol	100
KT	0.83	烟酸 Nicotinic acid	5.0
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	5	盐酸硫胺素 Thiamine hydrochloride	0.5
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	10	盐酸吡哆素 Pyridoxine hydrochloride	0.5
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	6	甘氨酸 Glycine	2
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.025	叶酸 Folic acid	0.5
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025	生物素 Biotin	0.05

### 2.3 胚性细胞团的继代培养

愈伤组织或胚性细胞团在培养基上生长一段时间后，由于营养物质枯竭、水分散失、一些组织的代谢产物积累，需及时地转移到新的培养基上继代培养。桉树胚性细胞长期进行继代培养，仍能保持旺盛的生活力和分化能力，不仅能分化出大量胚状体成苗，而且能不断增殖和继代（表11）。

试验结果表明：继代后15~35 d增殖最快，15 d内是恢复期，40 d以后开始老化。同时，胚性细胞团的体积在1~3 cm<sup>3</sup>时，细胞分裂最旺盛，增殖最快。继代时的体积则以0.12~0.2 cm<sup>3</sup>最好，小于0.05 cm<sup>3</sup>时所需要的恢复期长，大于0.2 cm<sup>3</sup>时容易老化（变褐色或黑褐色）。因此，继代培养，应以20 d左右为宜，胚性细胞团的切割应以0.1~0.2 cm<sup>3</sup>为宜。尽管一个试管内有苗200余株，一个1000 mL的三角瓶内能有苗2000余株。但因这些苗生长是不同步的，而且又没有分类进行继代，移栽时细胞团和大小苗都一起被移出，以致大部分小苗被埋入土中淹死，只有2~4 cm高的才能长大成苗，所以一个试管的细胞团仅能成苗10~20株，成苗率占5%~10%。

### 2.4 胚状体的形成

胚状体成苗的全过程：原胚——球形胚——心形胚——鱼雷形胚——子叶形胚——发育成根苗齐全的胚状体苗，与整体植物中受精卵的发育极为相象。

桉树胚状体，是在加椰子汁的固体培养条件下，由胚性细胞团表皮细胞形成的。胚状体在早期阶段与发育的芽有时很难区别。Haccins (1971) 认为两者区别在于胚状体具有两极性<sup>[8]</sup>。

表10 不同激素配比效应对比

Table 10 Comparison of effect of different hormone prescription

试验号 Expt. no.	材料 Material	培养基 Medium	管数 No. tubes	产生绿苗数 No. plantlets induced	完整植株 Complete plantlet
A <sub>5</sub> 1112	胚性细胞团 Embryonic cell aggregates	H+BA <sub>0.2</sub> +NAA <sub>0.5</sub> +蔗糖3%+琼脂0.65%	24	2000	840
A <sub>4</sub> 1053	胚性细胞团 Embryonic cell aggregates	改良H+BH <sub>0.2</sub> +IBA <sub>0.5</sub> +蔗糖5%+琼脂0.65%	18	3600	1200
A <sub>4</sub> 1055	胚性细胞团 Embryonic cell aggregates	改良H+BA <sub>1</sub> +NAA <sub>0.5</sub> +蔗糖5%+琼脂0.6%	9	1800	0
A <sub>4</sub> 1114	胚性细胞团 Embryonic cell aggregates	改良H+BA <sub>0.5</sub> +IBA <sub>0.5</sub> +蔗糖5%+琼脂0.65%	24	4000	0
A <sub>4</sub> 1043	胚性细胞团 Embryonic cell aggregates	改良H+BA <sub>1</sub> +2,4-D <sub>0.5</sub> +蔗糖3%+琼脂0.7%	20	4000	1500

表11 12个胚性细胞团增殖情况表

Table 11 Statement of increment of 12 embryonic cell aggregates

试验号 Expt. no.	每代培养天数 Days of culturing for each generation				管数 No. tubes	继代日期 Date of subculture	至老化天数 Days till aging	细胞团号 No. of cell aggregate	转管至老化增殖 Increment from change tube to aging (cm <sup>3</sup> )	增殖倍数 Times of increment
	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>4</sub>						
	A <sub>3</sub> 1008	19	32	53						
A <sub>3</sub> 1020	19	31	77		60	1979. 8. 2	40	3 (Max.) 4 (Min.)	0.36~8.53 0.03~1.57	13.7 52.3
A <sub>3</sub> 1021	19	33	85		45	1979. 8. 4	51	5 (Max.) 6 (Min.)	0.59~6.19 0.012~7.41	11.7 617.5
A <sub>3</sub> 1022	19	33	129		13	1979. 8. 4	51	7 (Max.) 8 (Min.)	0.144~11.22 0.036~2.30	77.9 64.0
A <sub>4</sub> 1029	19	21	19	89	33	1979. 8. 7	53	9 (Max.) 10 (Min.)	0.32~7.92 0.08~8.08	24.7 101.0
A <sub>4</sub> 1030	19	21	19	71	30	1979. 8. 7	60	11 (Max.) 12 (Min.)	0.57~9.60 0.07~5.40	16.8 77.1

桉树胚状体的发生<sup>[9]</sup>：一是直接从种子或无菌苗的愈伤组织，经胚性细胞团而产生；二是通过胚性细胞团继代，在胚性细胞团的增殖过程中，再长出胚状体。为了诱导愈伤组织形成胚状体，连续改变培养基特别是激素成分是十分重要的。降低或去除培养基中的生长素成分尤为关键，特别是使用2, 4-D时。培养基中加入椰子汁或细胞激动素，能抑制胚状体的形成。总之，促进组织增殖的培养基的激素成分(KT及2, 4-D)并不适于胚状体的分化，除去KT及2, 4-D，换之以BA及IAA(或IBA或NAA)，则会促进胚状体的形成；加BA，组织增殖速度增加，但仍抑制胚状体形成。然而，一旦形成了胚状体原始细胞，则BA对其发育成胚状体并无影响。如果加入赤霉素，则会完全抑制其胚状体的分化，使细胞团迅速老化。另外细胞增殖过程中的激素环境对下一步器官分化有着明显的影响，具有两极性的胚状体与组培中器官形成一样，提高生长素的浓度有利于根的形成而抑制芽的形成，相反，较高浓度的激动素则促进芽的形成而抑制根的形成。腺嘌呤和生长素之间有着某种相互作用，比例高时，利于芽形成；比例低时，利于形成根。2, 4-D能促进愈伤组织的形成，引起根的产生；IAA、IBA能促进细胞团生长及芽的形成；NAA则引起大量根的形成。氮和生长素是分化胚性细胞团的关键比例。铁对胚状体的形成也具有重要作用。硫胺素的作用也极为明显。

### 3 芽器官离体培养

#### 3.1 无菌培养物的建立

1986年2~4月，芽膨大时，在巨尾桉优株母株不同树冠部位采集芽条，分4段接种试验：顶芽为A段；顶芽以下分B、C、D段。试验结果如表12。

表12 腋芽的萌动和褐化

Table 12 Sprouting and brown rot of axillary bud

部位 Position	腋芽位置 Location of axillary bud	接种数 No. inoculations	褐变率 Rate of brown rot (%)	萌动 芽数 No. sprouting buds	萌动率 Rate of sprouting (%)	备注 Remarks
树冠上部 Upper part of crown	A段 Section A	277	96	0	0	易脱分化成愈伤组织 Easy to differentiate to callus ++++
	B、C段 Section B、C	632	95	7	1.1	不易脱分化 Uneasy to differentiate +
	D段	775	100	0	0	
树冠下部 Lower part of crown	B、C段 Section B、C	436	80	49	11.2	不易脱分化 Uneasy to differentiate +
	D段 Section D	872	100	0	0	
浅根萌芽条 Coppice shoot of shallow root	B、C段 Section B、C	20	76	12	60	不易脱分化 Uneasy to differentiate +
	D段 Section D	41	100	0	0	

表12表明: A段组织幼嫩, 不但易褐化, 且易脱分化成愈伤组织; B、C段, 组织半木质, 较易于诱导芽增殖; D段, 因木质化程度高, 褐化严重, 没有萌动。在树冠上部采集的B、C段萌动率1.1%, 树冠下部的萌动率11.2%, 浅根萌芽条的萌动率60%。可见, 选用萌芽条半木质化的茎段, 容易建立无菌培养物。

巨尾桉带芽茎接种后, 易发生褐变, 并经常使培养基也变成棕褐色, 导致组培的失败。原因是外植体中的多酚化合物在多酚氧化酶的作用下氧化。在培养基中增加抗坏血酸、柠檬酸、半胱氨酸等, 用抗氧化剂溶液预先处理外植体, 采取暗培养, 以降低多酚氧化物的氧化。

表13 不同光照度对外植体褐变的影响

Table 13 Effect of different lights on brown rot of explant

无性系 Clone	外植体种类 Type of explant	外植体数 No. explants	光照度 Illuminanc (lx)	褐变率 Rate of brown rot (%)
I <sub>2</sub>	茎段 Stem	432	1000~1500	90
I <sub>2</sub>	茎段 Stem	81	全暗培养 Complete darkness	50
I <sub>11</sub>	顶芽 Phyllogen	49	1000~1500	98
I <sub>19</sub>	顶芽 Phyllogen	52	全暗培养 Complete darkness	0

表14 不同培养基对丛芽分化速率的影响

Table 14 Effect of different medium on differentiation of clustered buds

培养时间 Month of culturing (月)	丛芽分化速率(倍) Rate differentiation of clustered buds (times)	
	B <sub>1</sub> 培养基 B <sub>1</sub> medium	改良 H 培养基 Improved H medium
	1	0.75
2	1.50	0.75
3	2.25	0.90
4	2.85	1.10
5	3.35	1.25
6	3.75	1.40
7	3.85	1.50
8	3.85	1.65
9	3.95	1.75
10	3.95	1.75
11	3.95	1.75
12	3.95	1.75

光照度对外植体褐变的影响采用简单对比试验, 接种10 d后观察, 结果(表13)表明, 采取全暗培养可以基本解决氧化变褐的现象。

### 3.2 芽的增殖

外植体在培养基中全暗培养10~15 d后, 转入光培养, 芽长1 cm左右, 切取腋芽诱导分化丛生芽。

3.2.1 培养基选择: 不同培养基对丛生芽分化速率的影响见表14。

表14表明: B<sub>1</sub>培养基对促进丛生芽增殖效果显著, 培养6个月时, 丛生芽进入了旺盛增殖时, 已达3.75倍, 而改良 H 培养基, 芽的增殖缓慢, 培养到9个月, 只增殖1.75倍。

### 3.2.2 培养条件

当丛生茎芽长到2 cm时, 选取健壮芽条转移到生根培养基中, 其余芽丛留在原培养基中, 或转移到新配置的培养基中增殖生长。温度、光照度对有效苗分化的影响见表15。

表15 不同温度和光照度对有效苗分化的影响

Table 15 Effect of different temperature and illuminanc on differentiating effective plantlets

温度 Temperature (℃)	光源 Source of light	光照度 Illuminanc (lx)	每瓶有效苗数 No. effective plantlets each tube	生长状态 State of growth
20	日光灯 Fluorescent lamp	1000~1500	17	易产生淡青色玻璃苗 Easy to induce light green glassy plantlet ++++
	自然散射光 Nature scattering light	3000~7000	48	丛芽生长正常, 不易产生玻璃苗 Normal growth of clustered bud, uneasy to induce glassy plantlet +
26~28	日光灯 Fluorescent lamp	1000~1500	38	易形成玻璃苗 Easy to form glassy plantlet ++
	自然散射光 Nature scattering light	3000~7000	85	芽苗生长正常, 叶片舒展, 不易产生玻璃苗 Normal growth of buds and unfolding leaves, un easy to form glassy plantlets
28~32	日光灯 Fluorescent lamp	1000~1500	32	形成大量淡红色肉质玻璃苗, 褐化严重 Great amount of light red fleshy glassy plantlets, serious brown rot ++++
	自然散射光 Nature scattering light	3000~7000	77	产生玻璃苗少 Few glassy plantlet

从表15看出: 自然散射光比日光灯的有效苗数增加1倍以上, 且芽苗正常, 生长健壮, 很少玻璃苗; 温

度以26~28 C最好, 室温高达32 C也影响不大, 但室温20 C以下, 有效苗便大量减少。

### 3.3 诱导生根

丛生芽茎长到2 cm时, 选取健壮芽条转移到 B<sub>2</sub> 生根培养基中, 诱导生根; 或者移栽到苗圃, 培养生根。

3.3.1 培养基中无机盐浓度对发根率影响最大, 其次是生长素种类和培养程序 (表16)。

表16 无机盐浓度与激素种类对试管苗生根的影响

Table 16 Effect of concentration of inorganic salt and type of hormone on rooting of tube culturing plantlets

培养基中无机盐浓度 Concentration of inorganic salt in the medium	生长素 Growth hormone	发芽率 Rate of sprouting (%)	生长状况 Growth state
B <sub>1</sub> 全量无机盐 Full inorganic salt	ABT1号	13.8	切口易形成愈伤组织, 根系呈放射线状 Callus easy to form on cut and scattering root can be seen.
B <sub>1</sub> 1/2无机盐 1/2 inorganic salt	ABT1号	28.4	根细小, 无侧根 Fine root and no side root
B <sub>2</sub> 低无机盐 Lower inorganic salt	ABT1号	73~98	根系正常有健壮侧根 2~3条 Normal root system with 2~3 strong side roots
B <sub>2</sub> 低无机盐 Lower inorganic salt	IBA	61~86	易形成愈伤组织后发根 Callus easy to form, then rooting

从表16知, 最优搭配是: B<sub>2</sub>培养基+生根粉 ABT1号。在 B<sub>1</sub>培养基高浓度无机盐的情况下诱导, 不仅发根率低, 而且易形成愈伤组织; 同样是 B<sub>2</sub>培养基的低浓度无机盐, 生根粉 ABT 比生长素 IBA 发根好。

芽条转入生根培养基后, 先在室内弱光照射条件

表18 不同基质对移栽成活率的影响

Table 18 Effect of different medium on survival rate of transplantation

移栽日期 Date of transplanting	基质 Medium	移栽方式 Form of transplanting	移栽株数 No. of transplanting	成活株数 No. of survival	成活率 Rate of survival (%)	备注 Remarks
1987-08-11	蛙石+火烧土+沙 Vermiculite+burn soil+sand	苗床 Seedbed	12000	4400	36	连作霉菌严重 Serious moulds in continous cropping
1987-06-10	黄泥心土+煤灰 Yellow soil+coal ash (10: 1)	直接上袋法 Directly putting into bags	16000	11560	72	虫害, 部分茎腐病 Insect damage and part with stem-rot
1982-12-19	黄泥心土+煤灰+河沙 Yellow soil+coal ash+river sand	苗床 Seedbed	2899	2795	96	露天搭临时荫棚 Temporary shade shed
1989-05-12	黄泥心土+煤灰 Yellow soil+coal ash (10: 1)	直接上袋法 Directly putting into bags	180000	169020	93.9	育苗大棚内 Inside shade house

下培养10 d左右, 发根率达50%以上时 (冬季气温低室内培养16 d, 发根率达70%以上) 搬到室外在自然散射光照下培养6~15 d (秋冬时间稍长), 一般发根率都达90%以上, 小苗充分木质化, 叶片舒展, 叶色浓绿, 苗茎紫红, 基轴伸长。

### 3.3.2 在有菌条件下扦插生根

选用巨尾桉绿苗4000条, 在无激素生根培养基培养25 d, 没有生根, 绿苗已木质化, 转入大棚内有菌条件下扦插30 d, 发根成活率95%以上。

用6000瓶巨尾桉继代芽丛, 选取健壮单株芽和丛状茎芽以生长素 ABT1号、ABT2号及 IBA 分别4种浓度: 单株 (30、50、100、150 ppm), 丛状茎芽 (150、200、300、500 ppm) 处理, 扦插在有菌条件下的营养袋 (杯), 试验结果见表17。

表17 有菌条件下丛状茎芽扦插试验

Table 17 Experiment of clustered bud cutting under bacterial condition

生长素 Growth hormone	处理水平数 No. treatment levels	发根率 Rate of rooting (%)			保存率 Rate of survival (%)		
		平均 Mean	最高 Max.	最低 Min.	平均 Mean	最高 Max.	最低 Min.
ABT1号	4	91.5	95.6	96.4	86.9	92.4	81.6
ABT2号	4	92.8	95.6	91.3	89.3	95.0	83.6
IBA	4	85.8	93.1	81.8	81.0	89.2	68.0

### 3.4 幼苗移栽

(1) 瓶中培养壮苗。不论生根苗或用于扦插瓶继代苗, 均需要一段时间强散射光照培养, 以增加幼苗木质化。生根苗选择苗高2~4 cm 根系发达的完整植株; 继代苗选择叶片舒展, 木质化程度高, 单株茎芽2 cm 以上; 丛茎芽1~2 cm。



(2) 移苗时倒出培养基,使小苗根系与培养基分离,用水洗净残留在根上的培养基,并截去过长的根系,保留2~2.5 cm,用黄泥浆浆根,随移随栽;继代苗扦插生根,则洗净培养基后,用0.1%多菌灵浸泡10 min,然后用ABT处理。

(3) 基质用黄泥心土和煤灰按10:1拌匀(表18),移栽前用0.3%高锰酸钾液喷淋消毒。

(4) 将组培苗分大小两级分别栽到营养袋上,淋透水覆盖薄膜保湿,要避免直射阳光。

(5) 高温高湿时期,每天要揭开薄膜几次,增加苗床通透性。移栽后3 d 喷施1次多菌灵,以后每周喷1次,如发现有病死株出现,应及时挖除。

(6) 培育1周后,逐渐增加苗床通透性,2周后开始追施1%复合肥液,每周追施1次。20~25 d,小苗生长稳定,大部分已长出新叶,应全部揭开薄膜炼苗几天,然后转到全光照条件下培育,每10天追施2%~3%复合肥1次,苗高达15 cm时,停止追肥,及时安排出圃造林。

### 3.5 以苗繁苗

组培苗移栽成活后,苗高达15~20 cm时,栽顶留高约10 cm,促其产生萌芽,以后反复剪取5~8 cm长的萌芽条进行扦插育苗。

**3.5.1 母株移栽和采穗:**小苗需用50%的多菌灵或托布津1000倍液浸泡10 min 灭菌,然后用清水洗苗,再逐株蘸50 ppm 的ABT3号生根粉,在垂直插孔放入小苗,把土压实。苗龄45~60 d,苗高15~20 cm时从苗干半木质化部位平茬,留桩10 cm,2~3托叶片。萌芽长1 cm 以上时开始追施复合肥,长5~8 cm,有叶2~3对时即采芽扦插育苗。顶端优势芽已经超长,尚未达到木质化,则用剥取方法采芽,以消除优势芽对基部萌芽的压抑作用;达到半木质化的萌芽则用剪刀剪取,以保护叶腋潜伏芽生长,增加产芽量。当母株主干上的萌芽将要采完时,则选用株基部发生的一条健壮芽截顶代替主干产生萌芽,以保证母株矮化和产生幼态穗条,延续使用母株。

**3.5.2 扦插育苗:**扦插育苗在10月至次年4月进行。剪下萌芽条后马上竖立浸入水中,尽快扦插。用ABT1号生根粉、吲哚丁酸或萘乙酸200~500 ppm 水

剂速蘸,或用滑石粉糊状粘基部。冬春气温较低,萌条中的叶片全部保留,夏秋气温高,把过大叶片剪去1/3~1/2。在垂直插孔放入萌条,把茎质压实。扦插5~10 d,用0.2%尿素或0.2%磷酸二氢钾或0.1%尿素加0.2%磷酸二氢钾溶液喷雾,5天1次,连续2~3次;待抽新梢或根伸到容器底部时,淋0.3%~0.7%复合肥水液,5~7天1次,浓度逐步加大,淋肥后用清水洗苗。棚内扦插20天左右,插苗发根抽梢后,搬到棚外,先用黑网遮荫2~3 d,再在全光条件下炼苗,苗高15~20 cm,出圃造林。

至1992年,巨尾桉组培苗160万株,供5省(区)33个县市的100多个县营造示范林近千公顷。区域试验,普遍速生丰产,年生产量树高3.9~7.3 m(最高10 m);胸径3~5.3 cm(最大7 cm)。1年成林,3、4年成材,6、7年主伐时,蓄积量达90~120 m<sup>3</sup>每公顷,为原有桉树林分,平均蓄积量仅27 m<sup>3</sup>每公顷的3~4倍,且林相异常整齐,变异系数小,增产效益显著。被国家科委、区科委列入“八五”“星火计划”8万 hm<sup>2</sup>,至1993年已完成5 hm<sup>2</sup>,即可形成大产业。

### 参考文献

- 1 Susses Z M. The origin and morphogenesis of Eucalyptus cell population. in "White P. Grove A R proc. Interact Cont. On plant Tissue Culture": Moutchan publ. Corp., Berkeley. 1965, 383~319.
- 2 MBonga J M, Drurzan D C. 树木组织培养. 中国林业出版社, 1988, P55~138 302~322 202~203.
- 3 张丕方. 植物激素对桉树愈伤组织生长和器官发生的作用. 复旦学报(自然科学版). 1982, 21 (4): 445~452.
- 4 庄茂长等. 桉树器官培养诱导完整植株的研究. 林业科学, 1980, 16 (2) P. 151~153.
- 5 祁述雄等. 中国桉树. 北京: 中国林业出版社, 1989. 72~142.
- 6 欧阳权等. 桉树愈伤组织发生胚状体研究. 林业科学, 1981, 17 (1) P. 1~7.
- 7 欧阳权等. 开发桉树新技术. 南宁: 广西民族出版, 1992.
- 8 朱澄. 植物组织培养中的胚状体. 遗传学报. 1978, 5 (1): 79~88.
- 9 罗士韦, 许智宏. 经济植物组织培养. 科学出版社, 1988. P. 200~202.

(责任编辑: 蒋汉明)