

尾叶桉优良无性系组培快繁研究*

廖焕琴¹ 黄晓玲² 潘文¹ 张卫华¹

(1. 广东省林业科学研究院 / 广东省森林培育与保护利用重点实验室, 广东 广州 510520; 2. 仲恺农业工程学院, 广东 广州 510225)

摘要 文章以尾叶桉 (*Eucalypt urophylla*) 优良新无性系的无菌组培苗为材料, MS 培养基为基本培养基, 研究 6-BA、NAA 不同质量浓度配比对尾叶桉无菌幼苗丛芽增殖率, 以及生根粉种类、质量浓度、不同 IBA 和 NAA 配比对不同尾叶桉无性系生根率的影响。试验结果表明, 当 6-BA 质量浓度为 0.01 mg/L, 丛芽增殖率在 NAA 质量浓度为 0.01、0.1 mg/L 时递增; 而 NAA 质量浓度为 1、5 mg/L 时, 则有利于生根; 筛选出适宜尾叶桉优良无性系 ZQUA10 的增殖培养基为 MS+0.01 mg/L 6-BA+0.01 mg/L NAA+30 g/L 蔗糖+6 g/L 卡拉胶, 增殖系数达到 4.7; 筛选出适宜尾叶桉优良无性系 ZQUA13 的生根培养基为 1/2MS+0.5 mg/L ABT1+30 g/L 蔗糖+6 g/L 卡拉胶, 生根率达到 57.5%; 筛选出适宜尾叶桉优良无性系 ZQUB58 的生根培养基为 1/2MS+1 mg/L IBA+0.5 mg/L NAA+30 g/L 蔗糖+6 g/L 卡拉胶, 生根率达到 100%。

关键词 尾叶桉; 组织培养; 再生体系

中图分类号: S792.39 **文献标识码:** A **文章编号:** 2096-2053 (2017) 02-0036-06

The Research of *Eucalypt urophylla* on Tissue Culture and Rapid Propagation

LIAO Huanqin¹ HUANG Xiaoling² PAN Wen¹ ZHANG Weihua¹

(1. Guangdong Academy of Forestry/ Guangdong Provincial Key Laboratory of Silviculture, Protection and Utilization, Guangzhou, Guangdong 510520, China; 2. Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou, Guangdong 510225, China)

Abstract The paper studied the effects of different 6-BA and NAA concentrations on aseptic seedling cluster buds proliferation rate as well as the effects of different rooting powder and concentration on rooting rate of *Eucalyptus urophylla* tissue culture seedling with MS medium as basic medium. The study aimed to provide theoretical guidance for the establishment of efficient tissue culture and rapid propagation system and accelerate the efficient utilization of fine varieties and factory production of *E. urophylla*. The results showed: With the treatment 0.01 mg/L 6-BA and 0.01、0.1 mg/L NAA, the cluster buds proliferation rate reached the highest; it was beneficial to the growing of roots when NAA concentration was 1、5 mg/L; the proper medium for clonal variety of *E. urophylla*(ZQUA10) was MS + 0.01 mg/L 6-BA + 0.01 mg/L NAA + 30 g/L sucrose + 6 g/L carrageenan, the proliferation coefficient reached 4.7. The proper medium for clonal variety of *E. urophylla* (ZQUA13) was 1/2MS + 0.5 mg/L ABT1 + 30 g/L sucrose + 6 g/L carrageenan, the rooting rate reached 57.5%. The proper medium for clonal variety of *E. urophylla* (ZQUB58) was 1/2MS+1 mg/L IBA+0.5 mg/L NAA+ 30 g/L sucrose + 6 g/L carrageenan and the rooting rate reached 100%.

Key words *Eucalyptus urophylla*; tissue culture; regeneration system

* 基金项目: 广东省省级科技计划项目“广东主要商品林种业关键技术研究”(2015B070701009)。

第一作者: 廖焕琴(1988—), 女, 实习研究员, 主要从事林木遗传育种研究, E-mail: liaohuanqin@sinogaf.cn。

通信作者: 张卫华(1978—), 女, 高级工程师(教授级), 主要从事林木遗传育种研究, E-mail: zwh523@sinogaf.cn。

尾叶桉 (*Eucalyptus urophylla*) 是桃金娘科 (Myrtaceae) 桉属的一种大乔木树种, 其树干通直, 木材坚硬耐腐, 可作为重型结构和桥梁材料; 生长速度快且产量高; 木浆容易漂白且得浆率较高、适应性好, 目前已成为华南地区桉树人工林的主要栽培品种。由于桉属树种较多, 种间极易发生杂交, 导致后代严重分化, 传统的有性繁殖方法很难保持树种优良特性。因此, 需通过无性系育种等方法对林木进行遗传改良^[1]。无性繁殖技术中扦插法和压条繁殖法虽能保持母体优良特性, 但树木成活率低, 且缺乏母株, 大规模生产受到限制。通过组织培养获得的桉树, 不仅繁殖系数大、生长周期短, 且能保持母体优良特性。自 20 世纪 60 年代以来, 约有 60 个桉树品种成功建立了体外再生体系并获得再生植株^[2], 组织培养快繁技术已经成为桉树实现产业化、规模化重要环节和关键技术。

尽管组织培养在桉树快繁应用上取得一定成效, 但某些优良品种繁殖系数低、生根率低, 极大地影响了优良无性系的推广和利用, 因此针对不同品种的生长特性, 建立高效的再生体系仍是桉树组织快繁技术亟待解决的问题。本研究以前期研究选育出的尾叶桉核心育种群体中的 3 个尾叶桉优良无性系包括: ZQUA10 (增殖系数低) ZQUA13 (生根率低) 和 ZQUB58 (生根率低) 为研究对象, 开展不同生根粉、生长调节剂组织培养快速繁殖的相关研究, 旨在突破尾叶桉无性系增殖系数低、生根率低技术难点, 建立尾叶桉高效组培快繁体系, 为加快尾叶桉资源高效利用提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本实验材料采用广东省林业科学研究院提供的尾叶桉组培母苗, 为 2.5 a 生尾叶桉子代测定林早期选择的优良品系萌芽条无菌组织培养苗, 包括: ZQUA10 (增殖系数低)、ZQUA13 (生根率低) 和 ZQUB58 (生根率低)。

1.2 试验方法

对尾叶桉优良无性系 ZQUA10 进行丛生芽的增殖试验、对尾叶桉优良无性系 ZQUA13 和 ZQUB58 进行不定根的诱导试验。

1.2.1 增殖培养 基本培养基为 MS 培养基, 添

加植物生长调节剂 6-BA 和 NAA, 分别设置 0 (对照)、0.01、0.1、1、5 mg/L 5 个水平 (表 1), 培养基中添加蔗糖至 30 g/L, 添加卡拉胶至 6 g/L, 调节 pH 至 5.8。每瓶增殖培养基接种 5 个芽, 3 次重复。将组培苗置于温度为 25 ℃, 光照强度 1 000~1 500 lx、光照 12 h 的条件下进行培养, 30 d 后进行观察并记录试验结果。

表 1 不同激素种类及其水平组合 mg · L⁻¹

处理	6-BA	NAA	处理	6-BA	NAA
1	0.00	0.00	14	0.10	1.00
2	0.00	0.01	15	0.10	5.00
3	0.00	0.10	16	1.00	0.00
4	0.00	1.00	17	1.00	0.01
5	0.00	5.00	18	1.00	0.10
6	0.01	0.00	19	1.00	1.00
7	0.01	0.01	20	1.00	5.00
8	0.01	0.1	21	5.00	0.00
9	0.01	1.00	22	5.00	0.01
10	0.01	5.00	23	5.00	0.10
11	0.10	0.00	24	5.00	1.00
12	0.10	0.01	25	5.00	5.00
13	0.10	0.10			

1.2.2 ABT 生根粉生根培养 以 1/2MS 为基本培养基, 设置 2 种生根剂 (ABT1, ABT2) 进行单因子试验。每种生根剂分别设置 0.01、0.1、0.5、1、5 mg/L 5 个质量浓度水平。培养基中添加蔗糖至 30 g/L, 添加卡拉胶至 6 g/L, 调节 pH 至 5.8。以不加生根剂的 MS 培养基作为空白对照。切取长 1.2 cm 带顶芽茎段作为生根芽, 接入生根培养基中, 每瓶 8 根, 每处理 5 瓶。将组培苗置于温度为 25 ℃, 光照强度 1 000~1 500 lx、每天光照时间 12 h 的条件下进行培养, 10 d 后进行观察并记录试验结果。各因素及水平组合如表 2。

表 2 不同生根粉及其水平 mg · L⁻¹

处理	生根粉	质量浓度
1	ABT1/ABT2	0.00
2	ABT1	0.01
3	ABT1	0.10
4	ABT1	0.50
5	ABT1	1.00
6	ABT1	5.00
7	ABT2	0.01
8	ABT2	0.10
9	ABT2	0.50
10	ABT2	1.00
11	ABT2	5.00

1.2.3 IBA 和 NAA 培养 以 1/2MS 为基本培养基, 添加植物生长调节剂 IBA 和 NAA, 每种生长调节剂分别设置 0 (对照)、0.1、0.5、1、2 mg/L 5 个质量浓度水平。培养基中添加蔗糖至 30 g/L, 添加卡拉胶至 6 g/L, 调节 pH 至 5.8。切取长 1.2 cm 左右的带顶芽茎段作为生根芽, 接入生根培养基中, 每瓶 8 根, 每处理 5 瓶。将组培苗置于温度为 25 ℃, 光照强度 1 000~1 500 lx、每天光照时间 12 h 的条件下进行培养, 10 d 后进行观察并记录试验结果。各因素及水平组合见表 3。

1.3 数据处理与分析

增殖系数 (倍) = 总芽数 / 接种数 (以芽长 ≥ 0.5 cm 为数据源)

生根率 (%) = 生根数 / 接种数 × 100% (以根长 ≥ 0.5 cm 为数据源)

采用数据处理软件 SPSS 18.0 及 Microsoft excel 2010 进行数据的计算和统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同激素配比对尾叶桉无性系 ZQUA10 增殖效果的影响

由表 4 可知处理 7、8、9、13、14、17、18 的增殖系数达到 4.0 以上, 即 6-BA 质量浓度为 0.01~1 mg/L, NAA 质量浓度为 0.01~1 mg/L 时叶

浅绿、舒展, 增殖系数较高, 会不同程度地出现大量丛芽和次生芽; 由处理 1~5 可知不添加 6-BA 时无菌苗呈单芽增殖, 生长缓慢; 处理 11~15 即当 6-BA 的质量浓度达到 0.1 mg/L 时无菌苗虽增殖良好, 但叶片开始出现失水萎蔫的现象; 由处理 21~25 可知 6-BA 的质量浓度达到 5 mg/L 时, 无菌苗叶片变黄, 生长畸形, 因此 0.01 mg/L 6-BA 更适合 ZQUA10 增殖。

由处理 4、5、9、10、14、15 可知当 NAA 质量浓度达到 1.5 mg/L 时, 无菌苗开始生根, 且当 6-BA 质量浓度在 1 mg/L 以下时, 随着 NAA 质量浓度的增加, 生根效果越明显。故综上所述最适合尾叶桉无性系 ZQUA10 增殖的培养基中 6-BA 质量浓度为 0.01 mg/L, NAA 质量浓度为 0.01 mg/L。

2.2 不同生根粉及浓度对尾叶桉无性系 ZQUA13 生根效果的影响

由图 1 可知, 在 ABT1 处理中, 处理 4 生根率高达 57.5%, 根系生长粗壮, 生根效果最好; 处理 5 和 6 生根率分别达到 32.5% 和 42.5%, 但出现愈伤组织, 不利于根系发育。在 ABT2 处理中, 处理 8 生根效果最好, 生根率为 37.5%。处理 2~6 生根率整体比处理 7~11 高, 表明 ABT1 诱导生根的效果整体上比 ABT2 更好, 因此 1/2MS 培养基 +0.5 mg/L 生根粉 ABT1 可作为尾叶桉无性系

表 3 不同激素种类及其水平组合 mg · L⁻¹

处理	IBA	NAA	处理	IBA	NAA
1	0	0	14	0.5	1
2	0	0.1	15	0.5	2
3	0	0.5	16	1	0
4	0	1	17	1	0.1
5	0	2	18	1	0.5
6	0.1	0	19	1	1
7	0.1	0.1	20	1	2
8	0.1	0.5	21	2	0
9	0.1	1	22	2	0.1
10	0.1	2	23	2	0.5
11	0.5	0	24	2	1
12	0.5	0.1	25	2	2
13	0.5	0.5			

表 4 不同激素种类及其水平组合尾叶桉无性系 ZQUA10 增殖表现

处理	增殖系数	生长情况
1	2.8 ± 0.3 defg	叶翠绿，舒展，单芽增殖，长势一般；根少量，较细
2	2.9 ± 0.1 defg	叶翠绿，舒展，单芽增殖，长势较好；根少量，较细
3	2.9 ± 0.1 def	叶翠绿，舒展，单芽增殖，长势较好；根少量，较细
4	2.7 ± 0.3 efg	叶翠绿，舒展，单芽增殖，长势较好；根较多，粗壮
5	2.4 ± 0.3 fg	叶翠绿，舒展，单芽增殖，长势较好；根大量，粗壮
6	3.9 ± 0.5 bc	叶浅绿，舒展，少量丛芽，芽粗壮，长势较好
7	4.7 ± 0.3 a	叶黄绿，舒展，大量丛芽，芽粗壮，长势良好
8	4.4 ± 0.2 ab	叶浅绿，舒展，大量丛芽，芽粗壮，长势良好
9	4.4 ± 0.2 ab	叶浅绿，舒展，大量丛芽，芽粗壮，长势较好；根少量
10	2.1 ± 0.5 gh	叶翠绿，舒展，少量丛芽，芽粗壮，长势较好；根大量，粗壮
11	3.4 ± 0.0 cde	叶浅绿，舒展，丛芽较多，芽粗壮，长势一般
12	3.5 ± 0.3 cd	叶浅绿，舒展，丛芽较多，芽粗壮，长势一般
13	4.5 ± 0.2 ab	叶浅绿，叶少量合拢，大量丛芽，芽粗壮，长势一般
14	4.1 ± 0.1 abc	叶浅绿，叶部分皱缩，大量丛芽，芽粗壮，长势一般；根少量
15	1.3 ± 0.1 ij	叶浅绿，舒展，单芽增殖，芽粗壮，长势一般；根粗壮，较多
16	1.7 ± 0.4 hi	叶黄绿，较小，舒展，单芽增殖，芽一般，长势一般
17	4.5 ± 0.1 ab	叶浅绿，舒展，大量丛芽，芽一般，长势差
18	4.3 ± 0.2 ab	叶浅绿，舒展，大量丛芽，芽一般，长势差
19	3.9 ± 0.1 bc	叶浅绿，舒展，大量丛芽，芽一般，长势差
20	1.3 ± 0.1 ij	叶浅绿，较小，少量丛芽，芽一般，长势差
21	1.0 ± 0.1 ij	叶黄绿，舒展，单芽增殖，芽一般，长势差
22	0.9 ± 0.1 ij	叶黄绿，舒展，单芽增殖，芽一般，长势差
23	0.9 ± 0.1 j	叶黄绿，皱缩，无增殖
24	0.7 ± 0.1 j	叶黄绿，皱缩，无增殖
25	0.7 ± 0.1 j	叶黄绿，皱缩，无增殖

注：数据为平均值 $\pm$ 标准差；表中同列数据后不同小写字母表示各处理间在 $\alpha = 0.05$ 水平差异显著；培养时间为 30 d。

ZQUA13 的生根培养基。

2.3 IBA 和 NAA 不同浓度对比对尾叶桉无性系 ZQUB58 生根效果的影响

由图 2 可知，处理 16~20 在 IBA 质量浓度为 1 mg/L 时生根率均达到 75% 以上，处理 1~15 的生根率明显比处理 16~25 低，因此可知 0.1 和 0.5 mg/L 质量浓度 IBA 利于促进生根，其中处理 18，即 IBA 为 1 mg/L，NAA 为 0.5 mg/L 时生根率达到 100%，可作为尾叶桉无性系 ZQUB58 的生根培养基。

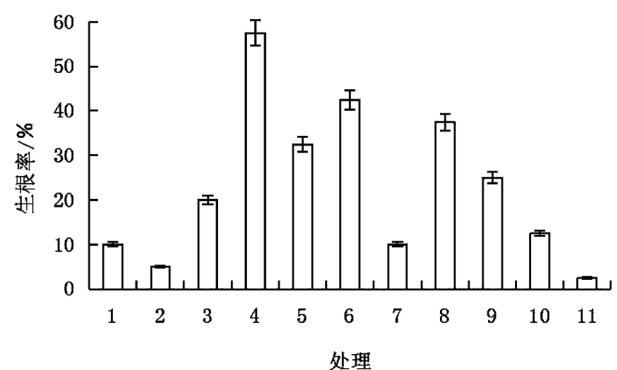


图 1 不同生根粉及浓度对尾叶桉无性系 ZQUA13 生根率的影响

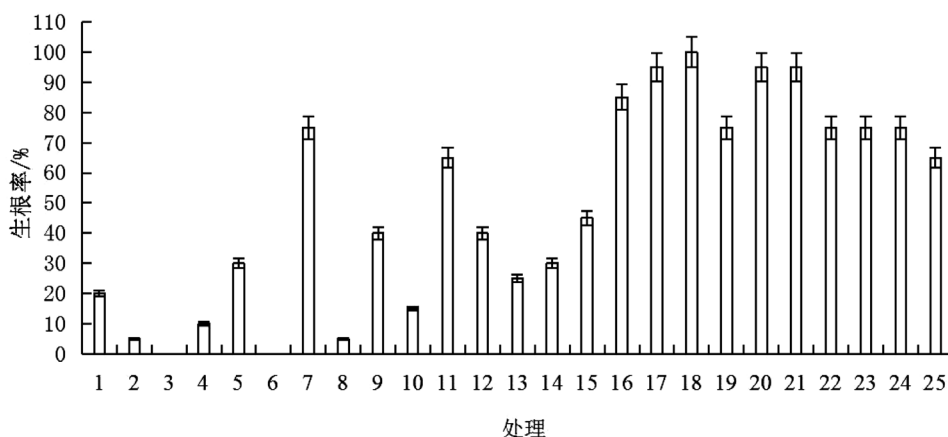


图2 IBA和NAA不同浓度对比对尾叶桉无性系ZQUB58生根率的影响

3 结论与讨论

尾叶桉是世界上生长速度最快的树种之一,其木材不仅是制浆造纸工业优质原料,还可广泛应用于矿山、家具、人造板、工业建筑和车船等各行各业。MS培养基被大量用于研究桉树的遗传转化再生体系。此外,国外学者也使用WPM、G22、GBA等培养基以及TDZ、激动素、玉米素等生长调节剂进行了相关研究^[3-5]。本试验选用广东省林业科学研究院组培室的无菌苗,参考相关文献,设计采用遗传稳定性好的丛芽发生途径,开展尾叶桉组培快繁技术的相关研究。使用MS培养基作为基本培养基,研究6-BA、NAA两种激素及其不同浓度对增殖系数低的尾叶桉无性系ZQUA10无菌幼苗丛芽增殖率的影响,以及ABT1、ABT2两种生根粉及其不同质量浓度对生根率低的尾叶桉优良无性系ZQUA13无菌幼苗生根率的影响。

6-BA作为一种人工合成的嘌呤类细胞分裂素,具有较强的启动尾叶桉细胞分裂的能力^[6]。研究表明,其在丛芽的分化和形成上具有显著的促进效应^[7]。但在尾叶桉无性系ZQUA10的诱导增殖试验结果显示,较高质量浓度的6-BA不仅没有促进丛芽的分化形成,而且不利于丛芽的诱导,诱导出的丛芽形态萎蔫,长势不佳且易枯死。这与马生健^[1]、徐强兴^[8]的研究结果一致,说明低质量浓度的激素有利于丛芽诱导增殖。试验同时表明,当6-BA和NAA质量浓度都为0.01 mg/L时,叶片舒展且呈浅绿色,分化产生大量粗壮的丛芽,且丛芽高生长良好,长势佳,为最适合诱导尾叶桉(ZQUA10)增殖的培养基。前期研

究发现,愈伤组织块较大的处理,其细胞分裂较旺盛,具有较大的分化潜力,植株不易发生褐化死亡现象^[9]。同时在培养过程中发现,激素组合6-BA 5 mg/L和NAA 1、5 mg/L中尾叶桉叶片上多出现颗粒状愈伤组织的现象,此类情况并不罕见,在山桉(*Eucalyptus dalrympleana*)、巨桉(*E. grandis*)、冈尼桉(*E. gunnii*)等其他桉属树种中也有过报道^[10]。石大兴等^[11]、刘莹等^[12]认为这种异常反应可能是由外源激素引起的,采用无激素的方法培养多代,即可正常表现。

在生根粉试验中,我们可以看到,当生根粉质量浓度在0.01、0.1 mg/L,ABT2生根率高于ABT1,但当生根粉质量浓度稍高,在0.5、1.0、5.0 mg/L时,ABT1的生根率就远远高于ABT2(达到两倍以上),试验表明当生根粉ABT1的质量浓度在0.5 mg/L时,尾叶桉优良无性系ZQUA13的生根率达到最高,为57.5%。这与陈碧华等^[13]的研究结果是一致的。

生长激素IBA和NAA都对桉树组培苗生根具有良好的促进作用^[14-15],增殖试验结果显示,添加质量浓度为1、5 mg/L的NAA有利于尾叶桉组培苗生根,根多且粗壮。这与祁芳斌^[16]、翁秋媛^[17]的研究结果一致。陈江平^[18]则认为NAA是生根效果最佳的生根剂,在添加了NAA的处理中,桉树生根率高且须根多,芽苗基部仅有少量的愈伤组织。在探讨IBA和NAA对无性系ZQUB58生根影响的试验中,处理16~25的生根率明显比处理1~15高,因此质量浓度1 mg/L IBA更利于尾叶桉优良无性系ZQUB58生根,且质量浓度1~2 mg/L NAA下生根率并不一定比0~0.5 mg/L质量浓度高,因此IBA对无性系ZQUB58

生根的促进作用比 NAA 更显著,当 IBA 为 1 mg/L, NAA 为 0.5 mg/L 时生根率达到 100%,这一结果与刘均利等^[19]的研究结果基本一致。

参考文献

- [1] 马生健,潘清梅,吴志华,等.尾叶桉的组织培养及植株再生[J].桉树科技,2006,23(1): 11-16.
- [2] 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.
- [3] IAIN E, DAVID A. Regeneration of plants from leaf explants of micropropagated clonal *Eucalyptus grandis* [J]. Plant Cell Reports, 1994, 13(8): 473-476.
- [4] MULLINS K V, LEWELLYN D J. Regeneration and transformation of *Eucalyptus camaldulensis* [J]. Plant Cell Reports, 1997, 16(11): 787-791.
- [5] SUBBAIAH M M, MINOCHA S C. Shoot regeneration from stem and leaf callus of *Eucalyptus tereticornis* [J]. Plant Cell Reports, 1990, 9(7): 370-373.
- [6] 蔡翼,李志娟,白明珍,等.不同激素组合对尾叶桉愈伤组织分化的影响[J].湖北农业科学,2014,53(9): 2177-2180.
- [7] 余下涵.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.
- [8] 徐强兴,潘学峰.尾叶桉U6无性系组培快繁技术研究[J].热带林业,2002,30(3): 22-24.
- [9] HUANG Z C, ZENG F H, LU X Y. Efficient regeneration of *Eucalyptus urophylla* from seedling-derived hypocotyls [J]. Biol Plantarum, 2010, 54(1): 131-134.
- [10] 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.
- [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)69-74; 177.
- [12] 刘莹,徐刚标.尾叶桉丛生芽和生根的诱导[J].河南林业科技,2009,29(2): 3-5.
- [13] 陈碧华,万泉,李乾振,等.尾叶桉组织培养快速繁殖的研究[J].福建林业科技,2002,29(2): 9-11.
- [14] 翟应昌,周志坚,垄峥,等.桉树组织培养育苗技术的研究[J].广东林业科技,1990, 6(6): 6-10.
- [15] 易敏,冉隆贤,汤历.邓恩桉的组织培养技术研究[J].广东林业科技,2005,21(2): 19-21;25.
- [16] 祁芳斌.桉树离体快繁研究[J].亚热带农业研究, 2006, 2(1): 15-17.
- [17] 翁秋媛.四个桉树无性系组培生根培养适宜生长调节剂水平的筛选试验[J].福建省林业科技,2006,33(2): 148-151.
- [18] 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.
- [19] 刘均利,郭洪英,陈灸,等.赤桉组培快繁技术研究[J].桉树科技,2010,27(1): 21-26.