桉树科技　2020,37(4):33-37
EUCALYPT SCIENCE & TECHNOLOGY

DOI:10.13987/j.cnki.askj.2020.04.06

# 粗皮桉芽器官离体快繁研究

唐再生，李丽芳，黄加宜，覃卫星，马忠才，李霞，熊涛*

(广西国有东门林场，广西 扶绥 532108)

**摘要**：为提高粗皮桉组培成活率，用粗皮桉优树伐桩萌芽的茎段作外植体，改良 MS 作基础培养基，以芽器官直接离体培养成苗的方式建立无菌培养材料，经继代增殖培养，诱导生根，瓶苗移栽等环节，建立粗皮桉组培快繁体系。结果表明：继代苗增殖系数 3.5 ~ 4.2，瓶苗生根率 95%，移栽成活率 92.5%，能够大规模商业化育苗。

**关键词**：粗皮桉；芽器官；组培快繁；育苗

**中图分类号**：S722.3+7　　**文献标识码**：A

# Study on Rapid in Vitro Propagation of *Eucalyptus pellita* Buds

TANG Zaisheng, LI Lifang, HUANG Jiayi, QIN Weixing, MA Zhongcai, LI xia, XIONG Tao[1]

(*Guangxi Dongmen State-owed Forest Farm , Fusui 532108, Guangxi, China*)

**Abstract:** In order to improve the survival rate of tissue cultured *Eucalyptus pellita*, stem segments collected from coppice sprouts of *E. pellita* were used as explants for culturing with a basic MS culture medium. Aseptic culture material was established by direct in vitro culture of bud organs. Subsequent subculture to proliferate available shoots followed by inducement of rooting and then transplanting of rooted plantlets enabled rapid propagation of *E. pellita*. The results showed that the multiplication coefficient of secondary (sub-cultured) seedlings was 3.5 ~ 4.2, the rooting rate of the in vitro explants was 95%, and then survival rate after transplanting was 92.5%. Thus, the methods employed can be used for large-scale commercial propagation.

**Key words:** *Eucalyptus pellita*; bud organ; tissue culture; breeding

粗皮桉(*Eucalyptus pellita*)原产澳洲，1983 年引种到广西东门林场种植后，表现出良好的生长适应性[1]。在实木利用方面，它具有尾巨桉(*E. urophylla* ×*E. grandis*)等短周期纸浆材无可比拟的优势。木质坚实，木材红色，被誉为天然“澳洲红木”，木材价值高，经济效益好[2]。生长周期相较尾巨桉长，从而减少人们经营活动对森林生态的干扰，属于环境友好型人工林。

利用优树萌芽组培繁育的无性系苗木造林，具有很好的发展前景。沙月娥等[3]采用愈伤组织途径成苗方式，建立粗皮桉的再生体系；廖焕琴等[4]采用尾叶桉优良新无性系的无菌组培苗为材料,进行丛芽增殖和不定根诱导试验，筛选出无性系 ZQUB58 生根率 100%的生根培养基；欧阳乐军等[5]用粗皮桉无菌苗下胚轴为外植体，研究不同激素处理对粗皮桉体胚发生的影响，初步建立了愈伤组织诱导及体胚发生最适合的激素浓度与种类。通过愈伤组织诱导分化不定芽的方式，获得的再生植株其变异率高，难以保持原有良种的优良特性，在木本植物组培快繁中不宜提倡[6]。刘均利等[7]用柠檬桉(*E. citriodora*)带芽径段为外植体进行组培快繁，发现柠檬桉褐化较严重；黄华艳等[8]、曾东武[9]利用巨尾桉(*E. grandis* × *E. urophylla*)和柳窿桉(*E. saligna* ×*E. exserta*)芽器官进行过组培快繁研究，筛选出生根率为 100%的培养基。当前鲜见粗皮桉芽器官离体快繁的研究，石前等[10]尝试用粗皮桉芽器官离体成苗，生根率仅 50%，不能满足规模推广造林的用苗需求。

**基金项目**：广西林业科技项目(桂林科字〔2016〕第 12 号)
**作者简介**：唐再生(1972—　)，男，高级工程师，主要从事桉树遗传改良及无性系开发研究
***通信作者**：熊涛(1989—　)，男，硕士，工程师，主要从事林木遗传育种研究，E-mail：704423155@qq.com

本研究以粗皮桉优树伐桩萌芽作外植体，以离体芽器官直接产生丛生芽的方式，建立组培快繁体系，以期能在短期内培育大量性状稳定，整齐一致的无性系苗木供造林使用。

# 1 材料和方法

## 1.1 试验材料

从引种试验林中选出优良家系的优良单株，伐倒促萌，以健壮萌芽条作繁殖材料。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 外植体选择和处理

选取健壮无病虫害萌芽条，剪去叶片，洗衣粉漂洗后，自来水流水冲洗 10 min，软毛刷刷洗干净后，按照萌芽条上的节位切段，分“3 ~ 4”(幼嫩茎段)，“5 ~ 7”(半木质化茎段)，“7 以下”(木质化茎段)3 种茎段。然后在超净工作台无菌条件下，75%酒精处理 10 ~ 15 s，无菌水洗涤 3 次；再用 0.1%$HgCL_2$ 溶液消毒 5 ~ 8 min，无菌水洗涤 5 次。用无菌滤纸吸干水分，切去茎段两端以及叶柄，切成长 1.5 cm 左右含 1 ~ 2 个节的茎段；接种到诱导培养基，全暗培养 9 ~ 18 d。

### 1.2.2 培养基

基本培养基为改良 MS 固体培养基，附加不同配比的细胞分裂素 6 ~ BA 和生长素 NAA，蔗糖 30 g $L^{-1}$，琼脂粉 3.9 ~ 4.2 g $L^{-1}$，诱导生根用 1/2 改良 MS 培养基，附加蔗糖 15 g $L^{-1}$ 以及不同浓度的生长素。pH 值调至 5.8 ~ 6.2。

### 1.2.3 培养条件

培养室光照强度 1 500 ~ 3 000 lx，以自然散射光为主，不足时用人工光源补足。每天光照时间 10 ~ 12 h；培养室温度 26±2℃，生根苗后期在大棚炼苗时，温度为 18 ~ 35℃。

### 1.2.4 生根苗移栽

先打开瓶盖灌注少量冷开水，炼苗 2 ~ 3 d，再洗去根部琼脂后移栽。移栽基质为：①椰糠+泥炭土(5：3)轻型基质，②黄心土+蛭石(5：1)，③轻型基质+黄心土(3：1)，移苗前用高锰酸钾溶液消毒基质。

# 2 结果与分析

## 2.1 无菌芽诱导

消毒灭菌后，幼嫩茎段污染少而枯死多；木质化茎段枯死少而污染率高(表 1)。5 ~ 7 节位的半木质化茎段污染较少，枯死也少。黑化枯死可能是外植体受到灭菌剂毒害而死亡，因此幼嫩茎段消毒时间宜短以减少死亡，而木质茎段消毒时间可稍微长一些，以充分杀灭杂菌，降低污染率。当材料较充足时，只选取半木质化茎段作外植体。

由表 2 可知，半木质化茎段萌芽率也最高且萌芽质量好，愈伤和玻璃化芽占比少。与培养基接触处的褐化程度较轻。幼嫩茎段褐化少而易产生愈伤组织和玻璃化苗；木质化茎段易褐化而且无菌芽生长也较弱。

分析认为：半木质茎段的侧芽，潜伏在茎节(叶腋)处，尚未萌发，在消毒时受外植体表皮保护未遭到伤害，接种后潜伏芽生长，萌发成无菌芽，萌芽快，质量好；分生活跃的幼嫩茎段，因表皮纤维不发达，维管结构也不健全，消毒时易枯死，存活者在培养基高浓度激素影响下，易形成愈伤组织，萌芽易出现玻璃化现象。木质化茎段的腋芽，受顶端优势作用的影响，已经脱落，接种后萌发的是第二潜伏芽，所需时间长，萌发慢。又因为木质化茎段已成熟，含酚、醌类物质较多，渗透到培养基后出现褐化，而培养基褐化反过来影响外植体的生长，使芽生长比较弱。

优树生长在野外，树龄较大，伐桩萌芽受病虫为害频繁，萌条所携带的杂菌较多。外植体消毒灭菌成功与否，成为组培育苗成败的关键。选用半木质茎段作外植体，既能减少污染，又能提高萌芽率质量，因此成为外植体诱导无菌芽过程中最重要的一环。

此外，粗皮桉有一个特别的特征，即外植体萌芽后，上端幼嫩茎段从节处产生离层，并逐渐断开脱落，用幼嫩茎段难以诱导成功。而且茎段与培养基接触处的褐化较严重，这与尾巨桉有明显区别。

表 1　不同外植体消毒灭菌后成活情况统计表

| 外植体位置 | 接种数/个 | 污染数/个 | 污染率/% | 黑化枯死数/个 | 黑化枯死率/% | 成活数/个 | 成活率/% |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 3 ~ 4 节(幼嫩茎段) | 96 | 5 | 5.2 | 47 | 48.9 | 44 | 45.8 |
| 5 ~ 7 节(半木质化茎段) | 179 | 23 | 12.8 | 18 | 10.0 | 138 | 77.1 |
| 7 节以下(木质化茎段) | 124 | 49 | 39.5 | 3 | 2.4 | 72 | 58.1 |

表 2　灭菌后成活的不同位置外植体萌芽情况

| 外植体位置 | 外植体数/个 | 褐化数/个 | 褐化率/% | 萌芽数/个 | 萌芽率/% | 萌芽生长情况 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 3 ~ 4 节(幼嫩茎段) | 42 | 0 | 0 | 19 | 45.2 | 芽幼嫩，茎叶不分明，愈伤芽占 25.7%，玻璃化芽占 22.5% |
| 5 ~ 7 节(半木质化茎段) | 130 | 12 | 9.2 | 81 | 62.3 | 芽生长旺盛，质量好，玻璃化芽占 7.7% |
| 7 节以下(木质化茎段) | 65 | 28 | 43.1 | 18 | 28 | 芽细弱，生长慢，玻璃化芽占 5.6%，培养基褐化者占 59.7% |

2.1.2　诱导培养基激素对粗皮桉萌芽的影响

由表 3 可知，粗皮桉内源激素比较丰富，在不添加激素的情况下，外植体能萌生小芽；添加单一生长素或细胞分裂素，均能萌芽，对人为添加的外源激素比较敏感，在添加 BA1.0NAA 0.2 ~ 0.4 时，萌芽快，长势好，形成大小芽错落有致的丛芽。

表 3　激素对粗皮桉外植体萌芽的影响

| 激素类型和浓度/(mg Ł$^{-1}$) | 萌芽率/% | 萌芽时间/d | 萌芽生长情况 |
|---|---|---|---|
| BA0NAA0 | 75.0 | 9 ~ 12 | 1 ~ 2 个小芽，芽生长慢，长势一般 |
| BA0NAA1.0 | 82.0 | 15 ~ 18 | 萌生单芽，节间长，久后外植体下端产生根 |
| BA1.0NAA0 | 64.0 | 24 ~ 30 | 萌生芽细，节间短，久后形成丛芽 |
| BA1.0NAA0.2-0.4 | 86.0 | 12 ~ 15 | 萌芽长势旺盛，芽生长快，大芽节间长，久后形成丛生芽。 |

## 2.2　继代增殖培养

2.2.1　无菌芽的选优

经过选择的外植体萌生丛芽后，芽的质量仍良莠不齐。在继代增殖培养之前以及继代培养过程中，需进一步优化。剔除愈伤芽，玻璃化芽，生长势弱的芽，选生长健壮长势旺盛的芽扩繁，从源头上提高无菌芽的质量。

2.2.2　不同激素组合培养基对丛芽继代培养的影响

将丛芽切成小丛，长芽切成小段接种到不同激素浓度的继代培养基，18 ~ 20 d 后观察。

由表 4 可知，沿用诱导培养基继代培养，所用激素浓度高，增殖系数大，但芽的质量不理想，一是出现水肿芽，二是连续三代后，芽节间很短，成为不能进行生根培养的无效芽。少数苗出现叶片愈伤，极少数苗出现畸形，芽肥厚，扁平状。降低激素浓度，用 1/2 诱导培养基的量，芽仍然生长旺盛且芽苗生长正常。

组培快繁育苗过程中，继代培养的目标是能持续进行以芽繁芽，提供正常芽苗诱导生根。因此，可以采取激素浓度高低交替的方法[5]。但在商业化育苗中，操作不方便。本研究利用外源激素在芽苗体内的累积作用，先降低继代培养基的激素浓度，然后多代培养并观察，根据苗的生长情况“微调”激素浓度，直到芽苗生长稳定为止。实践表明，粗皮桉继代培养中，以 BA 0.35 mg Ł$^{-1}$+NAA0.15 mg Ł$^{-1}$，可促进芽苗增殖，又能促芽苗伸长。增殖系数达到 3.5。芽苗生长健壮，有效芽多。不同无性系之间有一定差异，需调试后建立独立配方。

### 2.3 诱导生根

选健壮芽苗，从茎节下切成 1.5 cm 左右小苗，垂直接种到生根培养基中，18 d 后检查。由表 5 可知，4 种激素浓度的生根率均较好。用 IBA 和 IBA+NAA 组合，茎切口处产生小愈伤，非愈伤出根，只是愈伤团挤压改变了根向下伸展的方向。当洗苗和移栽时，愈伤如果脱落，根也易脱离。单用 $ABT_1$，根细长，和 IBA 结合使用，根系粗壮，苗生长好。以 $ABT_1$1.0+IBA0.2 最好。

表 4 不同激素浓度的培养基对继代苗生长的影响

| 培养基 | 增殖系数 | 芽苗生长情况 |
|---|---|---|
| 改良 MS+BA1.0+NAA0.4 | 4.2 | 生长旺盛，芽多，肥嫩，少部长芽出现水肿。基部小芽节短，叶小而密 |
| 改良 MS+BA0.4+NAA0.2 | 3.5 | 生长旺盛，芽较多，节间适中，叶片绿，大小适宜 |
| 改良 MS+BA0+NAA0 | 2.5 | 长生较慢，长势一般。仍能够生长 |

表 5 不同生长激素浓度组合对粗皮桉生根的影响

| 激素浓度/(mg Ł$^{-1}$) | 接种数/个 | 生数数/株 | 生根率/% | 平均根系数/个 | 萌芽生长情况 |
|---|---|---|---|---|---|
| $ABT_1$ 1.2 | 400 | 389 | 97.3 | 3.2 | 苗翠绿、茎细、节间长、根细长 |
| $ABT_1$ 1.0+IBA 0.2 | 400 | 381 | 95.3 | 3.9 | 苗绿，茎粗，根系发达，根较粗 |
| IBA 0.5 | 400 | 366 | 91.5 | 3.5 | 苗绿，叶色淡，根粗，侧根少，茎切口有愈伤 |
| IBA 0.5+NAA 0.3 | 400 | 370 | 92.5 | 4.1 | 苗绿，叶色淡，茎粗，茎切口有愈伤 |

### 2.4 瓶苗移栽

生根苗接种后 20 ~ 25 d，苗茎充分木质化，根系完整发达，可以移栽。洗苗后，根系过长者需截去部分再移植。在多菌灵溶液中浸泡 30 min，用镊子夹取移入育苗基质中。移栽后用 70%遮阳网搭拱棚覆盖，冬季加盖薄膜保温。

由表 6 可知，不同基质类型对小苗成活率的影响差异小，成活率均超过 90%。轻型基质中，苗木生长更绿一些。空气切根后，苗的须根特别多。黄心土基质中，苗木根比较粗，须根较少。如用育苗袋育苗，有穿根现象，需要挪动育苗袋并剪去过长的根。

表 6 不同基质类型对粗皮桉小苗移栽后生长的影响

| 基质类型 | 移栽数/株 | 成活数/株 | 成活率/% | 苗木生长情况 |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 550 | 509 | 92.5 | 苗木茎叶清绿，须根多，生长好 |
| 2 | 550 | 523 | 95.1 | 苗绿，根粗，须根较少，袋苗有穿根现象 |
| 3 | 550 | 515 | 93.6 | 苗绿，根粗，须根较少，袋苗有穿根现象 |

## 3 讨论与结论

本研究结果表明，粗皮桉无菌芽诱导培养基选用改良 MS+BA 1.0 mg Ł$^{-1}$+NAA 0.2 ~ 0.4 mg Ł$^{-1}$，萌芽率达到 86%，关键是要选择半木质化基段作外植体，既减少污染率，减少黑化枯死率，萌芽质量也更好。因为在消毒灭菌时，外植体被杀伤引起黑化枯死，与外植体褐化培养基是两种不同的情况。粗皮桉的褐化情况比尾巨桉要严重。

继代增殖培养中，对无菌芽进行选优，有利于提高继代苗质量。通过多代培养，依据苗情，微调培养基激素浓度，再使用固定配方，有利于商业化育苗，便于操作，实用性强。以 IBA 0.35 mg Ł$^{-1}$+NAA 0.15 mg Ł$^{-1}$ 用量，增殖系数可达 3.5，1 年继代 18 次，一株芽理论上可产生芽苗数 $3.5^{18}$ 条，约 62 亿

条，产苗量十分可观。

小苗移栽时，选用轻型基质，苗木质量最好，须根多，根系发达；种植后无缓苗期且质量轻，方便运输，但成本较高，需要用机器生产制造，专用育苗架摆苗，适合大型苗圃选用。黄心土基质可以就地取材，成本低，如果用育苗袋装基质，可直接摆苗在畦床上育苗，适合林地周边的小型苗圃选用。

## 参考文献

[1] 欧阳林男,陈少雄,刘学锋,等.粗皮桉在我国的潜在适生区与主导生态因子研究[J].桉树科技,2018,35(2):14-20.

[2] 王喆,孙柏玲,柴宇博,等.真空热处理粗皮桉木材化学性质的变化[J].东北林业大学学报,2017,45(6):61-64.

[3] 沙月娥,吴志华,欧阳乐军,等.粗皮桉的组织培养与植株再生研究[J].南方农业学报,2013,44(9):1511-1516.

[4] 廖焕琴,黄晓玲,潘文,等.尾叶桉优良无性系组培快繁研究[J].林业与环境科学,2017,33(2):36-41.

[5] 欧阳乐军,李莉梅,何秀容,等.粗皮桉胚性愈伤组织及体胚诱导[J].分子植物育种,2016,14(11):3159-3165.

[6] 沈海龙.植物组织培养[M]北京:中国林业出版社,2005.

[7] 刘均利,郭洪英,杨晓蓉,等.柠檬桉的组培快繁技术研究[J].桉树科技,2013,30(4):19-24.

[8] 曾炼武.巨尾杂交桉芽器官离体培养快速繁殖的研究[J].广西林业,1990(S1):16-23.

[9] 黄华艳,吴耀军.柳窿桉芽器官离体培养研究[J].广西林业科学,2003,32(1):27-28.

[10] 石前,李飞宇,李俏,等.粗皮桉的组培快繁方法[J].中国园艺文摘,2016(6):167-169.