

## 海南省良种桉树 Wh 系组培快繁技术的研究

马相奎<sup>1,2</sup>, 曹 兵<sup>1\*</sup>, 孔祥义<sup>1</sup>, 黎国运<sup>2</sup>, 陈 培<sup>2</sup>

(1. 三亚市南繁科学技术研究院, 海南 三亚 572000; 2. 海南省林业科学研究所生物技术室, 海南 海口 571100)

**摘 要:** 利用桉树优树的伐桩萌芽顶芽, 采用 1/2MS 培养基附加 6BA<sub>0.5</sub> + IBA<sub>0.25</sub> 培养直接产生腋芽/外植体; 并在光照强度为 4500lux, 培养温度为 30℃ 的条件下, 对瓶苗进行小量实验研究和入圃定植实验, 其成活率分别达 96.83% 和 94.89%。本试验重点研究有利提高繁殖和壮苗及瓶苗成活率的组合条件等因素, 为今后大面积推广桉树组培苗生产提供良好的技术支持。

**关键词:** 桉树; 组培快繁; 培养基

### Study on Tissue Culture of the Fine Eucalyptus (Wh) in Hainan

MA Xiang - kui<sup>1,2</sup>, CAO Bing<sup>1</sup>, KONG Xiang - yi<sup>1</sup>, LI Guo - yun<sup>2</sup>, CHEN Pei<sup>2</sup>

(1. Sanya Science & Technology Academy for Crop Winter Multiplication, Sanya Hainan 572000)

(2. Biotechnology Laboratory of Hainan Academy of Forestry Science, Haikou Hainan 571100)

**Abstract:** The explant had been induced from the bud of eucalyptus stump in induction medium 1/2MS + 6BA<sub>0.5</sub> + IBA<sub>0.25</sub>. Under the illumination intensity of 4500lux and the temperature of 30℃, the survival rate of clump shoots to plantlet was up to 96.83% and 94.89%.

**Key words:** eucalyptus; tissue culture; medium

桉树是桃金娘科 (Myrtaceae) 桉属 (Eucalyptus) 植物, 其种类繁多, 经确认的有 900 多种; 除尾叶桉 (E. urophylla) 等少数种源产于印度尼西亚外, 绝大部分桉树种源产于澳大利亚。桉树为我国最主要的热带速生丰产林树种之一, 是良好的纸浆原料树种。我国从 19 世纪末开始引种栽植, 在南部省区广泛种植。海南省 1917 年就有引种, 桉树的研究试验始于上世纪 50 年代, 目前已选出了一批优良的种源、家系。2000 年海南省政府为满足生产的需求, 迅速扩大更适合本地区种植条件的优良品种。种苗的生产规模和推广应用已成为当前的重点课题<sup>[1]</sup>。本文将重点探讨本土良种桉树 Wh 系苗的规模化组织培养技术, 为我省桉树产业的发展奠定了技术基础。

## 1 研究材料与方法

### 1.1 材料

组培外植体取自海南澄迈林场桉树种源试验林中优良种源入选优树 Wh 系, 该系为海南省林业局温茂元等同志杂交选育的本土优良桉树品种。选用成龄优树伐桩萌发的芽条顶芽作为培养材料。

### 1.2 方法

研究采用不通过愈伤组织的芽条顶芽直接诱导途径, 在解决外植体消毒处理的基础上, 选择不同的营养成分和生长激素水平, 研究外植体的初次诱导, 继代增殖、壮苗生根及炼苗成活的最好条件。同一试验不同处理采用相同的无性系材料。本试验设置

3 个处理,每个处理 4 次重复,每处理小区 10 个外植体,对各处理后的顶芽个数、继代苗高及炼苗成活率采用实测调查,生长和增粗等级按如下标准:

生长:1 级 - 优,2 级 - 良,3 级 - 中,4 级 - 差  
增粗:1 级 - 极显著增粗,2 级 - 显著增粗,3 级 - 较显著增粗,4 级 - 维持原状

将腋芽个数、生长等级和增粗等级按 Log(X + 1) 转换后,与继代苗高值一样。进行小区平均值单因子或双因子方差分析等。

2 结果与分析

2.1 外植体的消毒处理

木本植物的外植体消毒在组培中一直是个难题,长期的野外生境致使污染源的种类和数量十分繁多。经常由于外植体消毒不彻底而造成桉树组培污染。本试验采用 3 种不同的消毒处理方法进行外植体消毒,处理 1:材料经 70 %酒精处理 30s + 0.15 %升汞处理 9min,无菌水冲洗后直接培养;处理 2:材料经 70 %酒精处理 30s + 0.5 %升汞处理 9min,无菌水冲洗,切除顶芽周围组织后培养;处理 3:材料经 70 %酒精处理 30s,无菌水冲洗,0.15 %升汞(加 3 滴吐温 80)处理 9min,无菌水冲洗,切除顶芽周围组织后培养。各处理经培养 10 d 后观测,结果如表 1。可以看出处理 3 有利于提高外植体消毒成活率。

表 1 外植体的消毒处理效果

| 编号  | 处理方法 | 处理数 | 污染数 | 成活率( %) |
|-----|------|-----|-----|---------|
| (1) | 处理 1 | 40  | 32  | 20.0    |
| (2) | 处理 2 | 40  | 15  | 62.5    |
| (3) | 处理 3 | 40  | 6   | 85.0    |

2.2 外植体的初次腋芽诱导

将成年优树伐桩萌芽作为外植体,直接诱导产生腋芽,不仅材料质和量比较理想,而且可以缩短成

苗时间,改变培养基的大量元素浓度和激素种类可使外植体产生不同数量的腋芽(表 2),方差分析和多重比较的结果表明(表 3),选择合适的培养基十分必要,1/2MS 培养基显著优于 MS,采用激素 6BA<sub>0.5</sub> + IBA<sub>0.25</sub> 组合的效果明显优于其它组合,可见外植体进入初次培养基时无机盐浓度不要太高且激素配比组合要适当。从实验结果表明,1/2MS 附加 6BA<sub>0.5</sub> + IBA<sub>0.25</sub> 培养基能诱导腋芽萌发到最好效果,可促使外植体在 25 d 内产生 4.0 个腋芽。

表 2 不同培养基下外植体的初次芽丛诱导情况比较

| 编号 | 培养基                                | 平均芽数/外植体 |
|----|------------------------------------|----------|
| 1  | MS + 0.5mg/L 6BA + 0.25mg/L IBA    | 3.1 b    |
| 2  | MS + 0.5mg/L 6BA + 0.5mg/L IBA     | 2.6 c    |
| 3  | MS + 1.0mg/L 6BA + 0.5mg/L IBA     | 1.6 d    |
| 4  | 1/2MS + 0.5mg/L 6BA + 0.25mg/L IBA | 4.0 a    |
| 5  | 1/2MS + 0.5mg/L 6BA + 0.5mg/L IBA  | 2.8 b c  |
| 6  | 1/2MS + 1.0mg/L 6BA + 0.5mg/L IBA  | 2.0 c d  |

表 3 外植体初次诱导芽丛数的方差分析

| 变异来源 | df | SS     | F 值      | 理论 F <sub>0.05</sub> | 理论 F <sub>0.01</sub> |
|------|----|--------|----------|----------------------|----------------------|
| 重复   | 3  | 0.0137 | 1.33     | 3.29                 | 5.42                 |
| 培养基间 | 5  | 0.0359 | 30.67 ** | 2.90                 | 4.56                 |
| 误差   | 15 | 0.0095 |          |                      |                      |
| 总变异  | 23 | 0.0591 |          |                      |                      |

2.3 继代苗增殖

获得无根苗后,继代苗增殖采用初次腋芽诱导培养基效果比较理想,其增殖倍数在 4.6 - 5.3。

2.4 继代苗的壮苗培养

培养粗壮的继代苗不仅有利于提高增殖倍数,而且也十分有利于继代苗的生根培养和移栽成活。桉树的生长与培养温度和光照强度有密切的关系,进行双因子试验表明(表 4 和表 5),继代培养中光照强度对苗木的粗壮度生长显著,采用 4500lux 的光照强度和在 30 的培养条件下,有利于提高继代苗的粗壮度和高生长。

表 4 培养温度和光照强度对壮苗培养的影响

| 编号             | 苗茎增粗等级         |                |                |                | 苗高( cm)        |                |                |                | 生长等级           |                |                |                |
|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|                | A <sub>1</sub> | A <sub>2</sub> | A <sub>3</sub> | A <sub>4</sub> | A <sub>1</sub> | A <sub>2</sub> | A <sub>3</sub> | A <sub>4</sub> | A <sub>1</sub> | A <sub>2</sub> | A <sub>3</sub> | A <sub>4</sub> |
| B <sub>1</sub> | 4.0            | 4.0            | 4.0            | 4.0            | 2.4            | 1.8            | 2.7            | 2.4            | 3.2            | 3.0            | 2.1            | 2.5            |
| B <sub>2</sub> | 4.0            | 4.0            | 4.0            | 3.8            | 2.5            | 2.1            | 1.7            | 1.7            | 2.8            | 3.1            | 3.0            | 2.8            |
| B <sub>3</sub> | 4.0            | 3.7            | 3.8            | 4.0            | 1.2            | 2.0            | 1.0            | 3.2            | 3.0            | 2.5            | 3.2            | 2.7            |
| B <sub>4</sub> | 3.8            | 3.0            | 2.3            | 3.7            | 1.8            | 2.0            | 1.8            | 1.3            | 3.0            | 3.0            | 2.0            | 3.3            |

注:A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>、A<sub>3</sub>、A<sub>4</sub> 表示培养温度分别为 26 、28 、30 、32 ,B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>3</sub>、B<sub>4</sub> 表示光照强度分别为 3000lux、3500lux、4000lux、4500lux。试验采用诱导培养基加 0.3 %的活性碳及 0.5 %的 PVP,培养时间为 18 d。

表 5 培养温度和光照强度的双因子方差分析

| 变异来源 | df | 增粗等级   |                   | 苗高(5)  |      | 生长等级    |      |
|------|----|--------|-------------------|--------|------|---------|------|
|      |    | 均方     | F 值               | 均方     | F 值  | 均方      | F 值  |
| 光照强度 | 3  | 0.0039 | 3.90 <sup>*</sup> | 0.0378 | 0.98 | 0.00056 | 0.22 |
| 培养温度 | 3  | 0.0017 | 1.70              | 0.0108 | 0.28 | 0.00210 | 0.81 |
| 误差   | 9  | 0.0010 |                   | 0.0386 |      | 0.00258 |      |

注 :F<sub>0.05 (3,9)</sub> = 3.86 F<sub>0.01 (3,9)</sub> =6.99

2.5 生根苗的炼苗及入圃

生根苗入圃采用 5000 - 8000lux 的自然光照炼苗2 - 3 d后开盖 ,白天每隔2 - 3 h用水雾喷洒 1 次 ,7 d后取出瓶苗。取苗时先使塑料内少量的水浸入瓶内 ,边旋转式摇动边在塑料盆沿敲击瓶壁 ,瓶苗自动滑出 ,用手抓住基部摆洗至培养基完全离根 ,再采用 800 倍 50 %的多菌灵溶液浸1 min ,之后用水冲净沥干 ,入幼苗圃定植于营养钵上 ,保持 75 - 90 %的相对湿度。桉树的成活率与瓶内种苗根的条数和保护好根不受损伤有密切的关系<sup>[4]</sup>。随机取 100 株苗进行双因子试验 (3 次重复 ,其他同方法 1.2) ,结果表明 :带 2 - 3 条根的瓶苗并保护好根的完整性成活率可达96.83 %。

3 讨论与小结

3.1 采用成年优树的桉树外植体 ,经 70 %酒精 (30s) 与0.15 %升汞 (9min) 分段联合消毒后 ,应在无菌条件下切除顶芽周围组织 ,以减少污染 ,提高成活率。外植体的初次诱导可采用 1/2MS + 6BA<sub>0.5</sub> + IBA<sub>0.25</sub> 培养 ,接种25 d平均可得4.0个芽 ;此培养基也适宜于继代培养 ,一个外植体接种繁殖一年后 ,理论上可获得4.3 ×10<sup>9</sup> 条无根苗。

3.2 要确保继代苗的健壮、正常生长 ,调节光照强度和培养温度是必要的 ,其理想值分别是4500lux和 30 ℃。要提高瓶苗的出圃成活率 ,选择炼带 2 - 3 条根的苗且保持不伤根有利于瓶苗成活 ,成活率分别可达94.89 - 96.83 %。2003 年规模化生产的 45 万株苗送到海南澄迈林场苗圃定植 ,30 d后清点有

42.7万株成活 ,成活率为94.89 %。

3.3 桉树组织培养的瓶苗成活率历来是快繁的一个重要方面 ,桉树是热带地区最主要的速生丰产林树种之一 ,但其良种的高产及抗逆有区域和适应性的局限 ,研究开发并完善本土桉树良种的组培快繁生产工艺加以推广应用 ,是确保我省桉树人工林生长力的重要环节<sup>[6,7]</sup>。

致谢 :本实验在海南省林业局桉树推广中心温茂元教授的帮助和支持下完成 ,在此表示感谢 !

参 考 文 献

[1] 温茂元. 海南桉树引种种植成功经验 [J]. 桉树科技 , 2005 ,22 (2) :37 - 40.

[2] 程家胜. 植物组织培养与工厂化育苗技术 [M]. 北京 : 金盾出版社 ,2003.

[3] 曹孜义 ,刘国民. 实用植物组织培养技术教程 [M]. 兰州 :甘肃科学技术出版社 ,1996.

[4] 邱运亮. 赤桉组织培养及植株再生 [J]. 细胞生物学杂志 ,1995 ,1 (增刊) :70.

[5] 谭文澄 ,戴策刚. 观赏植物组织培养技术 [M]. 北京 :中国林业出版社 ,1991.

[6] Sommer H E , Caldas L S. In vitro methods applied to forest trees [M] // Thorpe T A. Plant tissue Culture Methods and Application in Agriculture. Academic Press , 1981 ,349 - 358.

[7] Haissig B E ,Nelson N D , Kidd G H. Trends in the use of tissue Culture in forest improvement [J]. Bio - Technology , 1987 , (5) :52 - 59.