

直干桉超级苗组培快繁技术体系研究

王晓丽¹, 孙继瑞², 韦文长³, 李贤忠¹, 曹子林^{4*}

(1. 西南林业大学 林学院, 云南 昆明 650224; 2. 河北建设集团园林工程有限公司, 河北 保定 071000;
3. 双江县林业局, 云南 临沧 677399; 4. 西南林业大学 生态与水土保持学院, 云南 昆明 650224)

摘 要:以直干桉超级苗茎段为外植体,分别采用正交试验、两因素全因子试验和单因素试验逐一探讨直干桉外植体消毒、腋芽诱导、不定芽增殖、生根培养、移栽等组培快繁主要环节中各自的最佳处理,构建直干桉超级苗组织培养的技术体系。结果表明,外植体联合消毒的最佳处理为 75% 酒精消毒 20 s, 1% 洁尔灭消毒 2 min 和 0.1% 升汞消毒 5 min,在控制污染率的同时,成活率极显著高于其他处理;暗培养在降低外植体褐化率、提高成活率方面具有极显著效应;腋芽诱导的最佳体系为改良的 MS 培养基、0.6 mg/L 6-BA 和 0.5 mg/L NAA,在提高腋芽萌发率的同时,可使芽长、芽壮且结果稳定;不定芽增殖的最佳处理为改良的 H 培养基、1.0 mg/L 6-BA 和 0.1 mg/L IBA,不但增大增殖系数,同时还缩短了增殖培养时间;生根培养的最佳处理为改良的 White 培养基、0.3 mg/L IBA 和 0.1 mg/L NAA,可极显著提高生根率、缩短生根时间且结果稳定;移栽培育的适宜基质组成为珍珠岩:腐殖土:草炭=1:1:1,成活率显著高于其他基质组成。

关键词:直干桉;超级苗;组织培养

中图分类号:S722.37 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7461(2019)04-0131-08

Technical System of Tissue Culture for Rapid Propagation of *Eucalyptus maideni* Superior Seedlings

WANG Xiao-li¹, SUN Ji-rui², WEI Wen-chang³, LI Xian-zhong¹, CAO Zi-lin^{4*}

(1. College of Forestry, Southwest Forestry University, Kunming 650224, Yunnan, China;
2. Landscape Engineering Limited Company of Hebei Construction Group, Baoding 071000, Hebei, China;
3. Forestry Bureau of Shuangjiang County, Lincang 677399, Yunnan, China;
4. College of Ecology and Soil & Water Conservation, Southwest Forestry University, Kunming 650224, Yunnan, China)

Abstract: The stem segments of *Eucalyptus maideni* superior seedlings were used as explants, orthogonal experiment, two-factor full factor experiment and single-factor experiment were adopted, respectively, to explore the best treatment in the main procedures of tissue culture, including disinfection, axillary bud induction, adventitious bud proliferation, rooting culture and transplantation, to establish the technical system for tissue culture of *E. maideni* superior seedlings. The results showed that the optimal treatments for combined disinfection of explants were 75% alcohol disinfection for 20 s, 1% bromo-geramine disinfection for 2 min and 0.1% mercuric chloride disinfection for 5 min. The contamination rate was controlled and the survival rate was significantly higher than those of other treatments. The browning rate was significantly reduced and the survival rate increased markedly through dark culture of explants. The best system for axillary bud induction was the improved MS medium, 0.6 mg/L 6-BA and 0.5 mg/L NAA, which could make the buds longer and stronger, and could increase the germination rate of axillary buds. The optimum treat-

收稿日期:2018-09-21 修回日期:2018-11-15
基金项目:国家重点研发计划课题项目(2016YFD0600501)。
作者简介:王晓丽,女,副教授,研究方向:森林培育。E-mail:1144607944@qq.com
* 通信作者:曹子林,男,副教授,研究方向:森林培育和林木生理生态。E-mail:fjcaozilin@qq.com

ment of adventitious bud proliferation was the improved H medium,1.0 mg/L 6-BA and 0.1 mg/L IBA, which not only remarkably increased the proliferation coefficient but also significantly shortened the breeding time. The optimal treatment of rooting culture was the improved White medium,0.3 mg/L IBA and 0.1 mg/L NAA,which significantly improved rooting rate,shortened rooting time and the test results were very stable. The suitable substrate composition for transplanting cultivation was perlite : humus soil : turf =1 : 1 : 1,the survival rate was significantly higher than that of other substrates.

Key words:*Eucalyptus maideni*; superior seedling; tissue culture

直干桉(*Eucalyptus maideni*)生长迅速,经营周期短,是桉树中少有的油、材兼用树种,经济价值显著^[1-3],在云南省有引种栽植和分布。目前直干桉人工林培育的材料来源主要是种子和实生苗,但良种资源少,种源不足,导致种子价格畸高且种苗质量良莠不齐,造林后林木分化明显^[4-6]。鉴于此,本课题组前期开展了直干桉超级苗选择的研究并获得一定数量的超级苗^[7],如何有效利用这些超级苗就成为直干桉人工林定向培育中急需解决的问题,遵循林木良种化必须有性创造和无性利用结合的方针^[8],超级苗无性快繁技术体系的构建成为解决该问题的关键。

植物组织培养以其条件可控、生产效率高等特点成为林木良种快繁的主要技术之一^[9-10]。迄今为止,全世界约有60种桉树开展了组织培养技术研究,绝大部分已获得完整植株^[11-19]。直干桉是世界公认的无性繁殖困难树种^[4],其组织培养研究较少。刘云彩^[20]等以直干桉优树茎段为外植体探讨其组培技术,褐化率控制在30%,芽萌动率最高63.1%,增殖系数最高3,生根率为43%~64.2%,移栽成活率72.6%。余小涵^[21]以直干桉优树茎段为外植体研究其组培快繁,褐化率控制在71%,芽萌动率最高50.6%,增殖系数最高3.7,生根率81%,移栽成活率65%。可见直干桉的组织培养研究虽然取得了一定的进展,也获得了完整的植株,但其稳定高效组培技术体系的建立还有待进一步的研究。本文以直干桉超级苗茎段为外植体,通过正交试验等探讨

外植体消毒、外植体褐化防除、腋芽诱导、不定芽增殖、生根培养和移栽炼苗的最佳处理措施,构建直干桉超级苗组织培养的技术体系,使选育出的优良单株无性系化,提高直干桉组培繁殖效率,为直干桉良种应用和推广提供技术和基础条件支持,为进一步开展直干桉的工厂化育苗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以生长健壮的1年生直干桉实生超级苗(超级苗的选取标准及结果已另文发表)^[7]半木质化茎段为外植体。

1.2 研究方法

1.2.1 直干桉外植体消毒 参考刘均利^[18]等、刘云彩^[20]等和余小涵^[21]桉树外植体消毒处理的方法并加以改进,采用三因素三水平的正交试验(表1,表2),筛选最佳消毒处理方法,每个处理组合接种10瓶,每瓶2株,设3次重复。外植体经过消毒处理后,接入MS培养基,10 d后观察不同处理组合的污染情况,统计污染率和成活率。

表1 直干桉外植体消毒处理因素水平

Table 1 Levels of experiment factors for disinfection treatment of <i>Eucalyptus maideni</i> explants			
水平	A 75%酒精/s	B 洁尔灭/min	C 0.1%升汞/s
1	10	1	3
2	20	2	5
3	30	3	8

表2 直干桉外植体消毒处理正交试验

Table 2 Orthogonal experimental design table for disinfection treatment of *E. maideni* explants

处理组合	A	B	C	D(空白)	试验内容		
1	1	1	1	1	75%酒精 10 s	1%洁尔灭 1 min	0.1%升汞 3 min
2	1	2	2	2	75%酒精 10 s	1%洁尔灭 2 min	0.1%升汞 5 min
3	1	3	3	3	75%酒精 10 s	1%洁尔灭 3 min	0.1%升汞 8 min
4	2	1	2	3	75%酒精 20 s	1%洁尔灭 1 min	0.1%升汞 5 min
5	2	2	3	1	75%酒精 20 s	1%洁尔灭 2 min	0.1%升汞 8 min
6	2	3	1	2	75%酒精 20 s	1%洁尔灭 3 min	0.1%升汞 3 min
7	3	1	3	2	75%酒精 30 s	1%洁尔灭 1 min	0.1%升汞 8 min
8	3	2	1	3	75%酒精 30 s	1%洁尔灭 2 min	0.1%升汞 3 min
9	3	3	2	1	75%酒精 30 s	1%洁尔灭 3 min	0.1%升汞 5 min

1.2.2 直干桉外植体褐化的防除 参考余小涵^[21]、谢志亮^[22]等和张宏平^[23]等的外植体褐化抑制方法,对外植体采用暗培养,于 MS 培养基中接入茎段,每瓶接种 2 株,共 10 瓶,设 3 次重复,以光培养外植体为对照,10 d 后观测并统计其褐化率和成活率。

1.2.3 直干桉腋芽的诱导 参考刘云彩^[20]等和雷亚灵^[24]腋芽诱导的方法并加以改进,采用 6-BA 和 NAA 两因素(0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/L 的 6-BA;0.2、0.3、0.4、0.5 mg/L 的 NAA)的全因子试验,将经消毒处理后的外植体分别接入含有不同浓度 6-BA 和 NAA 的 MS 培养基中进行腋芽启动,每个处理接种 5 瓶,每瓶 2 株,设 3 次重复。15 d 后观察腋芽启动情况,统计萌发率。

表 4 直干桉不定芽增殖正交试验

Table 4 Orthogonal experimental design table for adventitious bud proliferation of <i>E. maideni</i>							
处理组合	A	B	C	D(空白)	试验内容		
1	1	1	1	1	1/2MS 培养基	0.1 mg/L 的 6-BA	0.1 mg/L 的 IBA
2	1	2	2	2	1/2MS 培养基	0.5 mg/L 的 6-BA	0.5 mg/L 的 IBA
3	1	3	3	3	1/2MS 培养基	1.0 mg/L 的 6-BA	1.0 mg/L 的 IBA
4	2	1	2	3	H 培养基	0.1 mg/L 的 6-BA	0.5 mg/L 的 IBA
5	2	2	3	1	H 培养基	0.5 mg/L 的 6-BA	1.0 mg/L 的 IBA
6	2	3	1	2	H 培养基	1.0 mg/L 的 6-BA	0.1 mg/L 的 IBA
7	3	1	3	2	MS 培养基	0.1 mg/L 的 6-BA	1.0 mg/L 的 IBA
8	3	2	1	3	MS 培养基	0.5 mg/L 的 6-BA	0.1 mg/L 的 IBA
9	3	3	2	1	MS 培养基	1.0 mg/L 的 6-BA	0.5 mg/L 的 IBA

1.2.5 直干桉的生根培养 参考沙月娥^[16]等、刘云彩^[20]等和余小涵^[21]生根培养的处理并加以改进,采用三因素三水平的正交试验(表 5、表 6),筛选直干桉的最佳生根处理,每个处理组合接种 10 瓶,每瓶 1 株,设 3 次重复。不定期的观察 9 个不同的处理组合的生根情况,统计生根率。

1.2.6 直干桉移栽炼苗 参考余小涵^[21]移栽炼苗的方法,直干桉生根 1 个月后,在室内开瓶炼苗 3 d,

表 6 直干桉生根培养正交试验

Table 6 Orthogonal experimental design table for rooting culture of <i>E. maideni</i>							
处理组合	A	B	C	D(空白)	试验内容		
1	1	1	1	1	1/2MS 培养基	0.1 mg/L 的 IBA	0.1 mg/L 的 NAA
2	1	2	2	2	1/2MS 培养基	0.3 mg/L 的 IBA	0.3 mg/L 的 NAA
3	1	3	3	3	1/2MS 培养基	0.5 mg/L 的 IBA	0.5 mg/L 的 NAA
4	2	1	2	3	H 培养基	0.1 mg/L 的 IBA	0.3 mg/L 的 NAA
5	2	2	3	1	H 培养基	0.3 mg/L 的 IBA	0.5 mg/L 的 NAA
6	2	3	1	2	H 培养基	0.5 mg/L 的 IBA	0.1 mg/L 的 NAA
7	3	1	3	2	White 培养基	0.1 mg/L 的 IBA	0.5 mg/L 的 NAA
8	3	2	1	3	White 培养基	0.3 mg/L 的 IBA	0.1 mg/L 的 NAA
9	3	3	2	1	White 培养基	0.5 mg/L 的 IBA	0.3 mg/L 的 NAA

1.2.4 直干桉不定芽的增殖 以启动后的腋芽为试验材料,参考燕丽萍^[17]等、刘均利^[19]等和余小涵^[21]不定芽增殖的方法并加以改进,采用三因素三水平正交试验,筛选不定芽增殖的最佳培养基和最适的激素浓度(表 3、表 4),每个处理组合接种 10 瓶,每瓶 2 株,设 3 次重复。分别于 30 d 和 60 d 后观察不定芽的状态,并统计增殖系数。

表 3 直干桉不定芽增殖试验因素水平

Table 3 Levels of experiment factors for adventitious bud proliferation of <i>E. maideni</i>			
水平	A 培养基	B 6-BA/(mg · L ⁻¹)	C IBA/(mg · L ⁻¹)
1	1/2MS	0.1	0.1
2	H	0.5	0.5
3	MS	1.0	1.0

表 5 直干桉生根培养试验因素水平

Table 5 Levels of experiment factors for rooting culture of <i>E. maideni</i>			
水平	A 培养基	B IBA/(mg · L ⁻¹)	C NAA/(mg · L ⁻¹)
1	1/2MS 培养基	0.1	0.1
2	H 培养基	0.3	0.3
3	White 培养基	0.5	0.5

取出后洗净培养基,在温室中驯化 15 d,移栽到室外。移栽基质组合有腐殖土:红土:草炭=1:1:1;珍珠岩:腐殖土:草炭=1:1:1;珍珠岩:腐殖土:红土=1:1:1;珍珠岩:红土:草炭=1:1:1 共 4 个处理,每个处理移栽 4 株苗,设 3 次重复。

1.2.7 数据统计与分析 污染率=污染数/总接种数×100%;成活率=成活数/总接种数×100%;褐化率=褐化数/总接种数×100%;萌发率=腋芽萌发数/总接种数×100%;增殖系数=出芽数/接种芽数;生根率=生根数/总外植的数量×100%^[21]。采用 EXCEL2010 和 SPSS17.0 进行数据整理和分析。

2 结果与分析

2.1 不同消毒处理对直干校外植体污染和成活的影响

研究结果表明(表 7、表 8),不同消毒处理间外植体污染率(75.0%~5.0%)和成活率(76.7%~10.0%)均存在极显著差异,污染率最高的为处理组合 1(A₁B₁C₁),最低为处理组合 7(A₃B₁C₁),成活率

最高的为处理组合 4(A₂B₁C₂),最低为处理组合 7(A₃B₁C₁),以成活率为主,污染率为辅,可见处理 4 的存活率极显著高与其他处理且污染率极显著低于其他 7 种处理(除处理 7 外),因此从处理间的方差分析和多重比较来看,处理 4(A₂B₁C₂)用于外植体的消毒更为合适;因素间外植体污染率和成活率的方差分析中,因素 A 和因素 C 分别存在极显著和显著差异,因素 B 无显著差异,因素水平间多重比较发现,因素 A 和因素 C 中污染率均为 3 个水平两两间存在极显著差异,且第 1 水平>第 2 水平>第 3 水平,同时因素 A 和因素 C 中成活率水平间皆存在显著差异,且第 2 水平>第 1 水平>第 3 水平,考虑以成活率为主,污染率为辅,所以因素间的方差分析和多重比较认为,理论最佳处理组合为 A₂B₂C₂;由于因素 B 中成活率和污染率 3 个水平两两间均无显著差异,因此理论最优组合 A₂B₂C₂ 与实际最优组合 A₂B₁C₂ 差异不显著。综上所述,直干校外植体消毒的适宜处理组合为 A₂B₁C₂(75%酒精消毒 20 s,1%洁尔灭消毒 2 min,0.1%升汞消毒 5 min)。

表 7 不同消毒处理间直干校外植体污染率和成活率的方差分析和多重比较(平均值±标准差)

Table 7 Variance analysis and multiple comparison of contamination rate and survival rate between different disinfection treatments of *E. maideni* explants

处理组合	污染率	成活率	处理组合	污染率	成活率
1(A ₁ B ₁ C ₁)	75.0±2.9A	23.3±1.7D	6(A ₂ B ₃ C ₁)	63.3±1.7B	33.3±1.7C
2(A ₁ B ₂ C ₂)	46.7±1.7C	48.3±1.7B	7(A ₃ B ₁ C ₁)	5.0±2.9F	10.0±2.9E
3(A ₁ B ₃ C ₃)	31.7±4.4D	33.3±1.7C	8(A ₃ B ₂ C ₁)	58.3±1.7B	35.0±2.9C
4(A ₂ B ₁ C ₂)	18.3±4.4E	76.7±1.7A	9(A ₃ B ₃ C ₂)	11.7±4.4EF	25.0±2.9D
5(A ₂ B ₂ C ₃)	16.7±1.7E	35.0±2.9C	P 值	0.007**	0.000**

注:大写字母表示 0.01 水平上的差异显著性; ** 表示 0.01 水平上差异显著。

表 8 影响直干校外植体污染率和成活率的因素方差分析和水平多重比较

Table 8 Factor variance analysis and level multiple comparison of affecting contamination rate and survival rate of *E. maideni* explants

指标	A 因素				B 因素				C 因素			
	A ₁	A ₂	A ₃	P	B ₁	B ₂	B ₃	P	C ₁	C ₂	C ₃	P
污染率/%	51.1A	32.8B	25C	0.006**	32.8	40.6	35.6	0.25	65.6A	25.6B	17.8C	0.004**
成活率/%	35b	47.3a	23.3c	0.037*	36.7	39.4	30.6	0.40	30.6b	50a	26.1b	0.049*

注:小写字母表示 0.05 水平上的差异显著性;大写字母表示 0.01 水平上的差异显著性; * 表示 0.05 水平上差异显著; ** 表示 0.01 水平上差异显著。

2.2 暗培养对直干校外植体褐化的抑制效应

分别对光培养和暗培养外植体的褐化率及成活率进行独立样本 *t* 检验和 *F* 检验,研究结果表明(表 9),光培养和暗培养 2 个独立样本的褐化率及成活率 *F* 检验均无显著差异,说明 2 个独立样本方差齐性;光培养和暗培养 2 个独立样本的褐化率及成活率 *t* 检验均存在极显著差异,暗培养褐化率(12.7%)极显著低于光培养褐化率(52.2%),且暗培养成活率(86.1%)极显著高于光培养成活率(41.1%),同时暗培养降低了外植体成活率的变异

系数,使外植体成活更稳定,可见暗培养在降低外植体褐化率、提高成活率方面具有极显著效应。

2.3 不同激素配比对直干校腋芽诱导的影响

研究结果表明(表 10),6-BA 和 NAA 配合使用的 20 个处理中,6-BA 浓度为 0.6 mg/L 和 0.8 mg/L 的 8 个处理的腋芽萌发率均显著大于其浓度为 0.2、0.4 mg/L 和 1.0 mg/L 的 12 个处理,且 6-BA 浓度为 0.6 mg/L 和 0.8 mg/L 的 8 个处理间均无显著差异,因此就腋芽萌发率来说,6-BA 浓度为 0.6 mg/L 和 0.8 mg/L 的 8 个处理皆可显著促进腋芽

诱导;当 6-BA 浓度一定时,虽然 NAA 浓度的变化不会引起腋芽萌发率的显著改变,但诱导出的芽的形态有明显的区别,即随着 NAA 浓度的增大,腋芽增长、增壮,浓度为 0.4 mg/L 和 0.5 mg/L 的 10 个处理的芽长势健壮;综合腋芽诱导率和诱导出的芽的长势状况,0.6~0.8 mg/L 的 6-BA 和 0.4~0.5

mg/L 的 NAA 可以作为腋芽诱导的激素配比浓度,即处理组合 13、14、18、19 均可使用,但进一步考虑腋芽萌发率的变异系数,则在 4 个处理组合中处理 18 的变异系数最小(7.53%),因此处理组合 18(0.6 mg/L 的 6-BA,0.5 mg/L 的 NAA)作为直干桉腋芽诱导的激素配比更为适宜。

表 9 不同处理对直干桉外植体褐化率和成活率的影响

指标	光培养			暗培养				
	平均值±标准差	极差	变异系数	平均值±标准差	t 检验	F 检验	极差	变异系数
褐化率/%	52.2±5.9	20.0	19.50	12.7±1.5	0.003**	0.114	5.0	19.91
成活率/%	41.1±4.0	13.4	16.95	86.1±2.0	0.001**	0.227	6.7	4.05

注:**表示 0.01 水平上差异显著。

表 10 不同激素对比对直干桉腋芽诱导的效应

处理组合		形态观察	腋芽萌发率/%			
			平均值±标准差	极差	变异系数	P 值
1(0.2 mg/L 的 6-BA,0.2 mg/L 的 NAA)		芽长较小	33.33±5.77d	10.0	17.32	0.02*
2(0.4 mg/L 的 6-BA,0.2 mg/L 的 NAA)		芽长较小	53.33±5.77c	10.0	10.83	
3(0.6 mg/L 的 6-BA,0.2 mg/L 的 NAA)		芽长较小	76.67±5.77ab	10.0	7.53	
4(0.8 mg/L 的 6-BA,0.2 mg/L 的 NAA)		芽长较小	73.33±5.77ab	10.0	7.87	
5(1.0 mg/L 的 6-BA,0.2 mg/L 的 NAA)		芽长较小	46.67±5.77cd	10.0	12.37	
6(0.2 mg/L 的 6-BA,0.3 mg/L 的 NAA)		芽长中等	26.67±5.77d	10.0	21.65	
7(0.4 mg/L 的 6-BA,0.3 mg/L 的 NAA)		芽长中等	53.33±5.77c	10.0	10.83	
8(0.6 mg/L 的 6-BA,0.3 mg/L 的 NAA)		芽长中等	73.33±5.77ab	10.0	7.87	
9(0.8 mg/L 的 6-BA,0.3 mg/L 的 NAA)		芽长中等	83.33±5.77a	10.0	6.93	
10(1.0 mg/L 的 6-BA,0.3 mg/L 的 NAA)		芽长中等	50.00±10.00c	20.0	20.00	
11(0.2 mg/L 的 6-BA,0.4 mg/L 的 NAA)		芽长较长	30.00±10.00d	20.0	33.33	
12(0.4 mg/L 的 6-BA,0.4 mg/L 的 NAA)		芽长较长	60.00±10.00bc	20.0	16.67	
13(0.6 mg/L 的 6-BA,0.4 mg/L 的 NAA)		芽长较长	73.33±5.77ab	10.0	7.87	
14(0.8 mg/L 的 6-BA,0.4 mg/L 的 NAA)		芽长较长	80.00±10.00ab	20.0	12.50	
15(1.0 mg/L 的 6-BA,0.4 mg/L 的 NAA)		芽长较长	53.33±5.77c	10.0	10.83	
16(0.2 mg/L 的 6-BA,0.5 mg/L 的 NAA)		芽长较长	36.67±5.77d	10.0	15.75	
17(0.4 mg/L 的 6-BA,0.5 mg/L 的 NAA)		芽长较长	56.67±5.77c	10.0	10.19	
18(0.6 mg/L 的 6-BA,0.5 mg/L 的 NAA)		芽长较长	76.67±5.77ab	10.0	7.53	
19(0.8 mg/L 的 6-BA,0.5 mg/L 的 NAA)		芽长较长	70.00±10.00b	20.0	14.29	
20(1.0 mg/L 的 6-BA,0.5 mg/L 的 NAA)		芽长较长	46.67±5.77cd	10.0	12.37	

注:小写字母表示 0.05 水平上的差异显著性;*表示 0.05 水平上差异显著。表 15 同。

2.4 不同培养基和激素对比对直干桉增殖的影响

30 d 增殖系数和 60 d 增殖系数 2 个指标的不同处理组合间均存在极显著差异(表 11),处理组合 6(A₂B₃C₁)30 d 增殖系数(3.47)和 60 d 增殖系数(8.14)均极显著大于本指标中的其他处理组合,且处理组合 6(A₂B₃C₁)60 d 增殖系数(8.14)是处理组合 5(A₂B₂C₃)60 d 增殖系数(3.76)的 2.16 倍,即最高值是次高值的 2.16 倍,因此从处理间的方差分析和多重比较来看,处理组合 6(A₂B₃C₁)是直干桉腋芽增殖的最适处理;30 d 增殖系数的因素间方差分

析中(表 12),因素 A 存在极显著差异,因素 B 和因素 C 无显著差异,因素水平间多重比较发现,因素 A 3 个水平两两间存在极显著差异,且第 2 水平>第 3 水平>第 1 水平,60 d 增殖系数的因素间方差分析中(表 12),因素 A 存在极显著差异,因素 B 和因素 C 均为显著差异,因素水平间多重比较发现,因素 A 3 个水平两两间存在极显著差异,且第 2 水平>第 3 水平>第 1 水平,因素 B 第 3 水平显著大于第 1 和第 2 水平,第 1 和第 2 水平间无显著差异,因素 C 第 1 水平显著大于第 2 和第 3 水平,第 2 和

第 3 水平间无显著差异,结合 2 个时期腋芽增殖系数因素间的方差分析和多重比较认为,最佳处理组合为 A₂B₃C₁。综合来看,直干桉腋芽增殖的适宜处理组合为 A₂B₃C₁(H 培养基、1.0 mg/L 的 6-BA、0.1 mg/L 的 IBA)。

2.5 不同培养基和激素配比对直干桉生根的影响

研究结果表明(表 13、表 14),不同处理组合间生根率(7.0%~77.2%)和生根时间(7.7%~22.0%)均存在极显著差异,生根率最高的为处理组合 8(A₃B₂C₁),且其极显著高于其他 8 个处理组合,生根时间最短的为处理组合 8(A₃B₂C₁),处理组合 7、8、9 两两间无显著差异,但此 3 个处理组合均极显著小于其他 6 个处理组合。因此从处理组合间的

方差分析和多重比较来看,处理组合 8(A₃B₂C₁)为直干桉生根的最适处理;因素间方差分析中,因素 A 在生根率和生根时间的变异中均存在极显著影响,因素 B 在生根率的变异中有显著影响,而在生根时间的变异中没有显著影响,因素 C 则在生根率和生根时间的变异中均没有显著影响,因素水平间多重比较发现,A 因素生根率第 3 水平>第 1 水平>第 2 水平,生根时间第 3 水平<第 1 水平<第 2 水平,因素 B 生根率第 2 水平>第 3 水平=第 1 水平,所以因素间的方差分析和多重比较认为,理论最适处理组合为 A₃B₂C_(1,2,3)。综合来看,直干桉生根的最佳处理组合为 A₃B₂C₁(White 培养基、0.3 mg/L 的 IBA、0.1 mg/L 的 NAA)。

表 11 不同培养基和激素配比对直干桉增殖的影响

Table 11 Effects of different media and hormone combination on proliferation of *E. maideni*

处理组合	30 d 增殖系数	60 d 增殖系数	处理组合	30 d 增殖系数	60 d 增殖系数
1(A ₁ B ₁ C ₁)	1.63F	1.83FG	6(A ₂ B ₃ C ₁)	3.47A	8.14A
2(A ₁ B ₂ C ₂)	1.73F	1.77G	7(A ₃ B ₁ C ₁)	2.13E	2.97E
3(A ₁ B ₃ C ₃)	2.00E	2.00F	8(A ₃ B ₂ C ₁)	2.6D	3.14D
4(A ₂ B ₁ C ₂)	3.23B	3.51C	9(A ₃ B ₃ C ₂)	2.1E	2.86E
5(A ₂ B ₂ C ₃)	2.97C	3.76B	P 值	0.00**	0.00**

注:大写字母表示 0.01 水平上的差异显著性;* * 表示 0.01 水平上差异显著。表 13 同。

表 12 影响直干桉增殖的因素方差分析和水平多重比较

Table 12 Factors variance analysis and levels multiple comparison of affecting proliferation of *E. maideni*

指标	A 因素				B 因素				C 因素			
	A ₁	A ₂	A ₃	P	B ₁	B ₂	B ₃	P	C ₁	C ₂	C ₃	P
30 d 增殖系数	1.79C	3.22A	2.28B	0.000**	2.33	2.43	2.43	0.960	2.36	2.35	2.37	0.580
60 d 增殖系数	1.87C	5.14A	2.99B	0.000**	2.77b	2.89b	4.33a	0.049*	4.02a	2.71b	2.88b	0.045*

注:大写字母表示 0.01 水平上的差异显著性;小写字母表示 0.05 水平上的差异显著性;* 表示 0.05 水平上差异显著;* * 表示 0.01 水平上差异显著。表 14 同。

表 13 不同培养基和激素配比对直干桉生根的影响(平均值±标准差)

Table 13 Effects of different media and hormone combination on strike root of *E. maideni*

处理组合	生根率	生根时间	处理组合	生根率	生根时间
1(A ₁ B ₁ C ₁)	23.1±3.3DE	15.0±0.6B	6(A ₂ B ₃ C ₁)	7.0±3.3E	20.0±0.0AB
2(A ₁ B ₂ C ₂)	33.4±3.3CD	14.3±0.9B	7(A ₃ B ₁ C ₁)	53.7±3.3B	8.0±0.6C
3(A ₁ B ₃ C ₃)	43.0±3.3BC	13.3±0.9B	8(A ₃ B ₂ C ₁)	77.2±3.3A	7.7±0.9C
4(A ₂ B ₁ C ₂)	13.3±3.3E	22.0±0.6A	9(A ₃ B ₃ C ₂)	45.0±5.0BC	8.3±0.9C
5(A ₂ B ₂ C ₃)	20.1±5.8DE	21.7±0.3AB	P 值	0.00**	0.00**

表 14 影响直干桉生根的因素方差分析和水平多重比较

Table 14 Factors variance analysis and levels multiple comparison of affecting strike root of *E. maideni*

指标	A 因素				B 因素				C 因素			
	A ₁	A ₂	A ₃	P	B ₁	B ₂	B ₃	P	C ₁	C ₂	C ₃	P
生根率	0.33B	0.13C	0.60A	0.00**	0.31b	0.43a	0.33b	0.025*	0.36	0.29	0.39	0.33
生根时间	14.2B	21.3A	8.1C	0.00**	15.0	14.6	13.1	0.24	13.5	14.3	14.9	0.53

2.6 不同基质对直干桉移栽成活率的影响

研究结果表明(表 15),不同处理组合间移栽成活率存在显著差异,基质组成为珍珠岩:腐殖土:

草炭=1:1:1 的移栽成活率(72.3%)最高,且显著高于其他 3 种基质组成,腐殖土:红土:草炭=1:1:1 的移栽成活率(22.7%)最低,且显著低于其

他 3 种基质组成,珍珠岩:腐殖土:红土=1:1:1 和珍珠岩:红土:草炭=1:1:1 的移栽成活率无

显著差异,因此直干桉移栽成活的适宜基质组成为珍珠岩:腐殖土:草炭=1:1:1。

表 15 不同基质对直干桉组培苗移栽成活率的影响

Table 15 Effects of different substrates on the survival rate of transplanting *E. maideni* plantlets

基质组成	成活率/%	基质组成	成活率/%	P 值
腐殖土:红土:草炭=1:1:1	22.7c	珍珠岩:腐殖土:红土=1:1:1	52.7 b	0.031*
珍珠岩:腐殖土:草炭=1:1:1	72.3 a	珍珠岩:红土:草炭=1:1:1	48.0 b	

3 结论与讨论

桉树属很多树种组织培养中外植体消毒处理都有用到升汞,只是树种不同,升汞浓度和处理时间有差异^[16-21],同时有的桉树种的研究中也用到了一定浓度的酒精^[18],但是洁尔灭作为一种对外植体伤害很小、杀菌效果好的广谱表面活性消毒剂,在桉树种研究中未见使用。本研究直干桉外植体消毒处理使用 75%酒精、1%洁尔灭和 0.1%升汞 3 种消毒剂联合灭菌,使污染率降为 18.3%、成活率提高到 76.7%,在外植体消毒处理的基础上,通过暗培养,使外植体的褐化率达到 12.7%,远低于刘文彩^[20]等(30%)和余小涵(71%)^[21]的褐化率,表明本研究的外植体消毒处理(75%酒精消毒 20 s,1%洁尔灭消毒 2 min,0.1%升汞消毒 5 min)和暗培养(10 d)的结合是降低污染率和褐化率的适宜措施。

针对直干桉组培体系构建中腋芽萌动率低(50.6%~63.1%)的问题^[20-21],本研究在刘云彩^[20]等和余小涵^[21]对直干桉研究的基础上,进一步借鉴八仙花(*Hydrangea macrophylla*)和‘凤丹’牡丹(*Paeonia ostii*‘Feng Dan’)腋芽诱导(腋芽萌动率 92%)的培养基和激素配比体系^[24-25]并加以改进,采用 MS 培养基、0.6~0.8 mg/L 的 6-BA 和 0.3~0.5 mg/L 的 NAA,使直干桉腋芽诱导率获得大幅度提高,最高达到 83.33%。综合考虑腋芽诱导率和诱导出的不定芽的形态,最终确定直干桉腋芽诱导的最适体系为 MS 培养基、0.6 mg/L 的 6-BA 和 0.5 mg/L 的 NAA。

在直干桉继代增殖中,进一步借鉴红心杉(*Cunninghamia lanceolata*)的培养基和激素配比体系^[26]并加以改进,使得培养周期 30 d 的增殖系数为 3.47,培养周期 60 d 的增殖系数为 8.14,刘云彩等和余小涵对直干桉增殖研究中,培养周期 60 d 的增殖系数为 3~3.7^[20-21]。本研究在提高增殖系数的同时,缩短了培养周期,降低了育苗成本。同时,在继代增殖培养基中加入一定浓度的 NAA 可解决不定芽弱小的问题,省略了组培中普遍采用的需要转瓶到壮苗培养基上做复壮培养的环节^[20],可直接获得健壮的无根苗,缩短了培养周期,降低了育苗成

本。因此直干桉增殖的最适体系为 H 培养基、1.0 mg/L 的 6-BA 和 0.1 mg/L 的 IBA。

在直干桉的生根培养中,本研究通过筛选培养基和调整激素配比,生根率达到 77%,生根时间为 7.7 d,比刘云彩^[20]等对直干桉生根培养的生根率(42%~64.2%)有明显提高,生根时间(7~15 d)明显缩短且生根时间稳定,比余小涵^[21]直干桉生根培养 40 d 时统计的生根率(81%)虽然有所减少,但生根时间显著缩短,降低了育苗成本。所以直干桉生根培养的最适体系为 White 培养基、0.3 mg/L 的 IBA 和 0.1 mg/L 的 NAA。将生根组培苗进行炼苗移栽,珍珠岩:草炭:腐殖土=1:1:1 的基质组成移栽成活率(72.3%)最高,高于余小涵^[21]直干桉组培苗移栽成活率(65%),与刘云彩^[20]等直干桉移栽成活率(72.6%)相当,因此直干桉超级苗组培移栽的最佳基质为珍珠岩:草炭:腐殖土=1:1:1。

参考文献:

[1] 谢耀坚. 中国桉树人工林可持续经营战略初探[J]. 世界林业研究,2003,16(5):58-61.
XIE Y J. Primary studies on sustainable management strategy of *Eucalyptus* plantation in China[J]. World Forestry Research,2003,16(5):58-61. (in Chinese)

[2] 陈余美,林彬远. 直干桉引种及培育技术研究[J]. 四川林业科技,2006,27(3):10-14.
CHEN Y M, LIN B Y. A study of the intrdocution and cultural techniques of *Eucalyetus maidenii*[J]. Journal of Sichuan Forestry Science and Technology,2006,27(3):10-14. (in Chinese)

[3] 张荣贵,李思广,蒋云东. 云南的桉树引种及对其发展状况的剖析[J]. 西部林业科学,2007,36(3):98-102.
ZHANG R G, LI S G, JIANG Y D. Introduction of *Eucalyptus* in Yunnan and analysis on development status[J]. Journal of West China Forestry Science, 2007, 36(3): 98-102. (in Chinese)

[4] 曾德贤,吴子欢,朱仁刚. 云南省林业产业发展的良种问题及对策[J]. 林业调查规划,2010,35(5):57-61.
ZENG D X, WU Z H, ZHU R G. Problem of improved seeds and countermeasures of forest industry development in Yunnan [J]. Forest Inventory and Planning, 2010, 35(5): 57-61. (in Chinese)

[5] 黄海平,郑祥. 浅谈弥勒县直干桉栽培现状 & 发展对策[J]. 林业建设,2010(3):22-24.

[6] 张永桥,王自全,萧增新. 陆良县桉树经营方略初探[J]. 绿色科

技,2014(9):56-57.

[7] 王晓丽,杨再国,曹梦涵,等. 蓝桉及直干桉超级苗初步选择研究[J]. 西南林业大学学报,2018,38(4):89-93.
WANG X L,YANG Z G,CAO M H,*et al.* Preliminary selection of super seedlings of *Eucalyptus globules* and *Eucalyptus maidenii*[J]. Journal of Southwest Forestry University,2018,38(4):89-93. (in Chinese)

[8] 马常耕. 世界林木遗传改良研究水平与趋势[J]. 世界林业研究,1991(1):85-87.

[9] 任辉丽. 植物组培技术常见问题及其预防措施[J]. 南方农业,2015,9(36):20-21.

[10] 王纪忠,蒋婷婷,朱丽丽. 植物组培技术存在的问题及解决方法[J]. 现代农业科技,2012(20):166-167.

[11] 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.
XIE Y J. Advances in tissue culture of *Eucalyptus*[J]. World Forestry Research,2000,13(6):14-19. (in Chinese)

[12] 江海涛. 桉树组培快繁研究及其应用进展[J]. 现代建设,2012,11(7):64-67.

[13] ADAM S. Obtention de racines transformees chez Eucalyptus gunnii H par Agrobacterium rhizogenes[J]. Annales de Recherches Silvicoles, Association Foret-Cellulose,1987:7-21.

[14] ARYA H C,SHEKHAWAT N S. Clonal multiplication of tree species in the Thar desert through tissue culture[J]. Forest Ecol. Manag,1986,16:201-208.

[15] CATHLEEN M,RAJ D,ALEXANDER A M,*et al.* Development of Eucalyptus tissue culture conditions for improved in vitro plant health and transformability[J]. BMC Proceedings 2011,5(7):153.

[16] 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.
SHA Y E,WU ZHI H,OUYANG L J,*et al.* Tissue culture and regeneration of *Eucalyptus pellita*[J]. Journal of Southern Agriculture,2013,44(9):1511-1516. (in Chinese)

[17] 燕丽萍,夏阳,毛秀红,等. 邓恩桉的组织培养[J]. 林业科学,2011,47(5):157-161.
YAN L P,XIA Y,MAO X H,*et al.* Tissue culture of *Eucalyptus dunnii* [J]. Scientia Silvae Sinicae,2011,47(5):157-161. (in Chinese)

[18] 刘均利,刘海鹰,龙汉利,等. 柳桉组培快繁技术体系研究[J]. 四川林业科技,2016,37(4):74-78.
LIU J L,LIU H Y,LONG H L,*et al.* A study of tissue culture of *Eucalyptus saligna* [J]. Journal of Sichuan Forestry Science and Technology,2016,37(4):74-78. (in Chinese)

[19] 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.
LIU J L,GUO H Y,YANG X R,*et al.* Studies on tissue culture of *Eucalyptus citriodora* [J]. Eucalypt Science & Technology,2013,30(4):19-24. (in Chinese)

[20] 刘云彩,陈芳,吴丽圆,等. 直干桉组织培养[J]. 云南林业科技,1996(3):12-18.
LIU Y C,CHEN F,WU L Y,*et al.* Study on tissue culture of *Eucalyptus maidenii* [J]. Journal of Yunnan Forestry Science and Technology,1996(3):12-18. (in Chinese)

[21] 余小涵. 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.
SHE X H. Experimental studies on the seedling raising of tissue culture propagation of *Eucalyptus labill* [J]. Journal of Fujian Forestry Science and Technology,2002,29(3):26-29. (in Chinese)

[22] 谢志亮,吴振旺. 木本植物组培褐化研究进展[J]. 中国南方果树,2013,42(5):42-46.

[23] 张宏平,姬爱国,和林涛. 植物组培快繁褐化现象研究进展[J]. 农业工程,2013,3(5):128-132.
ZHANG H P,JI A G,HE L T. Research progress of browning phenomenon about plant tissue culture [J]. Agricultural Engineering,2013,3(5):128-132. (in Chinese)

[24] 雷亚灵,李周岐. 八仙花茎段组织培养技术研究[J]. 西北林学院学报,2008,23(4):101-103.
LEI Y L. A study on tissue culture for *Hydrangea Macrophylla* [J]. Journal of Northwest Forestry University,2008,23(4):101-103. (in Chinese)

[25] 唐豆豆,李厚华,张延龙,等. ‘凤丹’牡丹组织培养研究[J]. 西北林学院学报,2016,31(2):160-166.
TANG D D,LI H H,ZHANG Y L *et al.* Studies on tissue culture of *Paeonia ostii* ‘Feng Dan’ [J]. Journal of Northwest Forestry University,2016,31(2):160-166. (in Chinese)

[26] 覃林海,韦素婕,王芳,等. 不同培养基对红心杉组培苗增殖及其生理的影响[J]. 西北林学院学报,2017,32(3):122-127.
QIN L H,WEI S J,WANG F. Effects of different media on the seedlings growth and physiology in *Cunninghamia Lanceolata* [J]. Journal of Northwest Forestry University,2017,32(3):122-127. (in Chinese)