



研究报告

Research Report

尾巨桉愈伤组织诱导与再生体系的建立

孙长斌^{*1}, 郭棣¹, 张英兰²

1 普罗米绿色能源(深圳)有限公司, 深圳, 518000

2 中国科学院华南植物研究所, 广州, 510650

✉ 通讯作者: cbsunz@163.com; ✉ 作者

植物药与药理学杂志, 2012 年, 第 1 卷, 第 3 篇

收稿日期: 2012 年 06 月 06 日

接受日期: 2012 年 06 月 16 日

发表日期: 2012 年 06 月 27 日

本文首次发表在《基因组学与应用生物学》(2012 年第 31 卷第 6 期 592-596 页)上。现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License 对其进行授权, 再次发表与传播。只要对原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。建议最佳引用格式:

引用格式(中文):

孙长斌等, 2012, 尾巨桉愈伤组织诱导与再生体系的建立, 基因组学与应用生物学, 31(6): 592-596 ([10.3969/gab.031.000592](https://doi.org/10.3969/gab.031.000592))

引用格式(英文):

Sun et al., 2012, Callus Induction and *in vitro* Regeneration for *Eucalyptus urophylla* × *E. grandis* Elite Hybrid Line DH32-29, Genomics and Applied Biology, 31(6): 592-596 ([10.3969/gab.031.000592](https://doi.org/10.3969/gab.031.000592))

摘要 以尾巨桉(*Eucalyptus urophylla* × *E. Grandis*)白化苗茎段为外植体, 进行愈伤诱导和芽诱导获得不定芽, 建立了生产上广泛应用的桉树优良杂交品系 DH32-29 高效离体再生体系。户外采集桉树 2~3 年生尾巨桉 DH32-29 枝条进行无性系繁殖, 生根苗去除顶芽在无激素 MS+蔗糖 5 % 培养基上黑暗培养获得白化苗, 以此白化苗茎切段 3-6 mm 为外植体, 在 TDZ、CPPU、Zt 和 KT 分别与 NAA 组合诱导愈伤组织形成, 结果表明 TDZ 和 CPPU 的效果好, 愈伤诱导率达 100 %; 所得愈伤组织在含 0.5 mg · L⁻¹ BAA 和 0.1 mg · L⁻¹ NAA 芽诱导培养基上诱导不定芽的形成, CPPU 诱导的愈伤组织不定芽诱导率最高, 达 83.42 %; 诱导芽经过伸长和生根阶段形成再生植株, 生根率为 92.17 %。本体系所用材料为无性系无菌苗, 易得到大量均一的材料, 具有很高的再生率, 为利用现代分子育种技术对桉树的遗传改良奠定了良好的基础。

关键词 桉树, 愈伤诱导, 不定芽诱导, 杂交品系

Callus Induction and *in vitro* Regeneration for *Eucalyptus urophylla* × *E. grandis* Elite Hybrid Line DH32-29

Sun Changbin^{*1}, Guo Di¹, Zhang Yinglan²

1 Prometheus Greenery (Shenzhen) Limited, Shenzhen, 518000

2 South China Institute of Botany, Chinese Academy of Science, Guangzhou, 510560

✉ Corresponding author, cbsunz@163.com; ✉ Authors

Abstract Whitened internodal stems were used as explants to establish a high efficient regeneration protocol for *Eucalyptus urophylla* × *E. Grandis* elite hybrid line DH32-29 which are widely planted in China. Micro-propagation were established from a 2 to 3-year old DH32-29 and then rooted plant cut shoot apices were incubated on MS medium with 5 % sugar in dark to obtain whitened plantlet. Calli were induced from internodal stems derived from whitened plantlet stems with 3 to 6 mm length incubated on a B5 medium, supplemented with different kinds and concentrations of plant growth regulating substances, at highest frequency to 100%. After 21 days, the calli obtained were transferred to B5 medium including 0.5 mg L⁻¹ BAA and 0.1 mg L⁻¹ NAA obtained highest frequency to 83.42%. Shoot elongation was then stimulated on MS medium supplemented with BA, NAA for 20 to 30 days and 20 mm long shoots were cultivated on root induction medium for 25 days and rooted frequency up to 92.17%. The merit of this method is that abundant resource and genetic stability explants can be used to construct regeneration of eucalyptus at high frequency system that will be an efficient tool for introducing interesting genes into eucalyptus which is still considered recalcitrant.

Keywords *Eucalyptus*, Callus induction, Adventitious bud induction, Hybrid line

桉树是桃金娘科 (*Myrtaceae*) 桉属 (*Eucalyptus*) 植物的统称。广泛分布于亚洲、南美洲和欧洲的一些地区, 全球种植面积达二千万多公顷。桉树品种多, 包括杂交品种有 700 多种, 在这些品种当中有些品种具有重要的经济价值, 如可作为纸浆、木材、纤维板材以及提取单宁和精油等原材料(祁述雄, 主编, 2002, 中国林业出版社, pp. 434-464), 因此桉树具有广泛的开发利用价值, 且具有速生, 丰产, 适应性强以及生产周期短等优点, 目前已被多个国家和地区广泛种植。桉树人工造林面积已占世界人工造林面积的五分之一, 截至 2006 年, 全国桉树人工林面积已达到 170 万 hm², 居世界第三位, 仅次于巴西和印度(韦大器等, 2008; 范春节等, 2008)。由于传统育种的局限性, 一定程度上限制了桉树新品种的选育。进一步发展桉树抗虫、抗旱、抗冷等优良特征



的新品种, 尤其是对现有优良品系进一步的改造, 转基因技术是一种行之有效且高效的技术, 可弥补常规育种技术的不足, 加速优质、高抗桉树新品种的选育进程(范春节等, 2008; Flachowsky et al., 2009; Valério et al., 2003; Chang et al., 2011; Zhang et al., 2010)。然而, 转化体系依赖于高效稳定的再生体系, 具有高效稳定再生率的再生体系成为发展桉树转基因技术的一大难题。

目前桉树再生存在的问题: (1) 再生率较低, 难以进一步开展转化试验(王笑春等, 2006; 谭德冠等, 2005; 韦大器等, 2008; Lainé and David, 1994; Azmi et al., 1997); (2) 以种子为基础, 主要针对非杂物品系, 难以推广应用(Subbaiah and Minocha, 1990; Huang et al., 2010); (3) 对于杂物品系, 以种子为基础, 无法实现对现有优良品种的进一步的改良, 并且杂交种子之间遗传变异较大, 再生系统也存在较大差异(韦大器等, 2008; Barrueto Cid et al., 1999)。以上问题很大程度上制约了桉树转基因技术的进展。

对于我国广泛栽培的 DH32-29、广林 9 号等杂交优良无性系, 难以通过叶盘和茎段的愈伤组织获得再生或再生效率极低, 无法获得较多数量的独立转化植株从而筛选出外源基因表达良好的株系(范春节等, 2008)。在此, 我们以无性系无菌苗为材料来源, 首次建立了尾巨桉(*Eucalyptus urophylla* × *E. Grandis*) DH32-29 高效稳定的再生体系。

1 结果与分析

1.1 愈伤组织的诱导

为了诱导愈伤组织, 将白化苗茎切段 3-6mm 接种到 CIM1 至 CIM4 培养基上。在含 CIM 和 CIM2 的培养基中, 10 天后, 切口处陆续有愈伤组织长出, 从暗处到弱光下, 愈伤组织由黄白色逐渐变成淡绿色, 少部分为粉红色, 结构致密, 整体呈哑铃状, 外植体无褐化, 愈伤组织诱导率高, 均达到 100% (表 1)。而在 CIM3 和 CIM4 培养基中, 愈伤组织诱导相对较慢, 15 天左右伤口处有愈伤组织形成, 愈伤诱导率低, 分别为 75.74% 和 65.30% (表 1), 愈伤呈淡黄或淡绿色, 结构致密, 部分外植体褐化死亡, 且在 CIM4 培养基中易诱导根的形成。结果显示, TDZ 和 CPPU 易诱导茎段愈伤的形成, 且质地好, 而 Zt 和 KT 诱导愈伤缓慢, 容易引起外植体褐化, 并且 KT 易诱导根的形成, 一旦形成了根则很难进一步诱导芽的形成。

表 1 桉树离体茎段愈伤诱导

Table 1 Callus induction of *E. urophylla* × *E. Grandis* DH32-29

培养基 Medium	外植体数 NO. of Explant	愈伤组织数 NO. of Calli	愈伤诱导率 Percentage of Callus Induction (%)
CIM1	185	185	100.00 a
CIM2	199	199	100.00 a
CIM3	202	153	75.74 b
CIM4	219	143	65.30 c

注: 不同小写字母表示差异显著(P<0.05)

Note: Different small letters represent significant difference at 0.05 level

1.2 不定芽的诱导

在愈伤诱导培养基上培养 21 天的愈伤组织转接到含 0.5 mg L⁻¹ BA 和 0.1 mg L⁻¹ NAA 的 B5 培养基上进行不定芽的诱导, 不同激素组合诱导的愈伤组织影响不定芽的形成存在显著差异, CIM2 培养基诱导的愈伤组织不定芽诱导率最高, 达 83.42%, 而 CIM6 不定芽诱导率只有 0.91% (表 2)。

从形态来看, 10 天左右, 在 CIM1 和 CIM2 培养基中的愈伤组织开始起始器官发生, 有红色芽点从茎段两端愈伤处冒出, 而出芽高峰在 14-21 天。芽数多, 50 天平均芽数分别达 4.3 和 5.8 每个愈伤组织 (表 2)。在 CIM2 上诱导的愈伤组织诱导的不定芽叶子比较肥厚。在 CIM3 和 CIM4 培养基中的愈伤组织诱导的芽数较少, 且愈伤组织褐化严重。

1.3 不定芽伸长及生根培养

包含不定芽的愈伤转接到含 0.2 mg L⁻¹ BA 和 0.02 mg L⁻¹ 的 B5 培养基中进行芽伸长培养, 20 天左右陆续有不定芽伸长至 2 mm 以上。大于 2 mm 的芽, 切后转移到含 0.5 mg L⁻¹ IBA 的 1/2MS 培养基中进行生根诱导, 10 天后陆续有根发起, 25 天统计生根结果, 平均生根率达 92.17%。



表 2 桉树不同来源的愈伤组织在不定芽诱导中的效果

Table 2 Effect of shoot induction using different callus origin of *E. urophylla* × *E. Grandis* DH32-29

培养基	芽诱导率	出芽数 (每个愈伤组织)
Medium	Percentage of shoot induction (%)	Shoot number (callus ⁻¹)
CIM1	44.86 ± 6.23 a	4.3 ± 1.1 a
CIM2	83.42 ± 2.08 b	5.8 ± 1.0 b
CIM3	4.46 ± 1.11 c	1.3 ± 0.6 c
CIM4	0.91 ± 0.20 d	1.1 ± 0.4 c

注: 表中数值以平均值 ± 标准差表示, 不同小写字母表示差异显著 (P < 0.05)

Note: Data listed in the table were means ± SD. Different small letters represent significant difference at 0.05 level

2 讨论

我们建立的桉树再生体系主要包括: 快繁体系的建立、白化苗的制备、愈伤组织的诱导、不定芽的诱导、芽伸长和生根培养过程 (图 1 所示)。

目前, 国内外对桉树再生的研究, 主要以种子为基础 (Subbaiah and Minocha, 1990; Huang et al., 2010; 谭德冠等, 2005), 对于杂交品系来说, 种子之间存在较大差异, 不能保障遗传稳定性; 而对于已经广泛应用的桉树优良杂交品系, 更是无法通过种子苗作为外植体来建立其再生体系。本体系以 2-3 年生桉树的枝条, 建立快繁体系, 再利用无性系无菌苗制备白化苗, 保证了材料的供给、材料来源的均一性。生根苗在含 5% 蔗糖的 MS 无激素培养基中, 黑暗条件促生的白化腋芽茎段切段, 这种白化茎段很大程度上减少了外植体在愈伤诱导阶段的褐化, 尤其对于易褐化的桉树品种, 具有明显的改良效果。

桉树愈伤组织诱导激素的报道, 主要是关于不同浓度的 6-BA 和 IAA、IBA、NAA 激素组合对桉树外植体进行愈伤组织诱导及不定芽诱导的再生试验, 再生率低 (卜朝阳, 2004; 王笑春等, 2006; 谭德冠等, 2005; Mullins et al., 1997; Azmi et al., 1997)。本实验室也对这些激素组合作一系列实验, 表现出很低的再生率, 且重复性差, 外植体易褐化 (结果未列出)。本文用 TDZ、CPPU、KT 和 Zt 对桉树愈伤诱导的效果进行了试验, 结果表明 TDZ 和 CPPU 明显优于其他激素, 尤其以后者更佳, 再生率有明显提高。

本文以白化苗茎段为外植体, 通过愈伤组织诱导和芽诱导, 建立了桉树优良杂交品系尾巨桉 DH32-39 高效稳定的离体再生体系, 愈伤诱导率为 100%, 芽诱导率达 83.42%, 生根率为 92.17%。同时我们以此再生体系, 对广林 9 号等其他杂交优良品系的再生做了研究, 同样具有较高的再生频率。我们所建立的再生体系, 为后期转基因试验奠定了良好的基础。

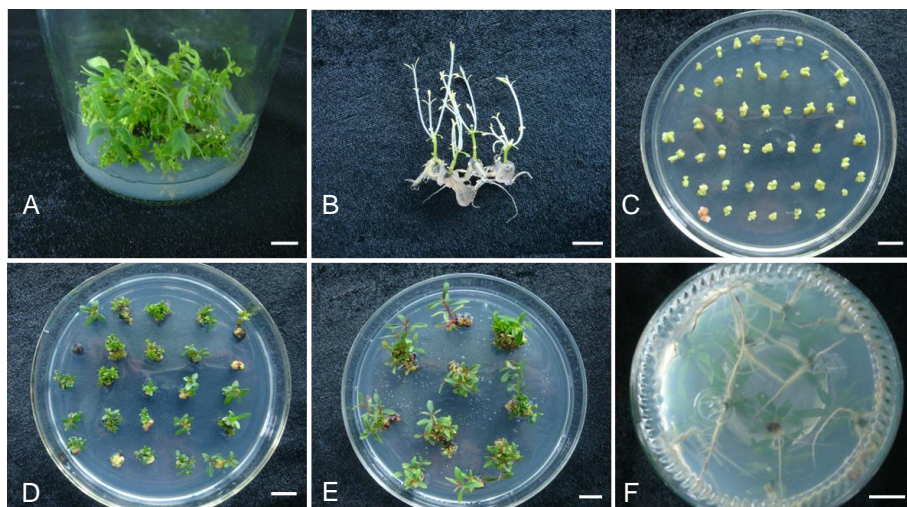


图 1 尾巨桉离体再生

注: A: 无菌快繁苗; B: 白化苗; C: 愈伤诱导; D: 不定芽诱导; E: 不定芽伸长; F: 再生苗生根

Figure 1 Regeneration for *E. urophylla* × *E. grandis* DH32-29

Note: A: Micor-propagation of *E. urophylla* × *E. grandis*; B: whitened plantlet obtained from rooted plant cutted shoot apices and



incubated on MS medium with 7 % sugar in dark; C: Calli Induced from stem explant cultured in CIM2 for 21 days; D: Shoot induced from CIM calli cultured in SD Medium for 40 days. E and F: shoot elongation and rooting. Bar = 1 cm.

3材料与方法

3.1 植物材料与处理

桉树品系为优良杂品系尾巨桉 DH32-29。从广东省河源桉树林场砍伐 2~3 年生桉树, 抽出的嫩枝条去除叶片经常规消毒, 具体为 75 %酒精中浸泡 20-30 秒, 无菌水冲洗 5 次, 0.1% HgCl₂ 溶液浸泡 5 分钟, 无菌水冲洗 5 次, 滤纸吸干。对经消毒的枝条进行切段, 每段 1-2 cm 带 1-2 个节, 插入 MS 培养基暗培养 10-13 天, 之后弱光下(光强 200lx)诱导腋芽的萌发。萌发芽经芽繁芽离体培养再生途径, 获得无菌生根苗。将生根苗切掉顶芽, 保留根和基部的若干个腋芽, 接种在含蔗糖 5% 的 MS 培养基上进行白化苗诱导培养, 暗培养 14-19 天, 温度(23 ± 2)°C。

3.2 培养基成分和培养条件

愈伤诱导和不定芽诱导所用基本培养基为含 3% (w/v)蔗糖和 0.6%(w/v)琼脂粉的 B5 培养基(pH5.6)。培养基配制后经 121 °C 高压灭菌 20 分钟后待用, 植物生长调节物质经滤头(含孔径 0.22μm 的滤膜)过滤灭菌后加入。

3.2.1 愈伤组织的诱导

取白化苗茎去除顶芽和潜伏芽, 切段 3-6 mm 作为外植体。接种到愈伤组织诱导培养基(CIM), 激素配比见表 3, 暗培养 7 天, 再转移到弱光照培养 14 天, 光照 16 时/天, 光照强度 200 lx, 培养温度(23 ± 2) °C。

表 3 桉树愈伤诱导培养基

Table 3 Medium for callus induction of *E. urophylla* × *E. Grandis* DH32-29

培养基名称 Medium	植物生长调节物质浓度 (mg L ⁻¹) Plant growth regulating substances (mg L ⁻¹)				
	NAA	TDZ	CPPU	Zt	KT
CIM1	0.02	0.6	/	/	/
CIM2	0.02	/	0.6	/	/
CIM3	0.02	/	/	0.6	/
CIM4	0.02	/	/	/	1.2

注: 基础培养基为含 3%(w/v)蔗糖和 0.6%(w/v)琼脂粉的 B5 培养基(PH5.6)

Note: The basal medium was composed of the ingredients of B5 medium containing 3% (w/v) sugar 和 0.6% (w/v) agar (pH 5.6)

3.2.2 不定芽的诱导

将获得的愈伤组织转接到含 0.5 mg L⁻¹ 6-BA 和 0.1 mg L⁻¹ NAA 的芽诱导培养基(SDM), 每隔 21 天继代培养, 光照 16 时/天, 光照强度 3000lx, 温度(23 ± 2) °C。

3.2.3 不定芽伸长及生根培养

诱导的不定芽转移到含 0.2 mg L⁻¹ BA 和 0.02 mg L⁻¹ NAA 的 B5 培养基中进行芽伸长培养, 每隔 21 天继代一次。不定芽中长度大于 2 mm 的芽经切割转接到含 IBA0.5 mg L⁻¹ 的 1/2MS 培养基中进行生根诱导培养。培养条件是光照 16 时/天, 光照强度 3000lx, 温度(23 ± 2) °C。

统计数据用 SPSS 软件分析, 以 Duncan 法评价差异的显著性, 显著性水平 α=0.05, 小写字母表示差异显著。

作者贡献

孙长斌在该研究中负责试验的安排和操作以及论文的撰写, 郭棣负责试验的安排和操作, 张英兰教授在试验方案的制定和修改工作中给予了悉心指导。

致谢

中国科学院华南植物研究所李耿光教授在本实验试验方法中给予了精心指导, 在此表示感谢。

参考文献



- Azmi A., Noin M., Landré P., Prouteau M., Boudet A. and Chriqui D., 1997, High frequency plant regeneration from *Eucalyptus globulus* Labill. hypocotyls: Ontogenesis and ploidy level of the regenerants, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 51(1): 9-16
- Barrueto Cid L.P., Machado A.C.M.G., Carvalheira S.B.R.C. and Brasileiro A.C.M., 1999, Plant regeneration from seedling explants of *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla*, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 56(1): 17-23
- Bu Z.Y., Studies on *Eucalyptus* regeneration systems, *Xinan Nongye Xuebao*(southwest china Journal of Agricultural Science), 17(4): 5000-503 (卜朝阳, 2004, 桉树再生系统的研究. 西南农业学报, 17(4): 500-503)
- Chang S., Connett M.B., Emerson S.J., Forster R.L., Gause K., Havukkala I., Higgins C. and Kodrzycki R., 2011, Cell signaling genes and related methods, United States Patent, US20110088126A1
- Fan C.J., Zeng B.S., Qiu Z.F., Wang X. and Bai J.Y., 2008, Progress on Genetic Transformation of *Eucalyptus* Progress on Genetic Transformation of *Eucalyptus*, *Zhejiang Linye Keji* (Journal of Zhejiang Forestry Science and Technology), 28(2): 65-72 (范春节, 曾炳山, 裘珍飞, 王旭, 白嘉雨, 2008, 桉树转基因研究进展. 浙江林业科技, 28(2):65-72)
- Flachowsky H., Hanke M.V., Peil A., Strauss S.H. and Fladung M., 2009, A review on transgenic approaches to accelerate breeding of woody plants, *Plant Breeding*, 128(3): 217-226
- Huang Z., Zeng F. and Lu X., 2010, Efficient regeneration of *Eucalyptus urophylla* from seedling-derived hypocotyls, *Biologia Plantarum*, 54(1), 131-134
- Lainé E. and David A., 1994, Regeneration of plants from leaf explants of micropropagated clonal *Eucalyptus grandis*, *Plant Cell Rep*, 13(8), 473-476
- Mullins K.V., Llewellyn D.J., Hartney V.J., Strauss S. and Dennis E.S., 1997, Regeneration and transformation of *Eucalyptus camaldulensis*. *Plant Cell Rep*, 16(11): 787-791
- Subbaiah M.M. and Minocha S.C., 1990, Shoot regeneration from stem and leaf callus of *Eucalyptus tereticornis*, *Plant Cell Rep*, 9(7): 370-373
- Tan D.G., Zhuang N.S. and Huang H.S., 2005, *Eucalyptus* 12ABL Callus Induction and Plantlet Regeneration Propagation System Construction, *Redai Zuowu Xuebao* (Chinese Journal of Tropical Crops), 26(3): 24-29 (谭德冠, 庄南生, 黄华孙, 2005. 刚果 12 号桉愈伤组织的诱导与再生植株快繁体系的构建. 热带作物学报, 26(3): 24-29)
- Wang X.C., Li F., and Jiang X.N., 2006, The establishment of tissue culture regeneration system of *Eucalyptus*, *Hebei Jianguokeji Xueyuan Xuebao* (Journal of Hebei Institute of Architectural Science and Technology), 23(2): 71-74 (王笑春, 李峰, 蒋湘宁, 2006, 桉树组织培养与再生系统建立研究. 河北建筑科技学院学报, 23(2): 71-74)
- Wei D.Q., Shi Q., Li X., Chen L.W., He G.Z. and Wu H.Y., 2008, Callus Induction and Plantlet Regeneration of *Eucalyptus urophylla* × *E. grandis* through Tissue Culture, *Anshu Keji* (Eucalypt Science and Technology), 25(1): 19-22 (韦大器, 时群, 李梅, 陈丽文, 何贵整, 吴红英, 2008, 尾巨桉愈伤组织诱导与植株再生研究. 桉树科技, 25 (1), 19-22)
- Valério L., Carter D., Rodrigues J.C., Tournier V., Gominho J., Marque C., Boudet A-M., Maunders M., Pereira H. and Teulières C., 2003, Down regulation of Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase, a lignification enzyme, in *Eucalyptus camaldulensis*, *Molecular Breeding*, 12(2): 157-167
- Zhang C., Winkler K.A., Miller S.A., Vales T., Foutz K., Zhao Y. and Wood M., 2010, Enhancement of cold tolerance in plant, United States Patent, US20100107473A1