

楸树优良无性系组织培养繁殖技术*

韩云花¹,于永明¹,王军辉²,马建伟¹,张宋智¹,李平英¹,魏秀琴¹

(1. 甘肃省小陇山林业科学研究所,甘肃 天水 741022;

2. 中国林业科学研究院林业所 国家林业局林木培育重点实验室,北京 100091)

摘要:以楸树(*Catalpa bungei* C. A. Mey.)1年生枝条水培萌芽为外植体,用10%的次氯酸钠液消毒6~7 min,通过组织培养试验,结果表明,楸树初代诱导与继代增殖以培养基 DKW+6-BA1.0 mg/L+IBA 0.2 mg/L+蔗糖 25 g/L+琼脂 4.5 g/L(pH 值=5.8)较为适宜,生根适宜培养基为 1/2MS+IBA 0.2 mg/L+NAA 0.01 mg/L+蔗糖 10 g/L+琼脂 5.0 g/L(pH 值 5.8),移栽适宜基质为泥炭土:珍珠岩(V/V)4:1。初代增殖系数为 4.78,继代增殖系数为 7.97,生根率可达 96.69%,移栽成活率为 99%。

关键词:楸树;组织培养;增殖系数

中图分类号:S723.132.6 文献标识号:A 文章编号:1671-4938(2015)07-0033-04

DOI:10.13456/j.cnki.lykt.2015.07.011

楸树(*Catalpa bungei* C. A. Mey.)为紫葳科梓树属高大乔木,原产我国,适应性强,木材纹理通直、质

地适中、结构紧密、干缩系数小,是珍贵优质用材及庭院观赏、道路绿化树种^[1],在我国丰富的树木资源中,惟其“材”貌双全,自古素有“木王”之美称。目前,国内外对楸树的生物学特性、开花结实习性、种质资源现状、良种选择、繁殖技术、造林技术等方面进行了较为系统的研究,取得了初步成果。由于楸树自花不孕、开花结实低、种子发芽率低、扦插生根困难,极大地影响了楸树良种的推广应用^[2-9]。楸树良种选育和

*国家科技支撑课题“珍贵用材树种新品种选育技术研究”(2012BAD01B05),天水市科技局科技支撑项目“珍贵用材树种灰楸优良无性系组培快繁技术研究”(2015)。

作者简介:韩云花(1974—),工程师,主要从事林木遗传育种与林木组织培养方面的研究。

通讯作者简介:于永明(1979—),工程师,主要从事林木遗传育种与林木组织培养方面的研究。

促发新枝,培养自然纺锤形树型,第三年加强夏季修剪,在培养树型的基础上,培养结果枝组,夏季修剪以刻伤、拉枝、摘心、剥为主,地下肥水管理和地上病虫害的防治技术,与优种山楂老树高位截干轮替更新技术相同。

3 结论

(1) 实施山楂大树渐变提干控冠复壮栽培技术3年后,优质果率达到92.41%,产量达3 114.40 k/667 m²,比对照(常规管理技术)增产191.53%,长枝比例达到13.42%,中枝比例达到22.49%,短枝比例达41.48%,叶丛枝比例22.61%,长中短果树比例适中,既有利于高产稳产,又有利于更新复壮。从树体改造费、修剪费、工时费、肥料费等投入费用合计均低于对照(常规管理技术)处理。说明此项技术更省力、更节约资金、更能增加经济效益。因此说山楂大树渐变提干控冠复壮栽培技术是一种优质丰产高效且省力的大树复壮栽培技术。

(2) 实施优种山楂老树高位截干轮替更新技术4

年后总枝量达256.45条,明显高于除不更新的(对照)枝条量。长枝占13.42%,中枝占22.49%,短枝占41.48%,叶丛枝占22.61%,长中短果树比例适合,座果率达78.46%,一等果率达90.24%,更新后第三年已经基本恢复未更新前的产量。更新后第四年产量达1 108.24 kg,因是高位轮替更新,每年都有产量,更新4年内各年度产量合计达到2 124.61 kg,树势中庸偏旺。适合树势相对较强的老树,树体既进行了更新又保持了较高的667 m²产量和经济效益。

(3) 实施地面平茬更新技术第4年枝条总量达178.52条,比新栽幼树枝条量增加14.29%,说明地面平茬更新技术比新栽幼树能更快形成树冠。地面平茬更新技术更新后4年产量达591.52 kg/667 m²,比同等条件下新栽幼树园增产24.94%。比较适合树种品种好,树体已衰弱,但能实现更新复壮的树势,直接平茬更新,能借助根系强大,快速恢复产量经济效益,且节省种苗费和栽植费。★

(栏目责任编辑 陶 绿)

种的优良特性倍受欢迎,但国内目前生产应用的楸树品种单一,在河南楸树主产区仍以金丝楸等为主品种,对新良种应用十分欠缺,主要是良种苗木不足且推广还未到位,处于以良种嫁接苗为主的应用现状。嫁接苗与根繁殖,繁殖系数低,特别是对选择出的优良无性系,繁殖材料少,难以形成规模化生产,限制了优良无性系苗木的生产应用。常规繁殖主要以嫁接为主,嫁接需要培育大量的砧木与接穗,培育砧木一般需要1~2 a,接穗需要当年生萌发条,耗材耗力且占地面大,成活率也一般在70%左右,两根一杆苗高平均在1.4~1.6 m之间,同时由于接穗生长量较大,接穗与砧木粘结口极易脱离,抗风性差,在生产中砧木基部产生大量萌发芽,需要不断摸芽除萌,增加了管理成本。楸树组培研究领域,国内研究报道较多,各研究配方与针对种源有所不同,普遍应用楸树嫩枝为外植体,有部分研究人员对楸树体细胞胚胎发生进行研究并取得一定的研究结论^[10]。为规范楸树组培技术并便于生产,系统的研究并建立楸树组培繁殖体系迫切需要,以期加快楸树优良种源的繁殖,推进优良无性系的应用与生产。

1 材料与方法

1.1 材料来源与培养

实验材料为珍贵阔叶树种种质创新课题组筛选的河南洛阳楸树优良无性系1-3。

外植体的培养及消毒处理:当年3月采取母树上1年生枝条,截成长度50 cm,置于温室中水培催芽,芽长约10 cm左右采取,冲洗干净,用10%的次氯酸钠液消毒6~7 min,无菌水漂洗4~5次,接入初代培养基中;增殖分化培养:将初代诱导成功的无菌茎段转接增殖分化培养基上。增殖培养茎段为带1个腋芽茎段;试管苗生根培养:将增殖分化芽转接于生根培养基,茎段长度为1.5 cm,确保插入培养基茎段部位没有腋芽,以免影响根系的诱导;培养温度22~26℃,光照2 000 lx,光照时间为14 h/d。

生根苗的移栽炼苗:基质为泥炭土:珍珠岩(V/V)4:1,基质应于炼苗前提前配好并装入营养钵,营养钵一般采用规格为8 cm×8 cm,配基质时适量加入多菌灵。炼苗:将生根瓶苗置于温室,适应环境7 d左右松开封瓶绳,隔天将瓶膜松开,10 d左右移栽,移栽后及时覆膜,遮荫,每天喷水3次。

1.2 数据统计

初代培养在7、15、30、45 d,增殖培养在15、30、45 d观测统计,统计指标:增殖芽数、芽长、叶数、接入茎段

愈伤组织横向及纵向膨大情况、叶色;生根培养30 d后观测统计,统计指标:接入茎段发根数、根长、发芽数、芽长、叶数;移栽苗统计成活率及观察幼苗长势情况。

2 结果与分析

2.1 不同基础培养基、6-BA、IBA对楸树诱导分化的影响

表1 不同基础培养基对楸树外植体诱导萌发的影响

培养基	楸树腋芽萌发及生长状况
M _s	叶片大,叶绿,茎段基部多有愈伤组织,诱导出的腋芽呈莲座状不见伸长
DKW	叶片大而绿,节间适中,新芽生长正常
WPM	叶片大而绿,节间适中,茎较细,有玻璃化芽
1/2MS	叶片大,叶绿,但萌芽少
B ₅	外植体萌芽时间最早,7 d左右就见腋芽开始萌动,芽生长快,节间长,叶细长,叶片小呈柳状
N ₆	外植体萌芽时间较早,但晚于B ₅ 培养基上芽的萌发,芽生长快,节间长,茎粗,叶细小呈柳状,第20 d统计时可见部分新芽的顶芽已经变褐枯死

表1表明,各基础培养基上楸树外植体都能萌发,但大多萌发芽生长不良,DKW萌发芽叶大且绿,节间适中,新芽生长正常,较为适宜楸树外植体的启动诱导培养。

表2可知,6-BA浓度对楸树诱导分化芽数与分化芽的生长影响基本保持一致,0.4~1.0 mg/L区间,诱导分化随6-BA浓度的增加而增大,1.0~1.5 mg/L分化芽的数量基本保持不变,分化芽的高度生长明显受到抑制;IBA对诱导分化的影响,浓度的增大对分化芽高度生长影响并不明显,0.1~0.2 mg/L对诱导分化芽的数量有促进作用,0.2~0.4 mg/L有明显的抑制;蔗糖浓度在25 g/L对诱导分化芽数有较好的促进作用,20~25 g/L对芽的高度生长有促进作用,25~30 g/L明显抑制。诱导分化的影响是培养基添加成分及培养环境综合作用的结果,结果表明,培养基DKW+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.2 mg/L+蔗糖 25 g/L+琼脂 4.5 g/L(pH值5.8)对楸树增殖诱导分化较为适宜。

2.2 初代、继代培养诱导分化动态变化及增殖系数

表3可知,楸树外植体初代培养芽的诱导分化主要在7~15 d期间,15 d后,芽的诱导分化基本停止;接入茎段愈伤组织膨大与芽的诱导分化同步,15 d后生长基本停止;芽长与叶数的增长是同步的,两个高峰期主要集中在7~15 d和30~45 d 2个阶段。从增殖系数来看,一个茎段经过45 d能诱导分化芽2.7

个,增殖芽长为 1.77 cm,叶数为 12.8 个,也就是说平均每 1 cm 长的茎段上有约 7.3 个叶,这说明茎段节间

距较短,叶片密集,腋芽较多,转接时茎段按 1 cm 计算,初代培养的增殖系数为 4.78。

表 2 不同浓度的 6-BA、IBA、蔗糖对楸树诱导分化的影响

	6-BA				IBA				蔗糖		
	0.4	0.70	1.00	1.5	0.10	0.20	0.30	0.40	20.00	25.00	30.00
浓度(mg/L)	0.4	0.70	1.00	1.5	0.10	0.20	0.30	0.40	20.00	25.00	30.00
诱导分化芽数/个	0.2	1.15	2.73	2.8	3.88	4.02	3.61	3.49	1.50	1.86	1.71
分化芽高度/cm	0.6	2.8	4.3	3.7	2.53	2.58	2.31	2.47	3.75	4.14	2.96

表 3 楸树初代、继代培养生长性状随培养时间的变化

指标	生长天数/d	增殖芽数/个	增殖芽芽长/cm	叶数/个	基部愈伤组织		叶色
					横向膨大/cm	纵向膨大/cm	
初代培养	7	2.6	0.15	0.5	0.11	0.11	浅绿
	15	2.7	0.4	6	0.58	1.26	绿
	30	2.7	0.72	8	0.81	1.371	绿
	45	2.7	1.77	12.8	0.79	1.37	绿
继代培养	15	2	0.5	4.4	0.37	0.23	绿
	30	2.7	1.66	7.4	0.66	0.54	绿
	45	2.7	2.95	10	1.06	0.8	绿

根据观测统计,楸树继代增殖培养 3 d 后愈伤组织开始膨大,芽开始分化,结合表 3,芽分化期集中在 3~30 d,3~15 d 大部分分化芽萌发,30 d 后芽分化基本停止;芽长快速增长在 15 d 后,45 d 后平均芽长可

达 2.95 cm;愈伤组织的分化与初代培养有所不同,膨大平缓但基本保持增长趋势。继代增殖系数为 7.97。

2.3 应用二次回归正交设计确定激素 IBA 与 NAA 在生根培养中的浓度

表 4 各指标 95%置信区间及用量范围

指标	IBA		用量范围(mg/L)	NAA		用量范围(mg/L)	预期目标
	95%置信区间	95%		95%置信区间	95%		
生根率/%	-1.313~-0.797		0.001~1.00	-0.704~-0.704		0.023~0.073	>95%
发根数				1.04~1.28		0.09~0.1	>4
根长/cm	-0.789~0.789		0.2~0.8	-1.28~-1.04		0.001~0.01	>7.9 cm
发芽数/个	-1.095~-0.411		0.08~0.344				>1 个
芽长/cm	-1.32~1.32		0~1.00				>1.0 cm
叶数/个	0.789~-0.789		0.2~0.8	-1.28~-1.04		0.001~0.01	>10 个
地上部鲜质量/mg	0.789~-0.789		0.2~0.8	-1.28~-1.04		0.001~0.01	>200 mg

表 4 为各指标回归方程置信区间及激素用量范围,由表可知,IBA 对楸树组培生根苗发根数无显著的影响,NAA 对生根苗发芽数与芽长无显著的影响;当 IBA 用量在 0.2~0.344 mg/L,各生长指标都处于最佳状态;NAA 在 0.001~0.01 mg/L 有利于根的伸长生长、叶数的增多与地上部鲜重的增加,0.023~0.073 mg/L 有利于生根率的提高,0.09~0.1 mg/L 有利于根数的增多。

根据表 4 各指标回归方程得出激素 IBA 用量的最佳范围为 0.2~0.344 mg/L;激素 NAA 得出 3 个

不同的区间,对楸树生根瓶苗的生长,与 IBA 配比使用,NAA 主要促使根系的发生与生长,促进瓶苗叶数的增多,对芽长的生长与发芽数无显著的作用。结合实践观测,生根培养适宜配方为 1/2MS+IBA 0.2 mg/L+NAA 0.01 mg/L+蔗糖 10 g/L+琼脂 5.0 g/L(pH 值 5.8),生根率在 96.69%以上。

2.4 生根培养性状观测

栽培布局已具规模,覆盖中国主要楸树产区。楸树良楸树茎段在接入生根培养基 3 d 后基部开始膨大发绿,并有淡绿色针点大小颗粒产生,7 d 后开始生根,

表5 楸树组织培养生根培养性状统计

指 标	发根数/个	生根率/%	根长/cm	发芽数/个	芽长/cm	叶数/个
均 值	3.3	96.69	2.24	1.1	0.80	5.8

发根部位主要为接入茎段剪切处针点颗粒上产生,生根后基部不再膨大。根系的诱导主要集中在 10 d 左右,单株大部分根系已经萌发;在 10~30 d 期间,未发根茎段根系的诱导基本停止,已发根单株进一步诱导根系的萌发,致使单株平均发根数仍在增多,与 0~10 d 期间相比,诱导率明显降低,而根系的伸长生长速度开始加大,大部分处理根系的生长主要集中在 10~30 d 期间,生长速度以 20~30 d 最快。

2.5 移栽炼苗

表 6 显示,移栽基质 $V_{\text{泥炭土}} : V_{\text{珍珠岩}} = 4 : 1$ 较为适宜。楸树组培苗叶大而嫩极易失水,在移栽过程中,一定要及时覆膜,一般应移栽与覆膜同步进行,覆膜后,膜内湿度大,幼苗极易感染茎腐病,每天喷多菌灵液对其有一定的防治,若幼苗感染,立即清理,以防感染周边幼苗。移栽期间最好选择傍晚或阴天,尽量避免阳光直射下操作;幼苗管理过程中,依天气情况喷水,晴天一般喷水 3 次/d,12:00—15:00 覆遮阳网,温度控制在 20~30 °C,10~15 d 后可揭膜,揭膜后 10~15 d 依天气情况中午继续覆遮阳网,随后可进行正常日常管理。为促进幼苗的生长,根据苗木的生长情况每周浇施一次尿素与磷肥混合液,浓度依苗木生长情况而定,苗高 10 cm 左右进入大田栽植,栽植成活率可达 99% 以上。

表 6 不同移栽基质楸树组培苗移栽成活率 /%

珍:泥(1:4)	珍珠岩	珍:泥(1:1)	泥炭土
73.44	72.02	55.714 29	40.408

3 结果与讨论

(1) 本研究体系的建立,是本课题研究组 3 年的研究努力,经过不同的材料、激素配比、基础培养基配方、温度等一系列研究总结出来的结果。在研究观测过程中,楸树外植体初代培养以茎尖为外植体材料诱导分化率极低,培养初期芽长及叶片正常生长,于 20 d 后,开始出现叶片脱落,整个茎段膨大形成愈伤组织,40 d 后出现干枯死亡;以带腋芽茎段为外植体,培养效果良好,这说明材料部位的不同,直接影响着初代培养的是否成功。大部分林木在进行组织培养过程中材料褐化较为严重,而在楸树培养上,并未发生褐化现象;在愈伤组织分化方面,楸树茎段基部培养 3 d 后愈伤组织开始膨大,大部分无性系 20 d 后膨大停止,愈伤组织表面并未发生芽的分化现象。此期间,愈伤组织为淡绿色,上附白色颗粒,膨大停止后,逐渐

失绿,为水渍状随之开始褐化干枯,随着愈伤组织的干枯,瓶苗的生长速度也逐渐减慢,这说明楸树愈伤组织的形成,虽未有分化芽的产生,却为茎段上面的分化芽提高了营养吸收面积,当愈伤组织干枯后,阻碍营养的吸收,分化芽生长速度减慢,因此,在繁殖过程中,当愈伤组织开始干枯,应立即转接瓶苗。经研究观测,本课题组认为 40 d 是楸树瓶苗的最佳转接时期;转接过程中茎段的长短依材料的不同长度有异,根据实践研究与观测,楸树在增殖繁殖期间,接入茎段 1 cm 最为适宜,茎段长于 1 cm 并没有提高芽的分化率,而短于 1 cm 操作不便且插入培养基太浅茎段不够稳固,太深整个茎段会出现愈伤组织膨大影响芽的分化与诱导。

(2) 生根培养材料以带一个腋芽茎段最为适宜,但在楸树繁殖过程中,发现大多无性系茎段节间距较短,茎段长度选择 1.5 cm 可以避免插入培养基部位有腋芽,导致腋芽萌发营养生长旺盛而抑制茎段发根。

参考文献:

- [1] 潘庆凯,康平生,郭明. 楸树[M]. 北京:中国林业出版社,1991.
- [2] 王新建,张秋娟,祝亚军,等. 楸树新品种及速生丰产技术研究的现状与展望[J]. 河南林业科技,2004,24(1):30-31.
- [3] 王改萍,杨燕,祁丽,等. 楸树的初代培养研究[J]. 江苏林业科技,2007,34(06):7-11.
- [4] 韩创举,杨培华,樊军锋,等. 楸树组培技术研究[J]. 西北林学院学报,2006,21(01):80-81.
- [5] 杨玉珍,王顺财,彭方仁. 我国楸树研究现状及开发利用策略[J]. 林业科技开发,2006,20(03):4-7.
- [6] 孟永红,李燕玲,杜克九. 楸树植株再生体系的建立[J]. 河北林果研究,2004,19(2):101-104.
- [7] 费鹏飞,傅玉兰. 楸树组培中材料灭菌的研究[J]. 安徽农学通报,2007,13(08):57-58.
- [8] 于永明,王军辉,马建伟,等. $LaCl_3$ 对楸树无性系试管苗生长的影响[J]. 东北林业大学学报,2011,39(01):31-33.
- [9] 于永明,王军辉,张宋智,等. 二次回归正交设计在楸树离体生根培养中的应用[J]. 南京林业大学学报(自然科学版),2011,35(4):47-50.
- [10] 江荣翠,彭方仁,谭鹏鹏,等. 楸树体细胞胚胎发生的研究[J]. 《南京林业大学学报(自然科学版)》,2013,34(2):15-18.
- [11] DB62/T 2013—2011,楸树无性系组培快繁技术规程[S]. 甘肃省质量技术监督局. ★