

上的一致有待研究;此外,项目试验点单位对香椿种源试验林造林后管理较为粗放,可能一定程度上影响各种源香椿生长潜力的发挥与比较,尤其是作为香椿用材林选优需要对其后期的材性进行比较,因此,确定的结论需对其继续调查与测定。

参考文献

- [1]彭方仁,梁有旺.香椿的生物学特性及开发利用前景[J].林业科技开发,2005,19(3):3-6.
- [2]焦其宏,王月海.香椿速生丰产用材林栽培前景浅议[J].山东林业科技,2000(1):3-6.
- [3]谈秀春,王新洋.香椿用材林早期生长规律研究初报[J].现代农业科技,2005(10):11.
- [4]范振富.香椿速生丰产用材林栽培技术试验[J].林业科技开发,2004,18(5):61-63.
- [5]林细平.香椿山地栽培试验[J].湖南林业科技,2004,31(5):41-42.
- [6]梁有旺,彭方仁,陈德平.不同种源香椿苗期生长差异比较[J].林业科技开发,2007,21(2):38-41.

(责任编辑 周贤军)

柳杉试管快繁技术的研究

张翠萍, 方伟, 桂仁意, 林新春, 黄丽春*

(浙江林学院 浙江省现代森林培育重点实验室, 浙江 临安 311300)

摘 要:柳杉不仅是重要的高山速生树种,而且是一种优良的绿化和环保树种,是我国珍贵用材树种之一。以柳杉为材料,研究其组织培养快繁技术。结果表明:以柳杉种胚为外植体,在MS培养基中就可以得到很好的生长。侧芽的增殖能力要高于顶芽。柳杉侧芽茎尖培养在MS+ZT 0.3 mg/L培养基中,腋芽增殖系数最高达5.3,在MS+0.3 mg/L BA进行增殖培养,侧芽增殖系数达4.3。生根培养采用两阶段发根(先用IBA处理10 d,再转入1/3MS大量元素),发根率达80%,平均根数为5.25,平均根长为5.16 cm。试管苗经过驯化移栽成活率达85%以上。

关键词:柳杉;组织培养;增殖

Studies on Mass Propagation in Vitro of *Cryptomeria fortunei* Hooibrenk ex Otto et Dietr by Tissue Culture//ZHANG Cui-ping, FANG Wei, GUI Ren-yi, LIN Xin-chun, HUANG Li-Chun

Abstract: *Cryptomeria fortunei* Hooibrenk ex Otto et Dietr is not only an important fast-growing and precious species in forestry but also an evergreen and ecological conservative species in China. The techniques for micropropagation of *Cryptomeria fortunei* Hooibrenk were studied by tissue culture in this paper. The results indicated that the lateral shoot proliferation rate was up to 5.3 in MS+0.3 mg/L ZT medium for mass propagation and obviously higher than that in MS+0.3 mg/L BA medium (4.3). The rooting rate of shoots was reached to 80% by two-step rooting method (first treated with 100 mg/L IBA for 10 days, and then transferred into the 1/3 MS medium). The average number of roots was 5.25 and the average length of roots was 5.16 cm. After acclimatization the survival rate of transplanted potted plants could be more than 85% with vigorous growing in green house.

Key words: *Cryptomeria fortunei*; Tissue culture; Proliferation

Author's address: Zhejiang Provincial Key for Modern Silvicultural Technology (Zhejiang Forestry University), 311300 Hangzhou, Lin'an, China

西天目山素有“大树华盖闻九州”之美称,而大树中数量最多,也最负盛名的就是柳杉了^[1]。柳杉(*Cryptomeria fortunei*)为杉科柳杉属(*Cryptomeria* D. Don),别名孔雀杉,是我国特有的用材树种。在我国除天目山以外,柳杉还分布于浙江、江西,现长江以南大

多数省区均有栽培^[2]。在西天目山,胸径2 m以上的大柳杉有19株,1 m以上的有1 300株。其中最大的柳杉胸径2.23 m,材积71 m³。如此大的柳杉群落在国内少有,在世界上也属罕见^[1]。但由于受经济利益的驱使,近年来柳杉资源遭受严重破坏,再加上酸雨、大气污染的危害和病虫害侵害,目前大径柳杉已屈指可数^[2]。

目前柳杉以种子繁育为主,扦插也可以,但技术落后,往往发芽率、合格苗率低。对其繁殖的研究也主要是对其实生苗的繁育技术的研究,周应书等对柳杉营养袋两段育苗及基质配方优化技术进行了研

收稿日期:2008-09-04

修回日期:2008-09-22

基金项目:浙江省科技厅重点项目“古树名木复壮技术研究”(编号:2005C22067)。

第一作者简介:张翠萍,女,硕士生,研究方向为植物组织培养。通讯作者:黄丽春,教授,博士。E-mail:bolch@gate.sinica.edu.tw

究^[3];刘正忠对柳杉实生苗繁育技术进行了研究;蔡燕康对柳杉做了扦插育苗试验^[4];陈怀秋还对柳杉种子园营建及管理技术进行了研究^[5]。到目前为止对柳杉的组培快繁技术的研究还未见有报道,而对同一属的日本柳杉(*Cryptomeria japonica* D. Don)早在20世纪就已经建立了成熟的体系,并且2003年,T Igasaki成功诱导日本柳杉体胚产生^[6,7]。因此,开展运用生物技术的方法进行人工造林,扩大柳杉种植面积,保护现有的柳杉资源具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为采自天目山柳杉种子,组织培养所用药品均为Sigma Aldrich产品。

1.2 试验方法

1.2.1 无菌培养体系建立

选取粒大饱满的种子,自来水冲洗12 h后用蒸馏水冲洗1遍,置于0.5% NaClO溶液(内含少量吐温-20,每50 mL加1滴)中真空灭菌10 min,然后用无菌水冲洗5~6遍。

在显微镜下,取出种胚,接入MS培养基中,不添加任何激素。先暗培养2 d,然后置于光周期为16 h/8 h,光强为2 800 lx,培养温度为 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 的培养室中。培养28 d后,调查并统计外植体初代培养的污染率、萌芽率。

1.2.2 不同部位的材料及激素对增殖培养的影响

选取长度为2 cm左右,长势和形态相似的无菌苗作为实验材料。分别截取1 cm顶芽茎尖、顶芽茎段、侧芽茎尖、侧芽茎段接种于增殖培养基促使增殖。增殖培养基以MS为基本培养基,以不同浓度的Thidiazuron(TDZ)、BA、2iP和Zeatin(ZT)为外源激素。每个处理接种20管,30 d和60 d后调查结果。

1.2.3 生根培养

选取长度为2 cm左右,长势和形态相似的无菌苗作为实验材料。分别截取1.5 cm茎尖,接种到生根培养基诱导生根。试验1以1/3MS为基本培养基,试验不同浓度的NAA、IBA、IAA对柳杉生根的影响。试验2采用两阶段发根,第1阶段用100 mg/kg的IBA处理不同天数(0、3、7、10、14 d)后;第2阶段转入无IBA的MS培养基;试验3从试验2中选取适合诱导发根的天数,然后分别接种到MS和1/3MS进行对比。每个处理接种20管,40 d后调查结果。

以上各试验的培养条件为光周期16 h/8 h,光强2 500~2 800 lx,培养温度为 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 。

1.2.4 移栽驯化

将生根的试管苗置入驯化室中,在强光(20 000 lx)下炼苗14~28 d,然后取出试管苗,冲净根部培养基,进行单株套袋移植。移植后每2 d将塑料袋剪口1次,7~14 d后完全脱袋,定期浇水,1个月后可移栽到温室。移栽基质为蛭石:珍珠岩:泥炭=1:1:1的混合基质。

1.3 数据统计分析

以上每个试验设计3个重复,各试验的结果分析均采用生物统计法将平均值及其标准误差^[8]和95%的可信度进行差异显著性分析^[9]。

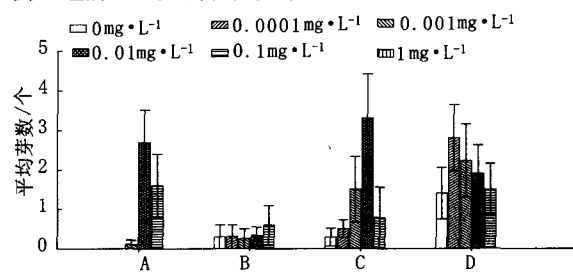
2 结果与分析

2.1 外植体的消毒和初代培养

在组织培养生产中关键是控制污染,污染率的高低直接影响快繁技术能否应用于实践。在初代培养28 d后调查得知,0.5%的NaClO处理10 min真空灭菌污染率达到5%。接种于MS培养基上的种胚7 d后即可变绿萌发,继续培养逐渐生长成为小芽。28 d后仍用MS继代培养,材料生长正常,叶片为深绿色。

2.2 不同部位的材料及激素对增殖的影响

由图1~4可以看出,柳杉顶芽没有明显增殖现象;侧芽茎段和茎尖比较差异不显著;自所有处理观察柳杉侧芽的茎段增殖效果较好,增殖系数可以达到4以上,但是在培养过程中褐化较严重,而且生长缓慢,芽长0.2~0.3 cm,不适合做增殖材料;侧芽茎尖增殖系数最高达5.3,芽长0.5~1 cm,有轻微褐化但长势旺盛,因此适合做快繁材料。



注:A 顶芽茎尖, B 顶芽茎段, C 侧芽茎尖, D 侧芽茎段
(没有显示的处理表示芽数为0),下同。

图1 TDZ不同浓度对柳杉快繁的影响

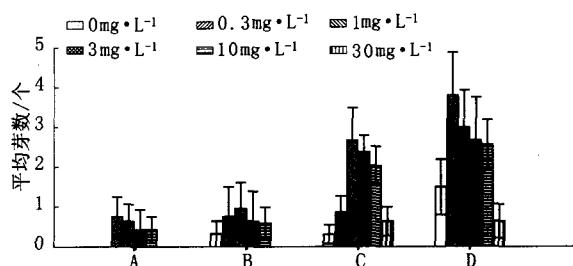


图2 2iP不同浓度对柳杉快繁的影响

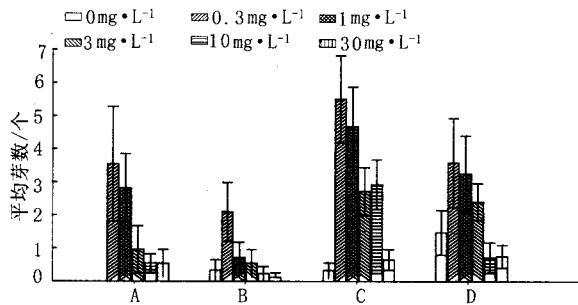


图3 ZT不同浓度对柳杉快繁的影响

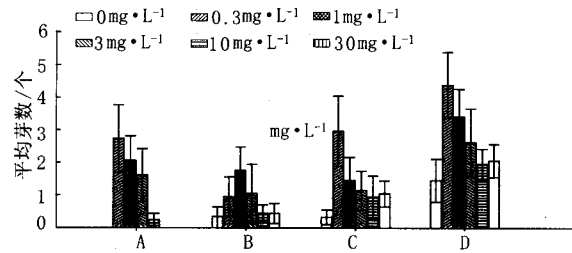


图4 BA不同浓度对柳杉快繁的影响

不同激素对柳杉芽增殖影响的结果见图1~4,从图1~4可看出,不同处理间的增殖倍数相差不大,ZT的添加对植株侧芽诱导影响最为明显,增殖系数最高可达5.3,TDZ、BA、2iP的添加都可以诱导侧芽的萌发,各种激素之间差异不显著,BA 0.3 mg/L、ZT 0.3 mg/L都可使其增殖倍数达4倍以上,适合工厂化育苗的需要。

2.3 最佳生根培养基筛选

2.3.1 不同激素对生根诱导的影响

将生长健壮的1.5 cm长的无菌苗单株切下,接种到生根培养基上进行培养。由图5可以看出,培养基中激素种类与浓度的变化对柳杉根诱导有很大的影响。对植株添加不同的生长素,对根的诱导存在差异显著;在未附加生长素的培养基中幼苗生根率为0,而在附加适量生长素的培养基中幼苗生根率较高,适量的生长素能促进根诱导。IBA 10 mg/L的根诱导率较IBA 1 mg/L低,即生长素浓度过高,根的生长会受到抑制,生长素浓度过低也不利于根的形成和生长。

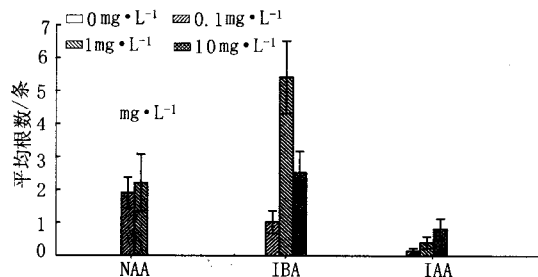


图5 不同激素对柳杉生根的影响

试验结果在1/3MS+IBA 1 mg/L培养基的生根

效果最好,15 d左右可见茎段基部有根生成,30 d后可生根2~5条,生根率70%,且根系发达,但植株发黄,生长势弱。在该生根培养基中进行诱导生根后,移栽成活率低,仅40%。

2.3.2 IBA处理不同天数对生根诱导的影响

用100 mg/kg的IBA对材料处理不同的天数对发根有不同的影响(表1、图6)。

表1 IBA处理不同天数对生根诱导的影响

IBA处理天数/d	发根率/%	95%可信度
0	0	0~16.84(b)
3	38.9	17.3~64.25(ab)
7	60.0	36.05~80.88(a)
10	78.9	54.43~93.95(a)
14	55.6	30.76~78.47(ab)

由表1、图6可以看出没有用IBA处理的植株没有根产生;随100 mg/kg IBA处理天数的增加发根率上升,但是处理14 d比处理10 d的发根率低,由此可知IBA处理天数过多根的生长会受到抑制。结果表明100 mg/kg IBA处理10 d最有利于发根,发根率达78.9%,根系发达而且健壮,有利于移栽成活。



注:从左到右依次为0、3、7、10、14 d

图6 100 mg/kg IBA对材料进行不同天数的处理

2.3.3 不同基本培养基对生根诱导的影响

100 mg/kg IBA处理10 d后分别转入MS和1/3MS大量元素,差异不显著,一般转入1/3MS后较利于生根,发根率80%,平均根数为5.25,根系粗壮,有利于移栽成活。

试验结果表明,采用两阶段发根(100 mg/kg IBA处理10 d;后转入1/3MS大量元素)培养基最有利于柳杉根的诱导。

2.4 驯化移栽对柳杉组培苗移栽成活率的影响

将诱导生根的柳杉组培苗经过14~28 d驯化后,移植到蛭石:珍珠岩:泥炭=1:1:1的混合基质,组培苗成活率达85%。试验结果表明,该驯化移栽途

径适合柳杉组培苗的大量移植(图7)。



图7 试管苗驯化移栽后成活的小苗

3 结论与讨论

(1)通过对柳杉进行组织培养及快繁技术研究,可以得出采用 NaClO 浸泡的同时真空泵抽虑灭菌,可大大降低污染率,不到5%,保证无菌材料的获得。同时,用 NaClO 溶液替代升汞等灭菌剂,在降低成本的同时也可以减少对环境的污染。

(2)在继代培养过程中,严格筛选出生长迅速健壮的材料用于继代,并且分别标记材料的无性系、顶芽和侧芽,为各试验准备材料;从而最大限度保持材料的一致和准确。

(3)MS 培养基无机盐和离子浓度较高,为较稳定的离子平衡溶液。其养分的数量和比例较合适,可满足植物细胞的营养和生理需要。它的硝酸盐(钾、铵)的含量较其他培养基为高,广泛用于植物器官的培养,效果良好。接种于 MS 培养基上的种胚7d后就可出现萌动现象,用做继代培养仍然可以正常生长,试验证明 MS 培养基可以为柳杉提供足够的营养物质。在增殖培养中添加 2iP 和 ZT 都可以使柳杉快速增殖,但是考虑到成本问题,BA 更适用于应用到生产上。BA 浓度的提高有利于芽的增值,但同时也会促进玻璃化的产生,所以在增殖继代培养中要特别注意 BA 用量的控制。本试验明确了柳杉的最佳生根培养基为两阶段发根,改变了传统上的发根培养,为以后的培养提供了新的方法。

(4)在驯化移栽过程中,选择粗壮、活力旺盛、不定根呈白色发育良好的试管苗,有利于移栽成活。由于组培苗是从试管无菌、高湿的环境转入外界生长,并且组培苗保护组织不发达,不能适应外界环境变化,因此在移栽前经过短期炼苗,有利于移栽成活率的提高。

(5)大量研究表明,基本培养基的成分以及使用

浓度对林木树种的分化起关键作用,选择合适的基本培养基对材料的增殖极为重要。欧阳磊等提出同一无性系在不同的基本培养基和不同激素浓度组合条件下,其继代增殖倍率存在较大的差异^[10];黄碧华在对速生杉木进行组培块繁技术研究时得出不同培养基比 BA 对芽增殖影响更大^[11]。本试验在增殖试验中只采用了 MS 为基本培养基,对外源激素的添加只采用了单因素设计,至于其他基本培养基和组合激素的培养,还有待进一步的研究。

参考文献

- [1]朱曦. 西天目山柳杉的忧患[J]. 大自然,1999(5):38-39.
- [2]阮兴盛. 柳杉的生态特性及栽培技术[J]. 林业勘察设计,2004(1):12-13.
- [3]周应书,罗林,谢永贵,等. 柳杉营养袋两段育苗及基质配方优化技术[J]. 林业科技开发,2005,19(3):49-51.
- [4]刘正忠. 柳杉实生苗繁育技术研究[J]. 武夷科学,2004,20:209-212.
- [5]蔡燕康,陈观岩. 柳杉扦插育苗试验[J]. 福建林业科技,2003,30(4):81-83.
- [6]Becwar M R, Wann S R, Johnson M A, et al. Development and characterization of in vitro embryogenic systems in conifers[M]// Ahuja M R. Somatic cell genetics of woody plants. Kluwer, Dordrecht,1988:1-18.
- [7]Igasaki T, Sato T, Akashi N, et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of *Cryptomeria japonica* D. Don[J]. Plant Cell,2003,22:239-24.
- [8]Colquhoun D, Lectures on Biostatistics[M]. Clarendon Press Oxford, 1971.
- [9]Snedecor G W. Statistical Methods, Fourth edition[M]. Iowa State College Press, Ames, Iowa,1946.
- [10]欧阳磊,郑仁华,翁玉榛,等. 杉木优良无性系组培快繁技术体系的建立[J]. 南京林业大学学报:自然科学版,2007,31(3):47-51.
- [11]黄碧华. 速生优良杉木组培快繁技术试验[J]. 福建林业科技,2007,34(2):133-136.

(责任编辑 吴祝华)

