

文章编号: 1001-3776(2008)03-0056-03

香榧腋芽组培及嫩枝嫁接技术研究

金航标¹, 戴文圣^{1*}, 吴慧敏¹, 郭伯夏²

(1. 浙江林学院 浙江省现代森林培育技术重点实验室, 浙江 临安 311300

2. 浙江省临海市东塍镇林特站, 浙江 临海 311300)

摘要: 以香榧优株茎段为外植体, 进行腋芽诱导, 结果表明, 在 $B_5 + BA0.1\text{mg/L} + NAA0.5\text{mg/L} + IBA1.0\text{mg/L}$ 的培养基中腋芽诱导效果最好, 诱导率可达 70%; 腋芽继代培养较适培养基为 $MS + BA1.0\text{mg/L} + NAA0.1\text{mg/L}$, 继代培养 20 d 可长成 4 cm 左右的健壮无根苗。采用腹接法将组培得到的无根苗嫁接于当年播种的实生砧木上, 腹接法 60 d 愈合率可达 80% 以上。

关键词: 香榧; 组培; 嫩枝; 嫁接

中图分类号: S664.5

文献标识码: B

Study on Tissue Culture for Axillary Bud and Softwood Grafting Technique of *Torreya grandis* cv. *Merrillii*JIN Hang-biao¹, DAI Wen-sheng¹, WU Hui-min¹, GUO Bo-Xia²

(1. Zhejiang Forestry University Key Laboratory for Modern Silvicultural Technology of Zhejiang Province, Lin'an 311300, China

2. Linhai Dongcheng Forestry Specialty Station of Zhejiang, Linhai 311300, China)

Abstract: Tissue culture of stem from strong *Torreya grandis* cv. *Merrillii* tree as explants was completed for induction of axillary bud. The highest induction rate (70%) was obtained on B_5 culture medium supplemented with $BA0.1\text{mg/L} + NAA0.5\text{mg/L} + IBA1.0\text{mg/L}$. And the appropriate medium for subculture was the MS supplemented with $BA1.0\text{mg/L} + NAA0.1\text{mg/L}$. 20 days later, it could be cultured as healthy seedless seedling of about 4cm long. Then the seedling would be belly grafted to current seedling. 60 days later, the recover rate could be topped to more than 80%.

Key words: *Torreya grandis* cv. *Merrillii*; tissue culture; softwood; grafting

香榧 (*Torreya grandis* cv. *Merrillii*) 系裸子植物红豆杉科 (Taxaceae) 榧属 (*Torreya*) 常绿乔木, 为我国特有的珍贵干果树种, 其种子风味香脆, 营养丰富, 具有消食、美容、健胃、强筋骨和预防心脑血管疾病等保健作用^[1]。香榧在我国已有 1300 a 以上的栽培历史, 现有繁殖方法成苗困难, 成活率低, 使得香榧的产量和面积一直徘徊不前, 香榧良种壮苗奇缺是无法实现大规模发展的根本原因。目前, 对香榧的研究领域主要集中于栽培选育^[2]、生长习性^[3]及造林^[4]等方面, 近年来开始细胞及分子水平^[5]的研究。由于香榧自身生理特性的限制, 国内外通过组织培养技术来实现香榧良种壮苗及快速繁殖的报道比较少。近两年有关于香榧体细胞胚发生^[6]及香榧器官离体培养再生植株^[7]的报道, 但香榧腋芽及丛生芽生根诱导困难, 诱导过程中褐化严重, 不能达到较高的生根率, 从而使得再生植株的比例非常有限, 利用器官发生途径达到香榧快繁的目的还需更进一步的研究。自然条件下嫁接繁育是当前香榧育苗的主要手段, 但接穗必须是材料较少的顶枝, 接穗的选取严重影响母株产量。本试验采用组织培养方法利用香榧优株茎段进行腋芽诱导, 快速培育接穗嫁接于当年生实生砧木上, 避免在香榧成年树上采穗条, 减少因采穗对香榧产量和树木生长的影响, 为香榧育苗过程中摆脱传统嫁接繁育技术在时间、空间上的限制, 降低劳动强度, 提高接穗利用率, 进一步减少香榧育苗成本及快繁技术的研究打下基础。

收稿日期: 2008-01-02; 修回日期: 2008-03-10

基金项目: 浙江省科技厅重点项目 (2006C22086)

作者简介: 金航标 (1983-), 男, 浙江浦江人, 硕士生, 从事经济林栽培及良种选育研究; *通讯作者。

1 材料与方 法

1.1 腋芽组织培养

外植体采自浙江林学院温室大棚香榧优株当年生茎段。幼嫩茎段经流水冲洗 5 h 以上, 在超净工作台上用 75%酒精消毒 30 s 后用无菌水冲洗一遍, 再用 0.1%升汞消毒 15 min, 无菌水冲洗干净。将外植体切成 1.5 cm 左右的长度, 每段带有 4~5 个叶腋, 保留叶片, 带顶芽及不带顶芽的茎段分开接种于诱导培养基。

初代培养以 B₅ 作为基本培养基, 分别加入不同质量浓度的 6-苄基腺嘌呤 (BA)、萘乙酸 (NAA)、吲哚丁酸 (IBA) 等植物激素诱导腋芽萌发及顶芽生长。剪下初代培养形成的腋芽在 MS 基本培养基上添加不同质量浓度的激素进行增殖培养。实验前培养基在 121℃ 高压灭菌锅内灭菌 20 min, 灭菌前 pH 值调到 5.8。B₅ 培养基蔗糖用量为 20 g/l, MS 培养基蔗糖用量为 30 g/l, 各培养基均加入 1 g/l 的活性炭以防褐化。培养室温度控制在 (25±2)℃, 光照强度 1 700~2 000lx, 每日光照 12 h。

1.2 砧木培育及嫁接方法

利用双层拱棚催芽技术对木榧种子进行催芽, 待胚芽刚刚出壳时常温播种于按 1:1:1 配制的泥炭、蛭石、珍珠岩混合而成的基质中, 并加施较低浓度的复合肥溶液。3 个月后挑选地上长度为 6 cm 左右的小苗作为嫁接砧木。嫁接前 3 d 对砧木浇透水。

嫁接采用砧木去头的劈接法及砧木不去头的腹接法, 接穗来自组培室培养的长度在 4 cm 左右的无根苗。用无菌水洗净接穗基部培养基, 用消毒过的锋利刀片将接穗削成楔形嫁接于粗度相近的实生砧木上, 整个嫁接过程在室内操作。嫁接完成后立即用消毒好的锡箔纸包扎切口, 并喷洒质量浓度为 0.1%的多菌灵溶液, 放于密闭塑料箱中保湿并遮光, 塑料箱放置于温度保持在 (25±2)℃ 的培养室中。

2 结果与分析

2.1 不同激素处理对腋芽诱导的影响

把香榧带叶茎段接种于不同质量浓度激素的 B₅ 培养基上进行腋芽诱导, 2 周后叶腋处休眠芽开始萌动, 培育 40 d 腋芽诱导速度逐渐减慢, 60 d 后诱导的腋芽数量基本稳定, 统计不同激素处理对腋芽诱导的影响, 结果如表 1。

从表 1 可看到, 外植体接种到同时添加 BA 与 NAA 的 B₅ 培养基时, 以 B₅+BA0.5mg/l+NAA1.0 mg/l 的浓度组合诱导效果最好, 诱导率可达 56.67%。实验中发现, 随着 BA 浓度升高外植体褐化逐渐严重, 当浓度在 2.0 mg/l 时,

外植体在 1 周后基部就开始出现褐化, 继而蔓延至整株致死; 较高浓度的 NAA 有利于香榧腋芽萌发, 但浓度过高, 茎段伤口容易愈伤化, 先是基部膨大产生愈伤组织, 最后整个茎段都愈伤化, 这些愈伤组织都不能分化出丛生芽, 从而影响诱导效果。

为了提高香榧腋芽诱导率, 在 B₅ 培养基中添加 BA、NAA 及 IBA 3 种激素观察其协同对香榧腋芽诱导的影响, 试验结果表明 (表 2), 诱导效果比只添加 BA 与 NAA 2 种激素要好, 其中在 B₅+BA0.1mg/l+NAA0.5 mg/l+IBA 1.0 mg/l 的培养基中腋芽诱导效果最好且诱导

表 1 BA 和 NAA 对香榧腋芽诱导的影响
Table 1 Effect of BA and NAA on axillary bud induction of *T. grandis* cv. *Merrillii*

| 试验号 | BA 浓度 /mg·l ⁻¹ | NAA 浓度 /mg·l ⁻¹ | 接种株数 /株 | 出芽个数 /个 | 诱导率/% |
|------|------------------------------|-------------------------------|------------|------------|-------|
| (1) | 0.1 | 0.5 | 60 | 18 | 30.00 |
| (2) | 0.1 | 1.0 | 60 | 23 | 38.33 |
| (3) | 0.1 | 2.0 | 60 | 7 | 11.67 |
| (4) | 0.5 | 0.1 | 60 | 21 | 35.00 |
| (5) | 0.5 | 1.0 | 60 | 34 | 56.67 |
| (6) | 0.5 | 2.0 | 60 | 9 | 15.00 |
| (7) | 1.0 | 0.1 | 60 | 15 | 25.00 |
| (8) | 1.0 | 0.5 | 60 | 21 | 35.00 |
| (9) | 1.0 | 2.0 | 60 | 14 | 23.33 |
| (10) | 2.0 | 0.1 | 60 | 10 | 16.67 |
| (11) | 2.0 | 0.5 | 60 | 11 | 18.33 |
| (12) | 2.0 | 1.0 | 60 | 9 | 15.00 |

表 2 BA、NAA 和 IBA 对香榧腋芽诱导的影响
Table 2 Effect of BA, NAA and IBA on axillary bud induction of *T. grandis* cv. *Merrillii*

| 试验号 | BA 浓度 /mg·l ⁻¹ | NAA 浓度 /mg·l ⁻¹ | IBA 浓度 /mg·l ⁻¹ | 接种株数 /株 | 出芽个数 /个 | 诱导率 /% |
|-----|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------|------------|-----------|
| (1) | 0.1 | 0.1 | 0.5 | 60 | 28 | 46.67 |
| (2) | 0.1 | 0.5 | 1.0 | 60 | 42 | 70.00 |
| (3) | 0.1 | 1.0 | 2.0 | 60 | 16 | 26.67 |
| (4) | 1.0 | 0.5 | 2.0 | 60 | 13 | 21.67 |
| (5) | 1.0 | 1.0 | 0.5 | 60 | 21 | 35.00 |
| (6) | 1.0 | 0.1 | 1.0 | 60 | 32 | 53.33 |

出的腋芽形态健壮,诱导率达70%。由此可见,低浓度的BA有效避免了培养过程中的褐化问题,较高浓度的生长素对香榧腋芽诱导必不可少,减少NAA用量而增加IBA用量克服了愈伤化,有利于提高香榧腋芽诱导率。

2.2 茎芽继代培养

初代培养的外植体培养60d后剪下新抽腋芽,接种于继代培养基中。培养20d时观察其生长状况(表3),NAA浓度过高对香榧腋芽生长不利,较高的BA浓度促进香榧腋芽增粗增壮。在MS+BA1.0+NAA0.1的培养基中腋芽生长速度最快,培养20d形成颜色浓绿、径干粗壮、长度在4cm左右的无根苗。初代腋芽质量对培养基养分吸收有较大差别,当接种于继代培养基上长度在2cm以上的较健壮的腋芽时生长速度快,形成的无根苗在做室内嫁接时更加容易成活。

2.3 室内嫩枝嫁接

香榧腋芽根诱导过程发现,大量的生根实验很难有根的分化,最后大量褐化死亡。基于香榧腋芽继代次数的增加分化能力降低,组培无根苗生根率低的状态,利用香榧组培无根苗为接穗嫁接于当年播种的实生小苗上能够获得完整植株。在继代培养基上培养20d左右,粗壮、充实、生命力强的无根苗较适合做嫁接用接穗。嫁接时,剪取径粗与实生砧木相当、长度4cm左右的带顶芽茎段作接穗,嫁接成活率较高。

劈接法由于其砧木去头,在嫁接20d后大部分接穗开始枯萎死亡;而腹接法由于砧木保持生长,养分和水分传输旺盛,接穗水分吸收充足,嫁接20d仍然健壮,接穗与砧木接合部可见奶黄色愈伤组织,能较好的愈合,60d统计愈合率可达84%(表4)。

3 结论

香榧顶芽通常在40d内即使不加外源激素也能100%萌发生长,而腋芽多为休眠芽,所以在诱导过程中相对比较困难,对各种激素协同作用的要求比较高。在B₃培养基中添加较低浓度的细胞分裂素及较高浓度的生长素有利于香榧腋芽诱导,在合适的激素浓度配比下腋芽诱导率可达70%。组培无根苗在MS培养基中添加合适浓度的激素培育可进一步生长,20d平均长度可达4cm。去除顶芽的无根苗在合适的培养基下可以继续诱导腋芽萌发,但实验中发现随着继代次数的不断增加,香榧腋芽分化能力逐渐降低。

刘海琳等^[7]利用1/2B₃培养基,通过香榧茎段离体培养,获得了完整植株,本试验也试图用香榧无根苗直接诱导生根,也有少量单根植物产生,但启动时间长,根系生长势弱,容易脱落,短时间内即导致整株苗褐化死亡。通过香榧茎段离体培养再生植株,获得较高生根率,还需做大量的深入研究。而利用香榧茎段组培得到的无根苗作接穗嫁接于当年生的实生砧木上,能得到较高的愈合率,其中腹接法60d愈合率可达84%。香榧室内嫩枝嫁接过程中,接穗质量、嫁接技术熟练程度以及切口处污染的控制,对嫁接苗是否成活都有较大的影响。

参考文献:

- [1] 王向阳,修丽丽.香榧的营养和功能成分综述[J].食品研究与开发,2005,26(2):20-22.
- [2] 韩宁林,王东辉,韦金辉,等.香榧早实丰产的栽培模式及主要技术措施[J].林业科学研究,2006,19(5):567-573.
- [3] 戴文圣,黎章矩,程晓建,等.香榧林地土壤养分状况的调查分析[J].浙江林学院学报,2006,23(2):140-144.
- [4] 戴文圣,黎章矩,程晓建,等.香榧生长习性 & 提高造林成活率的关键技术[J].西南林学院学报,2005,5(4):89-92.
- [5] 谭晓风,胡芳名,张党权,等.香榧主要栽培品种的RAPD分析[J].园艺学报,2002,29(1):69-71.
- [6] 姜新兵,陈力耕,何新华.香榧体细胞胚发生的研究[J].园艺学报,2004,31(5):654-656.
- [7] 刘海琳,陈立耕,童品璋,等.香榧茎段离体培养再生植株的研究[J].果树学报,2007,24(4):477-482.

表3 无根苗在不同培养基中壮苗情况

| 培养基 | 统计个数 平均长度 | | 生长情况 |
|-----------------|-----------|-----|--------------|
| | /个 | /cm | |
| MS | 24 | 3.5 | 腋芽较粗壮 |
| MS+BA0.1+NAA0.1 | 24 | 3.8 | 腋芽纤细 |
| MS+BA0.1+NAA0.5 | 24 | 3.5 | 腋芽纤细,基部叶片黄化 |
| MS+BA0.1+NAA1.0 | 24 | 2.9 | 腋芽生长不明显 |
| MS+BA1.0+NAA0.1 | 24 | 4.3 | 腋芽粗壮 |
| MS+BA1.0+NAA0.5 | 24 | 3.6 | 腋芽较粗壮,基部叶片黄化 |
| MS+BA1.0+NAA1.0 | 24 | 3.1 | 腋芽基部叶片黄化 |

表4 不同嫁接方法对成活率的影响

| 嫁接方法 | 统计株数 20 d 保有株数 60 d 愈合株数 愈合率 | | | |
|-----------|------------------------------|----|----|----|
| | /株 | /株 | /株 | /% |
| 劈接(砧木去头) | 50 | 12 | 5 | 10 |
| 腹接(砧木不去头) | 50 | 46 | 42 | 84 |