

几种林木和花卉植物的组培繁殖技术

阙国宁 诸葛强

(中国林业科学研究院亚热带林业研究所)

摘 要

本文对九种植物：北美红杉、柳杉、西洋杜鹃、金边瑞香、蝴蝶兰、花叶常春藤、斑叶竹节秋海棠、葡萄以及猕猴桃的组培繁殖技术进行了研究，提出了增殖、生根、移栽等技术要点。其中，中国柳杉及花叶常春藤的组培繁殖成功属国内首次报道。一些种类的组培繁殖已达到大批量生产的水平。

关键词 组织培养；繁殖

自1979年以来，我们对重要的林木、花木及果木的组培繁殖技术进行了研究，先后已有50余种获得成功。因限于篇幅，本文只简要报道其中在理论和生产应用上有价值以及获得新进展的九种，并着重在其增殖、生根、移栽等技术关键方面。

一、北美红杉(*Sequoia sempervirens*)试管嫩梢扦插繁殖

1. 材料类别 选择经引种驯化适于浙江生长的红杉优良实生苗，采取其茎尖及茎段。

2. 培养条件 茎尖接种于 $\frac{1}{2}$ MS + KT1.0mg/L + IBA0.5mg/L的培养基中，2个月后，每个茎尖基部可产生长约0.5—1.0cm的苗梢10—15根；转移培养在相同培养基中，经4个月可获得1.0—2.0cm的苗梢25—30根；再转至大号三角瓶中用上述培养基培养5个月，可获4—6cm长的苗梢80—100根。这时就可在无菌条件下，将长而粗的苗梢切下，供扦插繁殖。同时用锐利的小刀在无菌条件下，将含有大量细短苗梢的培养体切成带有5—6根苗梢的培养块，再放到相同培养基中培养。2个月后这些小块又继续产生大量苗梢，有的长达4—6cm，可再次剪切供扦插用。培养温度为 $25 \pm 3^\circ\text{C}$ 、光照强度1500—2000lx、每日光照12h左右。

3. 扦插管理 将剪切下的长约4—6cm的试管苗梢，在100ppm的IBA中浸6个小时，然后插于山泥(3):河沙(1)均匀混拌的扦插床中，浇透水，覆盖塑料薄膜。插后1个月要严格遮荫，并使苗床白天保持800—1000lx光照，以后光照逐渐增强。一般可在每年春季的2—3月份扦插，9月份以后就能在全光照条件下生长，并需每日喷清水1—2次。1个月后插穗基部开始形成愈伤组织，2个月后多数基部长出0.5—1.5cm长的根3—5条，1年生苗木

高达 18cm, 并有发达根系。只要移栽时期适当, 成活率可达 82.7—92.5%。

4. 意义和实用性 北美红杉在浙江舟山已引种成功, 并开始结实, 将很有希望成为我国沿海地区新的用材树种。选取在当地结实的种子, 在自然条件下培育实生苗, 进而选择出适于当地环境条件下的个别单株, 取其茎尖组织繁殖大量适于当地生长的组培苗。这将是一个很有前途的引种与组培相结合的繁殖方法。北美红杉组培繁殖率很高, 又可应用嫩梢扦插繁殖。因而, 其成本会大大降低。目前已选出适于当地环境生长的个别实生苗, 这为应用组培繁殖北美红杉苗木, 并实行工厂化生产, 提供了前提条件。

二、柳杉(*Cryptomeria fortunei*)组培繁殖

1. 材料类别 从 2—3 年生中国柳杉实生苗中选出冬季不变色类型的 1 年生茎段或顶芽。

2. 培养条件 无菌的茎段或顶芽培养于 $\frac{1}{2}$ MS + BA(0—5mg/L) + IBA(0—5mg/L) 的培养基中, 其芽的分化诱导率在 0—83% 之间, 其中以中浓度的 BA(1.0—1.5mg/L) 和低浓度的 IBA(0—0.5mg/L) 配合组成的培养基诱导效果最佳(见表 1)。通常, 当年生的嫩茎段诱导效果优于芽尖, 在含有 BA 与 IBA 配合的培养基中, 虽然初期诱发形成芽比较容易, 但继续生长后, 多数出现苗梢干枯现象。如果在培养基中加入少量玉米素和水解乳蛋白(200mg/L), 则可得到较为理想的效果。

表 1 柳杉不同处理的诱导效果

试 验 号	BA (mg/L)	IBA (mg/L)	接 种 材 料	
			茎 段	芽 尖
			诱 导 率 (%)	
1	0	0	20	0
2	0.25	0	50	33
3	1.00	0	83	50
4	5.00	0	0	0
5	0	0.5	0	0
6	0.25	0.5	0	0
7	1.00	0.5	33	0
8	5.00	0.5	27	0
9	0	2.0	0	0
10	0.25	2.0	25	0
11	1.00	2.0	7	0
12	5.00	2.0	28	0
13	0	5.0	20	0
14	0.25	5.0	0	0
15	1.00	5.0	43	0
16	5.00	5.0	0	0

柳杉外植体在上述培养基中培养 60—80 天后, 部分苗梢已达到 2—3cm, 并于基部产生大量不定芽。这时可切取嫩梢于 White + IBA(0.25—0.5mg/L) 的培养基中, 经 50—60 天培养可产生大量根条。将带根的试管苗移栽到含岩棉灰和山泥(1:3)的土壤中, 1 个月后即能

长出新根并抽梢。

3. 新进展及意义 柳杉为我国南方分布极广的树种。从浙江天目山选出的冬季不变色类型更是庭园绿化的良种。虽然国外对日本柳杉(*C. japonica*)的组培研究已有许多报道,然而对中国柳杉的组织培养研究,国内尚无专题报道。为此,应用组培来收集、保存柳杉中的新类型及杂种等,则具有一定的学术意义。

三、西洋杜鹃(*Rhododendron hybridum*)试管嫩梢繁殖

1. 材料类别 本试验所选用的20余种优良杜鹃品种均获成功。目前重点组培繁殖比利时杜鹃的二个优良品种(四季杜鹃1号、2号),这二个品种都具有花朵大而艳,且四季常花的特点,有很高的观赏价值。材料全部选取这些优良品种的当年生芽尖。

2. 培养条件 采用修改的MS培养基,适当地增加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的量,使 NH_4^+ 与 NO_3^- 的比率为1:1。试验证明,降低 NH_4NO_3 在培养基中的浓度,对于诱导丛生芽具有显著的作用(见图1)。本试验采用MS(修改)+KT(0.5—0.75mg/L)+NAA或IBA(0.1—0.5mg/L),对于继代培养嫩梢增殖具有显著效果。在原接种诱导形成丛生芽时,低浓度的玉米素是必不可少的。修改的MS培养基上,附加低浓度的(0.5mg/L)IBA或NAA,并加入少量活性炭,则极易诱导产生细须状的根系。

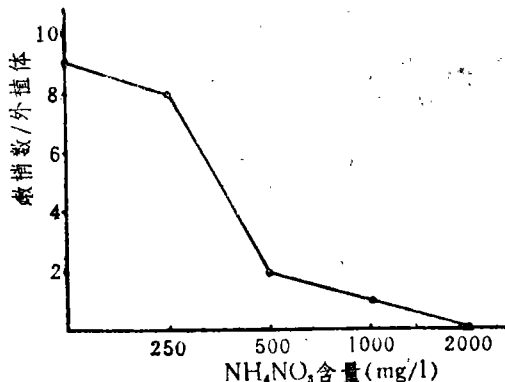


图1 培养基中 NH_4NO_3 含量对单位外植体嫩梢数量的影响

3. 生长分化情况 取0.5cm长的嫩茎或芽尖接种于上述诱导产生丛生芽的培养基中,经1个月培养,就可产生大量丛生芽。经多次试验,其诱导率均在90%以上。分割并转移丛生芽于新鲜培养基中,经2个月培养平均每个外植体可产生5—10根嫩梢,多者可达40—50根,其长度可达2—3cm,梢条粗壮,叶色嫩绿,切取这些嫩梢转培于含有生长素(NAA或IBA)的生根培养基中,经15天则开始生根,其生根率可达95%以上。将这些试管植株移栽于含有蛭石、山泥

及少量泥炭(2:3:1)的基质中,使其保持湿润,大约1个月即可在土壤中生长成完整植株。也可以直接用试管嫩梢插于上述基质中,只要保持湿润,并使移栽时温度在20℃以下,其成活率可达80%以上。西洋杜鹃组培繁殖率极高,一般一个月可增加1倍。新接种的外植体经2—3次剪切后,仍能产生大量丛生嫩梢。然而其嫩梢的粗度变细,因此一般一个新接种体继代培养2—3次以后,应逐步淘汰。

4. 新进展及意义 西洋杜鹃品种繁多,是重要的盆栽观赏花木。其组培繁殖率极高,每个芽每年能增殖100株以上试管苗。只要条件适宜,移栽成活率可达80%以上,而且培养基的成本也比较低廉。当年春季移栽的试管苗,如栽培管理精心,一般到夏秋就能开出艳丽的花朵,并能保持原品种的优良特性。我们所培养的四季杜鹃1号、2号二个品种,更是四季开花不断。目前都已达到大批量生产的水平。

四、金边瑞香(*Daphne adora* var. *marginota*)组培繁殖

1. 材料类别 取自5年生优良金边瑞香盆栽植株的芽尖。

2. 培养条件 采用修改的MS作为基本培养基,并将其总的盐分含量调到2443—4543mg/L之间,总氮量在452—1152mg/L之间,附加BA(0.5—3.0mg/L),以及0.5mg/L以下的NAA,以诱导愈伤组织及丛生芽。应用 $\frac{1}{2}$ MS附加低浓度的IBA诱导生根,进行常规的组培。

3. 生长与分化状况 大小约0.2—0.3cm的金边瑞香茎尖培养于上述分化培养基中,不久即形成愈伤组织。同时出现大量肉眼可见的丛生芽。切取这些丛生芽继代培养,2个月后多数培养体就能长出粗壮的嫩梢8—10根。继续培养至3个月,最多可分化出各种长度的嫩梢100根以上,经1年多次的继代培养,其愈伤组织仍能保持旺盛的分化能力,未见退化现象。当嫩梢长达3—4cm时,将其切下培养于含有生长素的生根培养基中,3周后出现根芽,经40—50天,75—80%的嫩梢都能生根;在生根过程中早期可能出现叶黄现象,但可继续培养。当萌出1—2根长度为1.5—2.0cm的根条时,多数试管小植株重新萌发,从而形成健壮的植株。取生根的小植株洗净,移栽于含有腐叶土、蛭石及木屑的培养土中,初期保持空气湿润,并置于遮荫环境,精心管理,2个月后即可抽出新梢。

4. 新进展及意义 金边瑞香是瑞香中的珍贵变种。本试验通过调节大量元素,用简单的培养基使其大量增殖,其分化率在90%以上,而且能长出粗壮嫩梢。通过调节生长素含量及应用方法,可大大提高生根率。同时由愈伤组织分化所产生的嫩梢中,有10%出现了具有金黄色叶片的新类型,这些新类型移栽后仍能保持变异的特性,是否能成为组培突变的新品种,还有待进一步观察。一旦移栽条件得到改善,转入大批量生产是完全可能的。

五、蝴蝶兰(*Phalaenopsis* sp.)组培繁殖

1. 材料类别 分割蝴蝶兰无性系苗木蘖生的长0.4—0.6cm的小芽。

2. 培养条件 应用 $\frac{1}{2}$ MS(大量元素减半)为基本培养基,在附加BA(0.2—2.0mg/L)与NAA(0.2—0.5mg/L)以及IAA(0.5—0.75mg/L)的条件下,能迅速分化出具有根与茎类似胚状体的双极性的完整植株。

3. 分化与生长状况 蝴蝶兰外植体在上述培养基中10—15天后,就在叶簇基部分化出许多肉眼可见的小芽,在合适的培养基上生长非常迅速,通常在高浓度的BA(2mg/L以上)上,虽能长出新芽,但后期多数叶片发黄。如果在培养中的某些阶段,用低浓度ZT刺激,以诱发胚状体发生,那就可获得更为理想的效果。在富含培养基的条件下,主要形成芽。在生产中可按每10天增殖1倍的速度发展。随着培养基的吸收,小的类似胚状体的芽则迅速增长。一般在250mg的培养瓶中,放置70—80ml培养基。经半年的培养,可获得具发达根茎的完整试管苗50—80株。这些试管苗不带任何愈伤组织,相互分离,并具有完整直接相连的维管束组织。选取其中生长健壮的、具有3—4个叶片、长2—3cm且根系完整的植株,可移栽于含有蛭石等的基质中,通过控制其温度与湿度,使试管植株移栽成活。

4. 新进展及意义 蝴蝶兰是气生兰的一种,为泰国、南亚及我国台湾省花卉出口的主要品种。目前已进入大规模工厂化生产的阶段。在我国只要适当地控制移栽与生长的环境条件,完全可以实现大批量生产。本试验已达到在固体培养基的条件下分化出类似胚状体结构的球形胚,从而大量、快速形成完整植株。同时能在一个培养基中完成培养体的分化及生长全过程,使培养基得到充分利用。这将大大降低苗木培养的成本。

六、花叶常春藤(*Hedera helix* L. cv. *Cavendishii*)试管微型繁殖

1. 材料类别 花叶常春藤(或称银边常春藤),取其大叶和小叶的花叶常春藤为培养材料,采带有嫩叶的长0.3—0.5cm的芽。

2. 培养条件 用修改的MS(铵态氮525mg/L,硝态氮788mg/L,总盐分5983mg/L)为基本培养基,附加BA(0.75—1.0mg/L),以及IBA(0.25mg/L),诱导产生愈伤组织及丛生芽,剪取长约2cm的嫩梢培养于修改的MS+KT0.5mg/L+NAA0.1mg/L的培养基上诱导生根。

3. 生长与分化状况 在秋季剪取带嫩叶和芽的嫩梢,采用常规方法灭菌,在诱导嫩梢的培养基中,置常规条件下培养7—10天后,嫩芽萌发。15天左右嫩芽开始生长,经3—4个月培养,每个培养体分化出长达2—4cm的嫩梢3—4根。通过3年试验证明,其诱导率在90%以上。试验还表明,最初的培养体宜在秋冬接种,春季移栽,因为在夏季多数试管嫩梢上会渐渐变褐色而引起生长不良。通过在培养基中添加少量活性炭,情况虽有所好转,但仍需作进一步改进。剪切下的嫩梢置于生根培养基中,30—40天后生根率为60—70%。这时可将已生根或已有愈伤组织与根芽的小植株移栽于山泥和沙(2:1)的基质中,且空气湿度要大,1个月后就可在常规的温室中生长。

4. 新进展和意义 花叶常春藤是国内外具有较高观赏价值的室内装饰植物,常年绿叶银边,细藤垂悬。在国内,我们首次报道了这种优良品种试管繁殖成功。目前已达到小批量生产阶段。

七、斑叶竹节秋海棠(*Begonia mecculata*)组培繁殖

1. 材料类别 切取斑叶竹节秋海棠的嫩叶(通常为1cm见方),在无菌条件下,切成大小约0.5×0.5cm的叶片,平贴于无菌培养基的表面。

2. 培养条件 将灭菌的嫩叶外植体培养于 $\frac{1}{2}$ MS附加低浓度的BA(0.25—1.0mg/L),以及低浓度的NAA(0.5mg/L以下)和少量水解乳蛋白的培养基中,叶片培养体便形成愈伤组织,分化出丛生芽,并且部分出现根系。

3. 分化与生长情况 接种后1个月叶片开始明显加厚,并在周围出现羽衣状黄绿色的愈伤组织。2个月后,沿着愈伤组织出现真叶。2个半月后,出现大量具茎的丛生状小植株。再继续培养于相同的培养基中,芽梢伸长,叶片长大并在基部出现根条。这时可将带有1—2片叶(长度1cm以上)的带根或不带根的嫩梢剪下,栽植于含有岩棉和山泥的基质中,经1个月培养即成为正常生长的完整植株。该植物的组培繁殖率极高,只需一个配方即可完

成愈伤组织形成、分化及生根，而且又可将剪切后所留下的愈伤组织块供继代培养。因此，只要条件适宜，成本极为低廉。

4. 新进展和意义 斑叶竹节秋海棠是优良的观花、观叶、观枝的盆栽花卉。开花期随着栽培年龄的增加而增加。通常1株3年生植株每年花期可达半年以上(5—11月份)。本试验采用嫩叶片，并以一个培养基即可完成组培繁殖的全过程。只要不霉变可连续剪切培养。另一方面，苗木移栽成活率高，又可采用嫩梢扦插进行繁殖。5年来我们已繁殖了大量苗木，现已完全达到工厂化生产水平。

八、葡萄(*Vitis vinifera* L. cv.)组培繁殖

1. 材料类别 取葡萄茎上带芽的长约0.5cm的茎段。其品种包括巨峰、先锋、甲斐路、黑奥林、京可晶、无核黑、京超等。

2. 培养条件 无菌的各品种芽外植体培养于修改的MS培养基中，附加BA(1.0—3.0mg/L)以及低浓度的生长素NAA(在0.5mg/L以下)，同时加少量的活性炭。在一个培养基中完成伸长、抽芽和生根的全过程。

3. 生长与分化情况 带芽的茎段外植体接种于上述培养基中，一周后其基部长出明显可见的愈伤组织。这时原来的接种芽开始萌发抽生，同时基部开始形成根条。随着根的生长，上部嫩梢生长速度加快。通常1个月后，接种芽抽梢长达10cm左右，带有茎5—8节，以及根3—5条。这时可剪切上部带叶芽的嫩梢，长2—3cm，供继代培养。留下的原接种体可继续抽生新嫩梢，或取出供移栽。带根的试管苗略经锻炼后可直接移栽于蛭石中。经7—10天保持高湿度的环境，即可在荫棚下正常生长。试验证明，由于采用这种方法，试管苗生长粗壮，因而在常温条件下一年四季均可移栽。这种繁殖方法对于大多数品种，其诱导率可达95%以上；增殖率大约每月每个接种体增加一倍。这样高的繁殖率使成本也相应下降。

4. 新进展及意义 我们采用了修改的MS培养基，在BA、NAA及活性炭的作用下所产生的试管苗嫩梢非常粗壮。同时，能在一个培养基中完成嫩梢增殖与生根的全过程。还能在常温条件下全年进行移栽。这样就大大降低了成本。由于该法没有通过愈伤组织阶段，因而确保了组培所获得的后代品种的纯正。移栽的苗木成活率高而且生长快，通常一年生苗木其长度可达0.75—1.0m。应用嫩芽进行葡萄微型繁殖，目前已达到工厂化生产的水平。

九、猕猴桃(*Actinidia chinensis*)组织培养大批量繁殖技术

1. 材料类别 猕猴桃的优良品种：新西兰品种海沃德、新西兰雌雄同株优良单株、河南1号、徐州2号、洛阳1号、洛阳2号、洛阳3号及浙江临海优株等10余种，取其带芽的长约0.3—0.5cm的茎段，作为外植体材料。

2. 培养条件 带芽的原始茎段外植体在含有2,4-D(0.5mg/L以下)以及低浓度的BA(0.5mg/L以下)诱导愈伤组织。经20—30天后，于含有BA(2mg/L以下)、ZT(2mg/L以下)及NAA(0.5mg/L以下)的培养基中诱导产生大量嫩梢，然后剪切嫩梢于仅含有BA(2mg/L以下)和NAA(0.25mg/L以下)的培养基上，并继代培养，诱导产生愈伤组织。同时从分化

出的大量嫩梢上,再剪取长约2 cm的嫩梢培养于含MS附加低浓度IAA(2mg/L以下)的培养基中诱导生根。

3. 分化与生长情况 原始外植体在诱导愈伤组织的培养基中很快能形成愈伤组织,然而必须及时转至分化培养基上。在含有ZT及BA的培养基中,40天后即可从愈伤组织上分化出约20—25根小嫩梢,其分化率可达80%以上。分割这些具有幼嫩梢头的愈伤组织,移栽于含有或不含ZT的培养基中,使其继续增殖。这时便进入了快速繁殖阶段,大约每15天就能长出10—15根嫩梢。当嫩梢长至2cm时,将其剪切下,并置于生根培养基中,1周后即长出根须,其生根率可达98%以上。猕猴桃各品种繁殖率极高。如果无菌条件完善,大约每10天增加1倍。把具根的试管苗移栽于含有蛭石、黑泥的基质中,约10—15天保湿,就可在自然条件下生长。移栽半年后单株苗长度可达20—40cm,这时就能定植。

4. 新进展及意义 猕猴桃是优良的食用果木。由于富含维生素C及各种人体所需的氨基酸,因此近年来在国内外深受欢迎,优良品种层出不穷。对猕猴桃及其制成的罐头、酒、饮料等的需求,今后将会大幅度增加。如按常规的嫁接繁殖,不但周期长、成本高,也很难满足对苗木的急需,特别是对优良品种的需求。1987年浙江省人民政府拨款建立了猕猴桃组培生产基地。经一年的努力,我们初步解决了猕猴桃工厂化生产中所需解决的技术问题。并繁殖了10余个优良品种。同时在培养基中逐渐除去了价格昂贵的细胞分裂素(ZT),而仍能保持极高的分化率、生根率、移栽成活率以及移栽以后定植在苗床中的苗木生长速率。从而大大降低了成本,为工厂化生产提供了可能性。

PROPAGATION OF NINE SPECIES OF PLANTS IN VITRO

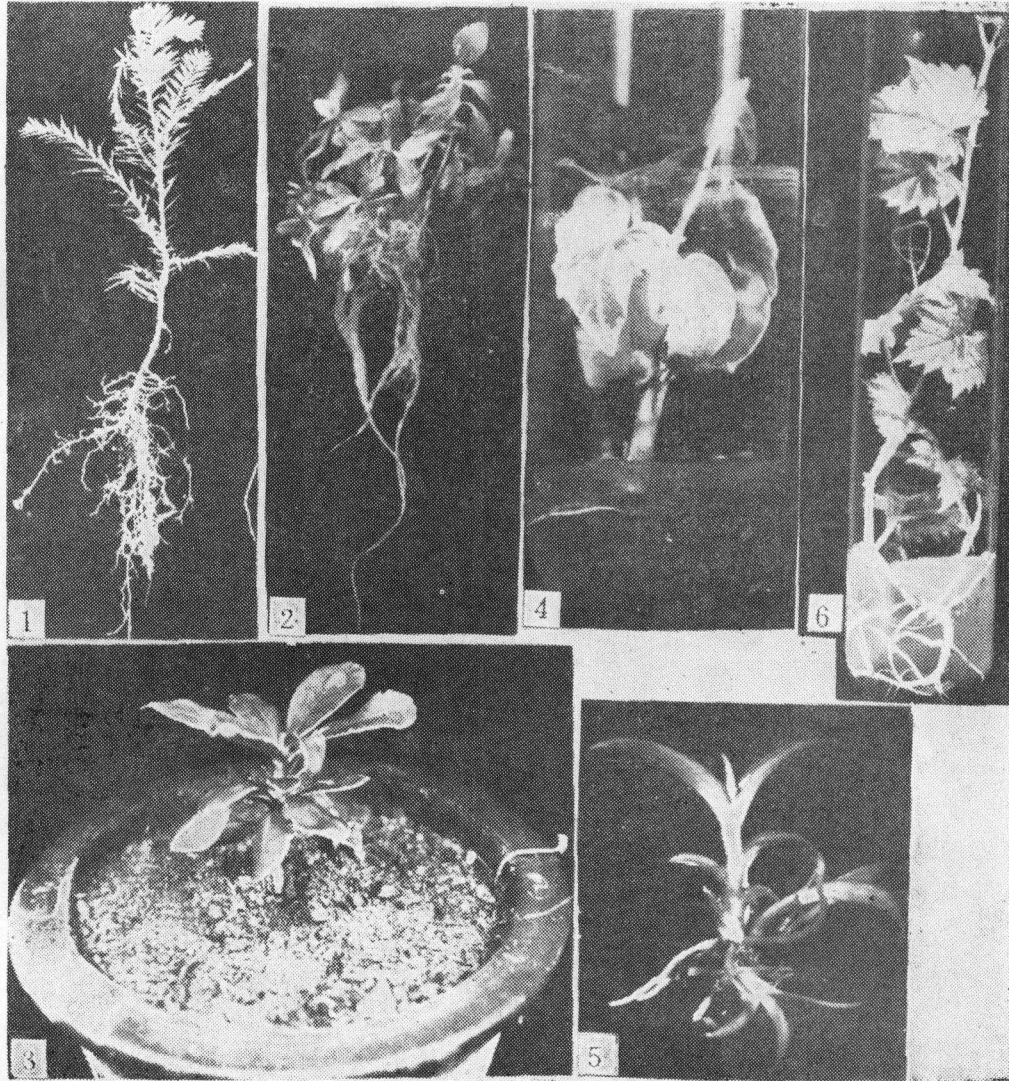
Que Guoning Zhuge Qiang

(The Research Institute of Subtropical Forestry CAF)

Abstract

Propagating techniques in vitro for the nine species of plants, *Sequoia sempervirens* (Lamb.) Endl, *Cryptomeria fortunei*, *Rhododendron hybridum*, *Daphne adora* var. *marginota*, *Phalaenopsis* sp., *Hedera helix* L. cv. *Cavendishii*, *Begonia mecculata*, *Vitis vinifera* L. cv. and *Actinidia chinensis*, are dealt with in this paper. The keys of the techniques for proliferating, rooting and transplanting are described. Success in vitro propagations of *Cryptomeria fortunei* and *Hedera helix* L. cv. *Cavendishii* have been first accomplished in China. In vitro propagation of some species achieved the level of mass production.

Key words: tissue culture; propagation



1. 从浙江生长的红杉实生苗接种体中分化出的完整植株, (1:1.5);
2. 比利时杜鹃试管完整植株, (1:2);
3. 移栽成活的金边瑞香试管苗生长状况, (1:2);
4. 在同一个培养基上完成组培全过程的葡萄试管苗, (1:1.4);
5. 在同一个培养基上完成增殖、生根;
6. 花叶常春藤试管苗生根与生长状况, (1:1)。