

杉木组培嫩梢增殖与复壮的分析*

阙 国 宁

(中国林业科学研究院亚热带林业研究所)

摘要 用取自1、5和10年生母本上的杉木茎段作为原始外植体,接种于含有BAP 0.75 mg/l和IBA 0.25 mg/l的“GN”培养基中($\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^- = 1:2.86$)。经1a连续4代培养,结果表明:嫩梢及苗木产量因外植体母本的年龄不同有很大差异。如母本年龄为1a的外植体,每个平均可获嫩梢170.3—445.7根,其中有效嫩梢78.0—194.9根,包括I级(好的,可供继代培养继续增殖)11.1—25.1根;II级(中等,可供生根培养以成苗)36.1—87.9根;III级(须继续培养)29.5—78.6根。随着原始外植体母本年龄的增加,以上各项数值都相应下降。

另一方面,由于组织培养对于成年母本的外植体具有不同程度的复壮效应,使得嫩梢增殖效果差异很大。如取自年龄为5、10年生母本上的外植体,平均年嫩梢产量为4.1—234.3根,如此大范围的变化为培养体的复壮选择提供了可能性。

此外,本文还对嫩梢增殖的生产效应作了初步分析。

关键词 杉木; 组织培养; 增殖; 复壮

在树木组织培养中,形态发生能力以及嫩梢增殖与生长状况通常是细胞和组织成熟度的重要标志之一^[3]。通过组培复壮以获得具童期性状的个体,这是当今值得重视的研究课题。在杉木组织培养中,虽然已解决了一般的繁殖技术问题^[1,2],然而当今组培工厂化生产面临的问题是高效率地繁殖那些已确定具有高遗传增益树木的个体。树木性状的表现力在一定的生长阶段通常与年龄成正相关,而营养繁殖能力又与年龄成负相关^[4],为此,许多树木个体一旦达到充分表现其优良性状的成熟年龄,往往失去了旺盛的营养繁殖能力,这个规律一般也适合于组织培养。但是,在离体培养条件下由于所分离的树木组织或细胞通常有可能自由表达其受压抑的潜在特性,利用个体内细胞及组织之间的生理成熟度差异,通过培养选择,诱发幼嫩性,恢复活性以达到复壮的目的。本研究目的在于探索不同年龄母本上的外植体的嫩梢增殖规律和成年母本外植体的组培复壮技术,为制定合理的苗木工厂化生产流程,确定正确的经济指标,提供可靠的实验依据。

一、材料与方 法

选取分别属于1、5、10年树龄的杉木实生植株,于春夏之交剪取当年生的新梢,长5—

本文于1989年6月19日收到。

*参加工作的还有请葛强同志。本研究内容为中国林科院科学基金课题的一部分。

10 cm, 剪除全部针叶, 经充分洗涤后按组培常规的无菌法将新梢剪成1.2 cm左右的茎段作原始外植体, 培养于温度为 25 ± 3 °C、光照强度为1 500—2 000 lx, 每日光照时间达12—14 h的培养室中, 经培养萌发后3个月观察所分化的嫩梢数量及品质, 接着, 每3个月进行继代培养一次, 一年后统计分析所获得试验结果。

按实际生产要求, 我们将所分化的嫩梢或芽分为两大类:

1. 有效嫩梢(芽) 具有较粗壮的嫩梢或饱满的芽, 经培养可能长成供继代培养或生根培养的嫩梢。通常又根据其生长状况分为3级: 其中, I级: 嫩梢粗壮, 长达3—5 cm, 剪切此嫩梢经继代培养有可能继续增殖成有效的嫩梢或芽; II级: 嫩梢较细, 但生长正常, 长度 > 2 cm, 切取这类嫩梢培养于生根培养基中, 可形成能移栽成活的完整植株; III级: 在愈伤组织四周生长着的较为粗壮的芽以及 < 2 cm较为粗壮的嫩梢, 这些芽及嫩梢连同其愈伤组织经继代培养后可以长成I—II级嫩梢。

2. 无效嫩梢(芽) 虽然已分化成可见的芽, 甚至也开始生长, 但过于密集细嫩, 经继代培养后, 一般不能长成有效嫩梢。

本试验全部采用修改的“MS”(简称“GN”)为基本培养基并附加BA(0.75 mg/l)和IBA(0.25 mg/l)。与“MS”相比, “GN”的显著特点是增加硝态氮含量, 其 $\text{NH}^+:\text{NO}_3^-$ 比值从原来的1:1.87降至1:2.86^[6], 钾元素含量基本保持不变, 同时显著降低磷、钙、镁的含量。本试验重复10次, 并计算其变异状况。

二、结果与讨论

(一) 嫩梢增殖的概况分析

从不同年龄母本上取来的每一原始外植体, 经1 a连续4代培养, 如按初代培养所得的嫩梢实值推算年嫩梢产量理论值, 结果见表1。然而, 实际上不同培养代数增殖的嫩梢数量及其品质是受继代再生率、有效嫩梢比率及不同品质嫩梢比率控制的。实际试验的调查数据表明, 不同年龄母本的外植体, 从第一次继代培养起, 在继代再生率上差异显著, 为此按不同年龄分别列出。而有效嫩梢的比率差异不大, 为了便于统计只按各年龄平均值列出予以统计, 其结果见表2。

表1 不同年龄杉木母本的外植体嫩梢增殖数理论值的估计

培养代数 ^①	每一外植体产嫩梢(芽)数		
	1年生	5年生	10年生
初代 ^②	33±6.3	24±13.3	9±6.1
1代	1 089	576	81
2代	35 937	13 824	729
3代	1 185 921	331 776	6 561

①各代培养时间均为3个月, 以下同;

②初代培养样品数=10。

表2 不同年龄杉木母本的外植体各培养代数的嫩梢数量及品质比率

培养代数	继代再生率 ^① (%)			有效嫩梢比率(%)	不同级别有效嫩梢比率(%)		
	1年生	5年生	10年生		I级	II级	III级
初代	100	100	100	55.0	20	50	30
1代	40.0	45.8	77.7	50.8	15	50	35
2代	30.3	33.3	66.6	46.7	10	45	45
3代	24.2	29.1	30.2	30.2	5	40	55

①继代再生率(%)=(各次继代培养总的嫩梢平均数/初代培养总的嫩梢平均数)×100。

从表1所列的结果,不难看出,就理论值而言,不同年龄母本的外植体的嫩梢增殖潜力差异很大,若将1年生与10年生相比较,经1a培养后,其数量差异可达180倍,这说明从幼龄母本上采取的外植体,具有巨大的增殖优势。然而,随着外植体的母本年龄的增加,其嫩梢增殖数量的变化幅度(即变异系数)却明显加大,即1年生为19.0%,5年生为55%,而10年生高达68%(表1, $CV(\%) = S/\bar{x} \cdot 100$),这说明植物个体发育的不均衡性。在母本年龄为5年生时,有部分原始外植体,经初代培养后的嫩梢数已达到或超过母本年龄为1年生的外植体;同样也有少数母本年龄为10年生的原始外植体,经初代培养后达到了母本年龄为5年生的外植体的增殖水平。为此,只要通过一代培养,选择分化增殖旺盛的培养体,也能达到复壮的目的。当然,从10年生以后已达到成熟年龄的母本上所取得的外植体,这种复壮机率就显著下降。从遗传学观点来看,一般杉木达到5—10年生时,在表型上其优劣特性就已较为明显地得以表达,而这时尚未完全丧失再生能力,若建立以繁殖优良单株无性系为目的组培繁殖体系,这时或许是选取外植体较为合适的母树年龄。分析表2所列的继代再生率,不难发现随着培养代数的增加培养体的生命力将全面下降。实际上,用经初代培养以后的不同年龄母本上的外植体所增殖的无菌嫩梢作培养体,结果表明各培养体所增殖的嫩梢数量随着培养代数的增加而逐渐接近,相对而言,就出现了随着外植体母本年龄的增加继代再生率有逐渐增加的趋势,这也从另一角度说明了组培的复壮效应。

(二) 不同年龄母本上的外植体嫩梢增殖效应分析

如果从来源于不同年龄母本的外植体所产生的嫩梢中,剔除那些细小、嫩弱以及愈伤组织化了(在生产上无用)的梢(芽),余下的按品质分类,属I级者供继代培养复壮再生,属II级者供生根培养移栽成苗,属III级者继续培养促使分化生长,同时按一定比例不断接种若干新的外植体以补充淘汰的老化培养体。这样就使得培养、增殖、生根、移栽组成了一套完整的连续生产体系。

从表3可看出,取自1年生母本上的单个原始外植体,在萌发后,经三个月的初代培养,

表3 不同外植体母本年龄与培养代数的嫩梢增殖与复壮效应

外植体 母本年龄 (a)	培养代数	平均总嫩梢数 (根/每外植体)	平均有效嫩梢数(根/每外植体)			
			I级	II级	III级	总和
1	初代	27.3—39.9	3.0—4.4	7.5—10.9	4.5—6.6	15.0—21.9
	1代	10.9—15.9	0.8—1.2	2.7—4.0	1.9—2.8	5.5—8.0
	2代	8.3—12.1	0.4—0.6	1.7—2.5	1.7—2.5	3.9—5.6
	3代	6.6—9.7	0.1—0.2	0.8—1.1	1.1—1.6	2.0—2.9
5	初代	10.0—37.3	0.8—3.0	2.6—10.3	1.9—7.2	5.5—20.5
	1代	4.6—17.1	0.3—1.3	1.2—4.4	0.8—3.0	2.3—8.7
	2代	3.3—12.4	0.2—0.6	0.8—2.6	0.8—2.6	1.5—5.8
	3代	2.9—10.8	0—0.2	0.4—1.4	0.5—1.5	0.9—3.2
10	初代	2.9—15.1	0.3—1.7	0.8—4.2	0.5—2.5	1.6—8.3
	1代	2.3—11.7	0.2—0.9	0.6—2.9	0.4—2.1	1.2—5.9
	2代	1.9—10.1	0.1—1.0	0.4—1.8	0.4—1.9	0.9—4.7
	3代	1.6—8.4	0—0.1	0.2—1.0	0.3—1.4	0.5—2.5

注:置信度(α)=95%。

平均可形成27.3—39.9根嫩梢(芽),其中有效梢15.0—21.9根(I级、II级、III级分别为3.4—4.4、7.9—10.9、4.5—6.6根)。继代培养后,由于受再生率影响,继代外植体所产生的总嫩梢数及各级嫩梢数也随之下降,这种趋势在各不同年龄母本的外植体中几乎同样存在。这种以各培养代数为基础的数据,仅从横向阐明了培养效果。在生产实践中,更重要的是以连续生产为基础的各培养代数的累计数值,即从纵向了解培养效果。表4列出了取自不同年龄母本上的单个原始外植体,经1 a 4代连续培养后,产生的各级嫩梢累计数值,其结果说明了实际产生的嫩梢数与理论值差异很大。如果分别按年龄为1、5、10年生的外植体所培养的结果统计,其实际值与理论值之比分别为 1.4×10^{-4} — 3.7×10^{-4} 、 0.4×10^{-4} — 0.7×10^{-3} 以及 0.6×10^{-3} — 1.6×10^{-2} 。说明按理论模式推算的繁殖率绝不能用于生产实践,否则将造成无法挽回的损失。另外,取自一年生母本的外植体,经4代连续培养后,出现了无I级嫩梢的培养体,这说明此时少数培养体已开始衰退以至无法再取其粗壮的无菌苗梢作继代培养。然而多数还具再生能力,这种能力甚至能保持2—3 a之久。对于母本年龄为5 a与10 a的外植体来说,这种衰退现象从第3代甚至第2代就开始出现。只有少数的培养体,由于受到组培复壮机制的诱导,仍能形成I级嫩梢,保持着继代培养的再生能力。应用这种特性进行繁殖成年优株无性系是极为有效的。

表4 不同年龄母本的每一外植体一年内各代嫩梢连续增殖数

外植体 母本年龄 (a)	培养代数	继代培养 体数 (个)	平均总 嫩梢数 (根)	平均有效嫩梢数(根)			
				I级	II级	III级	总和
1	初代	1	27.3—39.9	3.0—4.4	7.5—10.9	4.5—6.6	15.0—21.9
	1代	5—7	54.0—111.0	5.4—11.0	13.0—28.0	8.0—17.0	27.0—57.0
	2代	7—14	58.0—169.0	2.7—7.9	12.0—35.0	12.0—35.0	27.0—79.0
	3代	5—13	31.0—126.0	0—1.8	3.6—14.0	5.0—20.0	9.0—37.0
	合计	18—35	170.3—445.9	11.1—25.1	36.1—87.9	29.5—78.6	78.0—194.9
5	初代	1	10.0—37.3	0.8—3.0	2.6—10.3	1.9—7.1	5.5—20.5
	1代	1—4	4.6—68.0	0.3—5.2	1.2—17.3	0.8—12.1	2.3—34.7
	2代	0—7	0—86.0	0—2.8	0—12.0	0—12.0	0—28.0
	3代	0—4	0—43.0	0—0.6	0—5.0	0—6.8	0—12.5
	合计	2—16	14.6—234.3	1.1—11.6	3.8—44.6	2.7—38.0	7.8—95.7
10	初代	1	2.9—15.1	0.3—1.7	0.8—4.2	0.5—2.5	1.6—8.3
	1代	0—3	1.2—35.0	0—2.6	0—13.0	0—2.1	0—17.7
	2代	0—4	0—35.0	0—1.6	0—7.2	0—7.2	0—16.0
	3代	0—2	0—22.0	0—0.3	0—2.6	0—3.6	0—6.5
	合计	1—10	4.1—107.0	0.3—6.2	0.8—27.0	0.5—15.4	1.6—48.5

注:置信度(α)=95%。

(三) 嫩梢增殖的生产效应

在组培苗工厂化生产中,建立起能连续增殖大量嫩梢,并可不断提供这些嫩梢作为生根及继代培养的培养体(或称之为试管母本),是至关重要的。它如同常规扦插繁殖中的采穗株一样,在无性系繁殖中起决定性作用。据我们长期实践得知:一般在良好的条件下繁殖杉木,

组培嫩梢的生根率可达80%左右,移栽成活率可达70%左右,初代外植体接种萌发率可达50%左右。按此估计,如用1年生的实生杉木苗为母本,取表4中年产Ⅱ级嫩梢值(36.1—87.9)的平均数,则每一正常萌发的外植体每年平均可生产供生根的嫩梢62根,预计产生商品苗数=供生根的嫩梢数×生根率×移栽成活率=62×80%×70%=34.7株。这样按照工厂化的生产所需要的指标及劳动生产率和上述的技术经济指标,就不难推算出所需的设备、人工、能源资本等重要经济总指标,从而可为工厂化生产流程提供以试验为依据的较为正确的成本核算方法。鉴于林木生产的效益涉及到直接、间接、经济、社会诸方面,小试的核算结果尚有待中试及大规模生产实践加以证实。为此,更为详细的生产效应须待以后深入研究再加以解决。

参 考 文 献

- [1] 阙国宁, 1980, 杉木组织培养的初步研究, 林业科学(增刊), 137—140.
- [2] 阙国宁, 1983, BA和IBA对离体培养的杉木芽分化和生长的影响, 林业科学, 19(4), 406—409.
- [3] Bonga, J. M., 1982, Vegetative propagation in relation to juvenility, maturity, and rejuvenation in tissue culture in forestry, Ed. by Bonga J. M. and Durzen D. J., 387—406.
- [4] Faver J. M. et al., 1987, in vitro growth of buds taken from seedling and adult plant material in *Quercus robur* L., Plant Cell Tiss. Org. Cult., (8), 49—60.
- [5] Blitjo G. M. et al., 1987, Role of exogenous reduced nitrogen and sucrose in rapid high frequency somatic embryogenesis in *Medicago sativa*., Plant Cell Tiss. Org. Cult., (10), 11—19.

AN ANALYSIS OF SHOOT MULTIPLICATION AND REJUVENATION OF CHINESE-FIR IN VITRO

Que Guoning

(The Research Institute of Subtropical Forestry CAF)

Abstract Segments of stem cutting from 1- 5- and 10-year-old Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*) were cultured in vitro on GN ($\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^- = 1:2.86$) medium containing BAP (0.75 mg/l) and IBA (0.25 mg/l). After four successive subculture lasted for one year, the results show that there is a great difference in yields of shoots and nursery stocks due to different ages of maternal plants of the explants. For example, an explant which was one year old obtained 170.3—445.7 shoots on average, including 78—194.9 efficient shoots. Among these shoots there were 11.1—25.1 shoots of 1 degree (advanced, able to be on subculture); 36.1—87.9 shoots of 2 degree (moderate, able to be rooted) and 29.5—78.6 shoots of 3 degree (to be needed to subculture). And it is estimated that the yield of nursery stocks can reach 34.7 on average.

With the increase of ages of maternal plants of the explants, the above data decreased. However, the yield of shoots per explant, 5- and 10-year-old, was 4.1—234.3 because of an effect of rejuvenation in vitro as well as a great difference in shoot multiplication. Thus, there is a possibility in selecting rejuvenated cultures. Besides, this paper put forward a preliminary analysis on the effect of production of shoot multiplication.

Key words *Cunninghamia lanceolata*; in vitro; multiplication; rejuvenation

第20届美国南方树木改良会议概况及几点建议

应美国林务局克鲁格博士邀请于1989年6月17日—7月11日参加了第20届美国南方树木改良会议。与会代表共214人,主要来自美国南方的大学、科研、公司、试验站、种子园等;其次为澳大利亚、日本、芬兰等国的代表。会议共开二天半,会后进行了参观访问。

美国有威望的林木遗传专家A·E施昆来斯在会上作了重要发言。他说美国南方树木改良已有40年历史,并已取得较大成绩。截至1987年已有85%造林用苗是采用经改良的种子育成的,生长率的遗传增益达到5—15%(其他性状也有增益)。现在美国南方已营建种子园3946 ha,年产苗13亿株,可造林75万 ha。美国林木遗传育种取得的进展主要是公司、大学、政府机构密切合作的结果。北卡名誉教授布鲁斯卓贝尔在闭幕会上指出,树木改良在世界上特别是热带地区进展很快,引种成功的关键是种源的差异和培育当地小种;林木改良的无性繁殖、数量遗传、生物技术等几个领域值得强调,利用遗传潜力与育林措施结合的经验更要推广。

会议前后参观了华盛顿国家树木园、纽约植物园及一些试验站、种子园。国家植物园于1927年成立,占地180 ha,是一个植物改良研究机构,也是一个供教育与观赏的园地。

通过会议和参观访问,有以下几点体会和建议:①必须加强科研和生产的密切协作。美国南方林木改良工作所以成绩显著,主要是以三个大学为中心组织公司、试验站、种子园、林场等协作的结果。他们共同研究制定方案(火炬松、湿地松为重点树种),定期召开经验交流会,及时将成果用于生产。我国于1986年起由林业部种子公司与我所组织全国林木引种及15种重要引进树种的扩大试验取得的较大成绩,也足以说明生产、科研协作的重要性。②树木改良工作必须制定出长期稳定的育种策略。引进树种,应取得原产地科研单位支持。③加强无性繁殖。无性繁殖重点是桉、松、落叶松属等。一些全同胞子代优良单株或杂交种必须采用无性繁殖,可用扦插、组培等办法,但也要研究如何尽快取得幼年发育阶段材料,以利生根、生长。对无性系繁殖的材料必须具备广泛基因基础,否则影响今后的选育。④树木园应作为引种基地。建议在我国按生态气候区建立十个左右树木园作为引种中心。树木园应有一定土地、苗圃、温室、标本室和稳定的科研队伍及资金来源。根据当地自然景观、气候和植物区系,将树木园建成具有一定特色的引种基地。

(中国林业科学研究院林业研究所 潘志刚)