

秃杉的组织培养*

成小飞 李文钿

(中国林业科学研究院林业研究所)

摘要 取秃杉吸胀种子的胚、发育10~12天和20天左右的苗端作外植体,进行不定芽诱导,结果表明:不定芽诱导率明显不同,分别为31.4%、80.0%和0。不定芽的发生率主要取决于外植体的发育时期,其次为BA浓度。BA的最适浓度为2.0 mg/L。割取嫩枝插入1/2MS+IBA 1.0~2.0 mg/L的生根培养基中,生根率可达80%以上。割取嫩枝后的基部转入MS+1.0~2.0 mg/L BA+0.5 mg/L IAA的培养基中,不定芽以每周期3~5倍的速度增加。

关键词 秃杉;组织培养;不定芽诱导;增殖

秃杉(*Taiwania flousiana* Gaussen)属杉科台湾杉属,是国家一级保护树种^[1]。秃杉既是珍贵树种又是速生树种。目前秃杉主要是用种子繁殖,由于其结实期晚、结实量少、种子发芽率低,加之秃杉自然分布区窄,近年来乱砍滥伐等原因造成秃杉林分减少,要扩大繁殖栽培,就需解决苗木问题。

自从1974年Gautheret首次在*Pinus palustris*胚培养中获得完整植株后,有关针叶树种通过组织培养获得完整植株的报道迅速增加^[2~8],其中*Pinus radiata*和*Sequoia sempervirens*的微繁殖技术已应用于大规模商业生产。对于种子稀少的珍贵树木和有性杂交获得的优良杂种,组织培养是一种很有潜力的微繁殖手段。

本试验以秃杉苗端作外植体,成功地诱导了不定芽产生,并获得了较高的生根率。

1 材料与方 法

1.1 培养基的配制

(1) 种子萌发培养基: 6.5 g/L 琼脂。

(2) 不定芽诱导培养基(M₁): 选用MS、MCM(针叶树培养基)、White和H培养基为基本培养基^[9,10],按L₁₆(4³)正交设计^[11],分别加入0.05~1.0 mg/L IAA和1.0~8.0 mg/L BA,附加3%蔗糖和6.0 g/L琼脂。

(3) 不定芽生长培养基(M₂): 1/2 MS附加2%蔗糖和6.5 g/L琼脂。

(4) 不定芽增殖培养基(M₃): MS+1.0~2.0 mg/L BA+0.5 mg/L IAA,附加3%蔗糖和6.0 mg/L琼脂。

(5) 生根培养基(M₄): 1/2 MS+0.5~4.0 mg/L IBA,附加2%蔗糖和6.5 g/L琼脂。

本文于1990年8月23日收到。

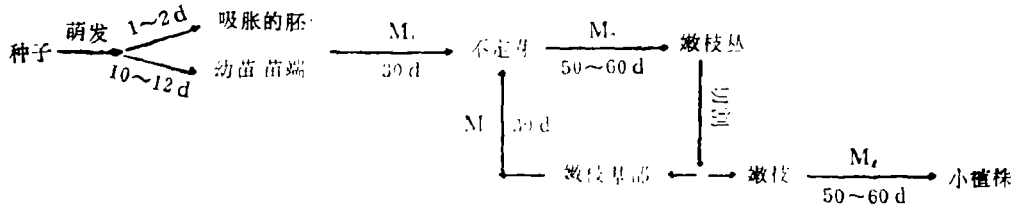
*该文属林业部攻关课题“珍稀濒危树种的繁殖与保存”的一部分。

以上培养基的pH值均调至6.8~7.0, 在0.8 kg/cm²压力下消毒20 min。

1.2 培养条件及培养程序

接种后的培养基置于光照培养箱内, 温度为24±1℃, 光照强度约为1500 lx, 光照周期为15 h光照, 9 h黑暗。生根培养时, 光照较弱, 约为800~1000 lx, 其余条件同上。

培养程序:



秃杉种子采自贵州雷公山。挑选含饱满胚的种子, 用60~70℃温水浸泡3~4 h(自然冷却), 70%酒精消毒1~2 min, 0.1% HgCl₂加几滴吐温80浸泡8~10 min, 无菌水冲洗4~5次。最后将种子接种于萌发培养基上, 置于光照培养箱内发芽。

分别取吸胀种子的胚、种子发芽10~12天和20天左右的苗端(包括子叶、顶端和部分下胚轴), 接种于M₁培养基上, 进行不定芽诱导。30天后(图版I-1,2), 将不定芽丛转入M₂培养基(一个月换一次新鲜培养基)。当嫩枝伸长到1~2 cm(约需50~60天(图版I-3,4)), 割取嫩枝, 插入M₄培养基中, 诱导生根。割剩后的基部切成约0.5 cm的小块, 转入M₃培养基。按以上方式, 不断重复, 每周期大约需3个月。

嫩枝插入M₄培养基50~60天后, 不定根长达0.5~1.0 cm(图版I-6)。将培养瓶移出培养箱, 置于窗台上锻炼一个星期, 然后将小植株从培养瓶中取出, 在自来水下洗除培养基, 移植于花盆中(基质为消毒过的林下腐殖质土), 用塑料薄膜覆盖, 以保持盆内湿度, 1~2天浇水一次。10天左右揭去塑料薄膜, 约一个月后小植株恢复正常生长(图版I-7)。

2 试验结果

2.1 不同时期外植体上不定芽发生

外植体转入M₂培养基30天后, 检查其不定芽发生(表1)。从表1可以看出, 外植体发育

表1 激素对不同外植体不定芽发生率的影响

不同外植体	IAA浓度(mg/L)	BA浓度(mg/L)	外植体数(个)	不定芽丛数(个)	不定芽发生率(%)
种子吸胀后的胚	—	1.0	51	16	31.4
	0.1	2.0	50	11	22.0
	—	4.0	30	褐化	
种子发芽 10~12d 的苗端	0.05	1.0	46	30	65.1
	0.1	2.0	48	38	80.0
	0.5	4.0	42	29	69.1
	—	—	—	—	—
种子发芽20d的 苗端	0.1	2.0	50	0	0
	0.5	4.0	48	1	0.02
	1.0	8.0	50	6	0.12

时期不同, 不定芽发生率明显不同。以种子发芽10~12天的苗端作外植体最好, 最高不定芽发生率为80.0%; 以吸胀种子的胚作外植体, 最高不定芽发生率仅为31.4%; 外植体为种子发芽20天的苗端时, 基本上无不定芽形成, 只有顶芽生长。

从表1还可以看出, 不同发育时期的外植体所需最适激素浓度不一样, 吸胀后的胚最适的BA浓度为1.0 mg/L, 随着BA浓度增加, 不定芽发生率下降, 部分不定芽出现玻璃化现象。当BA浓度增加到4.0 mg/L时, 外植体全部褐化死亡。10~12天的苗端最适的BA浓度为2.0 mg/L, 较前者高, 这是因为与胚芽相比, 苗端已开始进入营养生长, 要求较高浓度的外源激素作用, 才能改变其发育方向。

2.2 不同激素浓度和培养基对不定芽发生的影响

将发芽10~12天的苗端, 接入按 $L_{16}(4^3)$ 正交设计安排的 M_1 培养基上。转入 M_2 培养基30天后, 检查外植体上不定芽的发生, 结果见表2。

方差分析结果(表3)表明, 基本培养基类型和IAA浓度对外植体不定芽发生无明显影响, BA浓度对不定芽的发生影响极显著。在BA四个浓度水平1.0、2.0、4.0和8.0 mg/L上, 外植体不定芽发生率分别为65.5%、75.0%、55.8%和21.3%。其中以BA浓度为2.0 mg/L

表2 不同激素浓度和培养基类型对外植体不定芽发生的影响

试验号	培养基	BA(mg/L)	IAA(mg/L)	接种数(个)	不定芽丛数(个)	不定芽发生率(%)
1	MS	1.0	0.05	46	29	63
2	MS	2.0	0.1	48	39	81
3	MS	4.0	0.5	43	30	70
4	MS	8.0	1.0	35	7	20
5	MCM	1.0	0.5	36	23	64
6	MCM	2.0	1.0	48	34	71
7	MCM	4.0	0.05	46	25	54
8	White	8.0	0.1	32	6	19
9	White	1.0	1.0	48	33	69
10	White	2.0	0.5	46	32	70
11	White	4.0	0.1	38	17	45
12	White	8.0	0.05	40	8	20
13	H	1.0	0.1	33	22	67
14	H	2.0	0.05	40	32	80
15	H	4.0	1.0	30	15	50
16	H	8.0	0.5	38	10	26

表3 方差分析结果

方差来源	自由度	离差平方和	均方	F值	F_{α}
培养基	3	142.25	47.42	0.92	$F_{\alpha}(0.05) = 4.76$
BA浓度	3	6593.25	2197.75	42.82**	$F_{\alpha}(0.01) = 9.78$
IAA浓度	3	80.25	26.75	0.52	
剩余	6	308	51.33		
总和	15	7123.75			

时,不定芽发生率最高。基本培养基类型和 IAA 浓度虽然对外植体不定芽发生率无显著影响,但在不同的培养基上和附加不同浓度的 IAA,外植体不定芽发生率也有所不同。培养基中以 MS 培养基较好,其不定芽发生率为 58.5%,在 MCM, H 和 White 培养基上,不定芽发生率分别为 52.8%、55.8% 和 50.8%。IAA 浓度在 0.5 mg/L 水平上较好,不定芽发生率为 57.8%,其他浓度水平 0.05、0.1 和 1.0 mg/L 上的不定芽发生率分别为 55.0%、52.3% 和 52.0%。以上试验结果表明,以 MS 为基本培养基,附加 2.0 mg/L BA 和 0.5 mg/L IAA,可获得较高的外植体不定芽发生率。

2.3 不定芽的增殖

割取嫩枝后,将基部转入 M_3 培养基上,在激素的作用下,每个嫩枝的基部形成 3~5 个不定枝(图版 I-5)。转入 M_2 培养基上,不定芽生长约 60 天后,嫩枝伸长达 1~2 cm。割取上部诱导其生根,割取的嫩枝数为前一次的 3~5 倍,割取后的基部又转入 M_3 培养基中。经过三个周期的转换培养后,培养材料的不定芽发生能力没有减弱。如果一个外植体初次培养发生 4 个不定芽,经第二代增殖后,获得 12~20 个不定芽,第三代增殖后,不定芽数增加到 36~100 个。按理论推算每年可增殖 4 代,那么一个外植体经一年培养后可获得 150~700 个或更多嫩枝。

2.4 生根

割取嫩枝插入 M_1 培养基 50 天后的生根结果见表 4。从该表看,IBA 浓度为 0.5~4.0 mg/L 时,嫩枝生根率均在 75% 以上,IBA 浓度为 1.0~2.0 mg/L 时,嫩枝生根率高达

表 4 嫩枝生根结果

IBA 浓度 (mg/L)	嫩枝数 (个)	生根数 (个)	生根率 (%)
0.5	80	60	75.0
1.0	71	59	83.1
2.0	91	79	86.8
4.0	40	30	75.0

83.1%~86.8%。从生根情况看,IBA 浓度为 0.5~1.0 mg/L 时,嫩枝基部很少产生愈伤组织,生根条数一般为 1~3 根。随着 IBA 浓度增加,嫩枝基部逐渐产生愈伤组织,IBA 浓度为 2.0 mg/L 时,一些嫩枝基部有少量愈伤组织产生,生根条数多为 3~5 根。IBA 浓度增加到 4.0 mg/L 时,嫩枝基部产

生许多愈伤组织,根的生长受到抑制,生根率下降。因此,从该试验结果看,在秃杉嫩枝生根培养基中,IBA 的最适浓度为 1.0~2.0 mg/L。

3 讨 论

以吸胀种子的胚、发芽后 10~12 天和 20 天的苗端作外植体,其最高不定芽发生率分别为 31.4%、80% 和 0.12%,其中以幼小苗端作外植体,其不定芽发生率明显地高于其他两种。贺竹梅等曾以秃杉未萌发种子的胚作外植体,胚芽端不定芽发生率为 3%^[12]。以上结果说明,秃杉外植体上不定芽的诱导首先取决于外植体获取时期。Murashige^[8]指出,离体诱导形态发生的成功与否的关键在于选择适合的外植体。Aitken^[13]等也注意到了外植体的选择对辐射松(*Pinus radiata*)不定芽形成的重要性。他们取萌发后种子的子叶作外植体,其不定芽诱导能力要明显地高于以吸胀种子的子叶作外植体的诱导能力。Mott^[14]也采用同样方法来提高 *Pinus monticola* 不定芽形成的能力。Webb^[16]曾报道,在加勒比松

(*Pinus caribaea*) 胚培养中, 种子在无激素培养基中预培一段时间能加快不定芽的形成, 增加不定芽发生数量。此外, Aitken 等在辐射松子叶培养中还发现, 外植体年龄相差几天(5~10天)能显著地影响子叶上不定芽发生的能力。这些都说明选择外植体适合的发育时期是至关重要的。秃杉的试验结果也证明了上述报道具有普遍性。

Bonga^[16]指出, 在茎端发育的转变过程中, 存在着很大的可塑性。在茎端, 发育方向有规律性地变换, 如叶原基或侧芽原基的形成, 在每一转变过程中, 分生组织中原本存在的决定因素暂时部分地消失, 临时获得某种程度的器官发生能力。秃杉种子从休眠到幼叶发生过程, 即为从休眠状态到营养生长的转变过程, 发芽10~12天的苗端即处于这个转变过程中。这时的苗端已开始进入生长状态, 幼叶原基还未形成或仅为几个未分化的分生细胞¹⁾, 在外源激素作用下, 苗端或刚形成的幼叶原基, 容易改变发育方向, 形成不定芽。而种子萌发20天左右的苗端, 幼叶已形成, 苗端已完全进入营养生长状态, 获得了某种决定因素, 外源激素的诱导已不能改变其发育方向, 外植体只能继续朝正常苗端方向发展。

影响离体形态发生的第二个关键因素是选择适宜的培养条件(包括培养基、外源激素)。试验结果表明, 秃杉苗端培养对培养基要求不严, 无论是以高浓度盐的MS或MCM培养基, 还是以低浓度盐的White或H培养基作基本培养基, 对外植体不定芽发生均无明显影响。在秃杉幼苗苗端培养中, 决定不定芽发生的另一个关键因素是细胞分裂素。对大多数树种来说, 细胞分裂素是离体器官发生必需的外源激素, 细胞分裂素与生长素的适当配比通常决定器官发生的类型。在许多针叶树培养中, 仅附加细胞分裂素就可以诱导不定芽发生, 如辐射松子叶在仅加BA的培养基上, 就可以诱导分生组织形成和不定芽分化, 在不加BA的培养基上, 子叶则按正常发育的方向发展^[14]。秃杉苗端培养情况与上述类似, 外植体只有在加激素的培养基上, 不定芽才会产生, 在不加激素的培养基上, 苗端朝正常方向发育。在加BA的培养基上, 附加一定浓度范围的IAA对秃杉外植体不定芽发生无明显影响, 这也说明影响不定芽形成的主要外源激素是BA。BA一方面诱导不定芽形成, 另一方面又抑制其生长, 而且随着BA浓度的升高, 抑制作用加强。因此, 不定芽诱导形成后, 外植体必须转入无激素的培养基, 使不定芽生长。

该试验对秃杉的组织培养获得了较大的繁殖系数和较高的生根率。此外, 秃杉不定芽起源于分生组织细胞, 不通过愈伤组织¹⁾, 获得的植株具有稳定的遗传性, 能保持母本的遗传特性。

参 考 文 献

- [1] 郑万钧, 1982, 中国树木志, 中国林业出版社, 1: 310~311.
- [2] 郭达初, 1980, 北美红杉的器官发生与繁殖, 植物生理学报, 6(1), 91.
- [3] 阙国宁, 1982, BA和IBA对离体培养的杉木芽分化和生长的影响, 亚林科技, (4): 33~36.
- [4] Boulay, M., 1987, Conifer micropropagation: applied research and commercial aspects. In: *Cell and Tissue Culture in Forestry*, Bonga, J. M & D. J, Durzan (ed). Martinus Nijhoff Publishers. 3: 185~206.
- [5] David, A., 1978, *In vitro* propagation of gymnosperm, in *Tissue Culture in Forestry*. Bonga, J. M & D. J, Durzan (ed). Martinus Nijhoff/Dr W, Junk Publishers, The Hague. 72~108.
- [6] Thorpe, T. A. et al., 1984, Conifers. in *Handbook of Plant Cell Culture*, Sharp. W. R. (ed). Macmillan Publishing Company, New York. 12: 435~570.

1) 成小飞等, 1990, 秃杉离体培养的形态组织学研究, 待发表。

- [7] Isikawa, H., 1974, *In vitro* formation of adventitious buds and roots on hypocotyl of *Gyptomeria japonica*, *Bot. Mag.*, 87, 73~77.
- [8] Istvan, D., 1985, Experiments on *in vitro* propagation of *Sequoia sempetviens*, *Erdeszeti Fajpari Tud Kozl*, O, 163~167.
- [9] Bornman, C. H., 1983, Possibilities and constrains in the regeneration of trees from cotyledonary needles of *Picea abies in vitro*, *Physiol. Plant*, 57, 5~16.
- [10] Murashige, T. et al., 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture, *Physiol. Plant*, 15, 473~497.
- [11] 栾军, 1986, 试验设计的技术与方法, 上海交通大学出版社, 233.
- [12] 贺竹梅等, 1989, 不同培养条件对秃杉离体胚萌发生长的影响, 云南植物研究, 11(2), 227~230.
- [13] Aiteken, J. K et al., 1981, Influence of explant selection on the shoot forming capacity of juvenile tissue of *Pinus radiata*, *Can. J. For. Res.*, 11, 112~117.
- [14] Mott, R. L. et al., 1981, Tissue culture plantlets produced from *Pinus monticola* embryonic materials, *Forest Sci.*, 27, 299~304.
- [15] Webb, D. J., 1983, Adventitious bud formation on *Pinus caribaea* embryos treated with cytokinin, *Plant Sci. Lett.*, 32(1), 17~21.
- [16] Bonga, J. M. et al., 1987, *Cell and Tissue culture in Forestry*, Martinus Nijhoff Publishers, Boston, 1, 312.

Tissue Culture of Taiwaniana flousiana Gausсен

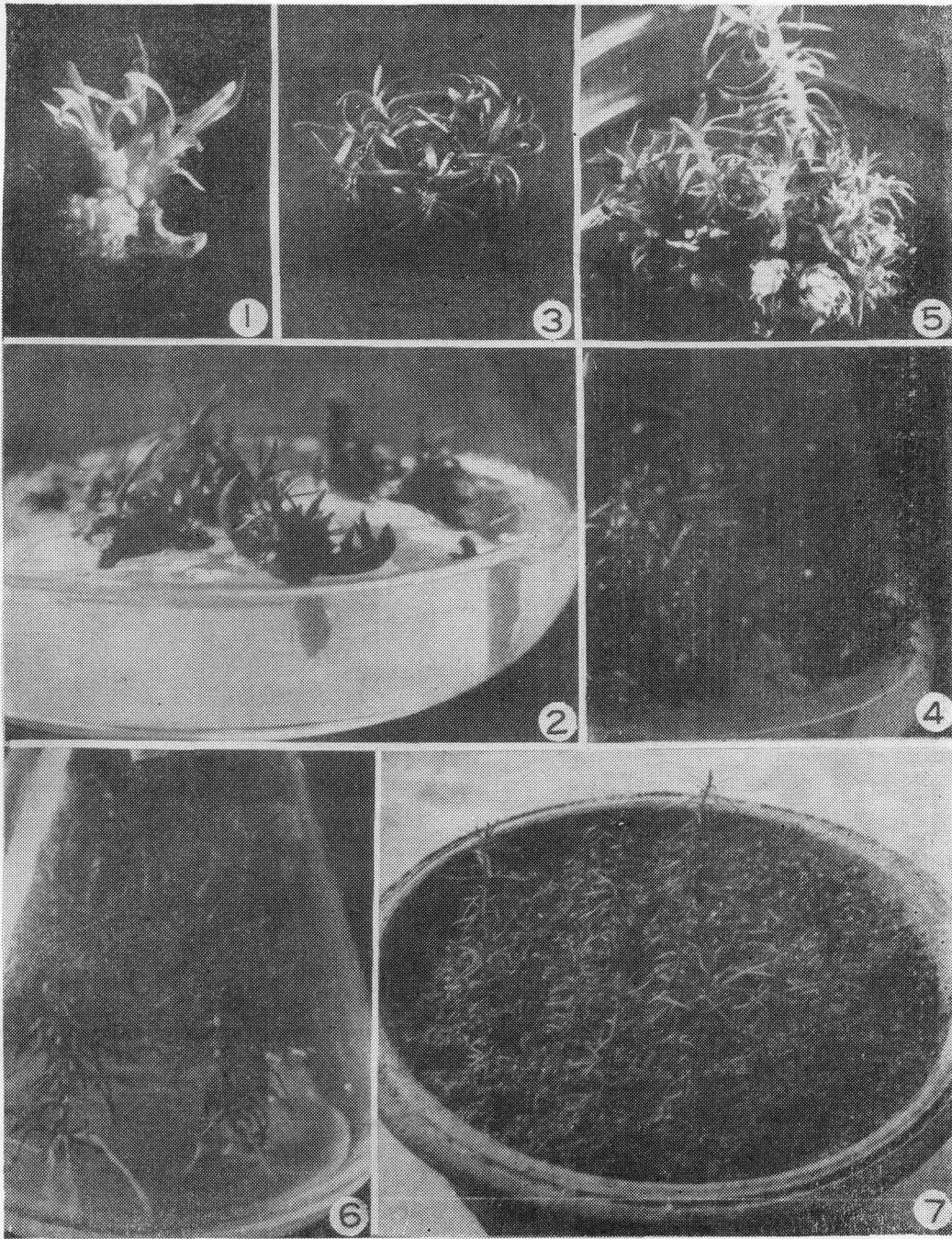
Cheng Xiaofei

Li Wendian

(The Research Institute of Forestry CAF)

Abstract The embryo of imbibitional seed, the apex of 10~12- or 20-day-old seedling (which included cotyledons, shoot apex and 2~3 mm hypocotyl stub) were used as explants to induce the adventitious buds. The result showed that the percentage of the induced adventitious buds of the 3 explants were 31.4%, 80% and 0 respectively. The proliferation of adventitious bud was firstly depend on the developmental stage of the explant, and secondly on the concentration of N⁶-benzyl adenine (BA). The optimum concentration of BA for the induction of adventitious bud was 2.0 mg/L. The elongated shoots were incubated in 1/2 Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 1.0~2.0 mg/L IBA to induce rooting, 80% of the shoots were rooted. The residual bases of the shoots were transferred to MS medium in the presence of 1.0~2.0 mg/L BA, and 3~5 adventitious buds were regenerated in each base.

Key words *Taiwaniana flousiana*; tissue culture; adventitious bud; proliferation



1、2. 示苗端和子叶上形成的不定芽； 3、4. 示苗端伸长的不定枝丛； 5. 示割取嫩枝后基部再生成的不定芽丛；
6. 示嫩枝生根； 7. 示移栽一个月后的小植株(图 1、3、5 培养物系从三角瓶中取出，用体视显微镜拍摄)。