

文章编号:1001-1498(2005)01-0102-04

北美红杉优良无性系组培快繁技术研究*

陈芳,马显达,陈娟,左显东

(云南省林业科学研究院,云南昆明 650204)

关键词:北美红杉;无性系;组织培养

中图分类号:S722.3⁺7 文献标识码:A

Study on Fast Propagation of Fine Clones of *Sequoia sempervirens*

CHEN Fang, MA Xianda, CHEN Juan, ZUO Xiandong

(Yunnan Academy of Forestry, Kunming 650204, Yunnan, China)

Abstract: In order to propagate and cultivate *Sequoia sempervirens*, taking 63 clones introduced from France as samples, the study on techniques and measures of tissue culture of *Sequoia sempervirens* was carried out from the aspects of sample preparing, explant differentiation inducing, bud propagating, and root generating. The results showed that the optimum medium for inducing bud differentiation was MS + 6-BA 1.5 mg L⁻¹ + KT 2.0 mg L⁻¹, root medium was 1/2MS + IBA 1.0 mg L⁻¹ + NAA 2.0 mg L⁻¹.

Key word: *Sequoia sempervirens*; clone; tissue culture

北美红杉 (*Sequoia sempervirens* (Lamb.) Endl.) 简称红杉。又名世界爷、美国红杉树,为杉科 (Taxodiaceae) 单种属植物,世界上稀有的子遗树种,也是世界著名的速生珍贵大径级用材树种和巨大锯木工业的主要原料^[1,2]。国外对北美红杉的组培研究较多,并进行了老树复幼工作^[3,4]。由于目前红杉在国内尚属引种阶段,种源极少,且种子繁殖后代分化较为严重,2000年4月云南省林科院从法国引进了63个优良无性系,为使这些无性系得以扩繁,结合前期已引种的红杉开展了北美红杉组织培养研究,以便为批量生产优良无性系提供理论基础和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料及处理

材料取自云南省林科院1975年从杭州植物园引种的优良母株当年生枝条茎段、2年生枝条茎段、萌蘖茎段以及从法国引进的63个优良无性系的1年生枝条(由于材料从法国引进,部分无性系太少或

老化或带有细菌未能彻底灭菌,只保留下来25个优良无性系),材料采集后,去叶冲洗干净,在无菌条件下,用0.1%升汞消毒5min,再用无菌水冲洗4~5次,然后切取茎尖约5~10mm,接种在不同诱导固体培养基上进行初代培养。

初代培养经60~75d后,切取新萌发的新梢,转入增殖培养基上进行增殖培养,继代培养3次后,切取1.5~2.0cm的绿苗进行生根试验^[5~7]。

1.2 培养基的制备

诱导分化培养基:以MS (Murashige and Skoog, 1962) 为基本培养基,附加不同浓度配比的KT(6-糠基氨基嘌呤)、BA(6-苄基氨基嘌呤)、NAA(α -萘乙酸)、蔗糖30g L⁻¹,琼脂0.6%,培养基的pH值调至5.6~5.8;生根培养基:以1/2MS为基本培养基,附加IBA(吲哚丁酸)、NAA、IAA(吲哚乙酸),蔗糖5~20g L⁻¹,培养基的pH值调至5.8。

1.3 培养条件

培养室温度20~28℃,光照强度3000~

收稿日期:2003-04-13

基金项目:国家林业局“948”项目“北美红杉优良种源及无性系引进”(项目编号99-4-05)

作者简介:陈芳(1965—),女,广东番禺人,高级工程师。

* 本试验得到了台湾中央研究院植物研究所黄丽春研究员的指导,特致谢意。

5 000 lx,光照时间 12 h d⁻¹。

1.4 试验设计

试验采用对比试验设计,每个处理接种外植体 10 个,3 次重复。形成丛生芽后,统计每个外植体出芽的个数,计算芽增殖率并进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 芽的诱导与增殖

2.1.1 外植体类对芽增殖率的影响 以材料较多的 1975 年从杭州植物园引种的优良单株为取材外植体,以 MS + BA2.0 mg · L⁻¹ + KT1.5 mg · L⁻¹ 为培养基,进行外植体种类选择试验,北美红杉的离体培养,从外植体接种到丛生芽形成时间比较长,约需 3 ~ 4 个继代周期,即 180 ~ 240 d。而外植体的种类(年龄)对芽增殖有明显影响(表 1)。从表 1 可以看出,外植体年龄越大,繁殖越低。2 年生枝条经 3 次继代增殖率只有 183%,而生理年龄最幼嫩的萌芽条作外植体,增殖率达 573.3%,结果表明,外植体越幼态增殖率就越高。

表 1 不同外植体种类对芽增殖的影响

外植体种类	接种数/个	形成丛生芽数	平均增殖率/%
当年生枝条茎段	30	123	410.0
2 年生枝条茎段	30	55	183.0
萌芽茎段	30	172	573.3

2.1.2 不同培养基对芽增殖的影响 为了选择红杉芽增殖的适宜培养基,以材料较多的 1975 年从杭州植物园引种的优良单株为取材外植体,选用了无机盐含量较高、微量元素种类较全的 MS 培养基,无机盐中等含量的 H 培养基和无机盐含量较低的 WH 培养基等 3 种基本培养基作试验。结果表明,红杉带腋芽茎段在 MS 培养基中,初始培养经 3 ~ 4 个继代周期形成丛生芽,芽增殖系数为 5.73 倍,处理间差异较显著。而在丛生芽继代培养中,其结果也是一致的。这就说明,红杉适宜在无机盐浓度较高的 MS 培养基中生长,在 H 和 WH 培养基中芽增殖系数较低,均不宜采用(见表 2)。

表 2 不同培养基对红杉芽增殖的影响

培养基	茎段初代培养	丛生芽继代培养
	增殖系数/倍	增殖系数/倍
MS	5.73	5.62
H	2.29	2.53
WH	1.43	1.70

2.1.3 细胞分裂素对芽增殖的影响 研究细胞分

裂素对红杉离体培养芽增殖的效应,试验在 MS 培养基中附加不同浓度的细胞分裂素 BA 和 KT。试验结果表明,细胞分裂素对芽增殖和生长是必不可少的(表 3)。从表 3 可以看到,在无任何细胞分裂素的对照组中,培养的芽及茎段大多只能形成单芽,基部少量形成丛芽。BA 和 KT 在一定浓度范围内,对腋芽茎段的初始培养和丛生芽继代培养的芽增殖有促进作用,但 KT 作用明显高于 BA。同时,在 BA 或 KT 处理中,浓度超过 3.0 mg · L⁻¹,芽增殖系数下降,而当 BA 和 KT 配合使用时,初始培养和丛生芽继代培养的芽增殖系数都有显著提高。当 BA2.0 mg · L⁻¹ 和 KT1.5 mg · L⁻¹ 配合使用时,芽增殖系数最高,分别达到 5.73 倍和 6.41 倍,显著地大于其它处理组,且丛生芽生长健壮。这再一次证明了 2 种细胞分裂素配合使用对芽增殖互作效果好。但是,当 BA 浓度 2.5 mg · L⁻¹,KT2.0 mg · L⁻¹ 或再加大用量时,芽增殖系数反而会降低,说明红杉茎段离体培养中,2 种细胞分裂素配合使用时,要有适当的比例。据本试验初步结果,促进红杉离体培养的芽增殖最佳培养基为 MS + BA2.0 mg · L⁻¹ + KT1.5 mg · L⁻¹。

表 3 外源激素对红杉离体培养增殖的影响

外源激素/(mg · L ⁻¹)		茎段初代培养	丛生芽继代培养	芽生长健
BA	KT	增殖系数/倍	增殖系数/倍	壮程度
0	0	1.0	1.0	+++
1.0	0	2.4	2.8	+++
2.0	0	2.9	3.1	+++
3.0	0	3.0	3.3	++
4.0	0	2.5	2.7	+
0	1.0	2.6	2.9	+++
0	2.0	3.3	3.7	+++
0	3.0	3.8	3.9	++
0	4.0	2.7	3.2	++
1.5	2.0	4.6	5.1	+++
2.0	1.5	5.73	6.41	+++
2.5	2.0	4.18	4.32	++
3.0	2.0	3.5	3.9	++

2.1.4 不同无性系芽增殖情况 诱导芽分化培养基采用 MS + 6-BA2.0 mg · L⁻¹ + KT1.5 mg · L⁻¹,将从法国带来的 63 个无性系的茎尖及茎段外植体接种在诱导培养基上,置于培养室培养,经 30 ~ 35 d 培养,茎尖开始生长,40 ~ 45 d 长出新梢。茎段外植体接种后 35 ~ 40 d,侧芽开始萌动,逐渐伸长。60 d 后将外植体材料转移到新鲜培养基上继续培养,茎尖和侧芽逐渐形成丛生芽。以后不断切割继代,芽丛不断增殖,60 ~ 75 d 继代 1 次,增殖率可达 3 ~ 6 倍。

表 4 列出了从法国带来的 25 个无性系试验统计材料(其余由于材料太少或老化或带有细菌未能

彻底灭菌,未能保留下来)。无性系间芽增殖率差异不明显,只是13、18、93号在第10个月时芽增殖率稍高点,达5~6倍。

表4 不同无性系芽增殖率的差异

无性系号	增殖率/倍				
	第2个月	第4个月	第6个月	第8个月	第10个月
3	1.8	2.1	2.3	2.9	3.1
7	1.5	1.8	2.6	3.1	3.2
9	1.7	2.1	3.2	3.6	3.8
10	1.2	2.6	3.1	4.4	4.6
11	1.6	2.7	3.5	4.1	4.7
13	1.5	2.5	3.4	4.9	5.1
18	5.5	5.4	5.1	5.4	6.1
22	1.3	2.4	3.1	3.9	4.3
24	1.1	2.1	3.7	3.1	3.1
25	1.4	2.1	3.7	3.5	3.7
26	1.6	1.9	3.4	3.1	3.0
27	1.7	2.5	3.2	3.2	3.4
28	1.8	2.6	3.4	3.5	3.4
29	1.1	2.3	3.5	3.6	3.7
32	1.9	2.5	3.6	3.1	3.8
36	1.4	2.8	3.4	3.4	3.5
37	1.2	2.1	3.7	3.1	3.7
39	1.3	2.3	3.9	3.7	3.2
40	1.2	2.6	3.1	4.1	3.8
41	1.2	2.1	3.0	4.5	4.7
47	1.5	2.4	3.4	3.2	3.4
49	2.1	2.7	3.4	4.5	4.6
93	3.3	2.8	3.9	4.8	5.1
101	1.2	2.5	3.1	3.8	4.1
105	1.7	2.1	3.3	3.4	3.5

2.2 壮苗培养

基本培养基为MS,不附加激素,培养条件同上。将生长于继代培养的丛芽切成小丛接种到壮苗培养基中,60~90 d后,小芽长高至2 cm以上,即可切取这些单苗转入生根培养基中培养。在壮苗培养阶段芽的生长主要表现为生长周期不同,经每月抽样5瓶检查统计,其中60%小芽长高2 cm以上的单芽所需的时间据月份不同而不同,2—3月,平均85 d,4—10月,平均为60 d,11—1月,平均为90 d。

2.3 根的诱导

生根试验以18号无性系进行,将生长至2~3 cm的健壮红杉小苗接种在生根培养基上,为了选择促进小苗生根快,根系发育好的生长素,试验以1/2MS为基本培养基,附加不同浓度的IBA和NAA,结果见表5。从中看到,在没有生长素的对照组中,接种30 d后,试管苗没有生根。而在培养基中附加IBA和NAA的对红杉试管苗生根有明显促进作用,但IBA效果明显高于NAA。在IBA处理组中,15 d即有少量苗生根,当IBA浓度为5.0 mg L⁻¹时,接种后15 d生根率为10.1%,30 d后达91.5%,但苗基

部膨大,组织疏松,根系虽然发达,但根脆易断,移栽成活率不高;而NAA和IBA配合使用,尽管生根率只有72.6%,但根系发育较好,在温湿度适宜的条件下,移栽成活率可达80%以上。

2.4 试管苗的移栽

将已生根的瓶苗移出培养室,放置在散射光较强处炼苗,使瓶苗在出瓶前充分进行光、湿、温的锻炼。移出3 d后拧松瓶盖,5 d后将瓶盖揭开,7 d后小心倒出瓶苗,用自来水冲洗,洗净培养基,并直接移植到塑料大棚或玻璃温室的苗床上。需要注意的是瓶苗出瓶前,瓶盖必须在拧松2 d后才揭,不能一下揭开,否则瓶苗容易萎焉。出瓶移植成活率与生长季节有关,2—3月、6—8月成活率较高,10月成活率开始下降,4—5月移栽成活率较低,这与昆明当时气温较高,湿度较小有关。

表5 红杉试管苗生根诱导试验

生长素/(mg L ⁻¹)		生根率/%				
IBA	NAA	7 d	15 d	20 d	25 d	30 d
0	0	0	0	0	0	0
0.05	0	0	0	0	0	0
0.1	0	0	0	0	0	0
1.0	0	0	0	0	0	0
2.0	0	0	2.5	33.2	38.4	40.1
5.0	0	0	10.1	58.7	90.5	91.5
0	0.05	0	0	0	0	0
0	0.1	0	0	0	0	0
0	1.0	0	0	0	0	0
1.0	2.0	0	0	18.3	30.4	72.6

3 小结

(1) 研究采用芽器官离体培养繁殖,以芽繁芽,芽器官未经愈伤组织阶段,有利于各优良无性系遗传性状的稳定。

(2) 红杉的离体培养试验,从外植体接种到丛生芽的形成要经历3~4个继代周期培养,约需180~240 d。说明红杉不定芽细胞启动迟缓,这与该树种遗传特性有关外,或是否在固体培养基上培养不太适合。有待于进一步采用液体震荡培养研究。

(3) 试验表明,在同一培养基中,红杉不同无性系芽增殖差异不明显,而生根受多因素的制约,生根率主要受培养基无机盐浓度、生长素的种类及浓度、母株年龄、季节、光照等因素的影响外,其他因子还有待进一步的试验研究。

(4) 本试验得出红杉适宜增殖培养基为MS+6

BA1.5 mg \cdot L $^{-1}$ + KT2.0 mg \cdot L $^{-1}$, 生根培养基为 1/2MS + BA1.0 mg \cdot L $^{-1}$ + NAA2.0 mg \cdot L $^{-1}$ 。

(5) 北美红杉生长周期长, 而且树体特高大, 采种甚困难。实生苗遗传变异大, 扦插苗株形不佳。因此, 美国辛普森公司每年生产红杉组培苗达百万株供造林, 红杉优良无性系离体培养是解决我国当前和将来所需种苗问题的有效途径。

参考文献:

[1] 左显东, 祁容频, 王懿祥, 等. 北美红杉在我国的引种及其生态

适应性[J]. 云南林业科技, 2000(4): 36~40

[2] 左显东, 白尚斌, 邵金平, 等. 北美红杉在云南的引种成效及其造林展望[J]. 云南林业科技, 2003(3): 1~10

[3] Li-Chun Huang, Suwen Z A. Rejuvenation of *Sequoia sempervirens* by repeated grafting of shoot tips onto juvenile rootstocks in vitro[J]. Plant Physiol, 1992, 98: 166~173

[4] Arnaud Y, Franclet A. Micropropagation and rejuvenation of *Sequoia sempervirens* (Lamb.) Endl.: a review[J]. Ann Sci For, 1993, 50: 273~295

[5] 谭文澄. 观赏植物组织培养技术[M]. 北京: 中国林业出版社, 1991

[6] 李云. 林果花菜组织培养快速育苗技术[M]. 北京: 中国林业出版社, 2001

[7] 韦三立. 花卉组织培养[M]. 北京: 中国林业出版社, 2001

欢迎订阅《北京林业大学学报》

(美国工程索引(EI)收录期刊)

邮发代号: 82—304

国内定价: 10 元/期

《北京林业大学学报》是教育部主管、国内外公开发行的全国性林学与森林生物学学术期刊。本刊拥有以北京林业大学、中国科学院、中国林业科学研究院、国内其他重点综合性大学、农林院校、工科院校以及国外有关科研机构 and 大学等单位的研究人员为主体的作者队伍。

《北京林业大学学报》是中国自然科学核心期刊、中文核心科技期刊、科技部“中国科技论文统计源期刊”和中科院“中国科学引文数据库统计源期刊”。

《北京林业大学学报》被中科院列入中国自然科学学术期刊排行榜(农林类)前 10 名, 并荣获第 2 届全国期刊奖提名奖等多项全国优秀期刊奖。

连续收录《北京林业大学学报》的国内外著名检索期刊和数据库有: 美国工程索引(EI)、俄罗斯《文摘杂志》、英国“国际农业与生物科学研究中心”数据库(CABI)、英国《动物学记录》(ZR)、中国科学引文数据库、《中国生物学文摘》、中国林业科技文献数据库等。

《北京林业大学学报》为双月刊, 大 16 开本, 单月月底出版。国内由北京市报刊发行局总发行, 全国各地邮局收订。如当地邮局订阅不便或错过征订时间, 也可直接汇款向本刊编辑部订阅。

邮编、地址: 100083 北京市清华东路 35 号《北京林业大学学报》编辑部

发行电话: 62338397 刘大林先生

发行电子信箱: limz@bjfu.edu.cn