

东方杉的组织培养繁殖技术研究

楼文阜¹, 陈 权¹, 张朝君¹, 董举文¹, 唐 寅¹, 张 军¹, 宋学孟¹, 王凌健², 杨远方³

(¹上海光兆植物速生技术有限公司, 上海 201801;

²中国科学院上海植物生理生态研究所, 上海 200032; ³新加坡南洋理工大学, 新加坡 639798)

摘 要: 以东方杉大树基部当年生的幼嫩萌枝为外植体, 进行了组织培养技术研究。结果表明, 外植体的最佳消毒方法为 75% 酒精消毒 30~60 s 后用升汞 0.2% 浓度消毒 10~15 min。采用茎段微型扦插和诱导丛生芽的方法来增殖扩繁, 适宜东方杉芽增殖培养基为: MHJ + BA 0.5 mg/L + NAA 0.05 mg/L + L-谷氨酰胺 0.5 g/L + 活性炭 5 g/L + 蔗糖 2%, 茎段腋芽萌发率可达 90%。芽伸长生长的培养基为: MHJ + L-谷氨酰胺 0.5 g/L + 活性炭 5 g/L + 蔗糖 2%, 35 d 平均增高 4.2 cm。试管苗的生根培养基为: 1/2 MHJ + L-谷氨酰胺 0.5 g/L + 活性炭 5 g/L + 蔗糖 1%, 最高生根率达 75%, 以沙为培养基质的效果比琼脂好。生根的组培苗先在沙床上进行炼苗, 炼苗成活率达 87%, 然后移栽到带混合基质的营养钵中育苗, 移栽成活率可达 90%, 育苗 1~2 个月后移栽大田。

关键词: 东方杉; 组织培养; 芽增殖; 生根培养; 炼苗; 繁殖

中图分类号: S791.27; Q943.1 **文献标识码:** A

东方杉(*Taxodium mucronatum* Ten × *Cryptomeria fortunei* Hooibrenk ex Otto et Dietr.) 是我国著名林木育种家叶培忠教授于 1962-1963 年用墨西哥落羽杉(*Taxodium mucronatum*) (♀) 和中国柳杉(*Cryptomeria fortunei*) (♂) 进行杂交而获得的新树种, 又称为杂交墨西哥落羽杉^[1-3]。该树种树形高大优美, 呈半常绿, 生长快, 抗盐碱和耐水湿能力强, 具有较强的抗风能力^[3], 在城市绿化、沿海防风、湿地造林、盐碱地绿化、河堤林带建设等生态环境建设中具有较为重要的推广应用价值^[4]。适种区域可覆盖长江中下游地区以及华东、华南沿海地区, 1975 年上海引进种植以来, 生长表现良好。目前我国自然保存的东方杉树种资源已极其稀少^[3], 加强对该树种的保存、繁殖和推广有着重要的意义。

由于东方杉无自然有性繁殖能力^[3,5], 而且扦插无性繁殖较慢, 因此东方杉繁殖困难影响其推广应用。目前虽然可以通过嫩枝扦插繁殖获得种苗, 但繁殖速度慢难以满足对东方杉的推广应用需求^[6]。另外现有保存的东方杉资源很少, 大量采集插穗将使种质资源遭到破坏。因而采用组织培养快繁技术进行东方杉的繁殖和利用是保存东方杉树种资源、解决目前东方杉种苗繁殖最为有效的方法。本项目就东方杉的组织培养繁殖技术进行研究, 首次成功建立了利用茎段为外植体通过组织培养技术进行增殖并形成再生植株的繁殖技术。本文报道该项研究结果。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试材料为上海市浦东新区川沙林场采集的 2~3 年生东方杉扦插苗当年生的侧枝和树龄 30 年的东方杉植株基部当年生的萌枝。

1.2 方 法

1.2.1 外植体选择与消毒 对采集的东方杉枝条根据嫩枝的木质化程度分类, 切成 3 cm 小段。茎段用洗洁精进行表面清洗后, 流水冲洗 30 min。然后用 75% 酒精振荡消毒 30~60 s, 清水冲洗 3~4 遍。再用 0.2% 升汞溶液消毒 10~20 min, 在超净工作台上用无菌水冲洗 5~6 遍。

收稿日期: 2007-04-04 初稿; 2007-05-14 二改稿

基金项目: 上海市科学技术委员会农业科技领域重点攻关项目基金资助[项目编号: 063919116]

作者简介: 楼文阜(1977-), 男, 硕士研究生, 从事植物育种和组织培养技术研究。Tel: (021) 69156062

1.2.2 芽的诱导与增殖 把消毒后的茎段切掉切口发褐的两端,再切成长约 1 cm 的小段插在诱导腋芽的培养基上,芽诱导基本培养基采用 MS、TE^[7]、DCR^[8] 和自配的 MHJ(表 1),附加激素 BA 0.2~0.5 mg/L 和 NAA 0.05~0.5 mg/L 等。腋芽长出后切下新芽转接到芽伸长生长培养基上,生长到 4~5 cm 后再切成约 1 cm 的茎段进行芽诱导培养,利用茎段抽芽方式进行增殖。切下新芽后的茎段可继续培养诱导形成丛生芽,以此方式继续进行增殖。培养温度控制在 25~28 ℃,光照强度为 50~80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ 。培养容器采用有透气孔的封口膜包扎的玻璃广口瓶。

表 1 MHJ 基本培养基成分
Table 1 Composition of MHJ medium

大量元素 Macroelement		微量元素 Microelement		有机物 Organic matter	其他 Others		mg · L ⁻¹
NH ₄ NO ₃	800	H ₃ BO ₃	31	盐酸硫胺素 Thiamine hydrochloride	0.05	蔗糖 Sucrose	20 g/L
KNO ₃	950	MnSO ₄ · H ₂ O	15.16	盐酸吡哆醇 Pyridoxine hydrochloride	0.25	琼脂 Agar	6 g/L
KH ₂ PO ₄	270	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8.6	烟酸 Nicotinic acid	0.25	pH	5.8
MgSO ₄	450	KI	0.83	甘氨酸 Glycine	1		
CaCl ₂	440	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.25	肌醇 Inositol	450		
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.8	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.025				
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	37.3	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.25				

1.2.3 生根培养 切取新生长的 2 cm 高的小芽,摘去切口端的叶片,转接到生根培养基。或者把芽切下后先转接到芽伸长生长培养基,5~6 周苗 4~6 cm 时再转接到生根培养基上进行生根培养。生根基本培养基用 MS 和 MHJ,加激素 IBA 0.1~1.0 mg/L 和附加物 L-谷氨酰胺 0.5 g/L、活性炭 5 g/L。培养温度控制在 (25 ± 1) ℃,光照强度为 80~100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ 。培养容器采用有透气孔的封口膜包扎的玻璃广口瓶。

1.2.4 炼苗和移栽 生根的试管苗经清洗后,移栽到沙床上进行炼苗,1~2 周内需加盖遮阳网以避免阳光直射,并通过自动喷雾控制苗床空气湿度,保持组培苗叶片湿润不失水。新根长出后逐步降低沙床的湿度,待抽出新叶后移栽到营养钵中,移栽基质为大田园土、河沙、泥炭土和珍珠岩混合配制而成。

2 结果与分析

2.1 外植体选择与消毒

植物组织培养成功首先要选择合适的材料并通过消毒处理获得无菌外植体。本试验比较了东方杉当年萌生的硬枝和嫩枝的消毒方法(表 2),从无菌苗获取难易程度看,采取小苗上的当年生嫩枝或老树基部的当年生幼嫩萌枝条作为外植体效果较好,这些外植体容易消毒且抽出的腋芽较强壮。褐色的硬枝茎段和褐绿色嫩枝茎段的消毒比较困难,污染率高达 80% 左右。叶片已经张开的嫩枝消毒效果好,叶片紧包的顶芽难以消毒干净易受霉菌的污染。消毒试验表明在用 75% 酒精消毒 55~60 s 和 0.2% 升汞消毒 20 min 时消毒剂量过大,大量嫩枝被消毒致死。最佳消毒方法是 75% 酒精消毒 30~60 s(由材料老嫩确定时间),然后用 0.2% 升汞溶液消毒 10~15 min,这样可避免外植体的消毒损伤,并保持了较低的污染率,从而获得较多且健壮的无菌外植体进行下一步的组织培养。

表 2 不同外植体的消毒方法
Table 2 Disinfection methods of different explants

外植体材料 Explant material	75% 酒精/s 75% Ethanol	0.2% 升汞/min 0.2% Mercuric chloride	接种数 Number of stems	死亡率/% Mortality	污染率/% Contamination rate
褐色的硬枝茎段 Brown hardwood stems	60	20	32	0	81.3
褐绿色嫩枝茎段 Green ripewood stems	40	12	34	0	67.6
绿色的嫩枝茎段 Green softwood stems	30	10	40	0	20.0
嫩茎尖(叶片紧包) Stem tips	20	6	35	3	77.1
大树基部嫩的萌枝 Green softwood stems from basal trunk	30	15	40	0	12.5

2.2 腋芽诱导和芽增殖

经过消毒的茎段在初代培养中进行腋芽诱导,2 周后开始抽出新芽,综合出芽率和出芽质量调查发现培养基 MHJ + BA 0.5mg/L + NAA 0.05mg/L 较好(表 3),抽芽率达 64%,芽呈绿色而且健壮,生长速度较快,20 d 后芽平均长高 0.8 cm。在相同激素组合的条件下,TE 和 DCR 基本培养基抽出新芽有黄化现象,且生长缓慢。在 MS 基本培养基上茎段抽芽质量好于 TE 和 DCR,但在 MHJ 中表现更佳。比较发现 TE 和 DCR 培养基的无机盐离子浓度较低,MS 和 MHJ 培养基相对较高,说明培养基的无机盐离子浓度高有利于东方杉的生长,这与周音等^[6]报道的结果一致。

表 3 外植体在初代培养中腋芽诱导和生长状况
Table 3 Explants' axillary bud induction and shoot growth state

培养基 Medium	接种数 Stem number	抽芽率 / % Percentage of germination	芽高 / cm Mean shoot height	芽生长状况 Shoot growth state
TE + BA 0.5 mg/L + NAA 0.05 mg/L + Sucrose 3%	48	21	0.2	芽小而黄,生长缓慢 Small and yellow, growing slow
DCR + BA 0.5 mg/L + NAA 0.05 mg/L + Sucrose 3%	43	35	0.3	芽小而黄,生长缓慢 Small and yellow, growing slow
MS + BA 0.5 mg/L + NAA 0.05 mg/L + Sucrose 3%	44	45	0.5	芽呈绿色,生长较快 Green, growing fast
MHJ + BA 0.5 mg/L + NAA 0.05 mg/L + Sucrose 2%	50	64	0.8	芽呈绿色而健壮,生长较快 Green and strong, growing fast

待新芽长至 1 cm,切下小芽转接至单株生长培养基,接种 1 ~ 3 周,东方杉组培苗生长较慢,3 周后生长速度明显加快,35 d 平均增高 4.2 cm。试验分别比较了 MHJ 和 MS 培养基在附加 L-谷氨酰胺、活性碳和生长素(IBA)等添加物或激素对东方杉的伸长生长的影响(表 4),结果显示 MHJ 培养基的培养效果明显比 MS 培养基好,MHJ 培养基上附加了 L-谷氨酰胺 0.5 g/L 和活性碳 5 g/L 的效果较好,说明 L-谷氨酰胺和活性碳很大程度上促进东方杉的伸长生长(图版 1)。Van Winkle 等^[9]对活性炭在组培中的作用研究中也发现活性炭可提高道格拉斯杉组培苗生长率和活力。L-谷氨酰胺也被报道广泛应用于针叶树的体细胞胚胎发生研究中,对胚的诱导和分化都起到重要的作用^[10]。培养基中加生长素 IBA 对东方杉的生长无明显作用,基部切口处形成较多愈伤,反而有一定的抑制作用。周音等^[6]发现 IBA 和 GA₃对东方杉的芽伸长生长不起作用,HMI 对芽的伸长生长有明显的抑制作用。

表 4 单株在不同培养基上的伸长生长比较
Table 4 Comparison of elongation growth of plantlets on different media

培养基 Medium	20 d 平均增高高度 / cm Mean height growth within 20 days	35 d 平均增高高度 / cm Mean height growth within 35 days
MHJ + Glutamine 0.5g/L + Activated carbon 5g/L	1.00	4.2
MHJ + IBA 1.0 mg/L + Glutamine 0.5 g/L + Activated carbon 5 g/L	0.68	3.2
MHJ + Glutamine 0.5 g/L	0.34	2.7
MHJ + Activated carbon 5 g/L	0.38	2.9
MS + Glutamine 0.5 g/L + Activated carbon 5 g/L	0.28	2.0

试管苗长高后切成长 1 ~ 1.5 cm 的茎段进行循环增殖培养,比较 MHJ 和 MS 培养基及不同浓度 BA 对茎段抽芽率和芽生长质量的影响(表 5),结果表明,试管苗增殖生长培养基以 MHJ + BA 0.5 mg/L + NAA 0.05 mg/L + L-谷氨酰胺 0.5 g/L + 活性碳 5 g/L + 蔗糖 2% 的效果最好。

MHJ 培养基中 BA 浓度为 0.5 mg/L 时,芽直接从腋芽处抽出新芽(图版 2),腋芽处无明显膨大的白色愈伤,新抽芽先呈黄绿色,后变成健康的绿色,每段抽芽 1 ~ 3 个,芽粗壮,叶间距短,30 d 后芽平均高 0.8 ~ 1.2 cm;MHJ 培养基中 BA 浓度为 1.0 mg/L 时,每段抽芽 2 ~ 5 个,芽的茎细嫩,基部叶片间距较长,30 d 后芽高 0.3 ~ 1.0 cm。而 MS 培养基中抽出的芽生长较慢,每段可抽 1 ~ 3 个芽,芽粗短,30 d 后芽高 0.2 ~ 0.5 cm,顶端叶张开,基部叶紧包着茎秆不舒展,芽质量较差。BA 浓度的提高可提高每个茎段的抽芽数量,但是由于每个茎段上的芽数量多会引起芽变细变弱,为了控制增殖中芽的质量,BA 浓度不宜过高。增殖培养中采用单株生长到一定高度后进行试管内微型扦插诱导腋芽抽出新芽的方式来扩繁,茎段

增殖方式每 4~5 周增殖比例达到 1:5。已抽芽的茎段切下新芽后继续培养可形成丛生芽(图版 3),丛生芽的增殖方式每 4 周增殖比例可达 1:2.5 左右。

表 5 试管苗增殖培养基及其发芽率比较

Table 5 Effects of multiplication media on percentage of germination

培养基 Medium	接种数 Stem number	抽芽率/% Percentage of germination
MS + BA 0.5 mg/L + NAA 0.05 mg/L + glutamine 0.5 g/L + Activated carbon 5 g/L	100	80
MS + BA 1.0 mg/L + NAA 0.05 mg/L + Glutamine 0.5g/L + Activated carbon 5g/L	75	84
MHJ + BA 0.5 mg/L + NAA 0.05 mg/L + Glutamine 0.5 g/L + Activated carbon 5 g/L	100	90
MHJ + BA 1.0 mg/L + NAA 0.05 mg/L + Glutamine 0.5 g/L + Activated carbon 5 g/L	87	86

2.3 生根培养

选择了若干个不同的基本培养基并附加不同浓度的生长素进行东方杉的生根培养实验(图版 4),在 MS、TE、DCR、WPM、White 等培养基上都未获得生根苗,仅在 MHJ 培养基上获得了少量生根苗,但其生根周期较长,且生根率较低。以 MHJ 为基本培养基,进一步比较了不同离子浓度和培养基质对东方杉组培苗诱导生根的影响(表 6)。降低 MHJ 培养基的离子浓度 50% 可适当的提高生根率,增加活性碳对生根起到很大的促进作用,这可能是由于东方杉生长期间切口处易形成抑制根原基形成的代谢物^[11],活性炭能有效的吸附有害代谢物。60 d 后可以看到部分苗白色的根尖从基部切口处的愈伤上形成,3~4 个月根系可长达 3~5 cm,并有侧根形成(图版 5)。组培苗的生物个体大小影响东方杉的生根率,高约 4~6 cm 的苗在同样的培养周期内比高约 2~3 cm 的小苗生根率提高了 25%。琼脂为基质的培养基形成的根系白而嫩,培养基质用透气性更好的沙可明显提高生根率,115 d 生根率可达 75%,而且形成的根系粗壮,易于组培苗的移栽。

表 6 MHJ 培养基的浓度、培养介质和苗大小对组培苗生根的影响

Table 6 Effects of concentrations of MHJ medium, culture substances and plantlet size on rooting of tissue-cultured plantlets

培养基 Medium	培养介质 Culture substance	苗类型* Plantlet size	接种株数 Number of plantlets	生根率 /% Rooting rate
1/2 MHJ + Glutamine 0.5 g/L + Activated carbon 5 g/L + Sucrose 1%	琼脂 Agar	小苗 Small plantlets	100	30
1/4 MHJ + Glutamine 0.5 g/L + Activated carbon 5 g/L + Sucrose 1%	琼脂 Agar	小苗 Small plantlets	100	25
MHJ + Glutamine 0.5 g/L + Activated carbon 5 g/L + Sucrose 1%	琼脂 Agar	小苗 Small plantlets	100	19
1/2 MHJ + Glutamine 0.5 g/L + Sucrose 1%	琼脂 Agar	小苗 Small plantlets	100	3
1/2 MHJ + Glutamine 2 g/L + Activated carbon 5 g/L + Sucrose 1%	琼脂 Agar	大苗 Large plantlets	80	55
1/2 MHJ + Glutamine 0.5 g/L + Activated carbon 5 g/L + Sucrose 1%	河沙 Sand	大苗 Large plantlets	80	75

* 小苗是指把新抽的芽切下来的小苗,高 2~3 cm;大苗是指新切下的小苗在单株生长培养基上培养 5~6 周后的大苗,高 4~6 cm。
Small plantlets were the newly regenerated shoots 2~3 cm high cut from stems; Large plantlets were ones 4~6 cm high which had been cultured for 5~6 weeks on growth medium.

2.4 炼苗和移栽

生根的组培苗移栽到土壤前需要进行 4~6 周的炼苗,尤其是以琼脂为基质的培养基中生根的苗,需要移栽到沙床上在合适的温度和湿度条件下炼苗(图版 6),炼苗成活率可达 87%,待新的根系形成后移

栽到营养钵中。炼苗期间保持沙床湿润透气,太湿易引起苗基部腐烂或透气性差从而影响新根生长。炼苗初期保持幼苗叶片湿润不失水,苗床温度控制在 20 ~ 30 ℃ 为宜,用遮阳网遮阴避免阳光直射到苗上。高温天气,用遮阳网遮阴和喷雾等方法降温,最高温不超过 35 ℃,冬季苗床内极端最低温不低于 12 ℃。新根形成后的小苗可移栽到营养钵中(图版 7),移栽基质使用混合配制的基质(大田园土:河沙:泥炭土:珍珠岩=2:1:2:1),移栽前基质用杀虫剂、杀菌剂处理。最佳移栽时间为新根形成并长出新的嫩叶后,移栽前控制沙床的湿度使东方杉组培苗的根系逐渐老化,须根发达,根毛发育健全,有利于提高移栽成活率,本试验的移栽成活率达 90%。营养钵小苗护理生长 1 ~ 2 个月后即可移栽大田(图版 8,9)。

3 讨 论

在东方杉的组织培养繁殖过程中,除基本培养基的离子成分、激素和各种添加物对其生长起重要作用外,繁殖培养微环境控制也很重要,如对光照强度、温度、湿度、培养容器的透气性、培养容器内气体如 CO₂ 浓度等控制。本研究发现东方杉对光照强度比较敏感,提高光照强度可以有效地促进组培苗的生长,但对芽的诱导没有明显作用。研究结果表明,培养容器的透气性影响东方杉的生长发育,提高容器的透气性很大程度上提高了东方杉的生长速度,其代谢产物如乙烯等气体的影响还有待进一步研究分析^[12]。目前国内外对组织培养微环境中的各种培养因子的研究已更加深入与细化,这些研究成果对植物的组织培养工厂化生产提供了可靠的参考依据^[13,14]。如目前无糖培养技术或光自养繁殖技术在植物的无性繁殖上的应用已是越来越广^[15]。对培养微环境里的各种因子的更加细化和量化研究将有助于东方杉以及其他针叶树种的组织培养规模化繁殖育苗。

生根培养难是针叶树组织培养中常见的难题^[16]。东方杉生根困难的原因除了其本身的基因型外,还有树龄过大受到年龄阶段制约引起生根困难也是因素之一。针叶树母树枝条的年龄效应很明显,幼龄树枝条一般扦插生根率较高,但是 4 ~ 5 年以上树龄的枝条生根率明显下降,生根性状退化^[17,18]。目前已有报道东方杉在幼龄树上采集的枝条进行嫩枝扦插生根率在 80% 以上^[19,20],说明降低母树的年龄对东方杉的生根起到很重要的作用。通过组织培养获得的东方杉组培苗在一定程度上幼化了原来的树龄,明显提高了其生长势,其复壮效果要明显优于扦插繁殖。通过组织培养获得的东方杉再生植株与扦插苗的生长对比调查,发现组培苗从生长势和树形上都要优于扦插苗。另外对于目前分布在上海各种立地条件下的东方杉林中选出的优株,采用组织培养的技术进行繁殖是目前繁殖速度最快、复壮效果最好的方法。东方杉的组织培养繁殖技术研究成功为其商业化工厂化生产育苗奠定了技术基础,进一步完善该技术及降低生产成本将可很快应用于大规模生产育苗。

近几年国内外对针叶树种无性繁殖的研究取得了很大的进展,随着对生根生理基础分析、生根分子机理、植物激素的作用机理等的深入研究^[21-24],针叶树的大规模商业化苗木生产将具有很大的发展潜力。现在国内外在体细胞胚胎发生规模化繁殖针叶树苗上有了很大的突破,落叶松、火炬松等已在实验室里能够进行生物反应器规模化繁殖体细胞胚^[25,26]。通过研究体细胞胚胎发生建立东方杉利用体胚增殖来快速繁殖的技术体系将是开辟东方杉无性快繁的又一新技术途径。

参 考 文 献

- [1] 《中国树木志》编委会. 中国主要树种造林技术(上册)[M]. 北京:农业出版社, 1978:52.
- [2] 陈云鹏,潘士华,张建军,等. 利用 RAPD 检测技术推测杂交落羽杉群落间的亲缘关系[J]. 复旦学报(自然科学版), 2002,41(6): 641-645.
- [3] 张建军,潘士华,沈烈英,等. 东方杉的树种特征与生态价值[J]. 上海农业学报,2003, 19(3): 56-59.
- [4] 沈烈英,张建军,潘士华,等. 东方杉——我国自主育成的园林新树种[J]. 园林, 2003(5): 36-37.
- [5] Zhang Jianjun, Zhu Jianhua. Taxodiomeria(Taxodiaceae), An Intergeneric Hybrid Between *Taxodium* and *Cryptomeria* From Shanghai, People's Republic of China[J]. SIDA,2003,20(3): 999-1006.
- [6] 周 音,张智奇,刘金鹏,等. 东方杉不定芽的高频率分化研究[J]. 上海农业学报,2004, 20(3): 11-14.
- [7] 唐 魏,欧阳藩,郭仲琛. 火炬松胚性愈伤组织诱导和植株再生的研究[J]. 林业科学, 1998, 34(3): 115-119.
- [8] Gupta P K, Durzan D J. Shoot multiplication from mature trees of Douglas-fir and sugar pine[J]. Plant Cell Rep., 1985, 4: 177-179.
- [9] Van Winkle S C, Pullman G. S. The role of activated carbon in tissue culture medium[J]. Energiea,1995,6(6): 1-3.
- [10] Shinjiro Ogita, Hamako Sasamoto, et al. The effects of glutamine on the maintenance of embryogenic cultures of *Cryptometia Japonica*[J]. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant,2001,37: 268-273.

- [11] 陈伟. 酚类化合物对木本植物组织培养根形态建成的影响[J]. 福建林业科技, 1995(1): 51-53.
- [12] 江玲, 管晓春. 植物激素与不定根的形成[J]. 生物学通报, 2000, 35(11): 17-19.
- [13] 吴毅明. 植物组织培养的环境调节研究进展[J]. 中国生态农业学报, 2000, 8(1): 73-75.
- [14] 徐志刚. 组培微环境与规模化育苗设施环境调控的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2002.
- [15] 牟宁宁, 高亦珂. 植物无糖组培技术研究进展[J]. 林业科技开发, 2007(1): 10-12.
- [16] 王虹, 张金凤, 董建生. 针叶树组织培养繁殖技术研究进展[J]. 河北林业科技, 2004(2): 14-18.
- [17] 雷泽勇. 针叶树无性繁殖研究进展[J]. 防护林科技, 2001(1): 55-57.
- [18] 季孔庶, 王章荣, 陈天华, 等. 马尾松扦插的年龄效应及继代扦插复壮效果[J]. 浙江林学院学报, 1999, 16(4): 341-345.
- [19] 闵士元. 东方杉造林技术[J]. 林业实用技术, 2004(12): 11-12.
- [20] 孙强, 尹中明, 吴文, 等. 东方杉夏季嫩枝扦插育苗[J]. 中国花卉园艺, 2006, (14): 38-39.
- [21] 肖尊安, 熊红. 不定根发生机理的研究进展[J]. 生物技术通报, 2002(3): 31-34.
- [22] Brain Forde, Helena Lorenzo. The nutritional control of root development[J]. Plant and Soil, 2001, 232: 51-68.
- [23] Gina H Mohammed, William E. Vidaver. Root production and plantlet development in tissue-cultured conifers[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1988, 14: 137-160.
- [24] Tim R Marks, Sally E Simpson. Interaction of explant type and indole-3-butyric acid during rooting in vitro in a range of difficult and easy-to-root woody plants[J]. Plant cell, tissue and organ culture, 2000, 62: 65-74.
- [25] 贾彩凤, 李悦, 瞿超. 木本植物体细胞胚胎发生技术[J]. 中国生物工程杂志, 2004, 24(3): 26-29.
- [26] 张守攻, 邱宏伟, 韩素英, 等. 落叶松树种的体细胞胚胎发生与规模化技术体系[J]. 中国生物工程杂志, 2004, 24(6): 28-33.

Research on propagation of $\times$ *Taxodiomeria peizhongii* (*Taxodium mucronatum* $\times$ *Cryptomeria fortunei*) by tissue culture

LOU Wen-fu¹, CHEN Quan¹, ZHANG Chao-jun¹, DONG Ju-wen¹, TANG Yin¹,
ZHANG Jun¹, SONG Xue-meng¹, WANG Ling-jian², Jean Yong Wan Hong³

(¹Shanghai Guangzhao Plant Fast-Growing Technology Co., Ltd., Shanghai 201801, China;

²Shanghai Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai 200032, China;

³Nanyang Technology University, Singapore 639798)

Abstract: The shoots newly sprouted within one year from the basal part of mature tree of $\times$ *Taxodiomeria peizhongii* (*Taxodium mucronatum* $\times$ *Cryptomeria fortunei*) were used as explants, and the technology of propagation by tissue culture was studied. The results were as follows: the optimal disinfection of explants was to disinfect them with 75% ethanol for 30~60 s, and then with 0.2% mercuric chloride for 10~15 min; the stem cuttings were used to induce regenerated shoots and adventitious shoots; the appropriate medium of shoot multiplication was MHJ + 0.5 mg/L BA + 0.05 mg/L NAA + 2 g/L glutamine + 5 g/L activated carbon + 2% sucrose, and the germination percentage of stem's axillary buds could reach 90%; the elongation medium was MHJ + 2 g/L glutamine + 5 g/L activated carbon + 2% sucrose, and the shoot height growth was averagely 4.2 cm in 35 days; the rooting medium for test-tube plantlets was 1/2 MHJ + 2 g/L glutamine + 5 g/L activated carbon + 1% sucrose, and the highest rooting frequency was 75%; as culture substance, sand was better than agar; the rooted plantlets were firstly transferred to sand bed in greenhouse for 4~6 weeks of hardening off, in which the survival rate was 87%, and then into nutrition pot with a survival rate of 90%; after one or two months the regenerated plantlets were transplanted into field.

Key words: *Taxodium mucronatum* $\times$ *Cryptomeria fortunei*; Tissue culture; Shoot multiplication; Rooting culture; Hardening off; Propagation



1. 东方杉单株伸长生长 Elongation growth of plantlets of *Taxodiomeria peizhongii*; 2. 茎段腋芽诱导 Induction of stem axillary buds; 3. 芽增殖培养 Shoot multiplication; 4. 单株生根培养 Rooting culture of plantlets; 5. 生根的试管苗 Rooted test-tube plantlets; 6. 组培苗在大棚里炼苗 Hardening off of plantlets in greenhouse; 7. 移栽到营养钵的组培苗 Plantlet established in nutrition pot; 8. 移栽到大田的组培苗 Tissue-cultured plantlets transplanted into field; 9. 大田里育苗 1 年的树苗 Plantlets growing in field for one year

图版说明 Explanation of plate