

# 加拿大铁杉不定芽诱导及植株再生技术研究

刘宝光<sup>1</sup>, 田春雨<sup>2</sup>, 徐广云<sup>3</sup>

(1. 北华大学 林学院采育林创新中心, 吉林 吉林 132013; 2. 吉林市林业局林业总站 吉林 吉林 132013; 3. 永吉县金家林业工作站, 吉林 永吉 132217)

**摘 要:**以加拿大铁杉成熟的合子胚为外植体,进行了组织培养研究。成功地建立了加拿大铁杉的无性繁殖体系。结果表明:适宜愈伤组织诱导的培养基为,改良 P<sub>6</sub>+BA 2.5 mg/L+KT 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L+2,4-D 1.0 mg/L,愈伤组织诱导率达 91.5%;适宜不定芽分化的培养基为改良 P<sub>6</sub>+BA 2.8 mg/L+2,4-D 0.125 mg/L,不定芽分化率达 4.93 个/g;适宜不定芽伸长的培养基为不加任何激素的改良 P<sub>6</sub> 培养基,不定芽伸率达 34.5%;适宜生根诱导的培养基为:改良 1/2 P<sub>6</sub>+NAA 0.05 mg/L+IBA 0.05 mg/L,生根率达 20.5%;适宜练苗的基质为珍珠岩,成活率达 28.4%。

**关键词:**加拿大铁杉;组织培养;诱导  
**中图分类号:**S 791.17 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)19-0157-03

加拿大铁杉属松科铁杉属,又名铁云杉,高大乔木,树可达 30 m,是一种常绿针叶树种,在北美分布广泛,在加拿大南至美国佐治亚州,西至美国威斯康辛州地区均有分布,是宾夕法尼亚州的州树,具有重要经济价值和生态价值的树种<sup>[1]</sup>。木材被广泛应用于家具生产和建筑业,其树皮可以用来鞣制皮革。加拿大铁杉具有金字塔形树冠,枝条平展,树形优美,常被景观绿化所采用。国内应用的加拿大铁杉其种子、种苗都需要进口,价格比较贵。采用组织培养方法可以扩大苗木供应量,降低苗木价格,快速满足生产实际的需要,还可缩短引种驯化周期,提高苗木品质,加快优良品系的推广应用。因此,开展加拿大铁杉的组织培养研究,可使这一优良树种尽快实现其潜在价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

外植体来源于宾夕法尼亚州种子。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 外植体处理** 种子先在流水下冲洗 30 min,然后在超净工作台上用 75%酒精消毒 30 s,用无菌水冲洗 1 次,放入 1%次氯酸钠溶液消毒 10 min,无菌水冲洗 5 次,然后摆放在垫有纱布的无菌培养皿中,加入适量的无菌水,用封口膜封好置培养箱内培养。预萌发 5 d 后在超净台内打开封口膜,剥去种皮,用相同的消毒方法再消毒 1 次,待用。

**1.2.2 试验设计** 愈伤组织诱导试验:对 MS、SH 和改良 P<sub>6</sub><sup>[2]</sup> 基本培养基和附加激素 BA、KT、NAA 和 2,4-D 进行五因素混合水平的正交设计(表 1),试验中每个处理接种 20 瓶,每瓶接种 2~3 个外植体,种胚水平放置,15 d 后调查统计诱导率。不定芽诱导试验:根据愈伤组织诱导结果,不定芽诱导试验以改良 P<sub>6</sub> 培养基为基本培养基,对附加激素 BA、KT、NAA 和 2,4-D 作四因素十三水平的均匀设计,设定极值(表 2)后利用均匀试验设

表 1 愈伤组织诱导正交设计

水平	因素/ mg · L <sup>-1</sup>				
	培养基	BA	KT	NAA	2,4-D
1	MS	0.5	0.5	0.1	0.1
2	SH	1.0	1.0	0.5	0.5
3	改良 P <sub>6</sub>	2.0	2.0	1.0	1.0
4		2.5	2.5	1.5	1.5

表 2 不定芽诱导均匀设计

取值	因素/ mg · L <sup>-1</sup>			
	BA	KT	NAA	2,4-D
低值	0.2	0.2	0.1	0.1
高值	3.5	3.5	1.5	1.5

计软件进行试验设计,每处理接种 10 瓶,愈伤组织块半陷入培养基中,15 d 后调查统计诱导情况。不定芽伸长试验:去掉褐化的坏死组织,将具有芽点、生命力旺盛的愈伤组织转接到不定芽伸长培养基上,对植物激素种类和浓度进行筛选。采用 3 次重复的随机区组设计,20 d 后对不定芽伸长率进行调查统计。生根试验:生根以改良 1/2 P<sub>6</sub> 为基本培养基,对 NAA、IBA 浓度进行筛选。采用 3 次重复的随机区组设计,10 d 后对生根率、生根数和根长进行调查统计。移栽试验:以蛭石、珍珠岩和 1/2 珍珠岩+1/2 蛭石为练苗基质,采用 3 次重复的随机区组设计,25 d 后通过调查苗木成活率对基质进行筛

第一作者简介:刘宝光(1972-),男,吉林省吉林市人,硕士,工程师,现从事林木遗传育种研究工作。E-mail: liubaoguang2005@yahoo.com.cn。  
收稿日期:2010-06-17

选。上述培养基中均附加 2%蔗糖和 0.56%琼脂,用 NaOH 和 HCl 调节 pH 5.8。培养温度(24±2)℃,光照培养,光暗周期 16 h/8h,光强度为 46~48 μmol · m<sup>-2</sup> · s<sup>-1</sup>。

2 结果与分析

2.1 不同培养基和生长调节物质对愈伤组织诱导影响

剥离出的种胚接种到愈伤组织诱导培养基上,3 d 后子叶开始膨大,并逐渐变绿,7 d 后子叶表面开裂,裂口处有颗状的愈伤组织生成,颜色也变为深绿色,质地松软,此后愈伤组织生长迅速,20 d 后愈伤组织变得致密,表面变得光滑。不同的培养基( $F=55\ 602.972$ ;  $S=0.003$ )、BA( $F=4\ 556.093$ ;  $S=0.011$ )、KT( $F=937.426$ ;  $S=0.024$ )、NAA( $F=520.537$ ;  $S=0.032$ )和 2,4-D( $F=7\ 699.315$ ;  $S=0.008$ )对愈伤组织诱导的影响均达到了显著水平,对愈伤组织诱导的影响:基本培养基>BA>2,4-D>KT>NAA(表 3),通过对基本培养基、BA、KT、NAA 和 2,4-D 对愈伤组织诱导影响的综合分析可知,以改良 P<sub>6</sub> 为基本培养基,当 BA 浓度为 2.5 mg/L、KT 浓度为 1.0 mg/L、NAA 浓度为 0.5 mg/L 和 2,4-D 浓度为 1.0 mg/L 时适宜加拿大铁杉的愈伤组织诱导。试验证明其组合的愈伤组织诱导率可达 91.5%,高于其它的试验组合诱导率,并且愈伤组织的生长增殖速度也高于其它试验组合,因此可以确定该试验组合是适宜于加拿大铁杉愈伤组织诱导的。

表 3 愈伤组织诱导 L<sub>16</sub>(3×4<sup>4</sup>)试验结果

处理	因素 mg · L <sup>-1</sup>					诱导率 /%
	培养基	BA	KT	NAA	2,4-D	
1	2(SH)	2(1.0)	2(1.0)	2(0.5)	1(0.1)	38.5
2	2(SH)	4(2.5)	3(2.0)	1(0.1)	3(1.0)	46.7
3	1(MS)	2(1.0)	3(2.0)	4(1.5)	2(0.5)	28.4
4	3(P <sub>6</sub> )	3(2.0)	3(2.0)	3(1.0)	1(0.1)	45.5
5	1(MS)	1(0.5)	1(0.5)	1(0.1)	1(0.1)	17.9
6	1(MS)	4(2.5)	2(1.0)	3(1.0)	4(1.5)	37.6
7	3(P <sub>6</sub> )	1(0.5)	2(1.0)	4(1.5)	3(1.0)	83.4
8	1(MS)	3(2.0)	4(2.5)	2(0.5)	3(1.0)	30.5
9	1(MS)	3(2.0)	2(1.0)	1(0.1)	2(0.5)	22.7
10	2(SH)	3(2.0)	1(0.5)	4(1.5)	4(1.5)	30.4
11	3(P <sub>6</sub> )	4(2.5)	1(0.5)	2(0.5)	2(0.5)	71.9
12	2(SH)	1(0.5)	4(2.5)	3(1.0)	2(0.5)	47.5
13	1(MS)	1(0.5)	3(2.0)	2(0.5)	4(1.5)	39.4
14	3(P <sub>6</sub> )	2(1.0)	4(2.5)	1(0.1)	4(1.5)	86.9
15	1(MS)	4(2.5)	4(2.5)	4(1.5)	1(0.1)	15.4
16	1(MS)	2(1.0)	1(0.5)	3(1.0)	3(1.0)	37.5
$\bar{y}_1$	28.7	47.1	39.4	43.5	41.0	
$\bar{y}_2$	40.8	47.8	45.6	45.1	42.7	
$\bar{y}_3$	71.9	32.3	40.0	42.0	49.5	
$\bar{y}_4$		52.3	45.1	39.4	48.6	
极差(R)	43.2	20.0	6.2	5.7	8.5	

2.2 不同生长调节物质对不定芽分化诱导的影响

将生长速度减缓的愈伤组织接种到芽分化诱导培养基上,5 d 后愈伤组织表面开始出现肉眼可辨的球面状突起的芽点,10 d 芽点伸长到 0.3~1.5 cm,内部隐约

可见 1~3 轮的叶点,这时芽点停止了进一步的生长发育,如果不转接,芽点将褐化死亡。生长时观测结果(表 4),对数据采用逐步回归的多元统计分析的方法,采用二次回归模型  $y=\beta_0+\beta_1x_1+\beta_2x_2+\beta_3x_3+\beta_4x_4+\beta_{11}x_1^2+\beta_{22}x_2^2+\beta_{33}x_3^2+\beta_{44}x_4^2+\beta_{12}x_1x_2+\beta_{13}x_1x_3+\beta_{14}x_1x_4+\beta_{23}x_2x_3+\beta_{24}x_2x_4+\beta_{34}x_3x_4+\epsilon$  来对数据进行匹配,引入项以  $F(0.10,9,3)=3.006$  为临界值,经统计分析,实际的引入项=预期项,回归方程( $F=9.859$ )回归显著。回归方程为:  $y=7.61-8.93x_1^4+2.831x_1x_4-3.91x_4^2$ 。根据极值理论可以确定当  $x_1=3.5$ ,  $x_4=0.125$  时可取得高诱导率 5.31 个/g,诱导效果均好于其它 13 个试验组合。但试验中当 BA 的浓度高于 3.0 mg/L 时不定芽畸形比较多,因此降低使用浓度为 2.8 mg/L,不定芽诱导率在 4.93 个/g,影响不是很大,且其试验效果仍好于其它组合。因此加拿大铁杉不定芽诱导适宜的培养基组合为改良 P<sub>6</sub>+BA 2.8 mg/L+2,4-D 0.125 mg/L。

表 4 不定芽诱导 U<sub>13</sub>(13<sup>4</sup>)均匀试验组合及试验结果

处理	因素 /mg · L <sup>-1</sup>				诱导量 /个 · g <sup>-1</sup>
	BA	KT	NAA	2,4-D	
1	0.20	1.30	1.03	1.27	0.20
2	0.48	2.68	0.45	0.92	0.41
3	0.75	0.20	1.50	0.57	0.23
4	1.03	1.57	0.92	0.22	3.53
5	1.30	2.95	0.33	1.50	0.00
6	1.58	0.48	1.38	1.15	0.57
7	1.85	1.85	0.80	0.80	1.37
8	2.13	3.23	0.22	0.45	2.45
9	2.40	0.75	1.27	0.10	4.52
10	2.68	2.15	0.68	1.38	2.34
11	2.95	3.5	0.10	1.03	0.74
12	3.23	1.03	1.15	0.68	1.21
13	3.50	2.40	0.57	0.33	1.56

表 5 不同激素组合对不定芽伸长的影响

编号	培养基 /mg · L <sup>-1</sup>	伸长率 /%
A1	改良 P <sub>6</sub> 不加激素	34.5±3.7a
A2	改良 P <sub>6</sub> +BA 1.0+2,4-D 0.05	12.3±2.1bcd
A3	改良 P <sub>6</sub> +BA 0.05+2,4-D 0.05	5.7±1.5cd
A4	改良 P <sub>6</sub> +2,4-D 0.05	1.2±0.4d
A5	改良 P <sub>6</sub> +BA 1.0+NAA 0.1	13.5±2.5bc
A6	改良 P <sub>6</sub> +BA 0.05+NAA 0.1	17.9±2.3b
A7	改良 P <sub>6</sub> +NAA 0.1	9.3±1.7cd

2.3 不同激素浓度对不定芽伸长的影响

不定芽在伸长培养基上生长缓慢,20 d 苗高仅为 0.5~1.0 cm,苗颜色为浅绿色,由表 5 可知,培养基对不定芽伸长率( $F=29.360$ ;  $S=0.000$ )的影响达到了显著水平,通过 LSD 多重比较可知 A1 培养基有益于不定芽的伸长,伸长率可达 34.5%,NAA 促进不定芽伸长的效果要好于 2,4-D,BA 的适量应用也有利于不定芽的伸长,但植物激素的应用常使不定芽的基部形成愈伤组织或玻璃化,不利于苗的生根生长发育。

2.4 不同培养基生根效果比较

将生长健壮的 1.5 ~ 2.5 cm 小苗转接到生根培养基上, 10 d 开始统计生根状况。由表 6 可知, 培养基对生根率 ( $F=42.778; S=0.000$ ) 和生根条数 ( $F=3.353; S=0.026$ ) 的影响均达到了显著水平, 对根长 ( $F=0.564; S=0.773$ ) 的影响不显著, 通过 LSD 多重比较可知 A2、A3 培养基益于提高苗木的生根率, 其诱导的生根率分别为 22.4% 和 20.5%。A3 有益于提高苗木的生根条数, 生根条数可达 5.3 条。虽然 A3 培养基在生根率和根长生长方面不是最好的, 根长生长为 1.03 cm。但综合比较看 A3 培养基是适宜生根诱导的。由表 6 还可看出, NAA 有益于生根条数, IBA 有益于提高生根率和根长的生长。

表 6 不同激素组合对生根效果的影响

编号	培养基/ mg · L <sup>-1</sup>	生根率/ %	生根条数	根长/ cm
A1	1/2P <sub>6</sub> +NAA 0.05	15.5±1.2bc	3.5±1.2ab	1.01±0.31
A2	1/2P <sub>6</sub> +IBA 0.05	22.4±2.3a	2.4±1.1ab	0.83±0.22
A3	1/2P <sub>6</sub> +NAA 0.05+IBA 0.05	20.5±2.1a	5.3±1.5a	1.03±0.13
A4	1/2P <sub>6</sub> +NAA 0.1	10.3±1.1d	5.1±0.9ab	0.87±0.14
A5	1/2P <sub>6</sub> +IBA 0.1	17.2±1.5b	4.2±1.5ab	0.85±0.21
A6	1/2P <sub>6</sub> +NAA 0.1+IBA 0.05	8.7±0.6d	4.7±0.8ab	1.05±0.15
A7	1/2P <sub>6</sub> +NAA 0.05+IBA 0.1	13.3±1.2c	3.5±0.5ab	0.95±0.10
A8	1/2P <sub>6</sub> +NAA 0.1+IBA 0.1	5.5±0.9e	1.8±1.1b	1.00±0.17

2.5 不同基质对移栽效果的影响

将温室消毒后, 第 1 天将生根苗封口膜揭开一半, 第 2 天全部揭开, 并适时用喷雾器喷淋叶面, 间隔时间逐渐加长, 练苗 3 d 后, 取出并洗净根部的培养基。分别移植到盛有蛭石、珍珠岩和 1/2 珍珠岩+1/2 蛭石基质的育苗盘中, 基质用 0.5% 的 K<sub>2</sub>MnO<sub>4</sub> 溶液淋透后再用

清水冲淋 3 遍 喷 1/4MS 营养液。将育苗盘移入在温室内搭建的小拱棚内, 小拱棚距育苗盘 10~15 cm 高, 保持湿度 80%, 适当遮荫, 5 d 后逐步撤去拱棚膜, 8 d 后取出, 15 d 移入培养土中, 常规管理。基质对苗木成活率 ( $F=19.739; S=0.008$ ) 影响达到了显著水下, 通过 LSD 多重比较可知 B2 基质组合效果较好, 其练苗成活率达 28.4% 以上(表 7)。

表 7 不同基质对练苗成活的影响

编号	基质	成活率/ %
B1	蛭石	17.6±1.5b
B2	珍珠岩	28.4±2.4a
B3	1/2 珍珠岩+ 1/2 蛭石	21.3±1.7b

3 小结

加拿大铁杉组织培养过程中, 适宜愈伤组织诱导的培养基为: 改良 P<sub>6</sub>+BA 2.5 mg/ L+KT 1.0 mg/ L+NAA 0.5 mg/ L+2,4-D 1.0 mg/ L。适宜不定芽分化的培养基为: 改良 P<sub>6</sub>+BA 2.8 mg/ L+2,4-D 0.125 mg/ L。适宜不定芽伸长的培养基为不加任何激素的改良 P<sub>6</sub> 培养基。适于生根诱导的培养基为: 改良 1/2 P<sub>6</sub>+NAA 0.05 mg/ L+IBA 0.05 mg/ L。适宜练苗的基质为: 蛭石。

参考文献

[ 1 ] Potter K M, Dvorak W S, Crane B S, et al Allozyme variation and recent evolutionary history of eastern hemlock (*Tsuga canadensis*) in the south-eastern United States[ J ]. New Forests, 2008, 35: 131-145.  
[ 2 ] Pullman G S, Namjoshi K, Zhang Y. Somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda* L. ); improving culture initiation with abscisic acid and silver nitrate[ J ]. Plant Cell Rep, 2003, 22: 85-95.

Study on Induction of Adventitious Buds and Plantlet  
Regeneration of *Tsuga canadensis*

LIU Bao-guang<sup>1</sup>, TIAN Chun-yu<sup>2</sup>, XU Guang-yun<sup>3</sup>

(1. Cutting and Culturing Forest Innovation Center of Jilin Province Forest College of Beihua University, Jilin Jilin 132013; 2. Forestry Central Station of Jilin City Forestry Bureau, Jilin, Jilin 132013; Jinjia Forestry Station of Yongji County Forestry Bureau, Yongji, Jilin 132217)

**Abstract:** Using mature zygotic embryos of *Tsuga canadensis* as explants, the tissue culture was studied. The vegetative propagation system was successful established. The results showed that P<sub>6</sub> medium supplemented with BA 2.5 mg/ L, KT 1.0 mg/ L, NAA 0.5 mg/ L and 2,4-D 1.0 mg/ L was suitable for callus induction and the rate was 91.5%. The improved P<sub>6</sub> medium supplemented with BA 2.8 mg/ L, 2,4-D 0.125 mg/ L was suitable for adventitious bud differentiation induction and the rate was 4.93/g. The improved P<sub>6</sub> medium supplemented without plant hormones was suitable for adventitious bud elongation induction and the rate was 34.5%. The improved 1/2 P<sub>6</sub> medium supplemented with NAA 0.05 mg/ L, IBA 0.05 mg/ L was suitable for root induction and the rate was 20.5%. The substrate of perlite was suitable for practice shoots and the rate was 28.4%.

**Key words:** *Tsuga canadensis*; tissue culture; induction