

## 柳杉优良无性系组培快繁体系研究

王 晨, 张俊红, 张 苗, 许雯婷, 楼雄珍, 童再康

(浙江农林大学 省部共建亚热带森林培育国家重点实验室, 杭州 311300)

**摘要:** 【目的】柳杉 *Cryptomeria fortunei* 外植体丛芽分化能力强而芽伸长不足。为探索分段培养过程中的柳杉不定芽诱导与增殖、伸长培养及生根诱导的最佳培养基, 建立柳杉分段培养的高效组培快繁体系。【方法】以 20 年生柳杉优良无性系的当年生带芽茎段为外植体, 采用正交试验设计分段培养的组培体系。柳杉外植体分段培养再生体系主要包括丛生芽诱导、伸长、生根及移栽等步骤。【结果】①在 3 种基本培养基 (MS、DCR 和 WPM) 中分别添加不同质量浓度 6-苄氨基腺嘌呤 (6-BA)、吲哚丁酸 (IBA) 及水解酪蛋白 (CH), 3 个柳杉无性系均能诱导出不定芽, 但诱导率存在显著差异, 以 WPM+1.00 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.10 mg·L<sup>-1</sup> IBA 中不定芽诱导率 (100%) 和增殖系数 (9.13) 最高。②高质量浓度激素培养基与低质量浓度激素培养基交替分段培养方式对柳杉无性系进行继代增殖培养, 效果良好, 有效枝条增长率可达到 456.87%。③柳杉无性系离体生根的最适宜培养基为 DCR+0.10 mg·L<sup>-1</sup> IBA, 且 3 个无性系生根率最高可达 100%。④生根的无菌苗移栽至 V(泥炭):V(蛭石)=1:1 的混合基质, 经过 15-20 d 炼苗, 成活率高达 96.70%, 繁殖潜能达 3 865 株·母株<sup>-1</sup>·a<sup>-1</sup>。【结论】柳杉分段培养的组培模式极大提高了柳杉组培再生效率, 有助于柳杉优良品种的工业化育苗。图 1 表 5 参 23

**关键词:** 森林培育学; 丛芽伸长; 分段培养; 组培快繁; 柳杉

中图分类号: S723.7 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2020)00-0001-07

## Study on rapid propagation system of superior clones in *Cryptomeria fortunei*

WANG Chen, ZHANG Junhong, ZHANG Miao, XU Wenting, LOU Xiongzen, TONG Zaikang

(State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

**Abstract:** [Objective] The induced clustered buds of *Cryptomeria fortunei* have strong differentiative capacity but insufficient elongation ability. In order to obtain the optimum medium of adventitious bud induction, proliferation, elongation culture and rooting induction, the rapid propagation system of *C. fortunei* was established. [Method] The annual shoot from 20-year-old *C. fortunei* were used as explants; the orthogonal test design was used to select the optimum medium. The propagation system of *C. fortunei* includes induction, proliferation, elongation, rooting and transplant. [Result] ① Adventitious buds from three clones could be induced on MS, DCR and WPM basic medium supplemented with different combinations of 6-BA, IBA and CH. But the proliferation ability of buds varied significantly among different mediums. When clones were cultured in WPM medium with 1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA and 0.1 mg·L<sup>-1</sup> IBA, the induction rate and proliferation coefficient was the highest, which was 100% and 9.13, respectively. ② When three clones of *C. fortunei* were subcultured alternately with high concentration hormone and low concentration hormone, the effective shoot growth rate reached 456.87%. ③ The most suitable medium for the *C. fortunei* rooting was DCR medium with 0.1 mg·L<sup>-1</sup> IBA, under which the rooting rate ratio was 100%. ④ The rooted seedlings were transplanted to a mixed matrix with equal vermiculite and peat, after 15-20 days of seedling hardening, and the survival rate was

收稿日期: 2019-08-21; 修回日期: 2019-11-21

基金项目: 政府间国际科技创新合作重点专项资助 (2016YFE0127200)

作者简介: 王晨, 从事珍贵树种育种研究。E-mail: 260980198@qq.com。通信作者: 童再康, 教授, 博士, 博士生导师, 从事珍贵树种资源保育与育种研究。E-mail: zktong@zafu.edu.cn

96.70%. Therefore, the potential propagation ability is 3 865 seedlings per maternal plant per year. [Conclusion] Thus, an efficient propagation technology for *C. fortunei* was established, which laid a technical foundation for industrialization of improved varieties. [Ch, 1 fig. 5 tab. 23 ref.]

**Key words:** silviculture; buds elongation; segmental culture; rapid propagation; *Cryptomeria fortunei*

柳杉 *Cryptomeria fortunei* 为杉科 Taxodiaceae 柳杉属 *Cryptomeria* 常绿高大乔木, 是中国特有的用材与绿化树种。天然种群集中分布于东南部的武夷山和天目山山脉, 长江以南省区多有栽培<sup>[1]</sup>。柳杉生长快, 生长期持久, 树干通直, 材质优良, 可广泛应用于建筑、桥梁、家具等, 且树姿雄伟, 树形优美, 是优良的园林绿化树种。同时, 柳杉叶片对空气颗粒物有着较强吸附能力, 是重要环保树种<sup>[2]</sup>。目前柳杉研究主要集中在育苗<sup>[3-6]</sup>、良种选育<sup>[7]</sup>、病虫害<sup>[8-9]</sup>与生理生态<sup>[10-11]</sup>等方面。此外, 学者进行了简单重复序列 (simple sequence repeat, SSR) 分子标记引物筛选<sup>[12]</sup>与材性相关基因的筛选<sup>[13]</sup>等分子生物学方面的初步探索。此前柳杉种苗繁育仍采用播种<sup>[3-4]</sup>、扦插<sup>[5]</sup>与嫁接<sup>[6]</sup>等常规扩繁方法, 但即便是良种选育, 也存在优良材料繁殖系数低、繁育周期长等问题, 有性繁育子代分离难以保持优良性状。植物组织培养是目前植物快速繁殖的重要手段, 具有繁殖系数高、生产速度快、受外界环境影响小、可实现工厂化育苗、全年生产等优点, 在良种繁育上已具有诸多成功案例<sup>[14]</sup>。如张翠萍等<sup>[15]</sup>以柳杉种胚为实验材料, 通过柳杉试管苗繁殖技术研究, 建立了种子试管苗组培快繁体系; 但该体系仅能应用于分离世代的种子材料, 受种胚采集时间和环境限制, 繁殖效率偏低。祝晨辰等<sup>[16]</sup>以柳杉优良无性系的茎段为外植体, 建立了柳杉优良无性系繁育技术体系, 但不定芽增殖效率较低 (1.23~5.00)。为提高柳杉的不定芽增殖效率, 本研究以柳杉优良无性系的茎段为外植体, 以高效分段培养的方式进行组织快繁, 以期建立高效无性繁殖技术体系, 为柳杉良种生产性规模化快繁提供参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

以浙江省文成县石垟林场 20 年生柳杉无性系测定林中 3 个植株健壮、性状优良的无性系作为外植体, 取当年生幼嫩枝条, 用洗涤剂浸泡 30 min 后轻刷枝条表面, 并将其剪成独立的带顶芽茎段, 流水冲洗 2 h。无菌条件下用质量浓度 75.0% 的乙醇浸泡 20 s, 再用质量浓度 0.1% 的升汞消毒 8 min, 无菌蒸馏水冲洗 4~5 次, 每次 1~2 min。

### 1.2 培养基及培养条件

1.2.1 不定芽的诱导与增殖 为探索基本培养基、水解酪蛋白 (CH) 对不定芽诱导与增殖的影响, 采用 MS、DCR 和 WPM 等 3 个基本培养基, 分别添加蔗糖 30 g·L<sup>-1</sup>, 琼脂粉 7 g·L<sup>-1</sup>, pH 值调至 5.8; 设置 6-苄氨基腺嘌呤 (6-BA, 0.10、0.50 和 1.00 mg·L<sup>-1</sup>)、吲哚丁酸 (IBA, 0、0.10 和 0.30 mg·L<sup>-1</sup>)、水解酪蛋白 (CH, 0、0.50 和 1.00 g·L<sup>-1</sup>) 各 3 个水平, 使用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交试验 (表 1)。每瓶接种 2~3 个茎段, 每个处理 10 瓶, 重复 3 次, 40 d 后统计数据, 计算不定芽诱导率与增殖系数。

1.2.2 不定芽的伸长 前期试验发现, 组织培养

过程中 < 1 cm 的不定芽操作效率偏低, 微扦插生根效果不佳。本实验将芽长 ≥ 1 cm 的不定芽定义为有效芽。为解决上一步实验中不定芽萌发多但有效芽少的问题, 调整培养基激素质量浓度, 设计 B<sub>1</sub>(WPM + 1.00 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.10 mg·L<sup>-1</sup> IBA)、B<sub>2</sub>(WPM + 0.20 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.02 mg·L<sup>-1</sup> IBA) 和 B<sub>3</sub>(不添加激素的 WPM 培养基) 等 3 个培养基组合, 每瓶接种 3~5 个茎段, 每个处理 10 瓶, 重复 3 次。

表 1 不同培养基对不定芽诱导与增殖

Table 1 Effects of different mediums on the induction and proliferation of adventitious buds

处理	培养基	$\rho_{6-BA}/$ (mg·L <sup>-1</sup> )	$\rho_{IBA}/$ (mg·L <sup>-1</sup> )	$\rho_{CH}/$ (g·L <sup>-1</sup> )	诱导率/ %	增殖 系数
A <sub>1</sub>	MS	0.10	0	0	50.00	4.00
A <sub>2</sub>	DCR	0.10	0.10	0.50	66.67	4.50
A <sub>3</sub>	WPM	0.10	0.30	1.00	55.56	4.20
A <sub>4</sub>	WPM	0.50	0	0.50	87.50	4.00
A <sub>5</sub>	MS	0.50	0.10	1.00	75.00	3.50
A <sub>6</sub>	DCR	0.50	0.30	0	90.91	3.00
A <sub>7</sub>	DCR	1.00	0	1.00	100.00	8.00
A <sub>8</sub>	WPM	1.00	0.10	0	100.00	9.13
A <sub>9</sub>	MS	1.00	0.30	0.50	94.12	7.25

40 d 后观察芽伸长情况，统计数据。

1.2.3 生根培养 剪取不定芽长 $\geq 1$  cm 的有效芽进行生根培养。在 DCR 和 WPM 培养基中添加  $0.10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  IBA 和不同质量浓度 (0, 0.01,  $0.10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 萘乙酸 (NAA)，每瓶接种 3 个有效芽，每个处理 10 瓶，重复 3 次。30 d 后观察并统计数据。

1.2.4 炼苗移栽 生根培养约 40 d 后，将株高 $\geq 5$  cm 且根系发达的柳杉无菌苗移至  $V(\text{泥炭}):V(\text{蛭石})=1:1$  的混合基质常规管理。30 d 后调查移栽存活率。

### 1.3 培养条件

以上培养条件均为光照时间  $16 \text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ ，光强  $2\ 000 \text{ lx}$ ，培养温度  $(23\pm 2)^\circ\text{C}$ 。

### 1.4 数据处理与统计分析

根据实验获得数据，分别计算以下指标。

芽诱导率 (%) = 出芽外植体数/总接外植体数 $\times 100\%$ 。芽增殖系数 = 诱导出的不定芽总数/外植体总数。有效枝条增长率 (%) = 诱导出的有效枝条总数/原有效枝条总数 $\times 100\%$ 。不定根的诱导率 (%) = 生根的枝条数/接种枝条总数 $\times 100\%$ 。平均不定根数 = 生根的总数/诱导出不定根的枝条数。平均根长 = 不定根的总长度/诱导出不定根的枝条数。移栽存活率 (%) = 移栽存活的苗数/移栽的总苗数 $\times 100\%$ 。繁殖潜能 = 繁殖系数<sup>3.75</sup> $\times$ 生根率 $\times$ 移栽存活率 (株 $\cdot$ 株<sup>-1</sup> $\cdot$ a<sup>-1</sup>)。

采用 SPSS17.0 和 Microsoft Excel 先对百分率数据进行反正弦转换，再进行方差分析和 LSD 多重比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同培养基对柳杉芽诱导与增殖的影响

由表 1 知：各无性系在所有培养基中均能形成不定芽，但不同处理间芽的诱导率与增殖系数存在差异。综合来看，A<sub>8</sub> 处理优于其他组合，不定芽诱导率和增殖系数达到最高，分别为 100% 和 9.13。外植体在培养基中 7 d 左右开始萌动，针叶基部的芽点膨大，随后逐渐伸长，萌发出芽 (图 1A)。从芽的生长状况来看，A<sub>8</sub> 芽萌发较多，叶色翠绿，生长健壮 (图 1B)；A<sub>1</sub> 芽萌发少，叶色较黄，芽苗瘦弱，生长状况较差 (图 1C)。

根据正交试验结果进行极差分析，结果见表 2。从诱导率来看，6-BA 对柳杉茎段不定芽诱导率的影响占主导地位，极差 (R) 达 40.63，其次是 IBA(15.07) 和基本培养基 (12.82)，最后是 CH(5.91)。其中 6-BA 最佳水平为  $1.00 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ，IBA 最佳水平为  $0.10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ，CH 最佳水平为  $0.50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ，最佳基本培养基为 DCR。因此，柳杉芽诱导与增殖的最佳基本培养方案为 WPM +  $1.00 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA +  $0.10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  IBA。

方差分析可发现 (表 3)：6-BA 对柳杉茎段不定芽的诱导率及增殖系数均有极显著影响 ( $P < 0.01$ )，基本培养基与 IBA 浓度对柳杉茎段不定芽的增殖系数有显著影响 ( $P < 0.05$ )。

### 2.2 不同浓度激素对柳杉不定芽伸长的影响

在继代培养过程中，将幼芽接入最佳诱导增殖培养基后，各无性系不定芽增殖系数显著提升。培养 40 d 后，接入不定芽伸长培养基。结果表明 (表 4)：相较于添加高质量浓度激素的培养基，低质量浓度或不添加激素的培养基对柳杉不定芽的伸长有显著促进作用。其中 B<sub>3</sub> 处理下柳杉芽伸长效果最好，有效枝条多，长势良好，有效枝条增长率达到 456.87%；B<sub>1</sub> 处理下柳杉芽基本没有伸长，短芽多，植株发黄，甚至死亡。由图 1D(培养 1 d)、图 1E(培养 7 d)、图 1F(培养 40 d) 可知：B<sub>3</sub> 处理下柳杉芽伸长良好。

### 2.3 不同培养基对柳杉不定根发生的影响

待枝条生长到 2~3 cm 时剪下，插入生根培养基进行生根培养。结果表明 (表 5)：幼苗在 2 种基本培

表 2 不定芽诱导与增殖试验结果极差分析

Table 2 Range analysis on the induction and proliferation of adventitious buds

指标	水平	6-BA	IBA	CH	基本培养基
诱导率 (%)	K <sub>1</sub>	57.41	65.49	80.30	73.04
	K <sub>2</sub>	84.47	80.56	82.76	85.86
	K <sub>3</sub>	98.04	80.20	76.85	81.02
	R	40.63	15.07	5.91	12.82
增殖系数	K <sub>1</sub>	4.23	3.73	5.38	4.92
	K <sub>2</sub>	3.50	5.71	5.25	5.17
	K <sub>3</sub>	8.13	4.82	5.23	5.78
	R	4.63	1.98	0.14	0.86

说明：K<sub>1</sub>、K<sub>2</sub>、K<sub>3</sub> 为各因素的 3 个水平对应的各次试验结果之和的平均值

表3 不同因素对茎段不定芽诱导与增殖影响的方差分析

因变量	变异来源	平方和	自由度	均方	F	显著度(P)
诱导率	6-BA	1 945.413	2	972.706	139.685	0.007**
	基本培养基	16.068	2	8.034	1.154	0.464
	CH	234.396	2	117.198	16.830	0.056
	误差	13.927	2	6.964		
	总计	42 965.601	9			
增殖系数	6-BA	37.102	2	18.551	1 006.38	0.001**
	IBA	1.207	2	0.603	32.736	0.030*
	基本培养基	1.174	2	0.587	31.85	0.030*
	误差	0.037	2	0.018		
	总计	291.059	9			

说明: \*表示在 $P=0.05$ 水平上差异显著, \*\*表示在 $P=0.01$ 水平上差异显著

培养基中生根情况无显著差异。当培养基中添加 $0.10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  IBA时, 枝条的生根率达到100%, 生根速度较快, 根多且健壮。平均生根数随着NAA质量浓度的升高而增加, 但平均根长减小(图1G)。当培养基中添加少量NAA时, 幼苗基部先分化出少量愈伤组织, 随后从愈伤组织中分化出根, 根条细弱, 根数较多, 根长度较短。随着NAA质量浓度升高, 生根率逐渐降低, 愈伤组织增多;

至 $0.10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 幼苗基部分化出大量愈伤组织, 生根受到抑制, 茎段发黄, 最终整株死亡。 $C_1$ 处理下柳杉幼苗生根率较高, 根长度大, 与其他处理差异显著。因此, DCR+ $0.10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  IBA为生根的最适培养基。幼苗在最佳不定根诱导培养基中生长, 7d左右长出白色的根尖, 之后根迅速伸长,

表4 不同浓度激素对不定芽伸长的影响

Table 4 Effects of different concentrations of Plant Growth Regulators on elongation of adventitious buds

培养基	$\rho_{6\text{-BA}}/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	$\rho_{\text{IBA}}/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	有效枝条增长率/%
B <sub>1</sub>	1.00	0.10	66.36±116.78 b
B <sub>2</sub>	0.20	0.02	286.84±148.46 a
B <sub>3</sub>	0	0	465.87±268.46 a

说明: 不同小写字母表示在 $P=0.05$ 水平上差异显著



A. 不定芽的诱导; B. 长势较好的无性系; C. 长势较差的无性系; D~F. 无性系分段培养的芽伸长情况; G. 生根的幼苗; H. 移栽成活的无菌苗

图1 柳杉茎段的不定芽诱导和植株再生

Figure 1 Adventitious buds induction and plant regeneration of *C. fortunei* sterile seedlings

30 d 后形成良好根系。由图 1G 可知：无性系在 C<sub>1</sub> 培养基中生根情况最好。

## 2.4 炼苗与移栽

组培苗经炼苗移栽，约 15 d 后发出新芽。检查根部有新根长出即移栽成活，移栽成活率达 96.70%，成活植株长势较好且一致。图 1H 可知：无菌苗移栽 1、15 和 40 d 后生长良好。

表 5 不同培养基对生根的影响

Table 5 Effects of different mediums on the percentage of rooting

培养基	基本培养基	激素		生根率/%	平均根数/条	平均根长/cm
		$\rho_{\text{IBA}}/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	$\rho_{\text{NAA}}/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$			
C <sub>1</sub>			0	100.00±0.00 a	10.00±5.00 b	3.87±1.17 a
C <sub>2</sub>	WPM	0.10	0.01	69.44±4.81 b	8.67±1.15 b	2.71±0.36 bc
C <sub>3</sub>			0.10	55.56±19.25 b	24.00±2.00 a	1.29±0.39 c
C <sub>4</sub>			0	100.00±0.00 a	10.50±0.71 b	3.82±1.17 a
C <sub>5</sub>	DCR	0.10	0.01	80.56±17.34 ab	15.67±5.86 ab	3.15±0.59 ab
C <sub>6</sub>			0.10	77.78±19.79 ab	17.33±9.24 ab	1.86±0.60 bc

说明：不同小写字母表示在  $P=0.05$  水平上差异显著

## 2.5 分段培养效果

将诱导与继代增殖的不定芽进行分段培养。首先，将经消毒的外植体接入诱导与增殖培养基进行不定芽的诱导与增殖；接着，将诱导与增殖的不定芽接入伸长培养基进行伸长培养；然后，将经过伸长培养的枝条剪下，一部分接入生根或增殖不定芽，进行分段循环培养；最后，将生根完成的无菌苗移栽炼苗，投入常规容器苗培育。经分段培养的组培苗，各无性系不定芽得到有效利用，有效枝条比例显著提升，单个外植体的繁殖潜能高达  $3\ 865\ \text{株}\cdot\text{株}^{-1}\cdot\text{a}^{-1}$ 。

## 3 讨论与结论

### 3.1 讨论

植物组织培养中，基本培养基的区别主要在于无机盐的种类和含量的不同<sup>[17]</sup>。MS 培养基中无机盐和离子浓度较高，具有较稳定的离子平衡，养分的数量和比例合适，因而适用范围比较广，是多数植物组织培养快速繁殖的基本培养基。相较于 MS 培养基，DCR 与 WPM 培养基均是低盐培养基。本实验结果表明：DCR 与 WPM 培养基的诱导效果均优于常用的 MS 基本培养基；不定芽诱导中 DCR 培养基效果最佳，不定芽增殖中 WPM 效果最佳。这与低盐培养基更适合于外植体生长和增殖的报道相符<sup>[18]</sup>。

植物激素尤其生长素和细胞分裂素在调控离体器官发生中起关键作用<sup>[19]</sup>。本实验中选用 6-BA 和 IBA 作为植物激素，选用 CH 作为营养物质，研究不同组合在柳杉芽诱导过程中的作用。结果表明：6-BA 最佳质量浓度为  $1.00\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ，同时添加少量的 IBA( $0.10\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 诱导率可达 100%，增殖系数达到 9.0 以上。有研究<sup>[20]</sup>表明，CH 对猕猴桃 *Actinidia chinensis* 芽苗的生长有一定促进作用；本实验中，添加 CH 的处理组合其诱导与增殖效果均无明显差异，可见 CH 不适用于柳杉不定芽的诱导与增殖。

有研究认为：繁殖系数过高，不定芽过度增殖会引起组培苗弱化，生长势变差<sup>[21]</sup>。崔佩荣<sup>[22]</sup>在对紫萼 *Hosta ventricosa* 继代增殖培养时发现：有效芽增殖系数随着激素质量浓度增加呈先上升后再下降规律，影响有效芽增殖。本研究采用高质量浓度激素培养基与低质量浓度激素培养基交替继代，对柳杉组培苗进行分段培养，可有效解决上述问题，显著加快柳杉组织培养进程，为工厂化育苗提供了有效途径。

大量研究<sup>[23]</sup>表明，培养基的无机盐质量浓度降至一半，可有效提高大多数植物的生根能力；WPM 和 DCR 培养基是低盐培养基，因此常和不同质量浓度植物激素配合诱导组培苗生根。本实验利用 WPM 和 DCR 培养基配合低质量浓度的 IBA 诱导生根，柳杉幼苗生根率高达 100%，同时生根较快，根系健壮。生根的无菌苗移栽至  $V(\text{泥炭}):V(\text{蛭石})=1:1$  的基质中，浇透水，保持相对湿度 90%~100%，30 d 后存活率达 96.70%。

### 3.2 结论

本研究建立的柳杉外植体分段培养再生体系, 主要包括丛生芽诱导、伸长、生根及移栽等。不定芽诱导与增殖阶段, 无性系在 WPM+1.00 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.10 mg·L<sup>-1</sup> IBA 中培养, 不定芽诱导率(100%)和增殖系数(9.13)显著高于其它处理; 不定芽伸长阶段采用高-低质量浓度激素培养基交替分段培养, 柳杉无性系继代增殖效果良好, 有效枝条增长率可达到 456.87%; 生根培养阶段, 无性系离体生根的最适宜培养基为 DCR+0.10 mg·L<sup>-1</sup> IBA, 且 3 个无性系生根率最高可达 100%; 炼苗移栽阶段, 生根的无菌苗移栽至 V(泥炭):V(蛭石)=1:1 的混合基质, 经过 15~20 d 炼苗, 成活率高达 96.70%。从不定芽的诱导到生根仅需 4~5 个月, 繁殖潜能高达 3 865 株·株<sup>-1</sup>·a<sup>-1</sup>, 为柳杉优良品系种苗生产提供了新思路。

综上所述, 柳杉分段培养的组培模式可有效解决柳杉外植体丛芽分化能力强而芽伸长不足的问题, 极大程度地加快柳杉组培进程, 为工厂化生产优质种苗提供技术参考, 并有利于进一步改善和优化木本植物组织培养技术体系, 从而对其进行更为深入的理论研究和规模化生产应用奠定理论和技术基础。

## 4 参考文献

- [1] 王江, 刘军, 黄永强, 等. 柳杉起源及天然分布[J]. 四川林业科技, 2007, 28(4): 92-94.  
WANG Jiang, LIU Jun, HUANG Yongqiang, et al. The origin and natural distribution of *Cryptomeria* [J]. *J Sichuan For Sci Technol*, 2007, 28(4): 92-94.
- [2] 杨冰, 丁访军, 刘延惠, 等. 柳杉与其他 2 种针叶树种叶片滞尘量的比较[J]. 四川师范大学学报(自然科学版), 2019, 42(4): 545-551.  
YANG Bing, DING Fangjun, LIU Yanhui, et al. Comparative study on dust retention capacities of *Cryptomeria fortune* and other 2 coniferous species [J]. *J Sichuan Norm Univ Nat Sci*, 2019, 42(4): 545-551.
- [3] 刘正忠. 柳杉实生苗繁育技术研究[J]. 武夷科学, 2004, 20(1): 209-212.  
LIU Zhengzong. A study of seedling-plant breeding technic on *Cryptomeria fortune* [J]. *Wuyi Sci J*, 2004, 20(1): 209-212.
- [4] 陈瑞杰. 柳杉初级种子园自由授粉子代测定及速生优良家系选择[J]. 福建林业科技, 2010, 37(4): 38-41.  
CHEN Ruijie. *Cryptomeria fortune* primary seed orchard open-pollinated progenies test and selection of fast-growing superior family [J]. *J Fujian For Sci Technol*, 2010, 37(4): 38-41.
- [5] 蔡燕康, 陈观岩. 柳杉扦插育苗试验[J]. 福建林业科技, 2003, 30(4): 81-83.  
CAI Yankang, CHEN Guanyan. The experiment on cottage seedling raising of *Cryptomeria citriodora* [J]. *J Fujian For Sci Technol*, 2003, 30(4): 81-83.
- [6] 翁怀锋. 柳杉第 2 代种子园亲本幼林期变异规律与初选[J]. 福建林业科技, 2012, 39(2): 6-8.  
WENG Huaifeng. Variation and selection of parents of the second generation seed orchard of *Cryptomeria fortunei* at the young stage [J]. *J Fujian For Sci Technol*, 2012, 39(2): 6-8.
- [7] 刘洪涛, 童再康, 李晓储, 等. 柳杉优树子代的遗传变异与再选择[J]. 浙江林学院学报, 1992, 9(1): 29-35.  
LIU Hong'e, TONG Zaikang, LI Xiaochu, et al. Genetic variation in progeny of Chinese *Cryptomeria* superior tree and reselection [J]. *J Zhejiang For Coll*, 1992, 9(1): 29-35.
- [8] 黄一名, 杨淑贞, 赵明水, 等. 物理去瘤法对天目山柳杉瘿瘤病的影响[J]. 浙江农林大学学报, 2013, 30(6): 910-913.  
HUANG Yiming, YANG Shuzhen, ZHAO Mingshui, et al. *Cryptomeria fortunei* tumor disease and a removal method [J]. *J Zhejiang A&F Univ*, 2013, 30(6): 910-913.
- [9] 梁光红, 林浩宇, 卢赐鼎, 等. 福建柳杉毛虫的七种寄生蝇形态记述和生物学[J]. 植物保护, 2018, 44(6): 177-184.  
LIANG Guanghong, LIN Haoyu, LU Chiding, et al. Morphology and biology of seven parasitic flies of *Dendrolimus houi* in China [J]. *Plant Prot*, 2018, 44(6): 177-184.
- [10] 张勇, 崔海军, 张银烽, 等. 柳杉种植对黔西南喀斯特山区金发藓沼泽植物群落和储水功能的影响[J]. 生态学报, 2019, 39(17): 1-10.  
ZHANG Yong, CUI Haijun, ZHANG Yinfeng, et al. Effects of artificial *Cryptomeria fortunei* forests on the plant community and water content of a *Polytrichum commune* bog in a karst region in southwestern Guizhou Province, China [J]. *Acta Ecol Sin*, 2019, 39(17): 1-10.

- [11] 周佳佳, 罗有发, 马李蓉, 等. 黔西北土法炼锌废渣堆场修复植物叶片和废渣的生态化学计量特征[J]. *地球与环境*, 2019, **47**(4): 419 – 428.  
ZHOU Jiajia, LUO Youfa, MA Lirong, *et al.* Ecological stoichiometric characteristics of plant leaves and slag at a restoration site of indigenous zinc smelting slag in northwestern Guizhou [J]. *Earth Environ*, 2019, **47**(4): 419 – 428.
- [12] 徐进, 刘子梁. 柳杉 SSR 引物的筛选及反应体系的优化[J]. *南京林业大学学报(自然科学版)*, 2013, **37**(6): 17 – 21.  
XU Jin, LIU Ziliang. Optimization of SSR-PCR system and SSR primer screening in *Cryptomeria fortune* [J]. *J Nanjing For Univ Nat Sci Ed*, 2013, **37**(6): 17 – 21.
- [13] 曹玉婷, 莫家兴, 欧阳磊, 等. 柳杉维管形成层及木质部区转录组序列及基因表达分析[J]. *分子植物育种*, 2019, **17**(3): 762 – 770.  
CAO Yuting, MO Jiaying, OUYANG Lei, *et al.* Transcriptome sequence and gene expression in vascular cambium and xylem of *Cryptomeria fortune* [J]. *Mol Plant Breeding*, 2019, **17**(3): 762 – 770.
- [14] 周权男, 张慧君, 戴雪梅, 等. 植物组织培养在农业生产中的应用研究进展[J]. *北方园艺*, 2014(13): 196 – 199.  
ZHOU Quannan, ZHANG Huijun, DAI Xuemei, *et al.* Research advances in application of plant tissue culture in agricultural production [J]. *Northern Hortic*, 2014(13): 196 – 199.
- [15] 张翠萍, 方伟, 桂仁意, 等. 柳杉试管快繁技术的研究[J]. *林业科技开发*, 2008, **22**(6): 36 – 39.  
ZHANG Cuiping, FANG Wei, GUI Renyi, *et al.* Studies on mass propagation in vitro of *Cryptomeria fortune* Hooibrenk ex Otto et Dietr by tissue culture [J]. *China For Sci Technol*, 2008, **22**(6): 36 – 39.
- [16] 祝晨辰, 徐进, 欧阳磊, 等. 柳杉优良无性系离体培养再生体系研究[J]. *南京林业大学学报(自然科学版)*, 2015, **39**(3): 55 – 58.  
ZHU Chenchen, XU Jin, OUYANG Lei, *et al.* Study on regeneration system of *Cryptomeria* clones in vitro culture [J]. *J Nanjing For Univ Nat Sci*, 2015, **39**(3): 55 – 58.
- [17] 董杰, 齐凤慧, 詹亚光. 茶条槭悬浮培养体系的建立与没食子酸合成的优化条件[J]. *植物学通报*, 2008, **25**(6): 734 – 740.  
DONG Jie, QI Fenghui, ZHAN Yaguang. Establishment of the suspension culture system and optimization of biosynthesis of gallic acid in *Acer ginnala* [J]. *Chin Bull Bot*, 2008, **25**(6): 734 – 740.
- [18] MANZANERA J A, PARDOS J A. Micropropagation of juvenile and adult *Quercus Suber* L. [J]. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 1990, **21**(1): 1 – 8.
- [19] 谷瑞升, 蒋湘宁, 郭仲琛. 植物离体培养中器官发生调控机制的研究进展[J]. *植物学通报*, 1999, **16**(3): 238 – 244.  
GU Ruisheng, JIANG Xiangning, GUO Zhongchen. Advances in the studies on the mechanism of plant organogenesis in vitro [J]. *Chin Bull Bot*, 1999, **16**(3): 238 – 244.
- [20] 谢志兵. 水解酪蛋白和不同碳源在猕猴桃组织培养的作用[J]. *农业与技术*, 2003, **23**(4): 56 – 59.  
XIE Zhibing. Effect of casein hydrolyzed and different carbon source on tissue culture of kiwifruit [J]. *Agric Technol*, 2003, **23**(4): 56 – 59.
- [21] 吴秀华, 张艳玲, 周月, 等. ‘海沃德’猕猴桃叶片高频直接再生体系的建立[J]. *植物生理学报*, 2013, **49**(8): 759 – 763.  
WU Xiuhua, ZHANG Yanling, ZHOU Yue, *et al.* Establishment of high frequency and direct regeneration system from leaf of ‘Hayward’ Kiwifruit [*Actinidia deliciosa* (A. Chev.) C. F. Liang et A. R. Ferguson] [J]. *Plant Physiol J*, 2013, **49**(8): 759 – 763.
- [22] 崔佩荣. 紫萼离体快速繁殖技术研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2013.  
CUI Peirong. *Research on Rapid Propagation Technology of Hosta ventricosa*(Salisb.) Stream[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2013.
- [23] TORRES K C, CARLISI J A. Shoot and root organogenesis of *Camellia sasanqua* [J]. *Plant Cell Rep*, 1986, **5**(5): 381 – 384.