

花楸组织 ✧ 培养技术

杨 玲 沈海龙 / 著



科学出版社

花楸组织培养技术

杨 玲 沈海龙 著

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书简要介绍了花楸的生物学特性、开发利用价值、研究现状与发展趋势,以及植物组织培养研究和体细胞胚胎发生研究现状。重点介绍了花楸各种不同外植体的愈伤组织诱导和增殖培养、花楸器官发生途径的植株再生技术和体细胞胚胎发生途径的再生植株技术,并对影响花楸体细胞胚胎诱导、增殖、成熟、萌发以及胚性保持等技术环节及其影响因素进行分析,观察了花楸合子胚胎和体细胞胚胎的发育过程并进行比较,在此基础上对花楸体细胞胚胎发生、发育中物质代谢和抗氧化酶活性进行分析,从而为实现花楸种质资源保护和优良资源扩大繁殖提供理论和实验依据。

本书可作为植物组织培养研究相关科研人员、研究生的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

花楸组织培养技术 / 杨玲, 沈海龙著. —北京: 科学出版社, 2017. 3
ISBN 978-7-03-052229-0

I. 花… II. ①杨…②沈… III. 花楸—组织培养 IV. S792.250.4

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2017) 第 054240 号

责任编辑: 丁慧颖 杨小玲 / 责任校对: 郑金红

责任印制: 赵 博 / 封面设计: 吴朝洪

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

天津市新科印刷有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2017 年 3 月第 一 版 开本: 720×1000 1/16

2017 年 3 月第一次印刷 印张: 15 3/4 插页 4

字数: 288 000

定价: 78.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

前 言

花楸（别名百花山花楸、百华花楸）是蔷薇科花楸属的落叶小乔木，主要分布在中国的华北、东北和西北地区，在朝鲜和俄罗斯远东地区也有分布。花楸具有较强的耐性、很高的观赏价值和木材使用价值。花楸树在春季满树银花，在夏季羽叶秀丽，在秋冬季红果满枝，在冬季果实可宿存。木材密实，纹理致密，具有很好的抗弯强度。在东北亚的许多国家，花楸树是值得保存的珍贵生物资源。在一些含有长寿命树种的稠密树林中，花楸的遗传多样性受到威胁，该树种更新变弱，最终可能局部消失。因此，需要采取有效保护措施以保存花楸种质资源。

花楸非常适合在冬季寒冷、色彩单调的北方城市内推广栽培。随着人们对北方绿化树种开发和选育研究的不断深入，特别是对乡土树种开发利用研究的重视，花楸市场前景看好。许多苗圃公司或个人纷纷培育花楸幼苗，发展势头迅猛，而苗圃育苗真正应用于城市和园林绿化才刚刚起步。由于目前花楸尚处于开发和人工驯化阶段，而自然界野生状态的花楸又呈单株散生状态，存在天然更新困难、采种母树不足、种子收集困难等问题。更兼花楸种子具有深休眠的特性，播种育苗技术复杂，实生苗生长周期长、成型慢，所以目前市场上花楸优质苗木供不应求。

为使花楸资源长期可持续利用，可应用微繁技术。植物器官发生和体细胞胚胎发生是细胞工程中植株再生的重要途径，其中植物体细胞胚胎发生技术属于植物组织培养研究中的前沿领域。在应用上，植物体细胞胚胎发生技术可以实现有效的大规模克隆繁殖。在理论上，体细胞胚胎发生是基因工程的桥梁，其在林木品种改良和资源扩繁、林木更新以及沙漠改造等方面都有着极大的现实意义。通过体细胞胚胎发生途径获得花楸再生植株，不仅可用于花楸树优良植株的扩大繁殖和种质资源保护，且可促进通过基因操作和原生质体融合进行树木遗传改良工作的发展，具有重大的经济、社会和生态环境效益。

本书集中反映了笔者及其研究组成员多年来在花楸组织培养方面研究的最新成果和数据。第1章介绍花楸的生物学特性、开发利用价值、研究现状与发展趋

势, 以及植物组织培养研究和体细胞胚胎发生研究现状 (杨玲副教授编写); 第2章主要介绍花楸未成熟合子胚的不定芽诱导和增殖培养方法 (沈海龙教授编写); 第3章主要介绍花楸无菌茎段腋芽增殖途径的植株再生技术 (沈海龙教授编写); 第4章主要介绍花楸成熟合子胚的愈伤组织和不定芽诱导技术 (沈海龙教授编写); 第5章主要介绍花楸叶片和茎段的愈伤组织诱导技术 (沈海龙教授编写); 第6章主要介绍花楸成熟合子胚和萌发的子叶及下胚轴的体细胞胚胎发生技术 (杨玲副教授编写); 第7章主要介绍采用未成熟合子胚为外植体的花楸体细胞胚胎发生技术 (杨玲副教授编写); 第8章主要介绍渗透胁迫对花楸体细胞胚胎发生的影响 (杨玲副教授编写); 第9章主要介绍外植体来源对花楸体细胞胚胎发生的影响 (杨玲副教授编写); 第10章主要介绍环境条件和培养方法对花楸体细胞胚胎增殖的影响 (杨玲副教授编写); 第11章主要介绍花楸体细胞胚胎成熟的培养方法 (杨玲副教授编写); 第12章主要介绍花楸体细胞胚胎萌发以及再生植株移栽驯化的方法 (杨玲副教授编写); 第13章主要介绍花楸次生循环体细胞胚胎诱导与胚性保持方法 (杨玲副教授编写); 第14章主要介绍花楸体细胞胚胎的细胞起源以及形态发育过程 (杨玲副教授编写); 第15章主要介绍花楸体细胞胚胎发生发育过程中物质代谢和抗氧化酶活性变化 (杨玲副教授编写)。第16章为结论与研究展望 (杨玲副教授编写)。

本书根据国家自然科学基金项目 (J1210053 和 31400535) 的研究成果撰写而成。本书的出版受国家自然科学基金项目 (J1210053 和 31400535)、黑龙江省自然科学基金项目 (C210407)、中央高校基本科研业务费专项资助基金 (2572014CA13)、黑龙江省博士后科研启动金 (LBH-Q14003) 的资助。本书在导师沈海龙教授的精心指导下完成, 是对沈海龙教授和我们历经多年获得的相关研究结果的总结和升华。本书对其他植物组织培养研究具有借鉴作用, 对我国植物工厂化生产和优良资源的可持续发展具有启示意义。由于作者水平有限, 疏漏之处在所难免, 恳请各位读者不吝赐教!

著 者
2016年6月

目 录

1	绪论	1
1.1	花楸概述	1
1.2	花楸属树种的国内外研究现状	3
1.3	植物组织培养的应用及其影响因素	13
1.4	植物体细胞胚胎发生研究现状	21
1.5	蔷薇科植物体细胞胚胎发生研究现状	47
2	花楸未成熟合子胚不定芽诱导和增殖培养	69
2.1	材料和方法	70
2.2	结果与分析	72
2.3	结论	82
3	花楸无菌茎段腋芽增殖和茎丛生根培养	85
3.1	材料和方法	86
3.2	结果与分析	87
3.3	结论	93
4	花楸成熟合子胚愈伤组织和不定芽诱导培养	95
4.1	材料和方法	95
4.2	结果与分析	96
4.3	结论	107
5	花楸叶片与茎段愈伤组织诱导及增殖培养	109
5.1	材料和方法	110
5.2	结果与分析	111
5.3	结论	120
6	花楸成熟合子胚和子叶及下胚轴体细胞胚胎发生	123
6.1	材料与方法	123
6.2	结果与分析	125
6.3	讨论	129

6.4	结论	129
7	花楸未成熟合子胚的体细胞胚胎发生	131
7.1	材料与方法	131
7.2	结果与分析	134
7.3	讨论	149
7.4	结论	152
8	渗透胁迫对花楸体细胞胚胎发生的影响	153
8.1	材料与方法	153
8.2	结果与分析	155
8.3	讨论	162
8.4	结论	163
9	外植体来源对花楸体细胞胚胎发生的影响	165
9.1	材料与方法	165
9.2	结果与分析	167
9.3	讨论	180
9.4	结论	184
10	花楸体细胞胚胎增殖培养	186
10.1	材料与方法	186
10.2	结果与分析	187
10.3	讨论	190
10.4	结论	191
11	花楸体细胞胚胎成熟培养	192
11.1	材料与方法	192
11.2	结果与分析	193
11.3	讨论	197
11.4	结论	198
12	花楸体细胞胚胎萌发培养	200
12.1	材料与方法	200
12.2	结果与分析	201
12.3	讨论	204
12.4	结论	204

13	花楸次生循环体细胞胚胎发生与植株再生研究	206
13.1	材料与方法	206
13.2	结果与分析	208
13.3	讨论	214
13.4	结论	216
14	花楸合子胚与体细胞胚胎组织细胞学研究	218
14.1	材料与方法	218
14.2	结果与分析	219
14.3	结论与讨论	224
15	花楸体细胞胚胎发生发育的生理生化变化	228
15.1	材料与方法	228
15.2	结果与讨论	229
15.3	结论	234
16	结论与研究展望	236
16.1	主要结论	236
16.2	花楸组织培养技术的研究展望	238
	附录	240
	彩图	

1 绪 论

1.1 花 楸 概 述

花楸（别名百花山花楸、百华花楸、花楸树，拉丁名 *Sorbus pohuashanensis*），为蔷薇科花楸属落叶小乔木，是我国北方珍贵的观果树种之一。由于花楸兼具观赏性、耐寒性和适应性，所以非常适合在冬季气候寒冷且色彩单调的北方城市内推广栽培。随着人们对北方绿化树种开发和选育方面研究的不断深入，特别是对乡土树种开发利用研究的重视，花楸树一时身价倍增，市场前景看好。

1.1.1 花楸生物学特性

1.1.1.1 形态特征

落叶小乔木，高可达8m以上。树皮平滑，铁灰色或灰黄色，通常有块状白斑。小枝粗，圆柱形；冬芽长大，矩圆状卵形，密被灰白色绒毛。奇数羽状复叶，小叶11~15，椭圆状矩圆形至矩圆状披针形，长3~5cm，宽1.4~1.8cm，先端锐尖或短锐尖，基部偏斜圆形，叶缘中部以上有细锐锯齿，表面具稀疏绒毛或近于无毛，背面苍白色，有稀疏或较密集绒毛，间或无毛。花期5~6月；花白色，密集型复伞房花序，总花梗及花梗均密被灰白色绒毛，后渐脱落，花梗长3~4mm，花径6~8mm。萼片三角形，5片；花瓣宽卵形或近圆形，5片，长3.5~5mm。花两性，雄蕊约20；花柱3~4，基部具短绒毛，较雄蕊短。子房半下位或下位，2~5室，每室具胚珠2。果熟期9~10月；梨果小型，近球形，径6~8mm，红色或橘红色，具宿存闭合萼片。内果皮软骨质，2~5室，各室具种子1~2枚（任宪威，1997；成俊卿等，1992；周德本，1986；周以良，1986；郑万钧，1985）。

1.1.1.2 自然分布

花楸为中等喜光、较耐阴树种，对土壤肥力要求不高，喜湿润且排水良好的酸性或微酸性土壤，在全光条件下生长良好。耐寒力强，可耐-50℃低温，国外报道可耐-70~-60℃低温（任步钧，1985）。耐湿冷环境，也能耐干燥瘠薄土壤

(Verstl, 1997a)。抗烟、抗病力强,耐污染 (Nebe and Opfermann, 1998)。

花楸常生于海拔 600 ~ 2500m 的山坡、山谷、杂木林内、林缘或小河旁,多于溪涧和阴坡生长。主要分布于北温带的我国东北、华北及甘肃等地,在朝鲜北部和俄罗斯西伯利亚东部也有分布。在东北主要分布在吉林省八家子区,在黑龙江省仅分布在小兴安岭以南的山地,如小兴安岭、完达山、张广才岭以及老爷岭山区。花楸虽然分布很广,但多单株散生在较高海拔的山地暗针叶林(云杉、冷杉林)内,数量不多,是寒温性针叶林特有的伴生阔叶树种(周以良, 1986; 郑万钧, 1985)。

2003 年 9 月下旬至 10 月上旬,我们曾对东北地区内 7 个分布地点的花楸分布情况和生长环境进行了调查,具体地点如下:黑龙江省伊春五营林场、绥阳林业局新青经营所、绥阳小北湖林场、山河屯市山河屯凤凰山经营所,吉林省八家子地区八家子林业局境内的先锋林场、吉林露水河林业局,辽宁省桓仁县境内老秃顶自然保护区。调查结果表明,在我们调查的 7 个种源内,花楸均呈零散生长状态,分布在石塘地、山脊、河旁、路旁林缘等地方。常伴着松树、椴树、桦树、杨树、水曲柳、榆树、槭树等生长,所处环境潮湿(其中老秃顶自然保护区内花楸生长环境的相对湿度达到 80%)。林内花楸结果较少。在路旁林缘等阳光较充足的地点,花楸结实较多。秋季,叶片为红色,果实颜色为红色、橙红色、黄色不一。红色果较饱满、体积较大且均未落果;黄色果较瘦小,9 月下旬已有部分落果。果实偶有鸟啄食的痕迹。

1.1.1.3 繁殖特征

花楸用种子繁殖。5 ~ 15 年生开始结实,每年结实较多或 2 ~ 3 年有一次丰年。花期 5 ~ 6 月;果熟期 9 ~ 10 月。种子的最佳采集期为果实变为橘红色,即已达到“生理成熟”期。由于山顶气温较低,果实成熟相对较晚,采集时间宜在 9 月下旬(梁华等, 1999)。果实采回后,堆放于室内或筐内,待果肉腐熟变软后进行调制,即将果实捣碎(或用手揉搓去果肉),用水漂洗出果皮和果肉,同时把浮在水面的秕粒除掉,将饱满的种子捞出后在室温下阴凉处晾干,去杂质,即得到纯净的种子。果实出种率 1.4% ~ 2%,种子千粒重 2.0 ~ 2.4g(国家林业局国有林场和林木种苗工作总站, 2003)。花楸种子为深休眠种子,播种前需要混湿沙或采用雪藏的方法进行低温催芽处理 60 ~ 70d,即可陆续发芽。待有 1/3 裂嘴即可播种。秋播在每年的 9 月初种子采后进行最好(吕威等, 2001; 于春江等, 1998; 周德本, 1986; 周以良, 1986)。

1.1.2 花楸开发利用价值

1.1.2.1 观赏价值

花楸是我国北方珍贵的观叶、观花、观果、观形俱佳的优良树种。其树形优美；春季满树银花，花序大，芳香四溢；夏季羽叶秀丽；秋季羽叶鲜红，金黄色至橘红色的果实挂满枝头，光彩夺目。冬季宿存果实更加红艳，在瑞雪中，耀眼光芒，引人入胜。可在街道、庭院、广场、公园、假山中单独栽培，或与其他观赏性植物搭配种植，则可使北方的城市一年四季繁华似锦，令人心旷神怡，流连忘返（牟兆军，2001）。

1.1.2.2 经济价值

花楸果可食用，含糖分、柠檬酸、维生素 A（8mg/100g），维生素 C（40 ~ 150mg/100g），尤其在初霜后富含胡萝卜素，可制作果酱、果汁及酿酒。种子含脂肪油 15.75%、淀粉 15.57%，茎皮含挥发油等物质。果实入药具有健脾、利水、补虚的功效，主治胃炎、胃痛、水肿、咳嗽及维生素 A、C 缺乏症。树枝和树皮有清肺、止咳、祛痰的功能，主治慢性气管炎、肺结核、哮喘、咳嗽（聂绍荃，2003；Gil-zquierdo and Mellenthin, 2001；郑万钧，1985）。

木材属散孔材类，有光泽；边材浅黄褐色或浅灰褐色，心材黄褐色至灰红褐色；纹理直，木材结构细致、均匀，切面光滑，耐磨损，适宜制作各种雕刻、美术工艺品、玩具及把柄、手枪之类的小件木制品（成俊卿等，1992；周以良，1986）。

1.2 花楸属树种的国内外研究现状

花楸属树种不仅观赏价值高，且兼有木材、药材、食用、饲用等多种用途，是优良的绿化和经济用树种。因此，关于花楸属树种的研究既有从理论研究角度出发的分类学、生殖学、生态学等方面的报道，也有从应用角度出发的药理学、栽培生产、无性扩繁等方面的报道。

1.2.1 花楸属树种的种类及其遗传变异

1.2.1.1 花楸属树种的种类

花楸属（*Sorbus*）约有 80 个种，分布于北温带；我国有 50 余种，主要分布

在西南、西北及东北地区（国家林业局国有林场和林木种苗工作总站，2003；任宪威，1997；郑万钧，1985）。欧洲有 10 余种遗传稳定的花楸种和变种（Verstl, 1997b）。除欧洲花楸外，适于园林绿化引种的还有果实为红-橙红色的美洲花楸（*S. americana*）、朝鲜花楸（*S. commixia*）、美丽花楸（*S. decora*）等 7 种；果实为玫瑰红色和白色的喀斯特花楸（*S. cashmiriana*）、寇内氏花楸（*S. koehneana*）等 5 种；其他石灰树（*S. folgneri*）等 3 种（Verstl, 1997c）。此外，在瑞典用朝鲜花楸接穗同欧洲花楸嫁接产生的名为“*S. dodong*”的新品种更耐寒和耐城市的干热气候，叶子的抗病性也更强，观赏性更好（Bengtsson, 1997）。在欧洲和北美洲，花楸属树种已经被广泛栽培应用于园林绿化中，其树姿、果实、秋叶都具有很高的观赏价值（Vegvari et al., 2000；Raspe et al., 2000；Saebo and Johnsen, 2000；Kucherov, 1999；Lee, 1999；Nikolic et al., 1998；Verstl, 1997c；Sciffer, 1997；Wright, 1981；Ebert, 1973）。此外，在花楸属树种的生物学特性、品种选育、定植、育苗和栽培技术等方面也都有较为系统的研究（Zerbe, 2001）。

我国的花楸资源丰富，主要有分布比较广泛的水榆花楸（*S. alnifolia*），产于我国安徽、浙江、福建等地的黄山花楸（*S. amabilis*），分布在甘肃、陕西山麓、溪谷的天山花楸（*S. tianschanica*），产于西藏南部和东部的西南花楸（*S. rehderiana*），分布于西藏、四川西部、云南西北部的西康花楸（*S. prattii*）、湖北花楸（*S. hupehsis*），以大兴安岭为分布中心的无毛花楸（*S. pohuanensis* var. *amurensis*），分布在我国东北、西北及华北各省的百花山花楸（*S. pohuashanensis*）等 50 余种（任宪威，1997）。目前我国已经成功引种驯化的花楸有原产欧洲和亚洲西部的“红衣主教”欧洲花楸和原产北美洲的“红艳天花楸”等。

1.2.1.2 花楸属树种的遗传变异

花楸属树种比较丰富，分布也比较广泛。由于对不同生长环境的适应，其花色、果色、株形、株高、叶形、叶色多有变化。仅果实颜色就从白色、黄色、橙色、橙红色到红色变化多端，尤其是人工引种驯化和品种改良更是使花楸的树形、叶色和果色多样化。但关于花楸属树种的遗传多样性研究的报道并不多。有关花楸属树种遗传多样性的研究，可分为形态学性状为主的表型分析和分子水平的检测两种手段。其中以形态学性状为主的表型分析，如《黑龙江树木志》中记载的无毛花楸与百花山花楸的天然杂交，导致花楸形态上多有变化（周以良，1986；聂绍荃等，2003）；梁书宾（1990）报道发现了山东花楸属的新变种棱果花楸（*S. alnifolia*）等。分子水平上的检测常用 RAPD（randomly amplified

polymorphic DNA, 随机扩增多态性 DNA), 该方法是揭示物种遗传多样性的有效工具。刘登义等利用 RAPD 技术对黄山花楸的遗传多样性进行了研究, 从 40 个 10 碱基随机引物中筛选出能产生稳定多态性标记的引物 4 个, 共扩增出 105 个位点, 其中多态性位点 30 个, 占 28.6% (刘登义等, 2003)。

笔者曾对花楸果实和种子表型进行过研究。研究发现花楸果实和种子表型变异极其丰富。花楸果实颜色在种源间和植株间变异较大; 果实和种子性状在植株间存在极显著差异, 种子长和宽在种源间存在显著差异; 种子宽度变异最大, 果实高/径性状最稳定; 种源间果实和种子的表型多样性丰富程度不同, 种源内的分化高于种源间; 果高、果径以及种长和种宽应视为重要和关键的花楸果实和种子表型性状; 种子表型变异在空间分布上呈现以纬度为主的单向变异模式。花楸的生物学特性决定了其生态学特性。丰富的表型变异是花楸抗逆性强、适应性广的原因。花楸种内果实和种子性状存在着丰富的种源间、种源内变异, 说明花楸的遗传改良潜力很大, 在遗传改良工作中进行优良种源、优良群体选择和利用的同时, 应充分重视优良个体的选择和利用 (杨玲等, 2009a)。

郑健等以花楸分布区 (山东省、山西省、河北省、辽宁省) 的 8 个天然群体为试材, 对其果实、种子特性等 9 个性状进行比较分析, 讨论群体间和群体内的表型多样性。结果表明, 花楸果实、种子特性等性状在群体间和群体内均存在极其丰富的变异, 9 个性状在群体间、群体内均达显著或极显著差异。群体内的变异是花楸的主要变异来源。花楸果实、种子性状与地理生态因子的相关分析表明, 纬度、海拔、年均温、年降水量与其性状呈显著相关 (郑健等, 2009a)。进一步采用水平淀粉凝胶电泳技术, 对采自山东、山西、河北、辽宁 4 个省的 6 个花楸天然群体的种子样本进行分析, 利用多位点异交率估算程序 (MLT) 估算 6 个群体的异交率。结果表明: 花楸各群体的花粉库与胚珠库中, 各位点基因的配子比例差异不显著, 基本处于平衡状态; 花楸各群体都存在轻度的自交或近交, 说明花楸属于混合交配类型, 表现为高度异交。花楸天然群体的近交衰退很大 (郑健等, 2009b)。

郭敏等以东北分布区内 6 个天然群体新采集种子和低温密封储藏 2 年的种子为试材, 研究种子重量、生活力和发芽能力的地理分异特点及储藏对其影响。结果表明: 种子重量和生活力在个体间差异极显著, 且与极端最低气温呈显著负相关关系; 低温储藏降低了种子重量和生活力的变异幅度; 种子发芽能力以山河群体最高, 绥阳和八家子群体较低, 其余群体中等。说明花楸树种子具有极好的耐寒性, 且在储藏过程中进行了生理后熟代谢 (郭敏等, 2011)。

1.2.2 花楸属树种的繁殖研究现状

1.2.2.1 种子繁殖研究现状

Razumova 曾对苏联境内 5 个区的 20 种花楸种子进行了采集和研究,发现所有的花楸种子都处于深休眠状态,几乎所有的种子在 0~3℃ 层积处理 3~9 个月即可解除种子的休眠;5~7℃ 层积处理会使种子萌发过程中的生理变化被延误;9~10℃ 使种子萌发过程中的生理变化受阻(除了花楸果 *S. domestica* 外);利用赤霉素、激动素及硫脲的混合物处理种子,在 3℃ 时会促进某些种(包括欧洲花楸 *S. aucuparia*)的种子发芽;花楸分布的地理位置对层积需要或生长调节物质的反应没有影响(Razumova, 1987)。

国外曾对欧洲花楸种子的后熟、休眠和发芽(Paulsen and Hogstedt, 2002; Yagihashi et al., 1998; Rogge, 1997; Basharuddin and Smith, 1993)、花楸果的育苗技术(Korber, 1993)、法国治疝花楸(*S. tominalis*)栽培与生长条件(Madjidian, 2000; Sevrin, 1992)、鸟类取食对朝鲜花楸以及动物的内脏消化作用对欧洲花楸种子发芽的影响(Paulsen and Hogstedt, 2002; Yagihashi et al., 1998; Oster et al., 1987)、温度对 *S. glabrescens* 种子发芽和休眠的影响(Taylor and Gerrie, 1987)等有过报道。结果证明花楸的果肉和果汁均明显抑制种子的发芽。自然条件下,大部分花楸种子没有鸟或动物的提前取食不发芽。被取食后排出的种子大约比对照种子重 9%,且出苗早,小苗生长也比对照种子快。未被鸟类取食的花楸种子,因为被果肉包裹,在第一年的春天不能萌发,夏天果肉腐烂后,种子在第二年的春天才能萌发。而实际上,大多数种子在第二年的春天并没有萌发,是因为它们在第一年的夏天里失去了活力(Yagihashi et al., 1998)。人工播种对种子的处理强调冷、湿两种条件,温度超过 5℃ 则种子停止发芽。需要 60~100d 的低温沙藏才能打破种子的休眠。

国内对花楸种子繁殖的研究一般集中在种子采集、调制、育苗地选择及整地作床、播种(包括催芽、播种时间和方法)、抚育管理、病虫害防治、移栽、苗木生长等方面的研究上(吕威等, 2001; 梁华等, 1999; 姜雁和李近雨, 1998; 于春江等, 1998; 熊济华, 1998; 徐英芳, 1993; 周德本, 1986; 郑万钧, 1985)。人们在生产实践中也积累了一些关于花楸的播种育苗经验。但由于国内对花楸树种的研究尚处于刚起步阶段,自然界野生状态的花楸数量又比较稀少,所以利用花楸种子繁殖苗木存在采种母树不足、种子收集困难、种子发芽率低等问题(Paulsen and Hogstedt, 2002; Yagihashi et al., 1998; 高慧和刘培义, 1997; Prien, 1997),兼有花楸播种育苗技术比较复杂不易掌握、实生苗生长周

期长、成型慢等问题,导致了目前市场上花楸苗木生产供不应求的局面。

郑健等采用文献查阅、实物标本核对和实地调查相结合的方法,对我国花楸野生资源的分布特点、生境以及自然更新方式等进行调查研究。结果表明:花楸在我国由南到北主要分布在暖温带落叶阔叶混交林区域,有少部分分布在温带针阔叶混交林区域,属于湿润山地植被带类型。花楸作为伴生树种散生分布在山地阔叶混交林、山地针阔叶混交林、山地落叶松纯林内或林缘以及山顶灌丛4种植被带(包括12种森林群落)类型中。花楸是低山、中山分布植物,在调查范围内,花楸分布在海拔500~2200m范围内,集中分布在海拔1200~2000m,在河北驼梁山、白石山、小五台山、雾灵山、塞罕坝,北京百花山、喇叭沟门,山西庞泉沟,内蒙古旺业甸林场,辽宁老秃顶子自然保护区,吉林东方红林场以及山东泰山大多分布在海拔1000m以上,黑龙江大亮子河林场和山东崂山则分布在海拔1000m以下,河北雾灵山在海拔800~1000m也有分布。除在雾灵山阳坡有分布外,花楸树大多生长在半阳坡、半阴坡、阴坡以及沟谷环境中,其分布区土壤类型以山地棕壤、暗棕壤为主。海拔、气温、空气湿度可能直接影响花楸树的自然分布。其自然更新方式有实生苗繁殖更新和萌蘖(包括根蘖和桩蘖)繁殖更新两种,以桩蘖为主要的更新方式(郑健等,2007)。

在我国东北东部林区,花楸树以种子繁殖、桩蘖繁殖和根蘖繁殖三种方式更新;在未经破坏的天然林和恶劣生境下的天然林中,三种方式建成的幼苗数量比例各占1/3,无显著差异;但在破坏后形成的次生林中,桩蘖苗比例(16.5%)明显降低。桩蘖和根蘖更新能够维持当地居群的稳定,其中根蘖繁殖可使幼苗扩散到母株周围50cm或更远处;1.0~2.9cm的Ⅱ径级向3.0~4.9cm的Ⅲ径级的转化率很低,在破坏后形成的次生林、恶劣生境下的天然林和未经破坏的天然林中,Ⅱ径级向Ⅲ径级的转化率分别为25.6%、45.3%和15.9%。这是限制花楸树天然更新的关键环节(许建伟等,2010a)。

许建伟等通过研究花楸树种子散布、土壤种子库及种子萌发出土过程,分析花楸树实生天然更新的影响因素。结果表明:自然散落的花楸树果实96.1%分布于母株2m范围内,凋落物层和土壤表层(0~2cm)的种子数占土壤种子库总数的97.0%;不同季节花楸树土壤种子库种子数量差别很大,当年11月上旬种子数量最多,达 (257.7 ± 69.2) 粒/米²;翌年7月下旬种子数量最少,仅为 (2.9 ± 2.9) 粒/米²;温度不是花楸树种子萌发出土过程的限制因子,0~5℃时幼苗出苗率达 $(67.5 \pm 6.6)\%$,但对其出苗速率影响显著。土壤含水量为50%时,花楸树出苗率最高,达 $(74.7 \pm 4.2)\%$;含水量为60%时,幼苗死亡率最低,为 $(32.6 \pm 0.6)\%$ 。花楸树种子的散布格局和土壤种子库的时空分布格局影响种子的萌发出土过程,进而影响其种群的天然更新(许建伟等,2010b)。

张秀亮等研究表明鸟类对花楸树种子的长距离传播具有重要作用。动物对花楸树种实的强烈捕食作用使花楸树种子可供更新的种子资源数量减少,限制了花楸树野外自然更新。但是动物对花楸树种实的捕食促进了种子的传播,从而有利于花楸树种群的自然更新与扩散(张秀亮等,2010)。

笔者曾对花楸种子生物学相关内容进行了长期研究。研究发现花楸的倒生型胚珠具有内外两层珠被,内含蓼型胚囊。花楸合子胚发育经历了球形期、心形期、鱼雷形期,在授粉后30d内即可发育至子叶形期(Yang et al., 2012a)。花楸果实形状从人工授粉后105d起不再发生显著变化。授粉后30d,花楸合子胚即可发育至子叶形,完成分化。随着发育时间的延长,胚干重呈增加趋势,而胚含水量则呈明显的下降趋势。两者之间为极显著的负相关关系。75d以后胚的长/宽值和含水量都不再发生显著变化,标志着胚开始进入生理成熟阶段。采收后的种子在人工调制之前,种皮的机械障碍作用是限制胚萌发的重要因素。25℃条件更适合发育过程中裸胚的萌发。种子是否经过水浸泡吸胀是影响种子发芽率的一个重要因素。较低的萌发温度(5℃和10℃)有利于调制后室温下保存的成熟种子的萌发(Yang et al., 2012b)。

生理休眠是花楸成熟种子休眠的主要原因。去除种皮的花楸种胚经过离体培养并不能很好地解除花楸种子的休眠,且产生矮化的幼苗。外源细胞分裂素和低温结合处理对打破花楸种子休眠具有很好的效果。花楸成熟胚的子叶和下胚轴的休眠程度较浅,成熟胚的上胚轴和胚根的休眠程度较深。对胚进行去两片子叶和断胚根处理可以略微提高胚的萌发率,说明在子叶和胚根中可能存在抑制剂,能抑制上胚轴和胚根的生长。低温沙藏可以解除休眠,获得子叶、胚轴和胚根正常伸长的幼苗(沈海龙等,2006)。

以花楸新采收种子和2~5℃下密封储藏2年的陈种子为材料,在10种低温层积时间和6种发芽温度下进行种子萌发实验。结果表明:新种子解除休眠需要的低温层积时间(120d)比陈种子(105d)长,解除休眠后的种子在5~25℃的范围内均能萌发,发芽温度越高种子发芽越早,超过25℃种子产生二次休眠;5℃和10℃发芽温度下解除休眠种子的发芽率和发芽指数较高,但发芽较晚(杨玲等,2008)。冷层积解除花楸种子休眠过程中,花楸种皮内ABA(脱落酸)含量显著下降,种皮和胚内各种促进生长类物质的相对含量(尤其是GA/ABA值)显著增加。因此推测种皮和胚内较高的ABA含量是抑制花楸种子萌发的主要原因(杨玲等,2008)。3种外源激素和萌发温度对花楸种子萌发影响的研究结果表明,25℃(16h光/8h暗,10d)→-5℃(暗110d)变温可极显著提高种子发芽率和种子发芽势,但极显著延迟发芽初始时间。200mg/L 6-BA溶液中吸胀2d后经历25℃→-5℃变温可使种子发芽初始时间最短(33d),发芽率(62.25%)和发

芽势 (57.88%) 最高。GA₃ (赤霉素) 或 ABA 与温度的结合处理对种子萌发的促进作用小于 6-BA 与温度的综合处理 (杨玲等, 2009b)。

静电处理可以促进花楸干种子吸水量的增加, 使室温光照条件下种子的发芽时间提前; 静电处理与低温沙藏相结合可以极显著地提高花楸种子的发芽率 (种子发芽率从 18% 提高到 42%)、促进花楸幼苗高度的增加、影响叶片中 SOD 酶的活性、增加叶片中总叶绿素含量, 显著提高叶片中可溶性总糖和可溶性蛋白质含量。种子浸泡时间对种子相对电导率、光下萌发时间、幼苗叶片中 SOD 酶活性、可溶性蛋白质含量以及可溶性总糖含量的影响均为最大, 静电场强度对各项指标的影响为中等, 静电处理时间只对幼苗叶片中总叶绿素含量的影响最大, 对其余指标的影响为最小 (Yang and Shen, 2011)。

用 KNO₃ 溶液处理花楸种子, 可以缩短花楸种子的发芽起始时间, 显著提高新种子发芽率、发芽势和平均发芽速。KNO₃ 溶液处理花楸新种子可以使种子发芽起始时间缩短为 48d, 种子发芽率提高到 51%, 种子发芽势提高到 49%, 种子平均发芽速达 97。KNO₃ 溶液对花楸陈种子萌发的促进效果好于新种子。4% KNO₃ 浸泡种子 72h 后于 5℃ - 25℃ - 5℃ 条件下萌发的种子发芽率可以提高到 67%, 种子发芽势提高到 54%, 种子平均发芽速达到 127。利用 KNO₃ 溶液处理花楸种子不仅可以达到缩短种子催芽处理时间、提高种子发芽率、增加种子发芽整齐度的目的, 而且具有操作简单、效果明显、无污染、易推广等适合生产实践要求的特点 (Bian et al., 2013)。

以花楸成熟合子胚胎为材料, 利用室内培养皿发芽法研究外源 NO 供体硝普钠 (sodium nitroprusside, SNP)、NO 合成抑制剂 (2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3 oxide, PTIO)、脱落酸 (abscisic acid, ABA) 以及乙烯受体抑制剂 (norbornadien, NBD) 对花楸树胚胎萌发和幼苗发育初期活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 积累的影响。结果表明: 光照条件下 SNP 预处理可减弱 PTIO 或 ABA 对胚胎萌发的抑制作用, 但不能减弱 NBD 处理对胚胎萌发的抑制作用。SNP 预处理显著增加幼苗叶片中叶绿素含量, 但这种增加效应不能被 PTIO 解除。PTIO 抑制 SNP 预处理引起的幼苗叶片中过氧化氢 (H₂O₂) 含量和超氧阴离子含量的增加。SNP 预理解除 PTIO 对根部超氧阴离子含量的抑制作用 (杨玲等, 2013)。

1.2.2.2 扦插和嫁接繁殖研究现状

由于利用花楸种子播种育苗受季节、品种等条件的限制, 所以营养繁殖成为繁殖具有优良特性的花楸树种的重要方法 (韩文忠和马兴华, 2006)。通过扦插、嫁接、组织培养等无性繁殖手段可以达到快速繁殖苗木以提高繁殖系数和工作效