

杉木优良无性系组培快繁技术体系的建立

欧阳磊¹, 郑仁华¹, 翁玉榛², 陈孝丑², 李林源³, 康月惠¹

(1. 福建省林业科学研究院, 福建 福州 350012; 2. 福建省洋口国有林场, 福建 顺昌 353211;
3. 福建省将乐国有林场, 福建 将乐 353300)

摘要:从杉木遗传测定林中选择 36 株杉木优良个体进行组培快繁技术研究, 在对 36 株杉木优良个体进行诱导、继代培养的基础上, 筛选出 5 个优良无性系建立了相应的组培快繁技术体系。诱导培养基: 1/2MS+6-BA(0.3~0.8 mg/L)+蔗糖(3%); 继代增殖培养基: 1/2MS+6-BA(0.5~0.7 mg/L)+IBA(0.1~0.3 mg/L)+蔗糖(3%); 生根培养基: 1/4 改良 MS+IBA(0.5~1.0 mg/L)/NAA(0.5~1.0 mg/L)/ABT^{1#}(1.0~1.5 mg/L)+蔗糖(1.5%); 组培苗移栽基质中, $m(\text{黄心土}):m(\text{细沙})=9:1$ 。采用该技术体系的杉木组培苗生根率可达 90%, 移栽成活率可达 96%。

关键词:杉木; 优良无性系; 组培快繁

中图分类号: S722.3

文献标识码: A

文章编号: 1000-2006(2007)03-0047-05

Establishment of Technique system of Tissue Culture on Chinese Fir Superior Clones

OUYANG Lei¹, ZHENG Ren-hua¹, WENG Yu-zhen², CHEN Xiao-chou², LI Lin-yuan³, KANG Yue-hui¹

(1. Fujian Academy of Forestry, Fuzhou 350012, China; 2. Fujian Yangkou Forest Farm, Shunchang 353211, China;
3. Fujian Jiangle Forest Farm, Jiangle 353300, China)

Abstract: Tissue culture technique of 36 plus-tree selected from Chinese fir progeny tests was reported in this paper. Among the 36 plus-tree 5 superior clones were systematically studied and their technique system of tissue culture was established completely. The techniques were as follows: Initial culture media was 1/2MS+6-BA(0.3~0.8 mg/L)+Sucrose(3%), clump shoots induction culture media was 1/2MS+6-BA(0.5~0.7 mg/L)+IBA(0.1~0.3 mg/L)+Sucrose(3%), rooting culture was 1/2 improvement MS+IBA(0.5~1.0 mg/L) or 1/2 improvement MS+ABT^{1#}(1.0~1.5 mg/L)+Sucrose(1.5%), and transplantation media was yellow-center soil 90%+fine sand 10%. Their rooting rate was up to 90%, and transplantation survival rate was up to 96%.

Key words: Chinese fir; Superior clone; Tissue culture and rapid propagation

组织培养技术繁殖苗木的主要优点是能够在短期内大量繁殖遗传基因型比较一致的优良材料, 而且能充分利用繁殖材料的遗传潜能, 达到最佳的效益水平, 同时苗木的生产可以在室内进行, 降低自然环境条件的不良影响, 全年生产组培苗木。目前, 已有 600 多种植物能用组织培养或器官培养方法形成芽、胚状体及完整的植株^[1-3], 已经利用桉树、杨树等用材树种优良无性系苗木大面积营造人工林。杉木的无性快繁技术起步于 20 世纪 70 年代, 80 年代开展了大量杉木无性系选育、扦插试验, 探索了杉木扦插生根的遗传变异规律^[4-6]。阙国宁于 1980 年开始进行杉木组培技术试验研究, 探索了不同年龄母本上外植体的嫩梢增殖规律和成年母本外植体的组培复壮技术^[7]。之后众多学者从事了杉木组培技术的研究, 组培快繁技术取得了一定的进展^[8-14]。虽然前人在杉木组培方面开展了一定的研究, 但组培快繁技术尚未取得完全突破, 特别对遗传上真正优良的无性系的快繁技术研发成功的报道甚少。鉴于此, 笔

收稿日期: 2006-09-08

修回日期: 2007-02-11

基金项目: 福建省林木种苗科技攻关专项; 福建省科技重大专项(2006NZ001-2); 科技部农业科技成果转化资金项目(2006GBZC400138)

作者简介: 欧阳磊(1978-), 男, 工程师, 硕士, 主要从事林木遗传育种研究。

者通过对36个杉木优良无性系进行组培快繁技术研究,探索杉木优良无性系从外植体诱导到生根、炼苗移栽的技术,以期为筛选杉木优良无性系进行组培苗木规模化生产提供依据。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

以福建省洋口国有林场、福建省邵武卫闽国有林场、福建省国有来舟林业试验场、福建省平和国强国有林场等十多片杉木无性系测定林、杉木第二代子代测定林、杉木杂交子代测定林为对象,从中选出生长快、生物总量高、优质、耐瘠薄等不同类型的杉木优良个体36株作为组培试验材料。

1.2 诱导及继代培养

根据前人的研究结果,基本培养基以MS培养基为基础,稍作改动,培养基pH=5.6,琼脂6%,附加的激素为6-BA、IBA、ABT、NAA。

诱导培养时,以1/2MS培养基为基本培养基,添加不同浓度的细胞分裂素6-BA(0.1、0.3、0.8、1.4、2.0 mg/L)进行单因素试验研究。共5个处理,每处理接种100瓶,每瓶接1个外植体,对不同季节、不同环境采集的外植体进行诱导试验。

继代增殖培养时,以诱导培养的新芽茎段为材料,1/2MS培养基为基本培养基,添加不同浓度的6-BA(0.3、0.5、0.7、0.9 mg/L)和不同浓度的IBA(0.1、0.3、0.5 mg/L)。共12个处理,每处理接种10瓶,每瓶接种2个新芽,试验重复3次,继代5次后进行数据统计。对不同无性系进行试验。

生根培养及移栽以继代增殖苗和经过壮苗培养的苗为材料,1/2改良MS为基本培养基,蔗糖1.5%,分别添加NAA(0.1、0.5、1.0 mg/L),IBA(0.1、0.5、1.0 mg/L),IAA(0.5、1.0、1.5 mg/L),进行单因素试验。共9个处理,试验重复3次,对不同无性系进行试验。

以炼苗2周、生长健壮的生根苗,或经过壮苗培养和炼苗2周的无根苗为材料,以灰炭土、黄心土、灰炭土+黄心土(质量比为1:1)、黄心土+细沙(质量比为9:1)为移栽基质,共4个处理,每处理移栽1000株苗,30 d和60 d后每处理分别抽样50株苗进行调查分析。

1.3 数据处理

$$\text{诱导率} = \text{诱导数} / \text{接种数} \times 100\%$$

$$\text{萌芽率} = \text{萌芽数} / \text{没有污染的外植体数} \times 100\%$$

$$\text{增殖倍数} = \text{萌芽数} / \text{诱导数}。$$

2 结果与分析

2.1 外植体的表面灭菌

对不同季节采集的萌芽条采用3种不同的表面灭菌方法进行试验所得的结果见表1。从表1可知:(1)穗条的来源不同,外植体的诱导率和污染率存在较大的差异。来自采穗圃优树基部的萌芽条污染少,诱导率高,可达50%以上;采集于自然人工林优树基部的萌芽条,污染严重,诱导率低(10%~30%)。(2)表面灭菌方法不同,外植体的诱导率、污染率、褐化率有着不同程度的差别。对采穗圃中的萌芽条以第2种灭菌方法较好,诱导率较高且污染较少;对人工林中的萌芽条,以第3种灭菌方法较好。(3)季节对芽的诱导率也有一定的影响,与其他木本植物(如桉树)的外植体诱导有着相似的特点,杉木外植体的诱导培养在冬春季节诱导效果较好,在秋夏季节诱导效果较差。

表1 穗条来源和表面灭菌方法对芽诱导的影响
Table 1 Effects of different disinfect method and different scion on initial culture %

穗条来源	诱导时间	灭菌方法	诱导率 Percentage of forming buds	污染率 Pollution rate	褐化率 Browning rate
采穗圃	春季	1	44.3	32.8	4.7
		2	62.5	18.4	6.5
		3	42.2	31.5	7.3
采穗圃	春季	1	40.6	38.6	6.1
		2	53.7	22.3	7.2
		3	32.1	26.2	9.3
自然人工林	夏秋季	1	9.5	63.1	5.4
		2	18.7	54.7	6.3
		3	23.4	47.0	7.9

注:接种数均为50个。灭菌方法中,1.表示0.1%升汞灭菌10 min;2.表示75%酒精灭菌10 s,0.1%升汞灭菌8 min;3.表示75%酒精灭菌10 s,0.1%升汞灭菌4 min,然后再按此法重复1次。

2.2 芽的诱导培养

2.2.1 培养基对外植体萌动的影响

5种培养基对芽诱导的影响见表2。从表2可知,不同培养基对芽的诱导、生长均有较大影响。从诱导率来看,3号培养基的诱导率较高;从芽的生长来看,1号培养基较适合芽的生长;从萌芽率和增殖倍数来看,5号培养基较好。综合考虑芽的诱导、生长、增殖,3号培养基较适合诱导培养。通过对不同优良无性系进行诱导试验研究表明,不同无性系诱导所需的培养基激素浓度有所差异,需要利用不同培养基进行诱导,一般以1/2MS+6-BA(0.3~0.8 mg/L)为基本培养基即可成功地诱导新芽发生。

2.2.2 不同基因型对外植体诱导的反应差异

通过对36个无性系进行诱导试验表明,不同无性系间芽的诱导、生长和增殖差别较大,其中洋020无性系诱导率高,生长速度快,增殖倍数高;洋003等其他优良无性系的诱导率稍低,生长速度和增殖倍数较低;ZY01等无性系的诱导率都较低,但生长速度和增殖倍数都较高。方差分析表明:不同无性系之间的诱导率达显著差异水平而各重复之间无显著差异(表3),说明因本身基因型的影响,无性系的萌芽能力受遗传因素制约。这为选择诱导率高、萌芽能力强的优良无性系提供了理论依据。

2.3 继代增殖培养

2.3.1 激素对继代增殖的影响

随着激素总浓度的增高,芽的生长速度逐渐减慢,丛生芽比例增多,有效苗数的比例减少(表4)。当6-BA浓度保持不变时,随着IBA浓度的增高丛生芽的生长稍有减慢,当IBA浓度为0.5 mg/L时芽的高生长减慢较明显。IBA对继代增殖的影响主要在芽的高生长方面,对增殖倍数也有影响,浓度维持在0.3 mg/L效果较好。当IBA浓度保持不变时,随着6-BA浓度的增高,丛生芽数量增多,芽的高生长减少,有效苗的比例减少。6-BA主要影响继代增殖的倍数,当浓度过高时继代苗会出现轻微的玻璃化现象,芽的高生长受到抑制。综合各项指标,处理8比较适合杉木继代增殖培养。

表4 不同处理方法对继代增殖的影响

Table 4 Effects of different media on clump shoots induction subculture

处理 Treatment	激素浓度 Hormone content/(mg·L ⁻¹)		接种芽数 Inoculability/ 个	继代5次芽数 Buds after five subcultures/ 个	月增殖倍数 Proliferation multiple per month/倍	丛生芽特征 Character of buds
	6-BA	IBA				
1		0.1	15	139	1.56	芽生长快,丛芽很少,有效苗比例多
2	0.1	0.3	15	226	1.72	芽生长快,丛芽很少,有效苗比例多
3		0.5	15	253	1.76	芽生长较快,丛芽少,有效苗比例多
4		0.1	15	291	1.81	芽生长较快,丛芽少,有效苗比例较多
5	0.3	0.3	15	517	2.03	芽生长较快,丛芽较少,有效苗比例较多
6		0.5	15	987	2.31	芽生长较快,丛芽较少,有效苗比例较多
7		0.1	15	1271	2.43	芽生长较快,丛芽一般,有效苗比例较多
8	0.5	0.3	15	2491	2.78	芽生长较快,丛芽较多,有效苗比例较多
9		0.5	15	1617	2.55	芽生长较慢,丛芽一般,有效苗比例较少
10		0.1	15	1682	2.57	芽生长较慢,丛芽一般,有效苗比例较少
11	0.7	0.3	15	2582	2.80	芽生长较慢,丛芽多,有效苗比例较少
12		0.5	15	5439	3.25	芽生长很慢,丛芽多,有效苗比例很少

表2 不同培养基对芽诱导的影响

Table 2 Effects of different media on initial culture

培养基号 Media No.	诱导数 Forming buds/ 个	诱导率 Percentage of forming buds%	萌芽数 Buds/ 个	萌芽率 Bud rate%	平均芽长 Mean length of buds/ cm	增殖倍数 Proliferation multiple
1	6	12	9	18	2.1	1.50
2	9	18	20	40	1.7	2.22
3	14	28	45	94	1.6	3.21
4	10	20	35	70	1.0	3.50
5	7	14	30	60	0.6	4.29

注:接种数均为50个。

表3 不同无性系诱导率方差分析

Table 3 The variance analysis of different clone initial culture

变异来源 Variation source	自由度 f	平方和 SS	均方 MS	F值 F value
无性系	35	4.434	0.127	122.713**
重复	2	0.002	0.001	1.131
误差	70	0.072	0.001	
总方差	108	20.111		

2.3.2 基因型对继代增殖的影响

方差分析表明,36个无性系之间的增殖倍数达到极显著水平(表5),说明无性系增殖倍数受本身基因型的影响;不同重复之间的增殖倍数达到极显著水平,可见随着继代次数的增加,继代苗的幼化状态不同,组织的分生能力不同,继代增殖倍数不同。一般外植体随着继代次数的增加得到复壮和幼化,组织的分生能力增加,继代增殖倍数提高。但在继代次数相同的情况下,无性系的增殖倍数主要受其本身基因型的影响,这为选择继代增殖倍数高的优良无性系提供了理论依据。

2.4 生根培养

2.4.1 激素对生根的影响

添加3种激素的生根培养基对生根有着明显的促进作用,生根率明显提高,最高的从18%提高到78%(表6)。3种激素中IBA对生根的促进作用最强,添加IBA的生根培养基上生根率较高,生根时间较短,而且根长适中。综合来看,处理5的生根率高、出根早、根系生长健壮,移栽易成活。试验结果还表明,生根培养除了与培养基有较大关系,苗本身的因素影响也较大,同样的生根培养基在不同重复试验中的生根率不同,而且不同继代次数的有效苗在同样的生根培养基中生根率存在着较大的差别。这可能与有效苗的健壮、幼龄化状态、木质化程度等内部生理因素有关,通过进一步调试,生根率可达90%。研究还发现,不同无性系生根所需的激素种类和浓度存在较大的差异,有的无性系只要用低浓度的单一生长素即可很好地生根,而有的无性系则需要单一高浓度的生长素或不同生长素种类按一定配比处理后才能生根,通过进一步调试,生根率最高可达90%。

2.4.2 基因型对生根的影响

通过对筛选出来萌芽能力强、继代增殖倍数高8个优良无性系进行生根试验,得出不同无性系的生根能力不同。方差分析表明:不同无性系的生根率差异达到极显著水平,不同重复之间的差异没有达到显著水平,说明各无性系的生根能力受本身基因型的影响,生根能力强的无性系在不同重复试验中生根率都很高,使筛选生根率高的优良无性系成为可能。

2.5 移栽

将生根苗在培养室培养20d,当根长约0.5cm时转移到过渡性温室大棚中培养15d左右,小苗长成3cm以上,根长约为1.5cm且根系发达、叶色浓绿时,将苗根部的培养基清洗干净,移植在经过消毒的培养基中。通过对不同移栽基质进行试验得出的表7可知,不同基质的移栽成活率不同:灰炭土的移栽成活率较低,加入10%细沙的黄心土移栽成活率最高,移栽60d后移栽成活率为91%。通过对不同无性系在不同季节进行移栽试验得出,不同无性系的移栽成活率差异性较少,而季节对移栽成活率影响较大,夏季高温季节的移栽成活率较低,在冬季和春季的移栽效果较好。

2.6 快繁技术体系的建立

以继代增殖倍数和生根率为主要指标对36个无性系进行了筛选,筛选出继代增殖倍数2.20倍以上、组培苗生根率50%以上的5个优良无性系,各无性系的诱导、增殖、生根和移栽的基本情况见表8。

表5 不同无性系增殖倍数方差分析表

Table 5 The variance analysis of different clone clump shoots induction subculture

变异来源 Variation source	自由度 f	平方和 SS	均方 MS	F值 F value
无性系	35	27.111	0.775	72.952**
重复	2	0.128	0.064	6.010**
误差	70	0.743	0.011	
总方差	108	414.335		

无性系提供了理论依据。

表6 激素对生根培养的影响

Table 6 Effects of ABT, IBA, NAA on rooting

处理 Treatment	激素 Hormone	生根率 Rooting frequency%	生根天数 Rooting time/d	平均根数 No. of roots per shoot/根	平均根长 Mean length of roots/cm
1	ABT(0.5)	31	22	2.1	1.6
2	ABT(1.0)	67	26	2.3	2.0
3	ABT(1.5)	61	31	1.6	1.3
4	IBA(0.1)	51	21	2.6	1.2
5	IBA(0.5)	78	18	3.1	1.5
6	IBA(1.0)	63	25	1.9	1.6
7	NAA(0.1)	32	31	1.3	1.0
8	NAA(0.5)	45	29	2.0	0.9
9	NAA(1.0)	21	35	1.7	1.2
10	0	18	38	1.0	1.6

注:括号中为激素浓度(mg/L)。

表7 不同基质对移栽的影响

Table 7 Effects of different media on transplantation

处理 Treatment	成活率 Survival rate%	
	30 d	60 d
灰炭土	55	46
黄心土	87	80
灰炭土和黄心土(1:1)	78	73
黄心土和细沙(9:1)	96	91

从表8可知,通过对这5个优良无性系进行重点研究,筛选出了比较合适的诱导、继代和生根培养基以及移栽基质,使无性系的诱导率(ZY02、ZY03的外植体采自优树伐桩萌芽条、污染率高)、增殖倍数、生根率和移栽成活率都达到了比较高的水平,基本建立了组培快繁技术体系,其中洋020和ZY03的各项指标已初步达到了产业化水平。

表8 5个优良无性系的组培概况
Table 8 Tissue culture of 5 excellent clone

无性系 Clone	诱导率 Percentage of forming buds%	诱导培养基 Media	增殖倍数 Proliferation multiple	增殖培养基 Media of proliferation	生根率 Rooting frequency%	生根培养基 Rooting media	移栽成活率 Survival rate of transplantation %
YL020	55	1/2MS+BA(0.5)	2.63	1/2MS+BA(0.3)+IBA(0.1)	90	1/4改良MS+NAA(0.5)	96
YL061	56	1/2MS+BA(0.5)	2.42	1/2MS+BA(0.4)+IBA(0.1)	68	1/4改良MS+NAA(0.5) +IBA(0.5)	95
YL003	43	1/2MS+BA(0.5)	2.51	1/2MS+BA(0.5)+IBA(0.1)	53	1/4改良MS+NAA(1.0)	93
ZY02	18	1/2MS+BA(0.8)	2.23	1/2MS+BA(0.5)+IBA(0.1)	66	1/4改良MS+ABT ^{1#} (1.0)	90
ZY03	15	1/2MS+BA(0.8)	2.52	1/2MS+BA(0.3)+IBA(0.1)	85	1/4改良MS+ABT ^{1#} (1.0)	92

注:括号中为激素浓度(mg/L);移栽基质为黄心土+细沙(m黄心土:m细沙=9:1)。

3 结论

(1)杉木外植体诱导、继代增殖和生根主要受无性系本身基因型的影响。不同无性系的外植体诱导率、继代增殖倍数、生根能力都达到了差异极显著水平,各无性系的诱导、增殖和生根都受本身遗传因素的制约。研究发现,无性系的诱导率与继代增殖倍数存在相关性,诱导率高的无性系往往继代增殖倍数高,如YL20、YL003、ZY03、ZY08等优良无性系;但无性系的诱导率和继代增殖倍数与无性系生根能力不存在相关性,如洋003的增殖倍数比较高而生根率比较低,洋234继代增殖倍数比较低而生根率很高,而无性系YL20和ZY03的继代增殖倍数和生根率都很高。这为筛选适合组培产业化即诱导率高、萌芽能力强、容易生根的优良无性系提供了可能。

(2)外植体诱导、继代增殖、生根和移栽受外界培养条件的影响较大,同一无性系在不同的基本培养基和不同激素浓度组合条件下,其诱导率、继代增殖倍率和生根率存在较大的差异。诱导培养在冬季和春季比较好,污染率低且诱导容易,培养基以1/2MS+6-BA(0.3~0.8 mg/L)较好;继代增殖培养的培养基以1/2MS+6-BA(0.5~0.7 mg/L)+IBA(0.3 mg/L)较好;生根培养基以1/2改良MS+IBA(0.5~1.0 mg/L)或ABT^{1#}(1.0~1.5 mg/L)较好;移栽基质以黄心土和细沙(质量比为9:1)较好。基本构建了优良无性系的组培快繁技术体系,为实现组培苗木规模化生产奠定了理论基础。

(3)研究还发现,对于诱导率高、萌芽能力强但生根困难的优良无性系采用诱导、增殖、壮苗、移栽途径来生产组培苗木是比较可行的方法,继代苗经接入壮苗培养基(即MS+IBA(0.1~0.5 mg/L)+IAA(0.5~1.0 mg/L)+蔗糖(3%))后,高生长很明显,且苗木健壮,培养30 d苗高均可达3 cm以上,将其转移到过渡性温室大棚中培养10 d左右,然后移栽到加入10%细沙的黄心土基质上,移栽成活率可达90%以上,60 d后苗木的生根率可达85%以上。对于在生根瓶里不能生根,而在移栽基质中却能生根的原因和机理还不清楚,笔者认为是无性系本身基因型和外界因素共同作用的结果,苗木需要在移栽基质中培养较长时间才能形成根系分生组织随后形成不定根。

[参考文献]

- [1] 王怀智. 经济植物组织培养[M]. 北京: 科学出版社, 1988.
- [2] 陈正华. 木本植物组织培养及其应用[M]. 北京: 高等教育出版社, 1986.
- [3] 林静芳. 林木组织培养的现状与展望[J]. 林业科技通讯, 1988(4): 1-4.
- [4] 施季森, 何祯祥. 林木无性繁殖及其在遗传改良中的地位[J]. 世界林业研究, 1994(3): 25-30.
- [5] 施季森, 何祯祥, 叶志宏, 等. 杉木无性系扦插生根能力遗传变异的研究[J]. 南京林业大学学报, 1993, 17(4): 9-14.
- [6] 何祯祥, 蒋 恕, 叶志宏, 等. 杉木无性系扦插繁殖生根机理[J]. 浙江林学院学报, 1994, 11(1): 38-44.
- [7] 阙国宁. 杉木组培嫩梢增殖与复壮的分析[J]. 林业科学研究, 1989, 2(6): 546-551.
- [8] 诸葛强, 阙国宁. 氮、磷、钾对若干种木本植物离体培养繁殖的影响[J]. 林业科学研究, 1990, 3(1): 41-46.
- [9] 吴耀溪, 李振问, 吴大忠. 杉木组织培养繁殖体系建立的研究[J]. 福建林学院学报, 1991, 11(1): 67-74.
- [10] 诸葛强, 阙国宁. 杉木离体培养中的钙、镁效应[J]. 林业科学研究, 1992, 5(1): 60-64.
- [11] 苏秀铤, 余小涵, 耿玉敏. 杉木优良无性系组培繁育试验研究[J]. 福建林业科技, 1997, 24(4): 36-40.
- [12] 吴大忠. 不同杉木优良无性系组培诱导特性的研究[J]. 福建林业科技, 1999, 26(1): 26-29.
- [13] 苏秀铤. 杉木无性系不同继代数组培苗差异研究[J]. 福建林学院学报, 2000, 20(4): 353-356.
- [14] 黄发新, 李明鹤. 不同生理老化程度杉木外植体的组培效果[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2001, 25(2): 83-86.

(责任编辑 郑球毅)