

速生优良杉木组培快繁技术试验

黄碧华

(福建省林业科技试验中心, 福建南靖 363600)

摘要: 应用正交设计法研究外植体的最佳消毒方式, 同时考察了培养基、6-BA、KT、NAA 等 4 个因子对杉木组培苗芽增殖的影响和 IBA、NAA、ABT1[#]、蔗糖 等 4 个因子对组培苗生根培养的影响。结果表明: 以茎尖为外植体材料, 消毒方式采用 70% 乙醇处理 40 s 后无菌水冲洗一遍, 再用 0.1% 升汞溶液处理 7 min 后用无菌水冲洗 5 次以上; 最佳的增殖培养基是 1/2 MS+6-BA 0.8 mg·L⁻¹, 最适于生根的培养基是 MS 培养基中 + 蔗糖 30 g·L⁻¹ + IBA 1.2 mg·L⁻¹ + NAA 0.2 mg·L⁻¹ + ABT1[#] 1.5 mg·L⁻¹。

关键词: 杉木; 无性繁殖; 组织培养; 正交试验

中图分类号: S791.27

文献标识码: A

文章编号: 1002-7351(2007)02-0133-04

A study on the technique of the superior Chinese fir tissue culture and rapid propagation

HUANG Bi-hua

(Fujian Provincial Forestry Research Center, Nanjing, Fujian 363600, China)

Abstract: The orthogonal design was used to select the optimal method for the explant disinfection. This paper studied the effects of 4 factors, medium, 6-BA, KT and NAA, on the bud propagation, and the effects of 4 factors, IBA, NAA, ABT1[#] and sucrose, on rooting in tissue culture. The result showed that the stem tips should be used for explants; the disinfection method was using 70% alcohol for 40 s then rinsed with autoclaved water once, followed by 0.1% HgCl₂ for 7 min then rinsed with autoclaved water 5 times; 1/2MS medium supplemented with 6-BA 0.8 mg·L⁻¹ was suitable for its multiplication, and MS supplemented with sucrose 30 g·L⁻¹ + IBA 1.2 mg·L⁻¹ + NAA 0.2 mg·L⁻¹ + ABT1[#] 1.5 mg·L⁻¹.

Key words: Chinese fir; clone propagation; tissue culture; orthogonal experiment

杉木(*Cunninghamia lanceolata* Hook)是我国主要速生用材树种, 具有生长快、产量高、材性好、用途广等特性^[1]。组织培养是迅速繁殖林木良种的重要手段之一, 给林业带来了飞跃的进步。国内外对桉树、杨树、相思树等速生树种的优良无性系的组织培养研究已取得了一定进展^[2,3]。为了挖掘潜力, 缓解对营建杉木丰产林的良种需求, 最快捷有效且经济的方法是建立杉木优良无性系组培快繁技术体系, 培育优良杉木苗来营造杉木丰产林, 以迅速提高杉木生产力。为此, 本试验进行了杉木优良无性系的组培快繁研究。

1 材料和方法

1.1 试验材料

试验采用 5 年生的杉木优良无性系 061、065 的半木质化穗条作为外植体, 优良无性系 061、065 选自福建省洋口国有林场杉木二代测定林。

1.2 材料的处理方法

从修剪好的杉木半木质化穗条(茎尖、茎段和茎部)中切取 0.5~1 cm 长作为外植体材料, 用自来水冲洗 3 h, 然后用 0.2% 灭菌净浸泡 30 min。清洗后在超净工作台用 70% 乙醇处理, 无菌水冲洗一遍; 再用 0.1% 升汞溶液处理; 最后用无菌水冲洗 5 次以上^[4]。把材料放置无菌的滤纸上, 滤干水分用手术刀在接种盘中切除芽条切口处, 保留茎尖小芽和侧芽, 接入已制作好的诱导培养基。MS 为初始培养基, 加上 6-苄基腺嘌呤 6-BA 0.1 mg·L⁻¹ 和萘乙酸 NAA 0.1 mg·L⁻¹。

收稿日期: 2007-02-26

作者简介: 黄碧华(1973-), 女, 福建泉州人, 福建省林业科技试验中心助理工程师, 从事植物组培快繁研究。

1.3 试验设计

1.3.1 外植体消毒试验 选用正交表 $L_9(3^4)$ 进行外植体消毒试验, 处理因素及水平见表 1^[5], 共设 5 次重复, 每个处理试验 50 瓶, 每瓶 11 个外植体, 每 5 d 观察记录 1 次外植体的污染情况和萌动情况。

1.3.2 芽增殖试验 以固体培养基 MS、1/2MS、1/3MS、1/4MS, 附加不同配比的 6-苄基腺嘌呤 6-BA、激动素 KT、萘乙酸 NAA, pH 值 5.8, 采用正交设计 $L_{16}(4^5)$ 进行不同组合处理试验, 设 3 次重复, 每处理接种 50 瓶, 每瓶 10 个芽苗, 每 5 d 观察 1 次并记录增殖倍数和生长情况, 试验因素及水平见表 2。

1.3.3 生根诱导试验 以 MS 为基本培养基, pH 值 5.8, 选取经继代培养顶端明显的芽条, 长度 1.5~2 cm, 考察 IBA、NAA、ABT 1[#]、蔗糖等 4 个因素对生根的影响, 每因素设 4 个水平, 采用正交表 $L_{16}(4^4)$ 进行试验安排, 设 3 次重复, 各因素水平见表 3, 每试验接种 50 瓶, 每瓶 10 株, 每 10 d 观察 1 次, 并记录生根情况和生长情况。

1.4 培养条件

组培苗的无菌体系建立、分化和生根培养都在培养室进行, 培养室的培养温度为 $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 光照强度 2 000 LX, 光照时间为 $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

2 结果与分析

2.1 消毒对杉木外植体的影响

杉木外植体消毒试验结果见表 4, 从表中各因子水平的 K 值来看, 选用茎尖为外植体材料, 同时用 70% 乙醇处理 40 s、0.1% 升汞处理 7 min 的处理组合为最好, 正好与本试验中的处理 3 的结果相符, 其平均萌芽率高达 36%; 其次为处理 7, 平均萌芽率达 15%, 处理 1 的效果最差, 外植体未经消毒, 全部被细菌污染, 平均萌芽率为 0。从总极差值来看, 影响杉木外植体萌芽率最重要的因素是 0.1% 升汞, 而外植体部位和 70% 乙醇的影响相对较小。

2.2 不同培养基及激素对杉木芽增殖的影响

不同培养基及激素对杉木芽增殖影响的结果见表 5。从表中可看出, 不同处理间的增殖倍数、不定芽和有效芽数量相差较大。因增殖倍数是衡量芽增殖质量优劣的主要性状指标, 为此对不同因子处理的增殖倍数进行方差分析和极差分析, 结果见表 6。从表中看出, 不同培养基和 6-BA 对杉木芽增殖培养的影响达极显著差异水平, 而且培养基比 6-BA 对芽增殖倍数的影响更大, 而 KT 和 NAA 对增殖倍数的影响不显著。从表 K 值大小看, 培养基以 1/2 MS 处理为最好, 6-BA 以第 3 处理水平即 $0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 为最好,

表 1 消毒试验因素与水平

水平	因 素		
	外植体部位	70% 乙醇/s	0.1% 升汞/min
1	茎尖(穗条尾梢)	0	0
2	茎段(穗条中部)	30	3.5
3	茎部(穗条基部)	40	7

表 2 增殖培养因素与水平 单位: $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

水平	因 素			
	培养基	6-BA	KT	NAA
1	MS	0.2	0	0
2	1/2 MS	0.4	0.3	0.1
3	1/3 MS	0.8	0.6	0.2
4	1/4 MS	1.2	0.9	0.4

表 3 生根诱导试验因素与水平 单位: $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

水平	因 素			
	蔗糖	IBA	NAA	ABT 1 [#]
1	15	0.2	0	0
2	20	0.4	0.1	0.5
3	30	0.8	0.2	1.0
4	40	1.2	0.3	1.5

表 4 消毒对杉木外植体萌动的影响及极差分析结果

处理	外植体部位	70% 乙醇/s	0.1% 升汞/min	平均萌芽率/%
1	茎尖	0	0	0
2	茎尖	30	3.5	13
3	茎尖	40	7	36
4	茎段	0	3.5	12
5	茎段	30	7	8
6	茎段	40	0	9
7	茎部	0	7	15
8	茎部	30	0	2
9	茎部	40	3.5	5
K_1	16.3	9.0	3.7	
K_2	9.7	7.7	10.0	
K_3	7.3	16.7	19.7	
R	9.0	9.0	16.0	

*: 萌动率为无感染、有芽点长出的外植体数除以总接数。

则芽增殖培养的最优处理配方为:1/2MS+6-BA 0.8 mg·L⁻¹,其增殖倍数可达 4 倍以上,适合工厂化育苗的需要。

表 5 杉木外植体芽增殖试验结果

处理	培养基	6-BA	KT	NAA	指 标		
					不定芽数/个	有效芽数/个	增值倍数
1	MS	0.2	0.0	0.0	2.1	1.3	1.1
2	MS	0.4	0.3	0.1	4.3	2.8	2.3
3	MS	0.8	0.6	0.2	7.6	4.2	2.7
4	MS	1.2	0.9	0.4	9.1	5.0	2.8
5	1/2 MS	0.2	0.3	0.2	6.7	3.2	2.6
6	1/2 MS	0.4	0.0	0.4	13.6	6.1	5.1
7	1/2 MS	0.8	0.9	0.0	8.1	5.4	4.2
8	1/2 MS	1.2	0.6	0.1	9.8	8.2	4.1
9	1/3 MS	0.2	0.6	0.4	4.5	4.2	2.6
10	1/3 MS	0.4	0.9	0.2	8.1	3.3	3.7
11	1/3 MS	0.8	0.0	0.1	8.7	2.9	4.3
12	1/3 MS	1.2	0.3	0.0	9.2	7.3	3.2
13	1/4 MS	0.2	0.9	0.1	7.7	5.8	2.5
14	1/4 MS	0.4	0.6	0.0	6.8	3.7	3.3
15	1/4 MS	0.8	0.3	0.4	9.6	6.5	4.1
16	1/4 MS	1.2	0.0	0.2	6.8	7.8	3.3

*:有效芽指 1.1 cm 以上的芽条;增殖倍数为有效芽总数/接种外植体数量。

表 6 不同因子处理的增殖倍数方差分析(完全随机模型)和极差分析

变异来源	因子方差分析及显著性检验				极差分析				总极差 R
	平方和	自由度	均方	F 值	K ₁	K ₂	K ₃	K ₄	
培养基	6.62188	3	2.2073	43.6008**	2.23	4.00	3.45	3.30	1.78
6-BA	6.26187	3	2.0873	41.2305**	2.20	3.60	3.83	3.35	1.63
KT	0.35188	3	0.1173	2.3169	3.45	3.05	3.18	3.30	0.40
NAA	1.13188	3	0.3772	7.4527	2.95	3.30	3.08	3.65	0.70
空列*	0.15188	3	0.0506						
误差	0.1519	3	0.0506						
总和	14.51938								

2.3 不同蔗糖浓度和生长素对杉木外植体生根诱导的影响

不同生长素对杉木生根的影响结果见表 7。从表中可看出,不同处理间的生根数、根长和生根率相差较大。对不同因子处理的生根率进行方差分析和极差分析,结果见表 8,从表中看出,蔗糖、IBA、NAA 和 ABT1[#]对杉木组培生根均有显著或极显著的影响,从表中 K 值大小看,蔗糖、IBA、NAA 和 ABT1[#]的浓度分别以第 3 水平、第 4 水平、第 3 水平和第 4 水平处理的生根率为最高,即生根诱导的最优组合为在 MS 培养基中添加蔗糖 30 g·L⁻¹、IBA 1.2 mg·L⁻¹、NAA 0.2 mg·L⁻¹、ABT1[#] 1.5 mg·L⁻¹,该处理生根率可达 80% 以上,生根数达 3~5 条·株⁻¹,根长 2.0 cm 左右。从总极差 R 值大小看,对杉木外植体生根诱导影响最大的为 IBA,其次为蔗糖,大小排序为 IBA>蔗糖>NAA>ABT1[#]。

3 小结

1)杉木茎尖愈伤组织的形成能力强,其消毒方式为在超净工作台用 70% 乙醇处理 40 s,无菌水冲洗一遍;再用 0.1% 升汞溶液处理 7 min;最后用无菌水冲洗 5 次以上,即可备用。

2)芽诱导采用 1/2MS+6-BA 0.8 mg·L⁻¹效果最好,增殖倍数达 4 倍以上;生根培养基采用 MS 培养

基中附加蔗糖 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、IBA $1.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、NAA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、ABT1[#] $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ，该处理根系发育好，生根率可达 80% 以上，生根数达 3~5 条·株⁻¹，根长 2.0 cm 左右。

表 7 生长素对杉木外植体生根诱导的影响

处理	蔗糖 / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	IBA / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	NAA / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	ABT1 [#] / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	指 标		
					生根率/%	生根数/条·株 ⁻¹	根长/cm
1	15	0.2	0.0	0.0	40.2	1.2	1.8
2	15	0.4	0.1	0.5	45.7	2.3	1.6
3	15	0.8	0.2	1.0	83.9	3.5	2.1
4	15	1.2	0.3	1.5	87.3	4.1	2.0
5	20	0.2	0.1	1.0	65.3	3.1	2.2
6	20	0.4	0.0	1.5	70.5	2.8	1.7
7	20	0.8	0.3	0.0	89.4	4.8	2.4
8	20	1.2	0.2	0.5	92.5	5.3	2.8
9	30	0.2	0.2	1.5	82.7	4.2	2.9
10	30	0.4	0.3	1.0	83.5	3.8	2.1
11	30	0.8	0.0	0.5	70.4	3.2	1.7
12	30	1.2	0.1	0.0	85.4	3.5	1.9
13	40	0.2	0.3	0.5	62.5	2.1	2.6
14	40	0.4	0.2	0.0	67.8	2.7	2.3
15	40	0.8	0.1	1.5	80.1	3.5	1.6
16	40	1.2	0.0	1.0	85.6	4.6	1.9

表 8 不同因子处理的生根率方差分析(完全随机模型)和极差分析结果

变异来源	因子方差分析及显著性检验				极差分析				
	平方和	自由度	均方	F 值	K ₁	K ₂	K ₃	K ₄	总极差 R
蔗糖	660.185	3	220.062	25.834*	64.28	79.43	80.50	74.00	16.23
IBA	1655.215	3	551.738	64.771**	62.68	66.88	80.95	87.70	25.03
NAA	721.770	3	240.590	28.244*	66.68	69.13	81.73	80.68	15.05
ABT1 [#]	469.335	3	156.445	18.366*	70.70	67.78	79.58	80.15	12.38
空列*	25.555	3	8.518						
误差	25.555	3	8.518						
总和	3532.060								

参考文献:

- [1]张梅林,吕勇,吴军,等.杉木应用全息定域选种育苗试验[J].安徽林业科技,2005(2):9-10.
- [2]阙国宁.杉木组织培养的初步研究[J].林业科学,1980(增):137-140.
- [3]周天相.杉木无性系育种和良种繁育新技术[M].北京:中国林业出版社,1990:1-57.
- [4]姚立平,石文平.对组培技术应用的几点建议[J].辽宁林业科技,2005(4):45-54.
- [5]陈华豪,丁思统.林业应用数理统计[M].大连:大连海运学院出版社,1988:285-300.