

杉木成年优良无性系的不定芽增殖研究

周小红¹, 周艳威¹, 张元莉¹, 施季森¹, 郑仁华², 陈金慧^{1*}

(1. 南京林业大学森林资源与环境学院, 林木遗传与生物技术省部共建教育部重点实验室, 江苏 南京 210037;

2. 福建省林业科学研究院国家林业局南方山地用材林培育重点实验室, 福建 福州 350012)

摘要:以杉木成年优良无性系的无菌组培苗为外植体, 研究激素、活性炭等对不定芽增殖的影响, 在此基础上探讨接种方式对杉木增殖效率的影响。研究表明:6-BA 浓度为 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时能有效促进不定芽增殖, 但继续添加则起抑制作用, 并容易引起玻璃化; 去除顶端优势的接种方式能将不定芽的增殖效率提高一倍多; 不同的基因型间平均不定芽数相差 1; BA、KT、NAA 的组合使用较单一激素使用有利于不定芽的伸长, 适量的活性炭有利于杉木不定芽的伸长生长。

关键词:杉木; 接种方式; 器官发生; 不定芽

中图分类号: S791.27

文献标识码: A

Studies on Adventitious Bud Proliferation of Chinese Fir

ZHOU Xiao-hong¹, ZHOU Yan-wei¹, ZHANG Yuan-li¹, SHI Ji-sen¹, ZHENG Ren-hua², CHEN Jin-hui¹

(1. Key Laboratory of Forest Genetics and Biotechnology of Ministry of Education, College of Forest Resources and Environment,

Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China;

2. Fujian Academy of Forestry, Southern Mountain Timber Forest Cultivation Lab, State Forestry Administration, Fuzhou 350012, Fujian, China)

Abstract: Taking mature shoot sections of superior clones as test materials, an in vitro procedure for adventitious buds' induction in Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*) was set up. In this research, some factors, such as the type of plant growth regulator, genotype of the explants and activated charcoal in the medium, especially the methods of buds' inoculation, were studied for adventitious buds and proliferation. The results showed that when the concentration of 6-BA came to $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, it could effectively improve the proliferation of adventitious buds. However, while the concentration of 6-BA was too high, it would inhibit the buds' proliferation and they were easily vitrified. Removal of apical dominance could significantly increase the efficiency of buds' induction. And the efficiency differed a lot according to different genotypes. Using BA, KT, and NAA in combination was better for elongation of buds than using individual plant growth regulator; and proper using of activated charcoal could improve buds' elongation.

Key words: *Cunninghamia lanceolata*; buds' inoculation; organogenesis; adventitious buds

目前, 杉木种苗繁育主要通过种子、扦插和组织培养 3 个途径^[1-2]。组织培养手段可以克服种子繁殖中受大小年影响导致的产量不稳定, 能够快速繁

育性状优良的无性系种苗。然而, 传统组织培养中, 杉木的增殖系数较低, 生产成本较高, 不利于该技术的生产应用。

收稿日期: 2012-07-26; 修回日期: 2012-09-26

基金项目: 国家林业公益性行业专项基金(201004049)、国家自然科学基金重点项目(编号:30930077)、福建省自然科学基金项目(2009J06009)、福建省林木种苗科技攻关项目(闽林科[2009]4号)、江苏省高校优势学科建设工程和江苏省高校研究生科研创新计划资助项目(CXZZ11_0533)

作者简介: 周小红, 在读博士研究生, 从事杉木遗传改良研究。

* 通讯作者: 陈金慧, 副教授, 硕士生导师, 从事杉木、马褂木遗传育种研究, chenjh@njfu.edu.cn

对杉木组织培养的研究最早始于20世纪70年代末,阙国宁^[3]以杉木实生幼苗茎尖、幼嫩茎段为外植体,通过间接方式,从愈伤组织上分化不定芽并获得再生植株。李勇^[4]和陈剑勇^[5]分别利用杉木成熟合子胚和优良单株基部萌蘖条茎尖进行愈伤组织的诱导及植株再生。苏秀城^[6]在杉木无性系不同继代代数组培苗差异研究中表明,继代代数组对无性系的不同影响可能与无性系苗木中的激素积累水平和对激素的敏感程度有关。席梦利等^[7]以杉木子叶和下胚轴为起始外植体,实现了杉木器官发生与体胚发生。已有报道多集中于从激素浓度、种类、基本培养基等水平^[8]研究杉木不定芽的增殖效率,而研究不同接种方式对杉木不定芽增殖效率的影响以及多激素协同使用优势性的研究还未见报道。

本试验以杉木成年优良无性系根部萌条获得的无菌组培苗为研究对象,在研究多激素混合使用、活性炭等对杉木不定芽诱导的同时,探讨不同接种方式对杉木不定芽增殖效率的影响,旨在建立成年优良无性系的组织培养体系,为生产应用提供技术支持。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

以福建省洋口国有林场及福建林科院提供的10个杉木成年优良无性系的无菌组培苗为研究材料,为杉木成年优树的基部萌条。

1.2 培养基与培养条件

1.2.1 不同激素及活性炭对不定芽增殖及伸长生长的影响 以较适于杉木组织培养的DCR^[9]为基本培养基。增殖培养基为DCR基本培养基,添加0.5~2.0 mg·L⁻¹BA、0.2~1.0 mg·L⁻¹KT和0.2 mg·L⁻¹NAA,蔗糖3.0%,pH值5.8。每个处理接种8瓶,每瓶5个茎段,试验3次重复。培养35d后统计不定芽的增殖情况。

继代培养基以DCR为基本培养基,蔗糖3.0%,添加BA、NAA和活性炭(0.5、1.0、1.5 g·L⁻¹)(如表1),每个处理接种10瓶,每瓶5个不定芽。试验3次重复。培养35d后统计不定芽的有效伸长率和伸长数。

1.2.2 不同接种方式对外植体增殖的影响 采用竖插未去顶芽(A)、竖插去顶芽(A')、竖插中段(B)、竖插底段(C)、横插去顶芽(a)、横插中段(b)、横插底段(c)不同的接种方式进行不定芽增

殖研究(如表1),每种接种方式接种8瓶,每瓶接种5个茎段,试验3次重复,35d后统计不定芽的增殖情况。

表1 激素及活性炭对不定芽伸长生长的影响

培养基 编号	基本 培养基	BA/ (mg·L ⁻¹)	NAA/ (mg·L ⁻¹)	KT/ (mg·L ⁻¹)	活性炭/ (mg·L ⁻¹)
对照(0)	DCR				
1	DCR				0.5
2	DCR				1
3	DCR				1.5
4	DCR	0.5			
5	DCR	0.5	0.2		
6	DCR	0.5	0.2	0.2	

1.2.3 培养条件 采用光照培养,光照(2 000 lx)14 h·d⁻¹,培养温度为23~25℃。

1.3 数据统计与分析

通过分析不定芽增殖率,平均不定芽数,不定芽有效伸长率及平均伸长量来比较各种因素在杉木不定芽诱导中的作用。其中不定芽诱导率(%)=(诱导出不定芽外植体数/总外植体数)×100%;平均不定芽数=不定芽的总数/诱导出不定芽的外植体数;有效伸长率(%)=(伸长外植体数/总外植体数)×100%;平均伸长量=伸长量/伸长外植体数。

2 结果与分析

2.1 不定芽的增殖

2.1.1 激素对不定芽增殖的影响 将2 cm左右的1、2号基因型茎段接种于添加了BA 0.1~2.0 mg·L⁻¹、KT 0.2 mg·L⁻¹、NAA 0.2 mg·L⁻¹的DCR增殖培养基,10 d后即有黄绿色的芽点出现,35 d统计不定芽的增殖情况(表2)。

表2 BA对不同基因型不定芽诱导的影响

BA/ (mg·L ⁻¹)	1号基因型			2号基因型	
	不定芽诱 导率/%	平均不 定芽数	不定根诱 导率/%	不定芽诱 导率/%	平均不定 芽数
0.1	45.71	1.63	82.86	95	3.45
0.5	95.00	2.50	0	100	3.05
1.0	96.00	2.46	0	88	3.05
1.5	92.73	2.90	0	100	4.50
2.0	100.00	3.13	0	100	3.57

不同浓度的BA对不定芽的诱导存在差异。总体上说,随着BA浓度的升高,不定芽的效率增大,最高能实现100%的不定芽诱导频率,但是,当BA浓度超过1.5 mg·L⁻¹后,玻璃化程度显著提高。因

而,过高的 BA 反而不利于不定芽的增殖。

2.1.2 接种方式对外植体萌动的影响 探讨不同接种方式对不定芽的诱导的影响(图1,图2)。可以发现,去除顶端优势后竖插去顶芽(A')、竖插中段(B)、竖插底段(C)、横插去顶芽(a)、横插中段(b)、

横插底段(c)不定芽的诱导率均有提高,且以横插底段(c)和竖插底段(C)的两种接种方式不定芽诱导率最高。此外,可以发现较成熟的利于不定芽的增殖。

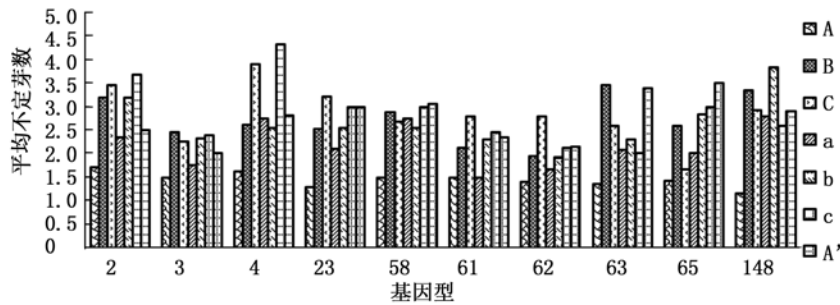


图1 不同接种方式对不定芽诱导的影响

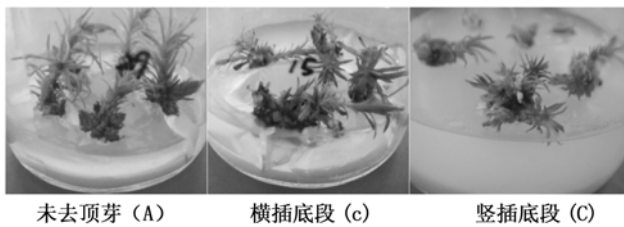


图2 不同接种方式的不定芽增殖

2.1.3 基因型对不定芽诱导的影响 如图1,图3和表3所示,不同的基因型对激素以及接种方式的反应存在差异。表2中,1号基因型接种于添加 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA、 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT、 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA的DCR增殖培养基可以获得不到50%的不定芽诱导率,而不定根诱导可以达到80%以上,而平均不定芽数最大可以相差1。

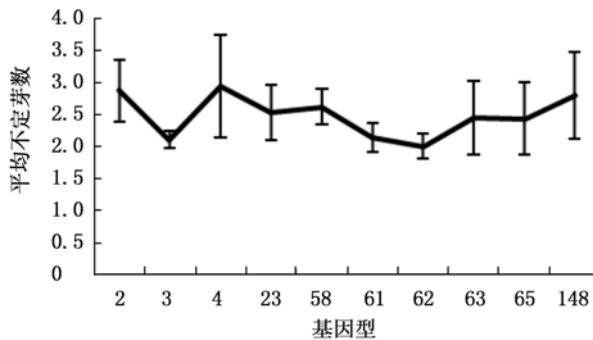


图3 基因型对不定芽诱导的影响

2.2 不定芽继代伸长培养

2.2.1 激素对伸长培养的影响 如表4所示,多个基因型在不添加激素的对照中都能有效地进行伸长培养。从表5、6的方差分析可以发现,不定芽有效

表3 BA对不同基因型不定芽诱导方差分析

变异来源	自由度	平方和	均方	F	P
不定芽诱导率	5	1 444.77	288.95	1.16	0.456 5
BA 浓度	4	1 157.90	289.48	1.16	0.444 8
基因型	1	286.87	286.87	1.15	0.344 2
误差	4	998.81	249.70		
总计	9	2 443.58			
不定芽诱导数	5	4.36	0.87	4.07	0.099 4
BA 浓度	4	1.86	0.47	2.17	0.235 6
基因型	1	2.50	2.50	11.65	0.026 9
误差	4	0.86	0.21		
总计	9	5.22			

伸长率激素组合的 F 值为 12.05 ($P < 0.000 1 < 0.01$),有效伸长量激素组合的 F 值为 4.97 ($P = 0.007 1 < 0.01$)表明不同激素组合间对不定芽伸长生长有极显著的影响。只添加 BA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的处理(4号培养基)中各基因型的有效伸长率都相对较低,可见单一的添加 BA 并不能达到有效伸长的目的。而添加 BA、KT、NAA 的处理(5号、6号培养基)相比其他处理较利于不定芽的伸长,激素的协同作用在杉木不定芽的伸长生长过程中影响显著。

综上所述,杉木不定芽的伸长生长在合适的基本培养基就可以正常生长,多激素按比例使用较单一激素的使用更合理。

2.2.2 活性炭对伸长培养的影响 如表7所示,添加不同浓度的活性炭有利于杉木不定芽的伸长生长。然而不同基因型对活性炭的浓度反应差异较大。62、65号基因型有效伸长率随着活性炭的增加而增加;3号基因型的有效伸长率在添加 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$

表4 BA、NAA、KT对不定芽伸长的影响

基因型	有效伸长率/%				伸长量/cm			
	0	4	5	6	0	4	5	6
2	54.28	56.32	72.43	95.83	10.00	8.75	9.00	10.00
3	62.81	49.47	65.68	90.70	9.80	9.17	9.17	10.00
4	45.87	46.25	52.65	72.79	8.00	10.00	10.00	12.00
23	57.14	56.25	37.50	90.50	10.00	10.00	10.00	13.50
58	93.33	76.19	76.48	100.00	10.00	10.00	10.00	10.00
61	53.53	33.13	70.54	66.26	13.33	6.25	10.00	8.33
62	56.57	59.72	70.26	90.22	12.50	10.00	9.35	11.26
63	69.05	36.67	74.17	62.63	11.67	8.33	6.25	10.00
65	82.08	76.19	65.00	75.00	13.75	8.75	9.00	10.00
148	63.75	64.03	81.37	100.00	13.33	9.00	8.75	10.00
平均	63.84	55.42	66.61	84.39	11.24	9.03	9.15	10.51

表5 BA、NAA、KT对不定芽有效伸长率的方差分析

变异来源	自由度	平方和	均方	F	P
有效伸长率	12	8 134.92	677.91	5.5	0.000 1
激素组合	3	4 454.18	1 484.73	12.05	<0.000 1
基因型	9	3 680.74	408.97	3.32	0.007 5
误差	27	3 328.07	123.26		
总计	39	11 462.99			

表6 BA、NAA、KT对不定芽有效伸长量的方差分析

变异来源	自由度	平方和	均方	F	P
有效伸长量	12	47.66	3.97	1.71	0.120 0
激素组合	3	34.60	11.53	4.97	0.007 1
基因型	9	13.06	1.45	0.63	0.765 4
误差	27	62.67	2.32		
总计	39	110.33			

表7 活性炭对不定芽伸长生长的影响

基因型	有效伸长率/%				伸长量/cm			
	0	1	2	3	0	1	2	3
2	54.28	74.19	83.34	80.16	10.00	14.17	13.89	15.00
3	62.81	95.83	82.55	74.20	9.80	10.00	10.83	10.00
4	45.87	75.56	84.62	47.22	8.00	11.67	15.00	16.67
23	57.14	66.67	92.31	66.11	10.00	20.00	20.00	18.33
58	93.33	95.83	85.71	95.00	10.00	17.50	21.67	25.00
61	53.53	74.94	87.15	86.67	13.33	13.57	10.00	15.00
62	56.57	79.81	85.44	91.67	12.50	20.00	20.00	15.00
63	69.05	81.21	87.88	83.33	11.67	11.00	16.00	16.25
65	82.08	94.59	95.80	96.67	13.75	20.63	18.75	22.00
148	63.75	80.73	88.31	86.08	13.33	15.71	15.83	15.63
平均	63.84	81.94	87.31	80.71	11.24	15.43	16.20	16.89

活性炭处理时较好;58号基因型添加活性炭后差异不明显。2、4、23、61、63、148号基因型的有效伸长率在添加 $1.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 活性炭时最高。

如表8、9,不定芽有效伸长率活性炭的 F 值为13.43($P < 0.000\ 1 < 0.01$),有效伸长量激素组合的

F 值为9.50($P = 0.000\ 2 < 0.01$),表明不同活性炭浓度的处理间对不定芽伸长生长有极显著的影响。而基因型的 F 值分别为4.19($P = 0.001\ 8 < 0.01$)和4.69($P = 0.000\ 8 < 0.01$),表明不同的基因型之间亦存在显著差异。

表8 活性炭对不定芽有效伸长率的方差分析

变异来源	自由度	平方和	均方	F	P
有效伸长率	12	5 982.82	498.57	6.50	<0.000 1
活性炭	3	3 092.05	1 030.68	13.43	<0.000 1
基因型	9	2 890.77	321.20	4.19	0.001 8
误差	27	2 071.35	76.72		
总计	39	8 054.16			

表9 活性炭对不定芽有效伸长量的方差分析

变异来源	自由度	平方和	均方	F	P
有效伸长量	12	479.33	39.94	5.89	<0.000 1
活性炭	3	193.15	64.38	9.50	0.000 2
基因型	9	286.18	31.80	4.69	0.000 8
误差	27	183.00	6.78		
总计	39	662.33			

因而,在生产实践中有必要根据不同的基因型选择合适浓度的活性炭。总体而言,培养基中添加 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 活性炭的培养基较适于杉木伸长培养。

而从伸长量考虑,添加活性炭后更有利于不定芽的伸长,可能活性炭能提供黑暗的环境,模拟自然条件,利于茎段的伸长生长。

综合可知,杉木不定芽伸长生长对活性炭的反应,各基因型的有效伸长率和其伸长量并不存在必然性,因而需要根据实际情况,选择既能达到有效伸长率要求,又能达到目标伸长量的活性炭浓度。

3 讨论

3.1 外植体及基因型对杉木不定芽诱导的影响

现有的研究多以杉木成熟种子^[10]、幼嫩茎段^[11]为外植体进行器官发生的研究,本试验以杉木成年优树根部萌条获得的无菌苗为起始外植体,并将不定芽的诱导频率达到100%,平均不定芽数最高提高到4以上,能为工厂化生产杉木优良种苗提供技术基础。

Skoog与Miller^[12]提出了“激素平衡”假说,即生长素生物学效应高于细胞分裂素时,诱导植物组织脱分化和根原基的形成;细胞分裂素的效应高于生长素时,诱导愈伤组织再分化和芽原基的形成;二者的比例平衡时,只形成愈伤组织。值得注意的是,植物激素的用量要考虑组织内源激素的含量及其生理学周期效应。换言之,激素的生物学效应是内源激素和外源激素效应的总和。

本试验中,1号基因型接种于添加 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA、 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ KT、 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA的DCR增

殖培养基(见表1)后,其不定芽诱导率为45.71%,不定根诱导率为82.86%。但当BA浓度超过 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 后,则不定根诱导率为零。2号基因型则不存在此现象,由此可见,当BA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,1号基因型激素的生物学效应是生长素的生物学效应高于细胞分裂素,而2号基因型则相反,因而,不同基因型间内源激素水平存在较大差异。这个结果在汤定钦^[13]的研究中也有发现,因此,针对不同的基因型,根发生需要建立一种最佳的内源生长素—细胞分裂素平衡。本试验选择的10个基因型之间存在很大差异。由于不同杉木优良无性系其性状遗传和生理基础的差异性,导致不同杉木无性系在同一组培配方条件下不定芽成功率和有效率方面存在很大的差异,因而对不同的基因型都有必要进行对应的研究。选择外植体时,除了考虑到树体的表型应具有良好的性状或具有特殊的基因型外,对试材的选择也要从不定芽诱导效率考虑,增加其实用价值。

3.2 不同接种方式对杉木不定芽诱导的影响

吕孟雨等^[14]发现不同的接种方式能对水稻成熟胚愈伤组织的诱导有显著的影响。方华舟^[15]在百合组培技术研究中发现,不同部位及不同放置方式对百合鳞片芽的诱导有显著影响。

由于植物生长存在顶端优势,其必然对不定芽的诱导会有很大的影响。Baxter等^[16]通过反复摘除伸长的幼茎顶端来实现腋芽增殖,建立了一种不施用外源激素即可进行腋芽大量增殖的方法。已有研究表明不同的外植体以及接种方式对组织培养的结果有很大的影响。本试验中采用去顶横插的方式能

使杉木不定芽的增殖效率提高一倍多。

参考文献:

- [1] 郑仁华, 施季森. 福建省杉木良种繁育现状与对策[J]. 林业科技开发, 2004, 18(2): 3-7
- [2] 苏秀城, 余小涵, 耿玉敏. 杉木优良无性系组培繁育试验[J]. 福建林业科技, 1997, 24(4): 36-40
- [3] 阙国宁. 杉木组织嫩梢增殖与复壮分析[J]. 林业科学研究, 1989, 2(6): 54-55
- [4] 李 勇. 杉木愈伤组织诱导及植株再生[J]. 林业勘察设计, 2011(1): 84-88
- [5] 陈剑勇. 杉木茎尖诱导愈伤组织及植株再生研究[J]. 西南林学院学报, 2009, 29(005): 37-41
- [6] 苏秀城. 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
- [7] 席梦利, 施季森. 杉木子叶和下胚轴的器官发生与体胚发生[J]. 分子植物育种, 2005, 3(6): 846-852
- [8] 阙国宁. 杉木组织培养的初步研究[J]. 林业科学, 1980, 16(S1): 137-140
- [9] Gupta P K, Durzan D J. Shoot multiplication from mature trees of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*) [J]. Plant Cell Reports, 1985, 4(4): 177-179
- [10] 席梦利, 施季森. 杉木成熟合子胚器官发生和体胚发生[J]. 林业科学, 2006, 42(9): 41-47
- [11] 朱木兰, 王 骥, 卫志明. 杉木再生系统的比较研究[J]. 分子细胞生物学报, 2007, 40(4): 239-244
- [12] Miller C, Skoog F. Chemical control of bud formation in tobacco stem segments [J]. American Journal of Botany, 1953, 40(10): 768-773
- [13] 汤定钦. 杉木组织培养述评[J]. 福建林业科技, 1992, 19(1): 65-69
- [14] 吕孟雨, 王海波, 高义平. 水稻成熟胚不同接种方式对愈伤组织诱导的影响[J]. 河北农业科学, 2009, 13(5): 34-36, 85
- [15] 方华舟, 洪万泓. 百合组织培养及快繁技术的研究与探讨[J]. 贵州林业科技, 2006, 34(4): 27-29
- [16] Baxter R, Brown S, England N, et al. Production of clonal plantlets of tropical pine in tissue culture via axillary shoot activation [J]. Canadian Journal of Forest Research, 1989, 19(10): 1338-1342