

湿地松组培快繁优良基因型的筛选

吴丽君

(福建省林业科学研究院, 福建 福州 350012)

摘 要: 以胚苗顶芽为外植体, 开展湿地松离体培养初代培养基、增殖培养基的优化及组培快繁优良基因型的筛选试验。结果表明: 最佳初代培养基为 B5+ 6 BA 2.0 mg · L⁻¹; 年增殖率最大的增殖培养基为 B5+ 6 BA 2.0 mg · L⁻¹+ IBA 0.1 mg · L⁻¹; 试验从湿地松普通家系中筛选出增殖能力强的优良基因型 132 个, 筛选出抗病家系优良基因型 2 个。

关键词: 湿地松; 组培; 器官发生; 植株再生; 优良基因型

中图分类号: S 791. 246 05 文献标识码: A

Selection of slash pine elite genotype for tissue culture and fast propagation

WU Lirun

(Fujian Academy of Forestry, Fuzhou, Fujian 350012, China)

Abstract: Using the sprouts of slash pine as explants, medium formulation for the first generation and multiplication was optimized. The results showed that the optimum medium for the first generation was B5+ 6 BA 2.0 mg · L⁻¹, and B5+ 6 BA 2.0 mg · L⁻¹+ IBA 0.1 mg · L⁻¹ for multiplication. The elite genotypes selected for the purposes included 132 from the non-antidisease and 2 from the antidisease families of the slash pine.

Key words: Slash pine; tissue culture; organogenesis; plantlet regeneration; elite genotype

组培技术是林木良种快繁的捷径, 是遗传操作、树种改良的前提^[1]。湿地松作为我国南方主要造林树种, 其抗病优良家系离体培养植株再生技术已受到业内学者普遍关注, 早年 Sommer 等^[2~4]开展过该方面的研究。近年来, 何月秋等以湿地松良种快繁为目标, 对湿地松常规组培技术进行了较为系统的研究^[5~7]。吴丽君等^[8]针对湿地松常规组培技术存在的问题, 采用固体和液体双层培养法, 简化了培养程序, 提高了快繁效率, 这些研究为湿地松组培技术的应用奠定了基础。

湿地松同大多数针叶树种一样, 为顽拗型植物, 其离体培养效果受基因型调控, 为此基于前期常规组培技术研究, 针对家系间、家系内个体增殖能力的差异显著性, 筛选增殖率高、继代周期短、生根能力强的适宜组培快繁的优良基因型, 对有快繁潜力的基因型进行组培快繁技术研究具有重要价值。

1 材料与 方法

1.1 材料

选取湿地松抗病家系 R2^[8] 和非抗病家系 CK1^[8] 生长健壮、苗龄 15 d 的胚苗, 截取带子叶

顶芽 (高 0.5~ 0.8 cm) 作为试验材料。

1.2 初代培养

选用改良 B5、DCR、PL 3 种基本培养基, 6-BA 3 个浓度水平: 0.5 mg · L⁻¹、1.0 mg · L⁻¹、2.0 mg · L⁻¹, NAA 3 个浓度水平: 0 mg · L⁻¹、0.01 mg · L⁻¹、0.05 mg · L⁻¹, 活性炭 AC 3 个浓度水平为 0 mg · L⁻¹、0.2 mg · L⁻¹、0.5 mg · L⁻¹, 根据正交表 L₉ (3⁴) 设计 9 种培养基。

1.3 优良基因型的筛选标准

转代培养 50 d, CK1 家系芽增殖 4 个或 4 个以上; R2 家系芽增殖 3 个或 3 个以上; 且每个芽高均匀, 每株芽苗高生长大于 10 mm; 以此标准连续筛选 5 代, 即可选定为适宜组培快繁的优良基因型。

1.4 继代增殖培养基

以 CK1 优良基因型增殖芽苗为试验材料, B5 为基本培养基, BA 2.0 mg · L⁻¹ 与 IBA 0 mg · L⁻¹、0.1 mg · L⁻¹、1.0 mg · L⁻¹ 3 个浓度组合形成 3 种培养基, 根据年增殖率^[8] 指标筛选适宜快繁的继代增殖培养基。

1.5 培养条件

部分试验在人工气候箱完成, 培养室及人工气

收稿日期: 2008- 12- 22 初稿; 2009- 03- 04 修改稿
作者简介: 吴丽君 (1968-), 女, 博士, 高级工程师, 主要从事林木、花卉组培技术及森林病理研究
基金项目: 福建省科技计划项目 (2007J0007)

候箱温度均设置在 25℃, 光照强度控制在 2 000 lx, 光照时间设置为 10 h, 培养基的 pH 值均在高压灭菌前调到 5 8。

家系 CK1 胚苗顶芽转接到 9 个试验处理(各试验处理基本培养基及植物生长调节剂浓度组合见表 1) 培养 50 d, 其丛生芽诱导率及总增殖率见表 2(未分化丛生芽即未增殖的不参与增殖率的统计)。

2 结果与分析

2 1 初代培养基的筛选

表 1 各试验处理基本培养基与植物生长调节剂浓度组合

Table 1 Combinations of basic media and plant growth regulators of different test treatments									
处理	A 因素 (培养基)	B 因素 (6 BA)	C 因素 (NAA)	D 因素 (AC)	处理	A 因素 (培养基)	B 因素 (6 BA)	C 因素 (NAA)	D 因素 (AC)
1	A1	B1	C1	D1	6	A2	B3	C1	D2
2	A1	B2	C2	D2	7	A3	B1	C3	D2
3	A1	B3	C3	D3	8	A3	B2	C1	D3
4	A2	B1	C2	D3	9	A3	B3	C2	D1
5	A2	B2	C3	D1					

注: 表中 A1为 B5, A2为 DCR, A3为 PL; B1为6 BA0.5 mg·L⁻¹, B2为6 BA1.0 mg·L⁻¹, B3为6 BA2.0 mg·L⁻¹; C1为 NAA0.0 mg·L⁻¹, C2为 NAA0.01 mg·L⁻¹, C3为 NAA0.05 mg·L⁻¹; D1为 AC0.5 g·L⁻¹, D2为 AC0.2 g·L⁻¹, D3为 AC0.5 g·L⁻¹。

表2 各培养基丛生芽诱导率与总增殖率统计与分析
Table 2 Rates of initiation and proliferation in various media

试验处理	诱导丛生芽的外植体数									外植体总数	丛生芽诱导率 (%)	总增殖率 (%)
	不分化	2个芽	3个芽	4个芽	5个芽	6个芽	7个芽	8个芽	9及9个以上芽			
1	16	9	5	3	3	7	4	0	2	49	67.3	4.48
2	27	11	4	4	1	0	0	0	0	47	42.6	2.75
3	26	10	6	3	2	1	0	0	0	48	45.8	3.0
4	30	6	5	3	1	1	0	0	0	45	37.8	2.94
5	21	9	12	4	3	1	0	0	0	50	58.0	3.14
6	20	7	11	4	4	1	2	0	0	49	59.2	3.55
7	33	11	4	1	0	0	0	0	0	49	32.7	2.38
8	25	7	9	2	4	1	1	0	0	49	49.0	3.42
9	15	7	8	9	5	3	1	0	0	48	68.8	3.76
丛生芽诱导率	A 因素		B 因素		C 因素		D 因素					
	K1	155.7			137.8		175.5		194.1			
	K2	155.0			149.6		149.2		134.5			
	K3	150.5			163.8		136.5		132.6			
	T1	51.9			46.0		58.5		64.7			
	T2	51.7			50.0		49.7		44.8			
	T3	50.2			54.6		45.5		44.2			
	R3	1.7			8.6		13.0		20.5			
总增殖率	K1	10.23			9.8		11.45		11.38			
	K2	9.63			9.3		9.45		8.93			
	K3	9.56			10.31		8.52		9.36			
	T1	3.41			3.27		3.82		3.79			
	T2	3.21			3.10		3.15		2.98			
	T3	3.19			3.44		2.84		3.12			
	R3	0.22			0.30		0.98		0.81			

注: 表中 K1、K2、K3 分别表示对应各因素中 3 个水平丛生芽诱导率或增殖率的总和, T1、T2、T3 分别为相应的平均丛生芽诱导率或平均增殖率, R 为各因素平均丛生芽诱导率或增殖率的极差。

由表 2 可见, 试验处理 1 与 9 ($A_1B_1C_1D_1$ 与 $A_3B_3C_2D_1$ 组合), 均取得了较高的丛生芽诱导率与较高的芽苗增殖率。极差分析可见, 因素 A 以 A_1 水平 (B_5 基本培养基) 为最佳, 因素 B 以 B_3 水平 ($6BA\ 20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 为最佳, 因素 C 以 C_1 水平 ($NAA\ 0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 为最佳, 因素 D 以 D_1 水平 (不添加活性炭 AC) 为佳, 因此 4 因素的最佳水平组合为 $A_1B_3C_1D_1$, 即最佳初代增殖培养基为 $B_5+6BA\ 20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。从各因素极差值 R 可判断, 影响丛生芽诱导率的主要因素依次为 NAA、活性炭、 $6BA$, 影响增殖率的因素依次为活性炭、NAA、 $6BA$, 而基本培养基对丛生芽诱导率及增殖率影响最小。

2.2 优良基因型的筛选

外植体基因型是影响芽苗增殖及其植株再生的重要因素^[9]。朱德兰等开展美国黄松成熟胚培养研究结果表明不同成熟胚个体的生理状态不同, 诱导培养反应差异十分显著^[10]。吴丽君等在开展不同家系对湿地松增殖率影响试验结果表明抗病家系与非抗病家系间的差异显著^[8]。本试验进一步证明了同一家系内不同基因型增殖能力的差异性, 可见, 筛选增殖率高的优良基因型是实现抗病湿地松组培快繁的必要而有效的途径。

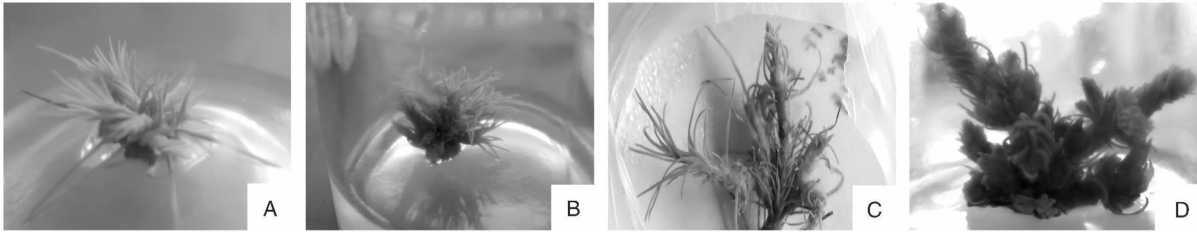
根据适宜组培快繁的优良基因型筛选标准, 筛选参试家系 CK1 和 R2 具有持续增殖能力的优良基因型作为增殖材料。湿地松继代增殖产生的小芽苗

经多代培养后有退化现象, 小于 3 mm 的芽苗黑褐至死亡率较高, 导致无法持续增殖, 增殖能力有逐代下降的趋势^[8], 为此连续 5 代跟踪调查丛生芽分化能力。经过持续 5 代共 250 多 d 的继代增殖培养, 已从普遍家系 CK1 的 5 000 多个基因型中筛选出芽苗生长快、丛生芽长势一致、增殖能力强的优良基因型 132 个, 筛选出抗病家系 R2 优良基因型 2 个 (图 1), 并对筛选出的优良基因型进行编号。

2.3 继代培养基的筛选

试验根据增殖培养基的设计方案, 对 3 个试验处理上继代芽苗的增殖率及高生长情况进行比较。由表 3 可见, 培养基附加 IBA, 可缩短继代周期, 从而影响年增殖率。处理 2 培养基上芽苗年增殖率最高, 单株芽苗可获得 3 277 个芽苗, 而附加 IBA $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 培养基仅获得 858 个芽苗。由此推断, 若以年增殖率为快繁技术指标, 在培养基上附加 $6BA\ 20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 及 IBA $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的激素组合可获得最多的有效增殖芽苗。

针叶树组织培养, 丛生芽苗生长缓慢是继代培养周期长的主要原因, 芽苗生长缓慢一方面可能是因为树种本身细胞分裂频率低, 生长缓慢; 另一方面可能因为增殖率高而导致芽苗营养需求和吸收不平衡, 营养供给不足^[11]。因此有效地控制好继代芽苗的增殖率, 缩短继代培养周期是确保每个芽苗在最短的继代培养周期内正常生长发育为有效芽苗 (具有持续增殖能力) 的关键技术。



注: A、B- 普遍家系 CK1 增殖率不等的基因型; C、D- 抗病家系 K2 增殖率不等的基因型

图 1 增殖率不等的优良基因型

Fig 1 Elite genotypes of different proliferation rate

表 3 $6BA$ 、IBA 激素组合对继代增殖率、继代周期及年增殖率的影响

Table 3 Effect of $6BA$ and IBA on proliferate rate, subculture cycle and annual proliferate rate

	$6BA$ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	IBA ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	继代周期 (d)	增殖倍率	年增殖率 (%)	年增殖的芽苗数
处理 1	2 0	0 0	65 ± 2	4 1	$3\ 69^{5.5}$	1314
处理 2	2 0	0 1	58 ± 2	4 1	$3\ 69^{6.2}$	3277
处理 3	2 0	1 0	53 ± 2	3 0	$2\ 70^{6.8}$	858

注: * 年增殖率= [增殖倍率 \times (1- 10%)]^{年增殖代数}, 其中 10%为每次继代污染率, 年增殖代数= 365 天/ 继代周期

许多针叶树离体培养中，单独使用细胞分裂素，足以诱导丛生芽发生。成小飞等在马尾松不定芽生长培养基中加入适量的 IBA，达到促进不定芽的伸长生长的目的^[11]。湿地松单独使用细胞分裂素 6-BA 也能促进芽苗分化丛生芽达到增殖目的，但过高浓度的分裂素势必抑制丛生芽的生长，从而延长继代培养周期，试验通过添加一定浓度的生长素 IBA 取代低浓度生长素 NAA 不仅促进芽苗的生长，同时可以克服 6-BA 与 NAA 的负互作效应^[8]。

3 结 论

除湿地松不同基因型外植体丛生芽增殖率具有差异外，生长素、活性碳、分裂素等因素也影响丛生芽的增殖率。为提高湿地松初代培养丛生芽诱导率与增殖率，继代培养基应不添加 NAA 或 AC 为宜，最佳初代培养基增殖培养基为 B5+ 6-BA 2.0 mg · L⁻¹。湿地松不同家系间、家系内个体间增殖率存在显著差异，因此筛选增殖率高的、适宜组培快繁的优良基因型是实现抗病湿地松组培快繁的有效途径。不同遗传材料在繁殖能力方面存在差异^[12]，在规模化的离体繁殖过程中应当充分利用遗传背景的异质性。本试验从普遍家系 CK1 的 5 000 多个基因型中筛选出芽苗生长快、丛生芽长势一致、增殖能力强的优良基因型 132 个，筛选出抗病家系 R2 适宜快繁培养的优良基因型 2 个。

年增殖率为组培快繁效率的综合性指标。生长素 IBA 取代 NAA 不仅促进芽苗的生长，同时克服了 6-BA 与 NAA 的负互作效应，增殖培养基 B5+ 6-BA 2.0 mg · L⁻¹+ IBA 0.1 mg · L⁻¹ 既有效地控

制了增殖率，又缩短了培养周期，确保年增殖率最大化。

参考文献:

[1] 黄健秋, 卫志明. 松属树种的组织培养和原生质体培养 [J]. 植物学报, 1994, 11 (1): 34- 42.

[2] SOMMER H E, BROWN C L. Plantlet formation in Pine tissue culture [J]. American Journal of Botany, 1974, 61 (5): 11.

[3] PEDRO P B, SOMMER H E. Factors affecting adventitious bud induction in Pinus elliottii embryos cultured in vitro [J]. New Forests, 1987 (5): 25- 35.

[4] BRONSON M R, DILXON R K. Cultural factors influencing adventitious shoot and plantlet formation from slash pine cotyledons [J]. New Forests, 1991 (5): 277- 288.

[5] 何月秋, 叶建仁, 池树友. 湿地松丛生芽增殖的研究 [J]. 西南林学院学报, 2005, 25 (3): 14- 17.

[6] 朱丽华, 张艺, 吴小芹. 湿地松的组织培养及植株再生 [J]. 南京林业大学学报, 2004, 28 (6): 47- 51.

[7] 朱丽华, 吴小芹. 湿地松组培苗生根的影响因子 [J]. 东北林业大学学报, 2005, 33 (5): 15- 18.

[8] 吴丽君, 叶建仁, 王志洁, 等. 湿地松组培继代增殖的影响因子 [J]. 福建林学院学报, 2007, 27 (2): 165- 169.

[9] 黄学林, 李筱菊. 高等植物组织离体培养的形态建成及其调控 [M]. 北京: 科学出版社, 1995: 15.

[10] 朱德兰, 李科友. 不同美国黄松成熟胚对组织培养的反应 [J]. 陕西林业科技, 2003 (3): 5- 7.

[11] 成小飞, 花晓梅, 李文钿. 马尾松离体培养条件下的微繁殖和菌根的形成 [J]. 林业科学研究, 1995, 8 (3): 241- 246.

[12] 王力华, 贺凤美, 邓正正. 日本落叶松微体繁殖及植株再生 [J]. 东北林业大学学报, 2004, 32 (6): 19- 23.

(责任编辑: 林海清)