

杉木幼茎离体培养与快繁体系的建立

蒋向辉^{1,2}, 余朝文^{1,2*}, 郝博飞¹, 完迪迪¹, 李定亮^{1,2}

(1. 怀化学院生物工程系, 湖南 怀化 418008; 2. 湖南省怀化市生物育种与加工技术实验室, 湖南 怀化 418008)

摘要: 应用正交设计法研究了以杉木幼茎为外植体的离体培养与快繁技术, 建立了杉木高频离体再生体系, 试验结果表明: 愈伤诱导的最适培养基为 2/3WPM + 6-BA 0.5 mg/l + IBA 2.0 mg/l + 2,4-D 0.8 mg/l; 芽分化的最适培养基为: WPM + 6-BA 1.5 mg/l + IBA 2.0 mg/l + 2,4-D 1.2 mg/l; 生根的最适培养基为 1/2WPM + 6-BA 0.5 mg/l + IBA 1.0 mg/l + IAA 1.2 mg/l; 杉木移栽的最适培养物是草皮土与泥炭土体积比为 1:1 的混合土。

关键词: 杉木; 幼茎; 离体培养; 快繁

中图分类号: S723.1⁺39

文献标识码: A

Culture in Vitro and Rapid Propagation System with Young Stem of *Cunninghamia lanceolata*JIANG Xiang-Hui^{1,2}, SHE Chao-Wen^{1,2*}, HAO Bo-fei¹, WAN Di-di¹, LI Ding-liang^{1,2}

(1. Huaihua College Department of Bioengineering, Huaihua, 418008, China;

2. Huaihua College Key Laboratory of Huaihua for Breeding and Bioprocess Technology, Huaihua 418008, China)

Abstract: Experiment was undertaken on culture in vitro and rapid propagation with young stem of *Cunninghamia lanceolata* as the explant by orthogonal design to establish regeneration system in vitro. The result showed that the optimal culture conditions were as follows: for the initial culture, the explants were sterilized by 75% alcohol and 0.1% HgCl₂. Culture medium for callus induction: 2/3WPM + 6-BA 0.5 mg/L + IBA 2.0 mg/L + 2,4-D 0.8 mg/L. The optimal medium for bud induction was WPM + 6-BA 1.5 mg/L + IBA 2.0 mg/L + 2,4-D 1.2 mg/L, that for root induction was 1/2WPM + 6-BA 0.5 mg/L + IBA 1.0 mg/L + IAA 1.2 mg/L, that for transplanting was turf-soil and mosses (V : V = 1 : 1).

Key words: *Cunninghamia lanceolata*; young stem; culture in vitro; rapid propagation

杉木 (*Cunninghamia lanceolata*) 属裸子植物杉科 (Taxodiaceae) 杉木属 (*Cunninghamia*), 其材质优良, 纹理直、质轻软、细密, 干后不翘不裂, 易加工, 耐腐蚀, 有香气, 为我国最普遍的重要用材树种, 也是我国最重要的造林树种。杉木的组织培养始于 20 世纪 70 年代末, 其主要研究目的是通过组织培养方法培育高遗传增益的优株或优良无性系或对老树进行复壮。已有关于杉木不同的外植体通过器官发生的植株再生的成功报道^[1], 尤以茎段为外植体诱导芽的分化的研究较多^[2-5]。虽然前人在杉木组培方面开展了一定的研究, 但以往有关杉木组培的研究都是在具有广谱适应性的 MS 培养基上进行改良, 组培快繁技术重复性较差, 因此近年来, 虽然有研究者开展了杉木基因转化的初步研究^[6], 但还没有获得转基因植株。WPM 培养基与 MS 培养基最大的区别是含氮量低, 对木本植物胚性愈伤组织的诱导的效果最好^[7], 组培快繁技术重复性较好。鉴于此, 笔者通过对 WPM 培养基的改良, 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, 以期为进一步杉

收稿日期: 2007-12-12; 修回日期: 2008-03-15

基金项目: 湖南省教育厅重点资助项目 (06C502)

作者简介: 蒋向辉 (1974-), 男, 湖南安化人, 讲师, 硕士, 主要从植物遗传与育种研究; *通讯作者。

木木质素改良的转基因研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试杉木良种栽种于怀化学院,分别于春(4月22日)、夏(6月30日)、秋(10月14日)3个季节选取长势旺盛的幼嫩枝条,除去所有叶片,切取除顶芽外的4~6 cm长的嫩茎作外植体。

1.2 方法

1.2.1 外植体的灭菌 在超净工作台上将外植体置于75%乙醇中1 min,再用0.1%氯化汞分别处理5、8、11 min,用无菌水冲洗5次,最后将枝条切成长1~2 cm的茎段。

1.2.2 初代培养 将已灭菌的外植体接种于WPM培养基中,以固体培养基WPM、1/2WPM、2/3WPM,附加不同配比的6-苄基腺嘌呤(6-BA)、吲哚丁酸(IBA)、2,4-二氯苯氧乙酸丁酯(2,4-D),pH值5.4,采用正交设计 $L_9(3^4)$ 进行不同组合处理试验,设4次重复,每处理接种15瓶,每瓶10个茎段,试验因素及水平见表1。另加蔗糖3%、琼脂0.7%,pH5.0~5.4。培养温度为 $25\pm2^{\circ}\text{C}$,暗培养45 d后统计外植体的污染率和愈伤诱导率。

1.2.3 丛生芽诱导和增殖 初代培养45 d后将长愈伤茎段转入不同继代培养基中(表1),每处理接种茎15个,转入光照12 h/d、光照强度1 500~2 000 lx的条件下培养,参照赵建萍等^[8]的方法统计每个茎段上丛生芽数以及每个茎段上的有效苗(高1.0 cm以上且生长健壮的小苗)数,以筛选适宜于芽增殖的培养条件。

1.2.4 不定根的诱导 将2 cm左右长的无根苗接种到采用正交设计 $L_9(3^4)$ 进行不同组合的生根培养基中(表2),培养40 d后统计生根率、平均根长、平均根数。

1.2.5 移栽驯化 将已诱导生根并开瓶炼苗试管苗取出,移栽至草皮土与泥炭土以不同比例混合培养物中,保持温度18~25℃,相对湿度80%,30 d调查成活率。

2 结果与分析

2.1 不同培养基及激素对杉木茎段愈伤诱导及不定芽分化的影响

不同培养基及激素对杉木茎段愈伤诱导的影响结果见表3。

从表3可看出,不同的培养基及激素对比对茎段愈伤的诱导影响较大,F值测定表明:各处理间差异达极显著水平($F=9.53>F_{0.99}=8.65$),多重比较认为在改良的WPM培养基(大量元素为WPM的2/3)中,6-BA浓度为0.5 mg/L、IBA浓度为2.0 mg/L、2,4-D浓度为0.8mg/L的生长调节物质对比对杉木茎段的愈伤组织诱导最好。

作为植物转基因工作的基础,高效的再生系统是外源目标基因导入植物的前题,而芽的诱导是关键的第一步。表3显示,不同处理间的不定芽数诱导效率相差较大,不定芽数诱导效率是衡量分化质量优劣的主要性状指标,为此对不同因子处理的不定芽数进行方差分析和极差分析(表4),从表4中可以看出,不同培养基和

表1 茎段初代培养丛生芽诱导因素与水平
Table 1 Factors and level of initial culture in vitro of young stem and clump bud induction

水平	因素			
	培养基	6-BA	IBA	2,4-D
1	1/2WPM	0.5	0.5	0.4
2	WPM	1.0	1.0	0.8
3	3/2WPM	1.5	2.0	1.2

表2 生根诱导试验因素与水平
Table 2 Factors and level of shoot induction

水平	因素			
	培养基	6-BA	IBA	IAA
1	1/2WPM	0.2	0.5	0.5
2	WPM	0.5	1.0	1.0
3	3/2WPM	1.0	1.5	1.5

表3 茎段初代培养与丛生芽诱导试验结果
Table 3 Result of young stem culture in vitro and clump bud induction

处理	培养基 (WPM)	6-BA /mg·L ⁻¹	IBA /mg·L ⁻¹	2,4-D /mg·L ⁻¹	愈伤诱导率 /%	不定芽数 /个
1	1	0.5	0.5	0.4	34	2.2
2	1	1.0	1.0	0.8	77	7.2
3	1	1.5	2.0	1.2	79	8.5
4	1/2	0.5	1.0	1.2	48	3.1
5	1/2	1.0	2.0	0.4	71	5.2
6	1/2	1.5	0.5	0.8	57	5.7
7	2/3	0.5	2.0	0.8	96	3.3
8	2/3	1.0	0.5	1.2	91	4.8
9	2/3	1.5	1.0	0.4	72	6.5

注:1/2MS与2/3MS分别表示大量元素分别为MS的1/2和2/3,其他营养元素不变。

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 对不定芽分化的影响更大, 而 IBA 和 2,4-D 对不定芽的影响不显著。多重比较分析认为, 在 WPM 培养基中添加 6-BA1.5 mg/l、IBA2.0 mg/l、2,4-D 1.2 mg/l 对杉木茎段不定芽的分化效果最好。

2.2 不同培养基和激素对杉木无根苗生根诱导的影响

不同培养基和激素对杉木生根的影响结果见表 5。

从表 5 中可看出, 不同处理间的生根数、根长相差较大。对不同因子处理的生根率进行方差分析(表 6)发现, 各培养组分对杉木组培生根均有显著或极显著的影响, 其中 IBA 对生根的影响达到极显著水平, 多重比较认为在改良有 WPM 培养基(大量元素为 WPM 培养基的 1/2)中, 添加 6-BA 0.5 mg/l、IBA1.0 mg/l 和 IAA1.2 mg/l 得到的单株生根数最多, 平均达 4.4 条, 而在 WPM 培养基中添加 6-BA 1.5 mg/l、IBA2.0 mg/l 和 IAA1.2 mg/l 得到的生根最长(30 d), 达到 3.5 cm, 由此可知 IBA 的浓度同时影响杉木根的分化与伸长。

2.3 移栽驯化

完整植株在不同配比的 3 种基质中 15 d 后有新的不定根发生, 老叶生长, 新叶出现, 表明组培苗已存活。其中以草皮土+泥炭土苔藓(体积比为 1:1)移栽成活率最高, 超过 90%。其原因主要是这种基质疏松湿润, 持水能力强且通气性好, 有机质含量较高。而较低的有机质含量以及较差的保水能力都不利于杉木管苗存活、生长。

3 小结与讨论

由于木本植物内生菌的影响导致木本植物组织培养的困难之一是建立无菌材料^[9]。对杉木外植体消毒试验发现当选用茎段为外植体材料, 同时用 75%乙醇处理 1 min、0.1%升汞处理 11 min 的处理组合为最好。其平均萌芽率高达 76%; 其次为 75%乙醇处理 1 min、0.1%升汞处理 8 min, 其平均萌芽率为 55%; 0.1%升汞处理 5 min 时效果最差, 外植体全部被细菌污染。

本试验运用正交设计的方法, 极好地优化了试验设计, 大大增强了试验的可操作性。以杉木茎段为外植体, 愈伤诱导的最适培养基为 2/3WPM+6-BA0.5 mg/l+IBA2.0 mg/l+2,4-D 0.8 mg/l; 芽分化的最适培养基为: WPM+6-BA1.5 mg/l+IBA2.0 mg/l+2,4-D 1.2 mg/l; 生根的最适培养基为 1/2WPM+6-BA 0.5 mg/l+IBA1.0 mg/l+IAA1.2 mg/l。本试验认为, 对于不同木本植物在组织培养的过程中, 对 WPM 培养基中大量元素的用量进行适当的改良, 效果较好, 因为大量元素直接影响培养基中 N 元素与 C 元素的比值。

木质素是植物体内含量仅次于纤维素的一类高分子有机物质, 具有重要的生物学功能(维持植物正常结构、输导水分和养料、防御病原菌侵害等)。但脱木质素却是形成造纸污染的主要源头。因此利用基因工程手段改良造纸原料植物的品质已成为国际上研究的热点。本试验在 WPM 培养基上进行改良以保证培养的外植体诱导出足够的芽, 并且重复性较高, 为下一步的杉木木质素改良的转基因研究打下了基础。

表 4 不同因子处理的不定芽数方差分析(完全随机模型)

Table 4 ANOVA on adventitious bud with treatment of different factors(completely random model)

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值
培养基	6.315	4	1.579	42.908**
6-BA	5.867	4	1.467	39.857**
IBA	0.925	4	0.231	6.284
2,4-D	0.846	4	0.212	5.747
误差	0.147	4	0.036	
总和	14.100	4		

表 5 生长素对杉木外植体生根诱导的影响

Table 5 Effect of growth hormones on root induction of *C. lanceolata* explant

处理	培养基(WPM)	6-BA /mg·L ⁻¹	IBA /mg·L ⁻¹	IAA /mg·L ⁻¹	生根数 /条·株 ⁻¹	根长 /cm
1	1	0.5	0.5	0.4	2.8	1.0
2	1	1.0	1.0	0.8	3.5	2.2
3	1	1.5	2.0	1.2	4.0	3.5
4	1/2	0.5	1.0	1.2	4.4	2.4
5	1/2	1.0	2.0	0.4	3.0	2.8
6	1/2	1.5	0.5	0.8	2.5	1.6
7	2/3	0.5	2.0	0.8	3.3	3.1
8	2/3	1.0	0.5	1.2	3.6	1.7
9	2/3	1.5	1.0	0.4	1.4	2.2

表 6 不同因子处理的单株生根数方差分析(完全随机模型)

Table 6 ANOVA on rooting number of individual with treatment of different factors

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值
培养基	560.159	4	140.039	15.717*
6-BA	654.231	4	163.558	18.356*
IBA	1623.670	4	230.918	45.558**
IAA	465.336	4	116.334	153.862
误差	35.641	4	8.910	
总和	3439.037	4		

参考文献:

- [1] 汤定钦. 杉木组织培养述评[J]. 福建林业科技, 1992, 19(1): 65-69.
- [2] 阙国宁. 杉木组织培养的初步研究[J]. 林业科学, 1980(增刊): 137-140.
- [3] 瞿应昌. 杉木优株的组织培养[J]. 植物生理学通讯, 1984, 35(4): 31-32.
- [4] 朱鹿鸣. 用组织培养方法繁殖杉木优树[J]. 江苏林业科技, 1985(5): 47-49.
- [5] 吴攸溪. 杉木组织培养在生产上的应用研究[J]. 福建林学院学报, 1991, 11(1): 67-74.
- [6] 林荣华, 叶冰莹. 杉木高效再生与基因转化的初步研究[J]. 生命科学研究, 2002, 6(4): 351-355.
- [7] 陈桂信, 谢文龙, 潘东明, 等. 木奈幼胚胚性愈伤组织诱导的研究[J]. 江西农业大学学报, 2006, 28(1): 44-49.
- [8] 赵建萍, 柏新富, 蒋小满, 等. 北高丛越桔芽器官离体培养与快繁体系的建立[J]. 林业科学, 2007, 43(5): 111-116.
- [9] 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. 24-74.

信息

浙江省省级地方标准《无公害杨梅》修订发布

2008年2月25日,由浙江省质量监督局批准发布, DB33/T372-2008《无公害杨梅》代替 DB33/T372-2002,于2008年3月25日开始实施。

DB33/T372-2008《无公害杨梅》与 DB33/T372-2002《无公害杨梅》相比主要变化如下:

——DB33/T372.1-2008《无公害杨梅 产地环境》部分中由强制性标准改为推荐性标准；产地生态环境要求中，不受污染源影响改为远离污染源影响；土壤质量指标项目中，增加总铜和 pH 值 6.5~7.5 土壤相关指标；检验规则中，删去检测项目可根据产地的实际污染情况，有选择地酌情增减。

——DB33/T372.2-2008《无公害杨梅 生产技术规程》部分中引用文件，删去造林树种苗木等级；园地选择中，增加极端最低温度不低于-9℃，光照充足，坡度不宜超过30°，海拔高度浙南可高，浙西北宜低。在园地规划中将鱼鳞坑改为带状或块状整地。品种中增加桐子杨梅。栽植中苗木质量标准规定改为苗木质量要求表；增加了可在10月上旬至12月中旬栽植，以及也可深栽，将嫁接口植入土中；整形修剪中，对自然开心圆头形和疏散分层形整形补充了数字说明；修剪时间增加了生长期修剪方法有环状剥皮、拉枝、摘梢、短截和疏剪。侧枝修剪，徒长枝修剪和过密枝修剪删改为修剪要点，分别有幼树期、初结果期和盛果期修剪；花果量调整修改为花果调控，增加多效唑控梢促花提高着果、疏花和疏果；施肥中修改了幼年树、成年树的施肥量，增加施肥时间、叶面施肥的肥料种类和浓度；不结果、少果、旺树改造方法中，增加环状剥皮、倒贴皮和土施多效唑；防治原则删去病虫害预测预报和以营林技术为基础，改为农业防治为基础，根据病虫害发生、发展规律因时、因地制宜。农业防治中增加冬季清园。生物防治中应用改为提倡使用；癌肿病防治增加20%叶青双可湿性粉剂和硫酸铜两种药剂。介壳虫类防治增加40%速扑杀乳油，蓑蛾类防治增加20%杀灭菊脂乳剂。增加果蝇的防治方法；采收中增加应依品种特征确定采收期、采收时间、方法和分级等。

——DB33/T372.3-2008《无公害杨梅 质量安全要求》部分中标题改为质量安全要求；范围中增加“鲜果”的生产销售；质量安全要求中，增加了感官要求和一级果理化指标要求；对铬、百菌清、对硫磷、水胺硫磷的最大残留限量按 GB2762 和 GB2763 的规定作了修正，砷以无机砷代替，汞以总汞代替；并增加了硝酸盐、甲基硫菌灵、多菌灵、氯氰菊酯、溴氰菊酯和倍硫磷等残留限量；检测方法中，增加了上述 6 种药剂检测方法；抽样方法中，更改为按 GB/T 8855-1988 规定执行；贮藏保鲜增加低温贮藏、果实采摘成熟度，修改了冷库低温贮藏温度和可贮藏天数，删去保鲜处理和氮气贮藏。

该标准修订为规范浙江省杨梅的生产、运输、贮藏和质量检验提供了依据,有利于保证杨梅的产品质量,提高林农的经济效益,对全省杨梅的生产具有非常重要的指导作用。

摘自浙江林业网