红心材马尾松胚培养研究

刘希华[1],邓德良[1],张　丽[2],邢建宏[1],梁一池[1]
(1.三明学院 资源与化工学院,福建 三明 365004;2.内蒙古赤峰市林业科学研究院,内蒙古 赤峰 024000)

摘要:采用正交试验设计,研究不同基本培养基和激素配比对红心材马尾松胚培养的影响。结果表明,沙子和无菌水培养基上的种子萌发率最高,达到71.6%,苗长得最好。WPM+6-BA 2 mg/L+NAA 0.3 mg/L+KT 0.2 mg/L培养基为最佳增殖培养基,增殖系数最高,达到7.3,芽高度较高、粗壮。以1/2WPM+ABT[1#]0.8 mg/L+NAA 0.1 mg/L培养基不定芽生根率最高,达到69.7%。

关键词:马尾松;红心材;组织培养;正交试验
中图分类号:S791.248　　**文献标志码**:A　　**文章编号**:1004-3268(2013)10-0122-04

Tissue Culture of Seedling of Red Heart-Wood *Pinus massoniana*

LIU Xi-hua[1],DENG De-liang[1],ZHANG Li[2],XING Jian-hong[1],LIANG Yi-chi[2]
(1.Department of Resources & Chemical Engineering,Sanming University,Sanming 365004,China;
2.Chifeng Academy of Forestry of Inner Mongolia Autonomous Region,Chifeng 024000,China)

Abstract: Using orthogonal experimental design,tissue culture of seeds of red heart-wood of *Pinus massoniana* was researched. The result showed that the germination rate of seeds of *Pinus massoniana* in the induction medium containing sands and aseptic water was the best with the germination rate of 71.6%. In the multiplication culture,the medium of WPM+6-BA 2 mg/L+NAA 0.3 mg/L+KT 0.2 mg/L was the best with strong and high buds and the multiplication coefficient of 7.3. In rooting culture,the rooting rate of 1/2WPM+ABT[1#]0.8 mg/L+NAA 0.1 mg/L was the highest,reaching 69.7%. This study will lay a foundation for rapid propagation technique system of red heart-wood *Pinus massoniana*.

Key words: *Pinus massoniana*; red heart-wood; tissue culture; orthogonal experiment

马尾松(*Pinus massoniana*)是我国针叶树种中分布面积最广、蓄积量最大的工业用材树种,由于生境差异和地理、生殖隔离作用,在长期自然和人工选择过程中,导致群体产生了广泛的遗传变异,形成了遗传结构、基因频率、形态特征和生态类型差异较大的群体,具有丰富的种内遗传变异和极大的遗传改良潜力[1-4]。在长期的进化过程中,马尾松种内形成了很多的变异类型,部分变异类型性状具可遗传性,如红心材和高产脂等类型。红心材马尾松类型的硬度、弯曲弹性模量、弯曲强度、顺纹压力等物理力学性质均要比普通马尾松强,且木头本身防虫耐腐,纹理美观,市场价值高[5]。随着马尾松天然林的大量采伐利用,许多天然林将消失,红心材类型马尾松数量也将随之锐减,如何保护这种天然变异类型,并将其数量扩大,这将是马尾松育种工作的重要内容。马尾松无性繁殖特别是组织培养技术是保护和扩大红心材变异类型数量的重要技术手段,虽然我国较早开始研究马尾松组织培养技术[6],但效果并不显著,且多集中于幼胚愈伤组织诱导培养方面[6-9],而茎段组织培养的研究鲜有报道。种子组织培养有别于茎段组织培养,且种子繁殖后代分化差异大[10],因此,红心材马尾松茎段组织培养的研究,将为选育

收稿日期:2013-03-23
基金项目:福建省科技厅重点项目(2011N0030)
作者简介:刘希华(1978-),男,福建闽清人,讲师,博士,主要从事林业生物技术教学与研究工作。E-mail:xihua7808@163.com

© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

和扩繁马尾松优良类型奠定基础。本研究以红心材马尾松种子为材料,探索胚培养技术,为马尾松变异类型的快繁提供理论基础。

1　材料和方法

1.1　试验材料

精选福建省漳平五一国有林场红心材马尾松种子园提供的优良种子作为供试材料。

1.2　试验方法

1.2.1　**启动培养基的筛选**　从冰箱中取出种子,洗净,依次用 70%乙醇处理 1 min 后,无菌水冲洗 2 遍,0.1%升汞处理 5 min,无菌水冲洗 5 遍。在接种盘上,用解剖刀破开种皮,接种在培养基上。培养基采用 3 种,见表 1,均需高压灭菌。设 3 次重复,每组 30 瓶,每瓶接种 3 粒马尾松种子。接种40 d后统计种子萌发情况。

表 1　启动培养基类型

编号	培养基成分
1	干净沙子+无菌水
2	干净沙子+无菌水+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L
3	WPM 琼脂培养基+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L

1.2.2　**增殖培养**　待种子萌芽后,将离芽基部 0.5 cm 处剪断,将上半部扦插到增殖培养基上。采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计,对基本培养基、6-BA 和 NAA 3 个因素进行研究,设计如表 2。培养基中加入琼脂 9 g/L,蔗糖 30 g/L,KT 0.2 mg/L,pH 值为 5.8,3 次重复,每组 30 瓶。30 d 后统计增殖系数。

表 2　增殖培养的因素与水平

水平	因素		
	培养基(A)	6-BA(B)/(mg/L)	NAA(C)/(mg/L)
1	MS	1	0.1
2	WPM	2	0.2
3	DCR	3	0.3

1.2.3　**生根培养**　采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计分析培养基、ABT[1#][11]和 NAA 3 个因素,其因素与水平设计如表 3。培养基 pH 值为 5.8,蔗糖 20 g/L,卡拉胶 5.5 g/L。重复 3 次,每个组合 30 瓶,每瓶接种 1 个植株。50 d 后统计生根率。

表 3　生根培养的因素与水平

水平	因素		
	基本培养基(A)	ABT[1#](B)/(mg/L)	NAA(C)/(mg/L)
1	WPM	0.4	0.1
2	1/2WPM*	0.6	0.2
3	1/4WPM*	0.8	0.3

注:*指培养基中大量元素的量减为 1/2 或 1/4。

1.3　数据处理

试验数据采用 DPS 软件处理[12]。

2　结果与分析

2.1　不同启动培养基对马尾松种胚萌发的影响

从表 4 可以看出,沙子培养基上的马尾松种子萌发率相对较高,其中在不加激素的培养基中萌发率最高,为 71.6%,萌发较早且长得最好(图 1),苗高为 4.7 cm;在 WPM 琼脂培养基上的种子萌发率比较低,仅 21.4%,且萌发较晚,苗较差,一般不长分枝。

表 4　培养基对马尾松种胚萌发的影响

编号	平均萌发率/%	苗高/cm	出芽数/条	萌发时间/d
1	71.6	4.7	3.1	14
2	45.5	3.2	3.2	20
3	21.4	2.6	0.8	23



图 1　马尾松种胚诱导出的幼嫩苗

2.2　不同基本培养基和激素配比对马尾松增殖的影响

从表 5 可以看出,从基本培养基类型来看,以 WPM 培养基的增殖系数较高,3 个处理增殖系数平均值为 6.03,芽长势较好,说明 WPM 适合马尾松增殖培养。其他 2 个培养基虽增殖系数为 3.19 以上,但芽长势较差。方差分析结果表明,基本培养基类型和 6-BA 质量浓度的影响均达到极显著水平($P<0.01$),NAA 则不显著,说明 NAA 不是影响增殖培养的主要因素。通过 R 值大小可以看出,3 个因素对增殖系数影响的主次关系为:A→B→C,结合 K 值,各因素的较优水平依次为 A_2、B_2、C_3,而这个组合刚好是第 5 组,其增殖系数达到 7.30,芽较高、粗壮(图 2)。

© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表 5 马尾松种胚增殖培养正交试验结果

编号	A	B	C	开始丛生芽数/个	30 d 后有效芽数/个	增殖系数	丛生芽情况
1	1	1	1	2.6	8.3	3.19	丛生芽数量少,纤细,生长差
2	1	2	2	3.2	15.7	4.91	丛生芽高度平均 1.5 cm,纤细,生长较弱
3	1	3	3	3.1	12.7	4.10	丛生芽基部愈伤组织较多,侧芽生长不良
4	2	1	2	2.7	13.9	5.15	丛生芽高度平均 1.8 cm,芽较粗壮
5	2	2	3	3.0	21.9	7.30	丛生芽高度平均 2 cm,芽粗壮,少愈伤组织
6	2	3	1	3.2	18.0	5.63	丛生芽高度平均 1.2 cm,芽多但生长欠佳
7	3	1	3	2.8	12.9	4.61	生长不良,愈伤组织较少,丛生芽均 1.2 cm
8	3	2	1	3.1	16.8	5.42	丛生芽高度均 1.0 cm,数量多,但生长不佳
9	3	3	2	2.7	12.1	4.48	愈伤组织相对较多,芽生长不良且数量少
K_1	12.20	12.95	14.24				
K_2	18.08	17.63	14.54				
K_3	14.51	14.21	16.01				
R	1.96	1.56	0.59				

注:有效芽是指高度在 1 cm 以上,且生长较为粗壮的丛生芽。

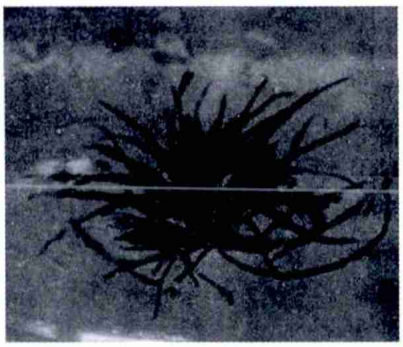


图 2 增殖培养基(第 5 组)上的不定芽

2.3 不同基本培养基和激素配比对马尾松不定芽生根的影响

从表 6 可以看出,第 6 个处理组生根率最高,达到 69.7%,最早生根时间为 21 d,平均生根条数为 3.5 条,生根长度均值为 1.4 cm,且芽高为 2.5 cm(图 3)。从培养基类型来看,以 1/2WPM 培养基的生根率均较高,3 个处理生根率平均值为 61.8%,说明 1/2WPM适合马尾松生根诱导培养。而以 WPM 培养基生根率最低,3 个处理平均值为 39.6%,但芽长得最高,均值为 3.7 cm,说明植物的地上部分和地下部分生长不一致。方差分析结果表明,基本培养基和 ABT$^{1\#}$ 的浓度影响均达到显著水平($P<0.05$),NAA 不显著,说明 NAA 不是影响生根诱导培养的主要因素。通过 R 值大小可以看出,3 个因素对生根率影响的主次关系为 A>B>C,结合 K 值,各因素的较优水平依次为 A_2、B_3、C_3。

表 6 马尾松不定芽生根诱导正交试验结果

编号	A	B	C	生根率/%	生根数/条	生根长度/cm	最早生根时间/d	愈伤组织面积/mm^2	芽高/cm
1	1	1	1	33.3	2.4	1.8	25	1.1	3.7
2	1	2	2	40.0	3.4	1.8	23	2.4	3.6
3	1	3	3	45.4	3.5	1.4	20	2.6	3.8
4	2	1	2	53.3	2.6	1.9	24	1.5	2.5
5	2	2	3	62.3	3.8	1.7	26	1.2	2.8
6	2	3	1	69.7	3.5	1.4	21	2.0	2.5
7	3	1	3	40.3	2.4	1.6	23	1.2	2.5
8	3	2	1	43.4	1.3	0.8	29	1.3	2.4
9	3	3	2	50.9	1.8	1.4	31	2.0	2.2
K_1	118.7	126.9	146.4						
K_2	185.3	145.7	144.2						
K_3	134.6	166.0	148.0						
R	22.20	13.03	1.27						

© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



图 3　马尾松不定芽诱导出的根

3　结论与讨论

在种子萌发诱导试验中,沙子和无菌水培养基上的萌发率达到最高,为 71.6%,且苗长得最好,而在含有激素的培养基上萌发率较低。说明种子自身有营养物质和激素,所以只要有水分,红心材马尾松种子就会萌发;培养环境中有激素存在,不但不会促进种子萌发,相反会抑制其萌发。本研究中首次用沙子作为培养基来进行马尾松种子诱导萌发试验,种子由于有种皮的保护,在消毒时不会损伤幼嫩组织,且长出的小苗可以直接进入增殖培养阶段。

本试验结果表明,WPM 适合马尾松的增殖培养。笔者通过比较 WPM[7]、DCR[13]和 MS[6]3 种类型培养基,发现 WPM 和 DCR 培养基两者较相似,均属于低盐培养基,而 MS 属于高盐培养基,与 DCR 和 MS 最大不同之处是 WPM 培养基没有铵根离子,且钾离子含量是三者中最高的,达到 2 380 mg/L。根据吴端正[5]对红心材马尾松分布范围的调查得知,红心材马尾松主要分布福建省闽西北地区,该地区的土壤主要以红壤土为主,该土壤容易缺钾[14],在长期进化过程中,红心材马尾松在钾充足的地方,生长较好 。福建省丘陵地区分布的马尾松施肥时,钾与氮的比例需达到 3∶1,才能达到最佳效益[15],所以笔者推断铵根离子的存在或许会抑制红心材马尾松增殖培养,而 WPM 培养基配方中钾含量远高于氮含量,且没有铵根离子,因而适合于增殖培养。

本试验结果表明,WPM+6-BA 2 mg/L+NAA 0.3 mg/L+KT 0.2 mg/L 培养基为最佳增殖培养基,增殖系数最高,达到 7.3,芽高度较高、粗壮。1/2WPM+ABT$^{1\#}$ 0.8 mg/L+NAA 0.1 mg/L 培养基上不定芽生根率最高,达到 69.7%。在进行生根诱导时,将基本培养基中大量元素降为增殖培养基或者壮苗培养基的一半,可以减缓芽部分的生长促进根部的发育[16]。

参考文献:

[1] 刘希华,邢建宏,戴伟宏,等. 马尾松优良家系及单株的选择[J]. 贵州农业科学,2011,39(5):179-182.

[2] 刘希华,邢建宏,杨国,等. 马尾松两广优良家系遗传变异研究[J]. 亚热带植物科学,2011,40(2):14-17.

[3] 梁一池,邢建宏,刘希华,等. 25 年生马尾松种源遗传变异及选择研究[J]. 三明学院学报,2007,24(2):121-126.

[4] 李丹,彭少麟. 马尾松地理种源遗传变异规律研究的综述与分析[J]. 应用生态学报,2000,11(2):293-296.

[5] 吴端正. 福建漳平红心材马尾松天然分布的调查研究[J]. 福建林业科技,1999,26(1):70-73.

[6] 吴若菁. 马尾松离体胚组织培养初报[J]. 福建林学院学报,1993,13(1):98-100.

[7] 杨模华,张冬林,杨艳,等. 马尾松幼胚离体培养器官发生植株再生研究[J]. 中南林业科技大学学报,2011,31(3):90-96.

[8] 李志辉,黄振,杨模华,等. 马尾松幼苗茎段愈伤组织诱导的研究[J]. 中南林业科技大学学报,2009,29(2):30-33.

[9] 杨艳,李志辉,丁贵杰,等. 马尾松幼胚培养愈伤组织诱导的初步研究[J]. 湖南环境生物职业技术学院学报,2007,13(1):6-9.

[10] 郑先波,栗燕,宋尚伟,等. 无籽西瓜成熟胚无菌萌发条件研究[J]. 河南农业科学,2005(2):54-57.

[11] 胡集瑞. 马尾松不同家系扦插育苗试验初报[J]. 福建林业科技,1999,26(1):78-80.

[12] 唐启义,冯明光. 实用统计分析及其 DPS 数据处理系统[M]. 北京:科学出版社,2002:49-265.

[13] 杨模华,李志辉,张冬林,等. 马尾松嫩茎愈伤组织保持、增殖与不定芽分化培养[J]. 中国农学通报,2011,27(10):12-17.

[14] 谢映勤,陈志强. 福建农地土壤贫瘠化现状与对策[J]. 太原师范学院学报:自然科学版,2005,4(2):78-81.

[15] 唐效蓉,李午平,邓国宁,等. 马尾松天然次生林施肥效应研究[J]. 中南林学院学报,2006,26(1):12-18.

[16] 徐进,王玉珍,罗景兰,等. 霍霍巴组培快繁技术体系研究Ⅱ. 分化和生根培养中的激素配比[J]. 河南农业科学,2004(11):22-24,69.

© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net