

樟子松组织培养不定根的诱导

彭丽萍¹, 董丽芬²

(1. 安徽科技学院 生命科学学院, 安徽 凤阳 233100; 2. 西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨陵 712100)

摘要: 以樟子松不定芽为外植体, 分别对影响樟子松组织培养不定根形成的几个主要因素进行了研究。结果表明: 培养基对樟子松不定根的诱导起关键作用, 1/4MS 培养基有利于不定根的诱导; 前期经生长素刺激可诱导不定芽生根, NAA 和 IBA 结合较单独使用具有更佳的生根效果; 进一步降低培养基中蔗糖质量浓度, 可使生根率提高到 72.00%。试验首次在离体培养条件下获得了再生小植株。

关键词: 生物技术; 樟子松; 组织培养; 不定根

中图分类号: S791.253; Q943.1

文献标志码: A

Induction of *Pinus sylvestris* var. *mongolica* Adventitious Roots by Tissue Culture

PENG Li-ping¹, DONG Li-fen²

(1. College of Life Sciences, Anhui Science and Technology University, Fengyang 233100, Anhui, China;

2. College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China)

Abstract: This paper made a study of the factors affecting the induction of *P. sylvestris* var. *mongolica* roots from adventitious buds. Results show that the culture medium (1/4 MS being the best) plays a determined role in initiating adventitious roots; that in the early period, auxin can be used to stimulate adventitious buds to take root but the combination of NAA (0.5 mg · L⁻¹) and IBA (0.2 mg · L⁻¹) has better effects on rooting; and that when the concentration of sucrose is reduced to 1%, the rooting rate can reach 72.00%. Accordingly, an experiment successfully induced the first sapling of *P. sylvestris* var. *mongolica* from its adventitious buds.

Key words: bio-technology; *P. sylvestris* var. *mongolica*; tissue culture; adventitious roots

樟子松 *Pinus sylvestris* var. *mongolica* 具有根系发达、材质优良、土壤适应性强、生长快等特点, 是我国北方主要造林树种和防风固沙树种。但樟子松育苗技术难度大, 无性繁殖困难, 结实间隔期长, 籽粒空瘪率高, 种子园种子不能很快满足生产上的需要^[1]。当前, 组织培养为快速繁殖松属树种提供了一条有效的途径, 因此, 对樟子松组织培养及快速繁殖技术的研究具有一定的理论和实践意义^[2~8]。

目前, 针叶树组织培养植株再生研究取得了可喜进展, 国外已对 30 多种针叶树种通过胚、子叶、下胚轴、针叶和悬浮细胞培养出再生植株^[2~8]; 国内对马尾松、火炬松、湿地松、兴安落叶松、云南松、红松、美国黄松等也进行了成功探索^[9~14]。然而, 许多针叶树种的芽繁殖可以获得成功, 但试管苗生根仍是一个亟待解决的问题, 只有生根问题解决后, 离体再生的小植株才会成为人工造林的有用材料。针叶树中仅少数有中等生根能力, 多数属难生根树种, 樟子松就是其中难生根的一种。为此, 樟子松组织培养中进行不定根的诱导研究尤为重要。

1 材料和方法

收稿日期: 2007-08-10

基金项目: 国家林业局项目“干旱地区主要造林树种快速育苗及设备研究”(96-122); 安徽科技学院引进人才基金(ZRC200685)。

作者简介: 彭丽萍(1978-), 女, 河南洛阳人, 硕士研究生, 研究方向为林木种苗繁殖。

1.1 材料

樟子松成熟胚经组织培养诱导产生的不定芽。

1.2 方法

1.2.1 不定芽诱导

将樟子松成熟种子 5℃沙藏 3 周,选择成熟、饱满、均一的种子经 0.1%~0.3%KMnO₄ 溶液消毒 10~20 min,无菌水冲洗干净后,在超净工作台上剥去外壳,接种时用 70%的酒精表面消毒 40 s,然后置于 0.1% HgCl₂ 溶液中消毒 4~5 min,无菌水冲洗 4~5 次,于无菌条件下用细镊子剥去胚乳,取出成熟种胚接种到 1/2MS+6-BA1.0 mg·L⁻¹+NAA0.2 mg·L⁻¹+蔗糖 30 g·L⁻¹的培养基上进行不定芽的诱导(见图 1)。

1.2.2 不定芽伸长

不定芽伸长采用 1/2MS+1 g·L⁻¹活性炭+20 g·L⁻¹蔗糖的培养基,附加 0.55%的琼脂,pH 值为 5.8,不加任何激素(见图 2)。

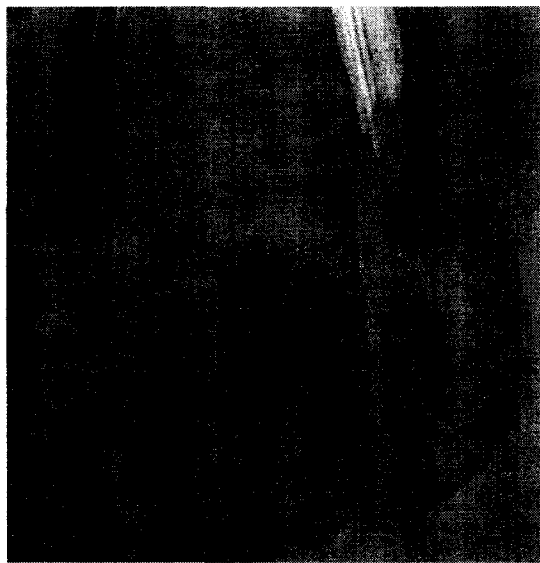


图 1 樟子松组织培养芽的形成

Fig. 1 The adventitious buds of formation from *P. sylvestris* var. *mongolica*

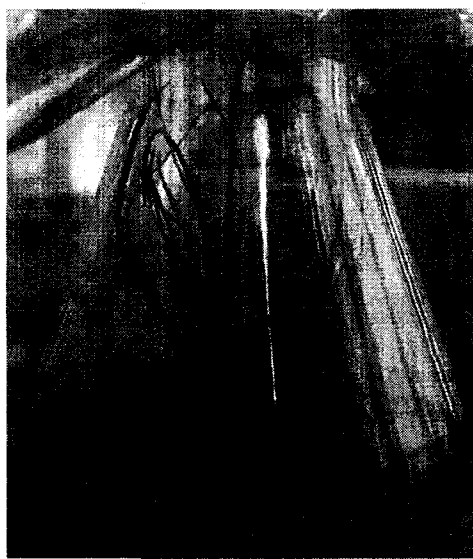


图 2 不定芽的伸长

Fig. 2 Buds on the medium with activated charcoal

1.2.3 不定根的诱导

将高 1 cm 左右的不定芽接种到生根培养基上进行根的诱导.生根培养基以 1/2MS、1/4MS、WPM 为基本培养基,添加不同质量浓度的 NAA 和 IBA,附加 20 g·L⁻¹的蔗糖,40 d 后统计生根情况。

不定根诱导率=(产生不定根的不定芽数/接种不定芽总数)×100%

1.2.4 不定芽高度对生根的影响

分别将高度在 1 cm 左右和高度小于 0.5 cm 的不定芽接种于生根培养基中,生根培养基采用 1/4MS 附加 2%的蔗糖,添加不同种类和质量浓度的生长素,40 d 后统计不定芽的生根情况。

1.2.5 蔗糖质量浓度对生根的影响

以 1/4MS 为培养基,添加 0.5 mg·L⁻¹的 NAA 和 0.2 mg·L⁻¹的 IBA,分别加入 5、10、20、30 g·L⁻¹的蔗糖,每种处理接种 25 瓶,40 d 后统计生根情况。

本试验中培养基均附加 0.55%琼脂粉,pH5.8,置于温度(25±5)℃、光照 1 500~2 000 lx 的条件下每天光照 14 h 进行培养,不定芽在含激素的培养基上培养 7 d,然后均转入未添加激素的原培养基上培养。

2 结果与分析

2.1 培养基和生长素对不定芽生根的影响

将高度在 1 cm 左右的不定芽分别接种到 1/2MS、1/4MS、WPM 培养基中,培养基附加 20 g · L⁻¹的蔗糖和不同质量浓度的萘乙酸(NAA)、吲哚乙酸(IBA),40 d 后统计生根率.由表 1 可知:培养基中大量元素的质量浓度对樟子松不定芽的生根存在一定的影响,进一步降低培养基中的大量元素质量浓度有利于樟子松不定芽的生根,1/4MS 培养基对樟子松不定芽生根最为有效;在以 1/4MS 为培养基且不加任何激素的情况下,培养一段时间偶尔有不定根产生.培养基中单独加入生长素可明显提高不定芽的生根率,NAA 的效果比 IBA 好,可见诱导生根的前期用生长素 NAA 刺激不定芽,对不定芽的生根有促进作用.在含有 NAA 的 1/4MS 生根培养基中同时加入低质量浓度的 IBA,对樟子松不定根的诱导有明显的促进作用,生根率达 57.89%.

表 1 不同培养基和 NAA、IBA 对不定根诱导的影响
Table 1 Adventitious root inductions in different media with different NAA and IBA

培养基	NAA 质量浓度 /(mg · L ⁻¹)	IBA 质量浓度 /(mg · L ⁻¹)	接种不定芽数	生根不定芽数	诱导率 /%
1/2MS	0	0	25	0	0
1/2MS	0.5	0	25	2	8.00
1/2MS	0	0.5	23	1	4.30
1/2MS	0.5	0.2	20	3	15.00
1/4MS	0	0	21	4	19.04
1/4MS	0.5	0	19	7	36.84
1/4MS	0	0.5	23	3	13.04
1/4MS	0.5	0.2	19	11	57.89
WPM	0	0	23	0	0
WPM	0.5	0	22	2	9.09
WPM	0	0.5	20	0	0
WPM	0.5	0.2	19	3	15.78

2.2 不定芽高度对生根的影响

将未经伸长生长和伸长生长后的不定芽接入 1/4MS 生根培养基中,培养基中加入不同种类和质量浓度的生长素,40 d 后统计不定芽的生根情况.由表 2 可知:未经伸长生长的不定芽在含生长素的培养基上可不同程度地诱导形成白色的根尖,根尖向下生长,在 1/4MS 附加 0.5 mg · L⁻¹NAA 和 0.2 mg · L⁻¹IBA 的培养基上诱导率达 31.03%,诱导形成的根尖数 2~5 个(见图 3).转接继续培养不定芽,根尖不能伸长生长,在培养过程中不定芽逐渐干枯死亡.高度在 1 cm 左右的不定芽在各种处理下均可诱导出不定根,在 1/4MS 附加 0.5 mg · L⁻¹NAA 和 0.2 mg · L⁻¹IBA 的培养基上不定根诱导率高达 63.33%(见图 4).由此说明,在樟子松不定芽生根过程中,根尖的诱导与苗子高度没有关系,但要使根尖继续伸长生长形成有效根,需不定芽伸长到一定高度,因此,在不定根诱导前期培育壮苗至关重要.

表 2 不定芽高度对不定根诱导的影响
Table 2 Influence of adventitious buds height on root inducing

生长素质量浓度	不定芽高度>0.8 cm			不定芽高度<0.6 cm		
	接种不定芽数/个	生根不定芽数/个	生根率/%	接种不定芽数/个	形成根尖芽数/个	诱导率/%
0 mg · L ⁻¹ NAA+0 mg · L ⁻¹ IBA	30	5	16.66	32	0	0
0.5 mg · L ⁻¹ NAA+0 mg · L ⁻¹ IBA	29	10	34.48	30	8	26.67
0.5 mg · L ⁻¹ NAA+0.2 mg · L ⁻¹ IBA	30	19	63.33	29	9	31.03

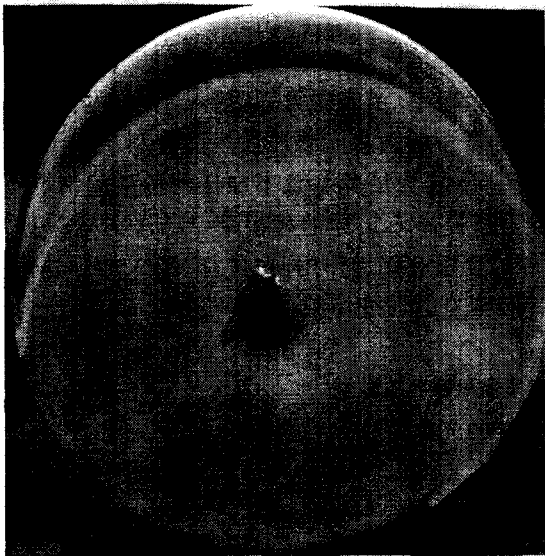


图 3 根尖的形成

Fig. 3 The formation of root tips



图 4 樟子松组织培养根的诱导

Fig. 4 The induction of root from adventitious buds

2.3 蔗糖质量浓度对生根的影响

针叶树不定根的诱导中,通常需要进行进一步降低培养基中蔗糖的质量浓度,以 $1/4MS + 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NAA} + 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{IBA}$ 为培养基,分别附加 5, 10, 20, 30 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的蔗糖,将高 1 cm 左右的不定芽接入培养基中进行根的诱导,40 d 后统计不定芽的生根情况,结果见图 5. 由图 5 可以看出:培养基中的蔗糖质量浓度对不定芽的生根产生一定的影响,当蔗糖质量浓度为 10 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,不定根诱导率最高达 72.00%,诱导形成的不定根数为 2~4 条(见图 6),最长的不定根达 1.5 cm 左右;当蔗糖质量浓度大于 10 g/L 时,随着蔗糖质量浓度的增大,不定根诱导率逐渐下降. 可见,进一步降低培养基中蔗糖的质量浓度有利于樟子松不定根的诱导,但质量浓度过低对根的诱导产生抑制作用. 图 7 为樟子松在离体培养条件下获得的再生小植株.

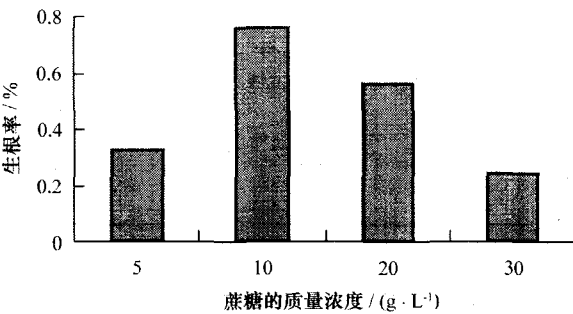


图 5 不同质量浓度的蔗糖对不定根诱导的影响

Fig. 5 Influence of different sucrose concentration on root inducing



图 6 樟子松组织培养根的诱导

Fig. 6 The induction of root from adventitious buds



图 7 生根的苗子

Fig. 7 The small plant from regeneration of tissue culture

3 讨 论

针叶树组织培养中诱导生根往往比较困难,生根率低严重制约着针叶树的离体快速繁殖.促进针叶树生根的方法通常有:降低培养基无机盐的质量浓度、降低蔗糖的质量浓度、加入不同种类和配比的激素、培养基中加入活性炭、诱导前期用激素进行刺激、试管外生根等^[5~7,9,17].本试验结果表明,基本培养基、生长素种类和质量浓度及处理时间、试管苗高度、蔗糖质量浓度等对樟子松不定芽生根有较大影响.培养基中进一步降低蔗糖的质量浓度(由 20 g/L 降到 10 g/L)、大量元素含量减半(由 1/2MS 降到 1/4MS)有利于樟子松不定根的诱导,1/4 MS 培养基对诱导樟子松不定芽生根效果较好,在不含生长素的情况下偶尔有不定根产生.蔗糖质量浓度降低后可进一步提高不定根的诱导率,这与 Thorpe(1977)总结针叶树中再生植株形成过程中芽生根的结论一致.

培养基中添加一种或两种以上的生长素或生长素和细胞分裂素配合使用,生根前期用高质量浓度的生长素刺激不定芽一段时间,然后转入无激素培养基上,能大大促进针叶树不定根的产生^[7,16],本研究结果与之相符,前期用高质量浓度的生长素刺激不定芽一周时间,可诱导樟子松不定芽生根.培养基中单独加入生长素 NAA 效果比 IBA 好,但在含生长素 NAA 的培养基中同时加入低质量浓度的 IBA,可明显促进樟子松的生根,两种生长素配合使用比单独使用效果好.樟子松不定根诱导中,根尖的形成与苗子高度无关,但要形成有效根,要求不定芽生长到一定高度,这可能是根的后期生长所需要的营养来源于苗子自身而造成的.

针叶树组织培养不定根的诱导是一个复杂的过程,受各种因素的影响.根的产生是一系列分化发育事件顺序性累积的结果,因此在根诱导的不同阶段要有针对性地采取不同的措施.

参考文献:

- [1] 康 明,田建强,郑均宝.樟子松成熟胚的离体培养与不定芽的形成[J].河北林学院学报,1993,8(4):273—276.
- [2] Bronson M R, Dixon R K. Cultural factors influencing adventitious shoot and plantlet formation from slash pine cotyledons [J]. New Forests, 1991, 5: 277—288.
- [3] Mathur G, Nadgauda R. In vitro plantlet regeneration from mature zygotic embryos of *Pinus wallichiana* [J]. Plant Cell Reports, 1999, 19: 1, 74—80.
- [4] Gonzzalez M V, Rey M, Tavazza R. In vitro adventitious shoot formation on cotyledons of *Pinus pinea* [J]. Hort Science, 1998, 33: 4, 749—750.
- [5] Druart P, Wulf O D. Activated charcoal catalses sucrose hydrolysis during autoclaving [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1991, 32 (1): 97.
- [6] Jang J C, Tainter F H. Microp ropagation of shortleaf, Virginia and loblolly $\times$ shortleaf pine hybrids via organogenesis [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1991, 25(1): 61—67.
- [7] Saborio F, Dvorak W, Donahue J, et al. In vitro regeneration of plant-lets from mature embryos of *Pinus ayacahuite* [J]. Tree physiology, 1997, 17: 787—796.
- [8] Niemi K, Scagel C, Heggman H. App lication of ectomycorrhizal fungi in vegetative propagation of conifers [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2004, 78: 83—91.
- [9] 张守英,杜小光,李 玲.兴安落叶松组织培养不定根诱导的研究[J].林业科技通讯,1993,(5):8—10.
- [10] 程广有,杨振国.红松组织培养技术的初步研究[J].吉林林业科技,2000,29(5):8—9.
- [11] 李科友,唐德瑞,朱海兰,等.美国黄松组织培养不定根诱导的研究[J].西北植物学报,2003,23(3):464—467.
- [12] 周 微,黄健秋,卫志明,等.云南松成熟胚的不定芽诱导及植株再生[J].植物生理学通讯,1995,31(5):351—353.
- [13] 阙国宁,房建军,葛万川,等.火炬松、湿地松、晚松组培繁殖的研究[J].林业科学研究,1997,10(3):227—232.
- [14] 唐 巍,欧阳藩,郭仲琛.火炬松成熟胚直接器官发生和植株再生[J].云南植物研究,1997,19(3):285—288.
- [15] 吴 涛,陈少瑜,陈 芳,等.思茅松胚性愈伤组织的诱导[J].中南林业科技大学学报,2007,27(5):74—78.
- [16] 初立业,宏波邵.植物激素在松树离体快速繁殖中的作用[J].生物技术通报,1995,(1):6—10.
- [17] 王 虹,张金凤,董建生.针叶树组织培养繁殖技术研究进展[J].河北林业科技,2004,(4):14—18.

[本文编校:谢荣秀]