

樟子松组织培养不定根诱导的研究

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浓度,可使生根率提高达72%。首次在离体培养条件下,获得了再生小植株。

关键词:樟子松,组织培养,不定根

中图分类号:S791.253.05

文献标识码:A

文章编号:1001-7461(2008)01-0100-04

Root Regeneration from Adventitious Buds in *Pinus sylvestris* var. *mongolica*

PENG Li-ping¹, DONG Li-fen²

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

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

Abstract: The factors affecting the adventitious root induction of *Pinus sylvestris* var. *mongolica* from adventitious buds were studied. The results showed that the basic medium played a key role in initiating the adventitious root, 1/4 MS was best one. It was beneficial for inducing adventitious roots when using auxin to stimulate adventitious buds in early period, while the combination of NAA (0.5 mg · L⁻¹) and IBA (0.2 mg · L⁻¹) had better effect on rooting. When the concentration of sucrose was 1%, the rooting rate could reach 72%. Root was firstly successfully induced from adventitious buds of *P. sylvestris* var. *mongolica*.

Key words: *Pinus sylvestris* var. *mongolica*; tissue culture; adventitious root

樟子松(*Pinus sylvestris* var. *mongolica*)具有根系发达,耐寒,耐旱,喜光,砂质土,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,组织培养作为一项生物技术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

1.1 材料

樟子松成熟胚经组织培养诱导产生的芽。

1.2 方法

1.2.1 芽的诱导 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,

收稿日期:2007-02-10 修回日期:2007-05-19

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”;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,助教,研究方向为林木种苗繁殖。

在超净工作台上剥去外壳,接种时用70%的酒精表面消毒40s,然后置于0.1% HgCl₂溶液中消毒4~5min,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-BA 1.0mg/L+NAA0.2mg/L+3%蔗糖的培养基上进行芽的诱导(图2a)。

1.2.2 芽的伸长 芽伸长采用1/2MS+0.1%的活性炭+2%蔗糖的培养基,附加0.55%的琼脂,pH5.8,不加任何激素(图2b)。

1.2.3 不定根的诱导 将高1cm左右的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,添加不同浓度的萘乙酸(NAA)和吲哚乙酸(IBA),附加2%的蔗糖,按表1进行试验设计,40d后统计生根情况。

不定根诱导率=(产生不定根的芽数/接种芽总数)×100%

1.2.4 芽高度对生根的影响 分别将高度在1cm左右和高度小于0.5cm的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,添加不同种类和浓度的生长素,按表2设计实验。40d后统计芽的生根情况。

1.2.5 蔗糖浓度对生根的影响 以1/4MS为培养基,添加0.5mg/L的NAA和0.2mg/L的IBA,分别加入5、10、20、30g/L的蔗糖,每种处理接种25瓶,40d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25±5℃,1500~2000lx的光照条件下每天光照14h进行培养,不定芽在含激素的培养基上培养7d,然后均转入除去激素的原培养基上培养。

2 结果与分析

2.1 培养基和生长素对芽生根的影响

不定根诱导试验结果表明,培养基的使用浓度对樟子松芽的生根具有一定的影响,降低培养基中的大量元素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/ (mg·L ⁻¹)	IBA/ (mg·L ⁻¹)	接种不定 芽数/个	生根不定 芽数/个	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 芽高度对生根的影响

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的诱导形成白色的根尖,根尖向下生长,诱导率在1/4MS附加0.5mg/L NAA和0.2mg/L IBA的培养基上达31.03%,诱导形成的根尖数2~5个(图2c)。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1cm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0.5mg/L NAA和0.2mg/L IBA的培养基上不定根诱导率高达63.33%(表2,图2d)。因此,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培育壮苗至关重要。

表2 芽高度对不定根诱导的影响

Table 2 Influence of adventitious buds heights on root inducing

生长素浓度	不定芽高度>0.8cm			不定芽高度<0.6cm		
	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 NAA+0 mg/L IBA	30	5	16.66	32	0	0
0.5 mg/L NAA+0 mg/L IBA	29	10	34.48	30	8	26.67
0.5 mg/L NAA+0.2 mg/L IBA	30	19	63.33	29	9	31.03

2.3 蔗糖浓度对生根的影响

针叶树不定根的诱导中,通常需要进一步降低培养基中蔗糖的浓度,以 1/4MS+0.5 mg/L NAA+0.2 mg/L IBA 为培养基,分别附加 5、10、20、30 g/L 的蔗糖,将高 1 cm 左右的不定芽接入进行根的诱导,40 d 后统计不定芽的生根情况。结果表明:培养基中的蔗糖浓度对不定芽的生根产生一定的影响,当蔗糖浓度为 10 g/L 时,不定根诱导率最大达 72.00%,诱导形成的不定根数 2~4 条

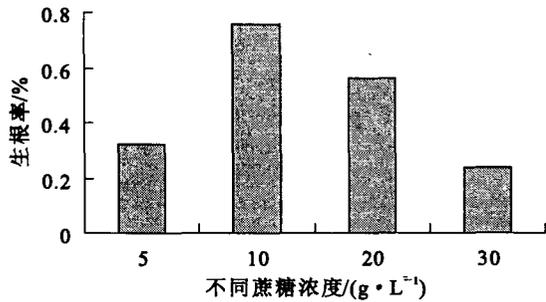


图 1 不同蔗糖浓度对不定根诱导的影响

Fig.1 Influence of different sucrose concentration on root inducing (图 2e),最长的不定根达 1.5 cm 左右。当蔗糖浓度大于 1%,随着浓度的增大,不定根诱导率逐渐下降。可见,进一步降低培养基中蔗糖的浓度有利于樟子松不定根的诱导,但浓度过低对根的诱导产生抑制作用。

3 结论讨论

本研究以樟子松沙藏成熟种胚为外植体在离体条件下,首次获得了再生小植株(图 2f)。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浓度、降低蔗糖的浓度、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^[5~7,9,16]。本试验结果表明,基本培养基、生长素种类和浓度及处理时间、试管苗高度、蔗糖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浓度(由 2%降到 1%)、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。蔗糖浓度降低后可进一步提高不定根的诱导率,这与 Thorpe 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

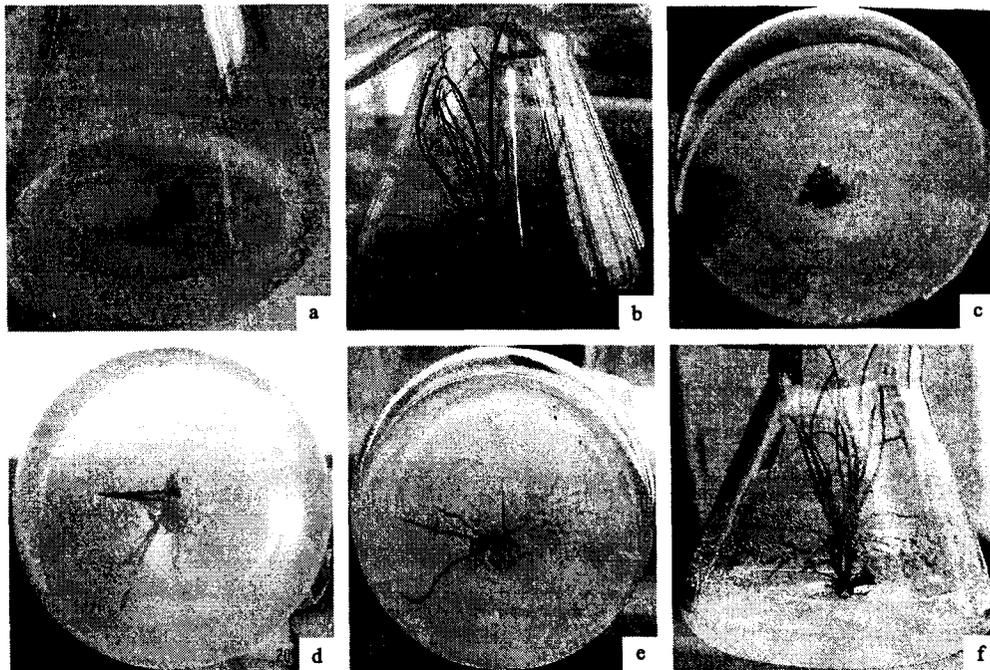


图 2 樟子松生根过程

Fig.2 Various stages of root inducing in *P. sylvestris* var. *mongolica*

- a. 樟子松组织培养芽的形成
- b. 不定芽的伸长
- c. 根尖的形成
- d. 不定芽根的诱导
- e. 不定芽生根的诱导
- f. 生根的苗

上,能大大促进针叶树不定根的产生^[7,15],本研究结果与之相符,前期用高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 catalyses 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 × shortleaf pine hybrids via organogenesis [J]. PlantCell, 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. Application of ectomycorrhizal fungi in vegetative propagation of conifers [J]. Plant Cell, Tissueand 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. 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] 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.
- [16] 王虹,张金凤. 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.

致 歉

发表在贵刊2007年第3期(总第85期)上的“水分胁迫对扶芳藤生长及光合特性的影响”一文,系我校郭宝林教授作为主研人承担的国家科技部“扶芳藤抗逆新品种在‘三北’干旱区中试与示范”项目(项目编号:2005110090621)研究的部分内容,该论文的试验研究由本课题资助;论文的设计、试验和撰写是在项目组成员杨俊霞教授悉心指导马超等人完成。为此,借贵刊向郭宝林、杨俊霞二位教授深表歉意。

作者:张 涛 段大娟