

马尾松幼胚离体培养器官发生植株再生研究

杨模华¹, 张冬林^{1,2}, 杨艳¹, 丁贵杰³, 李志辉¹

(1. 中南林业科技大学 林学院, 湖南 长沙 410004;

2. 缅因大学, 美国 澳元露 04469; 3. 贵州大学, 贵州 贵阳 550025)

摘要: 以马尾松幼胚为外植体, 经丛生芽诱导、增殖和伸长培养、生根诱导, 获得了再生植株。对影响马尾松幼胚器官发生植株再生的关键因子, 如减轻外植体褐变的处理方式、基本培养基类型、最适诱导培养基激素种类和浓度、增殖培养条件以及生根诱导影响因子(激素、活性炭和蔗糖)等, 分别进行了随机区组试验设计。试验数据经 SPSS 16 方差分析, LSD 多重比较, 结果表明: 1) 选择 WPM 培养基, 添加抗坏血酸 0.15 g/L , 并且每 2 天转接 1 次能有效地减轻外植体接种处理初期出现的褐化现象; 2) WPM + NAA 0.15 mg/L + 6-BA 1.00 mg/L + KT 0.50 mg/L 为较好的马尾松幼胚丛生芽诱导分化培养基, 丛生芽诱导率可达 98.15%; 3) 马尾松幼胚丛生芽增殖和伸长培养的最适培养基为 WPM + NAA 0.15 mg/L , 增殖系数可达 5.43; 4) 生根培养中, 生根质量最好的培养基组合为 WPM + IBA 2.0 mg/L + NAA 0.15 mg/L + Ac 0.50 g/L , 且生根培养基中添加的蔗糖浓度以 20.0 g/L 为宜, 生根率达到 66.67%。本研究结果可为利用马尾松幼胚建立组培快繁体系奠定研究基础。

关键词: 森林培育学; 马尾松; 幼胚; 器官发生; 植株再生

中图分类号: S 791.248

文献标志码: A

文章编号: 1673-923X(2011)03-0090-07

Micropropagation in immature embryos of *Pinus massoniana* *in vitro*

YANG Mo hua¹, ZHANG Dong lin^{1,2}, YANG Yan¹, DING Gui jie³, LI Zhi hui¹

(1. School of Forestry, Central South University of Forestry & Technology, Changsha 410004, Hunan, China;

2. University of Maine, Orono ME 04469, USA; 3. Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou, China)

Abstract: An *in vitro* procedure for micropropagation in immature embryos of *Pinus massoniana*, consisting of the following four steps has been established: adventitious shoot induction, adventitious shoot growth, root induction, and root growth. Influence of certain selected factors on each of these steps was determined with random block experiments, including treatments on controlling brown, basal medium (GD, DCR and WPM), plant hormones (6-BA, NAA and IBA), active carbon (Ac) and sucrose. SPSS 16.0 statistics software were used to analyze those data. Results were as followed. 1) For controlling brown, WPM containing ascorbic acid (0.15 g/L) and subculture the explant every 2 days were suitable. 2) Maximum adventitious shoot initiation and growth (98.15% at the 4th weeks and 5.43 times at the 6th weeks) were obtained on WPM with NAA (0.15 mg/L), 6-BA (1.00 mg/L) and KT (0.50 mg/L). 3) Adventitious shoot elongation (2.5 cm at the 3th weeks) was achieved on WPM medium with NAA (0.15 mg/L). 4) Four rooting experiments involving IBA, NAA, sucrose and Ac concentration were carried out. Best root induction and growth occurred when shoots were put on a medium of WPM containing 2% sucrose with IBA (2.0 mg/L), NAA (0.15 mg/L) and Ac (0.50 g/L), the rooting rate reached 66.67%. These findings provide foundation for setting up a tissue culture and rapid propagation system with immature embryos of *Pinus massoniana*.

Key words: silviculture; *Pinus massoniana*; immature embryo; organogenesis; micropropagation

收稿日期: 2010-12-10

基金项目: 湖南省教育厅优秀青年基金项目(09B112); 教育部博士点基金项目(20060538004); 国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAD24B0301)

作者简介: 杨模华(1974-), 女, 湖南常德人, 副教授, 博士研究生, 主要从事林木细胞工程及森林培育教学与科研工作

马尾松 *Pinus massoniana* 为松科 Pinaceae 松属 *Pinus* 的常绿高大乔木,是中国南方亚热带地区特有的、最重要的用材、建筑、采脂和松花粉等兼用的多用途人工造林树种。它具有适应性强,耐干旱贫瘠,速生丰产,纤维优良和全树综合利用程度高等特点^[1]。通过组织培养建立针叶树无性系是加速其品种改良和良种繁育的基础。未成熟胚由于其发育阶段早,分化能力强,常常作为组织培养外植体的来源,尤其是在松属树种体细胞胚胎发生研究中,获得成功的,绝大部分使用的外植体是幼胚。在离体胚培养的过程中,器官发生途径植株再生也是组培发生方式之一。成小飞等^[2]离体培养马尾松成熟胚,经丛芽诱导途径获得了马尾松再生植株,张宇等^[3]利用马尾松成熟胚,经直接器官发生和腋芽增殖途径建立了再生体系,Zhu Lihua 等^[4]在此基础上,进一步提高了无菌苗腋芽增殖倍数,并通过接种菌根处理,提高了马尾松再生植株的转化率到 65%。笔者试图建立马尾松原胚离体培养体系,通过调节激素种类与水平,调控离体培养环境,获得马尾松幼胚的直接器官发生途径植株再生,实现了幼胚丛生芽诱导分化、增殖、伸长培养、生根诱导,直至发育成完整小植株的过程。这可为利用幼胚为外植体,经器官发生途径建立无性快繁体系奠定研究基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

于7月中旬取马尾松未成熟球果,参考杨艳等^[5]的方法进行接种处理。

1.2 实验方法

(1) 降低褐变处理方式的筛选

基本培养基为 WPM+KT 0.50 mg/L, pH 值 = 5.8, 预防褐变的措施分别为: ①培养基添加氯化胆碱 1.0 mL/L, ②培养基添加抗坏血酸 Vc 0.15 g/L, ③培养基添加活性炭 0.5 g/L, ④不添加褐变抑制剂, 每 2 d 转接 1 次, 更换新鲜的培养

基, ⑤培养基添加抗坏血酸 Vc 0.15 g/L, 并且每 2 d 转接 1 次。随机试验设计, 每处理 18 个外植体, 重复 3 次。24℃培养, 分别设置光、暗环境培养。

(2) 幼胚诱导丛生芽分化基本培养基的筛选

采用 GD、DCR 和 WPM 三种培养基为基本培养基, 添加 NAA(0.10、0.15、0.20、0.25 mg/L)、6-BA(0.50、1.00、1.50、2.00 mg/L) 和 KT(0.50 mg/L), 完全随机区组设计, 蔗糖 28.0 g/L, 琼脂 6.5 g/L, pH=5.8, 每瓶接种 3 个幼胚, 每处理 10 瓶, 重复 3 次, 24℃光照培养。

(3) 丛生芽的增殖和伸长培养

增殖和伸长培养基为 WPM, 附加 NAA(0.00、0.10、0.15、0.20 mg/L)、随机试验设计, 抗坏血酸 Vc 0.15 g/L 和活性炭 0.5 g/L, 每处理 20 瓶, 重复 3 次, 每 2 周继代一次, 24℃光照培养。

(4) 激素组合对丛生芽生根诱导的影响

培养基为 WPM, 蔗糖 20.0 g/L, 抗坏血酸 Vc 0.15 g/L 和活性炭 0.5 g/L, 添加 IBA(1.00、2.00、3.00 mg/L)、NAA(0.10、0.15、0.20 mg/L)、两种激素水平完全随机试验设计, pH=5.8, 每处理 20 瓶, 三次重复, 24℃光照培养。

(5) 活性炭和蔗糖浓度组合对丛生芽生根的影响

培养基为 WPM, 添加 IBA 2.00 mg/L、NAA 0.15 mg/L, 附加活性炭(0.50、1.0 g/L)与蔗糖(20.0、25.0 g/L), pH=5.8, 随机区组试验设计, 每处理 10 瓶, 每瓶 3 个诱导分化的丛生芽, 3 次重复, 24℃光照培养。

1.3 数据统计分析

定期观察外植体的生长情况, 在诱导丛生芽阶段统计污染率、丛生芽诱导率、外植体褐变率, 并进行褐化评价; 在丛生芽增殖培养阶段统计芽分化数、芽增殖数、计算增殖率, 评价丛生芽生长状况; 在丛生芽生根诱导阶段统计生根数, 计算生根率, 评价生根质量。数据采用 SPSS 16 统计软件, 进行方差分析, LSD 多重比较。

2 结果与分析

2.1 马尾松幼胚器官发生植株再生过程

马尾松幼胚经器官发生途径植株再生过程如图 1(a)~1(l)所示,在 WPM 基本培养基上,添加 NAA 0.15 mg/L+6-BA 1.00 mg/L+KT 0.50 mg/L 浓度的激素组合,接种 1 周后,可见胚轴明显增粗,子叶微张,如图 1(a)、1(b)所示,部分子叶颜色由嫩黄色转变为黄绿色,胚轴乳白色;2 周后,深绿色子叶伸长,张开,胚轴膨大弯曲,与子叶相连处为浅绿色,胚根处产生粉红色团状愈伤组织,如图 1(c)、1(d)所示;3~4 周时,子叶增粗,胚轴膨大,很多不定芽原基突起在近子叶的胚轴处产生,如图 1(e)所示,少量胚根处有短根形成;5~6 周时,子叶

和胚轴上的芽原基开始分化出丛生芽群,每个幼胚上可以分化出 6~8 个丛生芽,如图 1(f)所示;随后,在丛生芽的周围又可再次分化出新的丛生芽。8 周后,切取丛生芽约 1.5 cm 左右,转接在丛芽伸长和增殖培养基上,陆续还有小芽丛从叶腋长出,如图 1(g)、1(h)所示;挑选顶芽发育良好,茎发育粗壮的丛芽转接入生根培养基中,进行生根诱导,1 周后,有部分幼苗基部形成大量愈伤组织,如图 1(j)所示;2 周后,有的茎基部分化出少量的不定根,如图 1(k)所示,部分茎芽基部直接形成了一条主根系,其上分布有须根;4 周后,根长可达 3 cm 左右,植株高 2.5~3.5 cm,如图 1(l)所示;继续培养,转入移栽成活阶段。马尾松幼胚器官发生丛芽分化与增殖、再生植株的过程为利用马尾松幼胚为外植体建立快繁体系提供了一条新途径。

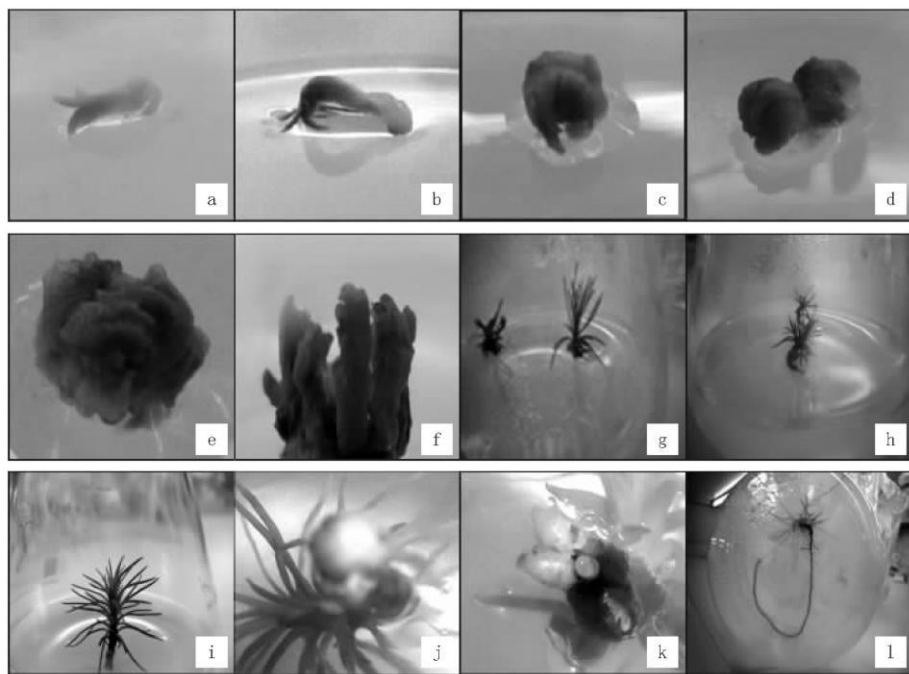


图 1 马尾松幼胚器官发生途径植株再生过程

Fig. 1 Micropropagation of immature embryos in *P. massoniana* in vitro

2.2 抑制褐变处理下马尾松幼胚离体培养状况

解决外植体材料以及培养中出现的褐化问题才有利于马尾松组培的顺利进行。马尾松幼胚接种于 WPM 培养基上,添加 KT 为 0.50 mg/L,其他成分如以上试验设计所述。在 5 种不同的褐变防治处理下,分别于接种后 5 d 和 10 d,观察统计褐变数,并

进行褐变评价分级,马尾松幼胚离体培养褐变状况均值结果见表 1 所示。对原始统计数据进行多因素方差分析表明,培养环境(光照和暗培养)对褐变数和褐变评价呈极显著性差异($P < 0.001$),暗培养下,褐化率均值较小,褐化程度较低,因此,幼胚离体培养时初期的暗培养有利于建立稳定的离体培养体

系。不同褐变防治处理对马尾松离体培养褐变率和褐变评价的多重比较表明, ①处理与③处理, ②处理与④处理差异不显著, ⑤处理与其他处理有极显著性差异, 褐化率低, 褐变评价级别低, 因此, 在幼胚

接种处理早期, 采用培养基中添加 Vc 0.15 g/L, 暗培养, 并且每 2d 转接一次的处理, 能较好建立幼胚初期离体培养体系, 有效地减轻褐化现象。

表 1 不同褐化防治措施下马尾松幼胚离体培养状况
Table 1 Effects of treatments on controlling brown in *P. massoniana*

| 观察时间 | 光照培养 | | | | | 暗培养 | | | | |
|--------|------|--------|--------|---------|------|------|--------|--------|---------|------|
| | 处理编号 | 接种总数/个 | 总褐变数/个 | 平均褐变率/% | 褐变评价 | 处理编号 | 接种总数/个 | 总褐变数/个 | 平均褐变率/% | 褐变评价 |
| 第 5 天 | 1 | 52 | 50 | 96.2 | +++ | 1 | 52 | 36 | 69.2 | +++ |
| | 2 | 52 | 30 | 57.7 | ++ | 2 | 52 | 20 | 38.5 | ++ |
| | 3 | 52 | 45 | 86.5 | +++ | 3 | 52 | 33 | 63.5 | ++ |
| | 4 | 52 | 32 | 61.5 | ++ | 4 | 52 | 22 | 42.3 | + |
| | 5 | 52 | 25 | 48.1 | ++ | 5 | 52 | 8 | 16.2 | ++ |
| 第 10 天 | 1 | 52 | 46 | 88.5 | ++ | 1 | 52 | 33 | 63.5 | ++ |
| | 2 | 52 | 25 | 48.1 | ++ | 2 | 52 | 16 | 30.8 | + |
| | 3 | 52 | 43 | 82.7 | +++ | 3 | 52 | 30 | 57.7 | ++ |
| | 4 | 52 | 30 | 57.7 | +++ | 4 | 52 | 15 | 28.8 | + |
| | 5 | 52 | 18 | 34.6 | + | 5 | 52 | 6 | 11.5 | + |

++ 越多, 表示褐变评价级别越高, 褐化程度越深。

2.3 马尾松幼胚离体培养丛芽诱导分化基本培养基选择

把马尾松幼胚接种在 GD、DCR 和 WPM 三种基本培养基上, 添加激素 6-BA、NAA 和 KT, 每种培养基上进行 16 个组合的完全随机区组试验, 合计 48 个处理, 每处理接种 10 个幼胚, 3 次重复, 试验设计见表 2。以诱导分化出可辨别的丛生芽为依据, 统计幼胚诱导数、计算丛芽诱导率, 结果见表 2。

对诱导丛生芽的结果用 SPSS 16.0 进行多因素方差分析, LSD 多重比较, 结果显示, 培养基类型、NAA 浓度以及培养基* NAA* 6-BA 等对马尾松幼胚丛生芽诱导呈极显著性差异, 其影响权重值分别为培养基> NAA> 培养基* NAA* BA; 6-BA 不同水平浓度间无显著性差异。对三种培养基丛生芽诱导率均值进行 LSD 多重比较表明, WPM (诱导率均值为 68.17%) 与 DCR、GD 这两种培养基的诱

表 2 不同培养基与不同激素浓度组合对马尾松幼胚丛生芽诱导分化的影响

Table 2 Effects of hormone concentration and medium on differentiation in immature embryo of *P. massoniana*

| 编号 | 激素浓度/(mg · L ⁻¹) | | | 诱导率/% | | | | | | | | |
|----|------------------------------|------|------|--------|-------|-------|---------|-------|-------|---------|--------|--------|
| | 6-BA | NAA | KT | GD 培养基 | | | DCR 培养基 | | | WPM 培养基 | | |
| 1 | 0.50 | 0.10 | 0.50 | 38.89 | 44.44 | 33.33 | 27.78 | 33.33 | 27.78 | 72.22 | 66.67 | 77.78 |
| 2 | 0.50 | 0.15 | 0.50 | 44.44 | 50.00 | 44.44 | 55.56 | 55.56 | 50.00 | 100.00 | 94.44 | 100.00 |
| 3 | 0.50 | 0.20 | 0.50 | 66.67 | 61.11 | 72.22 | 33.33 | 61.11 | 55.56 | 33.33 | 33.33 | 38.89 |
| 4 | 0.50 | 0.25 | 0.50 | 50.00 | 55.56 | 55.56 | 50.00 | 55.56 | 61.11 | 38.89 | 33.33 | 44.44 |
| 5 | 1.00 | 0.10 | 0.50 | 38.89 | 33.33 | 38.89 | 44.44 | 44.44 | 50.00 | 55.56 | 50.00 | 55.56 |
| 6 | 1.00 | 0.15 | 0.50 | 72.22 | 72.22 | 77.78 | 33.33 | 33.33 | 33.33 | 100.00 | 100.00 | 94.44 |
| 7 | 1.00 | 0.20 | 0.50 | 44.44 | 38.89 | 38.89 | 44.44 | 44.44 | 33.33 | 55.56 | 61.11 | 61.11 |
| 8 | 1.00 | 0.25 | 0.50 | 50.00 | 55.56 | 33.33 | 27.78 | 33.33 | 33.33 | 66.67 | 83.33 | 72.22 |
| 9 | 1.50 | 0.10 | 0.50 | 33.33 | 38.89 | 38.89 | 44.44 | 38.89 | 44.44 | 61.11 | 61.11 | 61.11 |
| 10 | 1.50 | 0.15 | 0.50 | 44.44 | 38.89 | 44.44 | 55.56 | 66.67 | 72.22 | 77.78 | 66.67 | 77.78 |
| 11 | 1.50 | 0.20 | 0.50 | 27.78 | 33.33 | 27.78 | 44.44 | 50.00 | 50.00 | 61.11 | 55.56 | 55.56 |
| 12 | 1.50 | 0.25 | 0.50 | 38.89 | 27.78 | 27.78 | 38.89 | 44.44 | 38.89 | 88.89 | 77.78 | 55.56 |
| 13 | 2.00 | 0.10 | 0.50 | 50.00 | 61.11 | 44.44 | 38.89 | 33.33 | 38.89 | 100.00 | 94.44 | 94.44 |
| 14 | 2.00 | 0.15 | 0.50 | 38.89 | 38.89 | 38.89 | 50.00 | 44.44 | 55.56 | 55.56 | 50.00 | 50.00 |
| 15 | 2.00 | 0.20 | 0.50 | 33.33 | 38.89 | 44.44 | 38.89 | 38.89 | 27.78 | 88.89 | 61.11 | 72.22 |
| 16 | 2.00 | 0.25 | 0.50 | 50.00 | 55.56 | 50.00 | 33.33 | 22.22 | 27.78 | 83.33 | 72.22 | 61.11 |

平均诱导率

45.370

42.939

68.171

导效果呈极显著差异,因此,WPM是马尾松幼胚丛芽诱导的最适培养基类型。从NAA不同浓度水平的LSD多重比较得出,NAA为0.15 mg/L的处理与其他三个处理间差异极显著,且诱导分化均值高,因此,选择NAA 0.15 mg/L的浓度,对马尾松幼胚丛芽诱导有利。6-BA的四个浓度处理之间差异不显著,随6-BA浓度的升高,诱导率的均值走向呈轻微下降趋势,其中以6-BA浓度为1.0 mg/L、NAA 0.15 mg/L的6号处理,诱导丛生芽数量多,质量高,因此,本试验选定WPM+NAA 0.15 mg/L+6-BA 1.0 mg/L+KT 0.50 mg/L为较好的马尾松幼胚丛芽诱导分化培养基,丛生芽诱导率可达到98.15%。

2.4 马尾松丛生芽增殖及伸长培养

将从幼胚诱导产生的丛生芽转接到WPM增殖培养基上,添加NAA(0.00、0.10、0.15、0.20 mg/L),随机区组设计。培养4周后,观察并记录丛

生芽的伸长和发育情况,试验设计及统计结果见表3。由表3数据,对NAA浓度与丛生芽增殖倍数进行单因素方差分析,LSD多重比较,表明,不同浓度的NAA处理间,差异极显著,NAA浓度的微小变化均对丛生芽的增殖和伸长培养产生影响,且在不同NAA浓度水平下,马尾松芽的增殖呈现出不同的生长势。其中不加激素的培养基上,芽增殖比较少且丛生芽生长慢,并且大部分以侧芽方式增殖,没有新的不定芽的分化。随浓度的增加,逐渐出现丛生芽分化现象,其中以NAA 0.15 mg/L的处理,芽苗增殖系数高,增殖系数可达5.43,且伸长培养长势好;随着NAA浓度的进一步升高,则会在基部产生大量愈伤组织,因此,NAA浓度的微小波动都会对马尾松丛生芽组培诱导的效果产生较大的影响。结合丛生芽生长状况,得出马尾松幼胚丛芽增殖和伸长培养的最适合的培养基激素组合为WPM+NAA 0.15 mg/L。

表3 NAA浓度对马尾松丛生芽增殖的影响

Table 3 Effects of NAA concentration on multiplication of adventitious shoot of *P. massoniana*

| 处理编号 | NAA/(mg·L ⁻¹) | 接种芽数 | | | 4周后有效增殖芽数 | | | 增殖倍数 | | | 丛生芽生长状况 |
|------|---------------------------|------|----|----|-----------|-----|-----|------|-----|-----|-----------------|
| 1 | 0.00 | 21 | 19 | 18 | 44 | 44 | 46 | 2.1 | 2.3 | 2.6 | 芽苗增殖少,且生长慢 |
| 2 | 0.10 | 19 | 25 | 17 | 78 | 107 | 75 | 4.1 | 4.3 | 4.4 | 芽苗增殖少,且较纤细 |
| 3 | 0.15 | 26 | 19 | 28 | 143 | 97 | 159 | 5.5 | 5.1 | 5.7 | 芽多且苗长势好 |
| 4 | 0.20 | 17 | 20 | 19 | 65 | 68 | 74 | 3.8 | 3.4 | 3.9 | 芽苗增殖少,有大量愈伤组织形成 |

2.5 马尾松丛生芽生根诱导

2.5.1 IBA和NAA激素浓度组合对马尾松丛生芽生根诱导的影响

将诱导培养得到的丛生芽分割,保留株高1.5 cm左右,转入添加IBA和NAA激素浓度组合的WPM生根培养基中,1周后,有部分幼苗基部形

成大量愈伤组织;2周后,观察到部分愈伤组织分化出了少量不定根,有些丛生芽直接形成了一条主根系,其上分布有须根。4周后,根长可达3 cm,植株高2.5~3.5 cm,35 d后,进行生根统计,统计结果见表4。

表4 IBA与NAA激素浓度组合处理下马尾松丛生芽生根诱导的状况

Table 4 Effects of concentration of IBA and NAA on root induction and root growth in adventitious shoot of *P. massoniana*

| 处理编号 | 激素浓度/(mg·L ⁻¹) | | 平均生根率/% | 生根诱导状况 |
|------|----------------------------|------|---------|-------------------|
| | IBA | NAA | | |
| 1 | 1.0 | 0.10 | 22.11 | 根少,生长较差 |
| 2 | 1.0 | 0.15 | 40.32 | 根纤细 |
| 3 | 1.0 | 0.20 | 33.33 | 须根多,主根不发达 |
| 4 | 2.0 | 0.10 | 49.89 | 主根粗短无须根 |
| 5 | 2.0 | 0.15 | 66.67 | 根系生长良好,根长3~4 cm |
| 6 | 2.0 | 0.20 | 42.33 | 愈伤组织内分化出2~3条不定根 |
| 7 | 3.0 | 0.10 | 32.56 | 愈伤组织内分化出1~2条短根 |
| 8 | 3.0 | 0.15 | 36.67 | 有根生成但比较短小 |
| 9 | 3.0 | 0.20 | 21.52 | 胚轴末端有少量紧密的浅黄色块状愈伤 |

对原始统计数据进行 SPSS 16.0 方差分析, LSD 多重比较, 结果显示, IBA、NAA 两种激素不同浓度水平对丛生芽生根诱导均呈现极显著性差异 ($P < 0.001$), 贡献值大小表现为 $IBA > NAA > IBA * NAA$ 。LSD 多重比较表明, IBA 的第 2 水平处理与其他两个浓度处理有极显著性差异, NAA 的第 2 水平处理与其他两水平浓度处理有极显著性差异。在生根培养过程中, 也观察到, NAA 和 IBA 浓度较低时, 比较难生根, 根系生长状态差, 根系瘦弱, 两种激素的浓度高时, 又会在丛芽基部形成大量的愈伤组织, 也不利于根的分化和形成, 过高的浓度甚至有可能出现针叶枯黄, 茎段和基部枯萎等毒害现象。当 IBA 2.0 mg/L 和 NAA 0.15 mg/L 浓度组合处理时, 根系生长状态好, 有一定的主根, 根长可达 40 cm 左右, 因此, 获得了马尾松丛生芽生根诱导的最佳激素组合, 生根率可达到 66.67%。

2.5.2 活性炭和蔗糖浓度对马尾松丛生芽生根诱导的状况

培养基添加不同浓度的蔗糖和活性炭, 会在培养基营养成分和渗透压方面产生差异, 从而提供了不同的生根环境。本研究中对蔗糖与活性炭在马尾松丛生芽生根诱导中的作用进行了探讨, WPM 培养基, 添加 IBA 2.00 mg/L 和 NAA 0.15 mg/L, 试验设计见表 5。切取约 1.5 cm 经伸长培养的丛生芽, 进行生根诱导培养, 培养 30 d 后, 进行生根情况记录, 统计结果见表 5。

表 5 活性炭和蔗糖浓度对马尾松丛生芽诱导生根的影响
Table 5 Effects of active carbon and sucrose concentration on root induction and root growth in adventitious shoot with of *P. massoniana*

| 处理 编号 | 活性炭/ ($g \cdot L^{-1}$) | 蔗糖/ ($g \cdot L^{-1}$) | 平均生根 率/% | 生根状况 |
|----------|------------------------------|-----------------------------|-------------|----------|
| 1 | 0.5 | 20 | 50.01 | 根系粗壮且发达 |
| 2 | 0.5 | 25 | 44.44 | 根系生长一般 |
| 3 | 1.0 | 20 | 40.28 | 根系生长缓慢 |
| 4 | 1.0 | 25 | 30.56 | 根系生长慢且纤细 |

对数据进行方差分析结果表明, 活性炭、蔗糖的不同处理对生根诱导率呈极显著性差异, 且活性炭的作用大于蔗糖, 但活性炭*蔗糖联合作用对生根诱导的差异不显著。这说明, 两者之间有交互作用。从表 5 中的生根状况观察发现, 活性炭 0.50 g/L 和蔗糖 20.0 g/L 的处理, 生根诱导率较

高, 根系生长粗壮且发达, 生根状况好; 增加活性炭质量浓度至 1 倍, 生根生长状态变差, 这与活性炭量越多, 吸附性越强, 诱导生根的激素部分被吸附后, 培养基中有效生根激素浓度供应不够有关。在活性炭浓度一定的情况下, 生根率随蔗糖浓度的升高而呈减小的趋势。培养基中的蔗糖不但提供碳源和能量来源, 同时对培养基的渗透压也有一定的调节作用, 最新的研究表明, 蔗糖还可作为信号分子调节细胞的物质代谢、光合同化物在体内的运输和分配以及植物发育^[6]。

3 讨论与结论

由于松属树种体内多酚类物质含量较高, 组培处理初期, 外植体的褐化情况比较严重, 严重阻碍针叶树离体培养的进一步发展, 幼嫩的组织或材料是针叶树种组培的良好外植体来源。本研究在建立马尾松幼胚离体培养的过程中, 杨艳等^[5]在研究中报道, 选取激素 6-BA、NAA 和 KT 这三个激素的水平组合, 有极少部分幼胚获得了类胚性愈伤组织, 但没有获得稳定的增殖培养, 而是绝大部分的幼胚向器官发生丛生芽诱导方向分化, 获得丛生芽, 经器官发生途径实现植株再生过程, 如本论文中所述。靳小翠等继续在其激素组合基础上, 添加了 2,4-D, 获得了良好的马尾松幼胚性愈伤组织^[7]。对本研究结果与杨艳、靳小翠的研究结果^[5,7]相比较, 从另一个侧面间接说明了, 2,4-D 在马尾松幼胚性愈伤的诱导中是必需的。

本研究中, NAA 浓度的微小变化, 都产生了极显著性差异, 影响丛生芽诱导和增殖的表现, 因此, 在马尾松组培研究中, 应慎重设定 NAA 的激素浓度梯度。吴若菁^[8]对马尾松离体成熟胚诱导丛生芽的结果表明, 离体胚在 MS + BA (0.50~1.00 mg/L) + NAA (0.20 mg/L) 的培养基中, 从子叶上分化出的丛生芽生长状况最佳; 而成小飞等^[2]研究表明, 决定马尾松种胚外植体存活率以及丛生芽诱导的多种因素中, 最首要的因素是基本培养基的类型。本研究方差分析结果表明, 培养基类型对丛生芽的诱导产生极显著性影响, 与以上结论一致; 研究中添加 NAA 0.15 mg/L 有利于马尾松幼胚丛生芽

诱导和分化,而成小飞等^[2]研究却认为,在诱导阶段添加 NAA,不利于丛生芽诱导,会致使成熟胚向愈伤组织方向分化,这一定程度上与采用的激素种类与培养基的交互作用有关。张宇等^[3]研究得出,马尾松成熟胚在 DCR + BA 0.50 mg/L + IBA 0.05 mg/L 培养基上,得到最高的丛生芽诱导率 99.3%,并通过石蜡切片观察到丛生芽发生为表皮发生方式。本研究中马尾松幼胚丛生芽也观察到,从子叶与胚轴连接处膨大、突起,形成不定芽。Zhu Lihua 等^[4]研究表明,采用 GD+ BA 4.0 mg/L+ NAA 0.2 mg/L 得到的幼苗腋芽诱导率达到 97%,比较以上马尾松胚培养和幼苗培养的最适培养基类型选择上,本研究得出 WPM 基本培养基为佳,与成小飞、Zhu Lihua 和张宇等^[2-4]得出的 GD、DCR 培养基分别为最佳培养基的结论不一致。但 GD、DCR 和 WPM 均属于硝态氮含量低的培养基类型,均适合于松属树种的组织培养,这又与其他研究者在松属树种组织培养研究中得出的结论一致。

在丛生芽伸长培养中,张宇等^[3]切取丛生芽在 GD+ BA 0.1 mg/L+ IBA 0.2 mg/L 的伸长培养基中培养,4~8w 后可获得大量生长良好、伸长整齐的丛生芽。本研究中以 WPM+ NAA 0.15 mg/L 的培养基激素组合获得较好的增殖和伸长培养,这说明培养基和激素的交互作用比较明显。

IBA 作为一种生根诱导剂广泛地应用在促进植物扦插生根的研究中,在组织培养中,也常常用其作为生根诱导的激素。成小飞等^[2]研究表明,1/2GD + IBA 4.0 mg/L 的处理中,形成了白色的不定根,且茎基部无愈伤产生,而在 1/2GD + IBA 2.0 mg/L 的处理中则无不定根产生。张宇等^[3]研究表明,马尾松不定根诱导以 1/2GD + IBA 2.0 mg/L + BA 0.05 mg/L 可得到较好的生根诱导。Zhu Lihua 等研究表明,1/2GD+ NAA 0.2 mg/L 的处理生根质量最好,其次是 2.0 mg/L IBA 的处理;本研究中得出 WPM + IBA 2.0 mg/L+ NAA 0.15 mg/L 为较好的生根诱导培养基,基部无愈伤组织产

生,生根质量好,根系生长良好。这说明,生根的最适条件会因培养基微环境的不同而出现差异。

本研究中也探讨了活性炭和蔗糖在马尾松丛生芽生根诱导中的作用效果,郭韩玲等^[9]研究培养基蔗糖浓度对苹果组培苗扩繁和生根的影响时,经多年的生产实践得出,改变生根前一代扩繁培养基和生根培养时的糖浓度,有利于提高组培苗繁育的成活率,且生根时以蔗糖浓度 20~25 g/L 为适宜。本研究中得出,马尾松丛生芽诱导生根时,蔗糖浓度为 20.0 g/L 的处理优于 25.0 g/L 的处理,添加 0.50 g/L 的活性炭对生根诱导也有利。

本研究以幼胚为外植体,从幼胚上诱导产生丛生芽,并得到增殖、伸长培养,经生根诱导成正常植株。这为马尾松组培快繁体系建立提供了一条新途径。

参考文献:

- [1] 丁贵杰,周志春,王章荣,等. 马尾松纸浆用材林培育与利用[M]. 北京:中国林业出版社,2006:1-10.
- [2] 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.
- [3] 张宇,卫志明,席梦利,等. 马尾松高效再生体系的建立[J]. 分子细胞生物学报,2006,39(3):271-275.
- [4] Li Hua Zhu, Xiao Qin Wu, Hong Ye Qu, et al. Micropropagation of Pinus massoniana and mycorrhiza formation in vitro[J]. Plant Cell Tiss. Organ. Cult. 2010, 102:121-128.
- [5] 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.
- [6] Hummel M, Rahmani F, Smeekens S, et al. Sucrose mediated translational control[J]. Ann. Bot., 2009,104(1):1-7.
- [7] 靳小翠,李志辉,杨模华,等. 马尾松幼胚培养愈伤组织诱导研究[J]. 中南林业科技大学学报,2010,30(4):80-84.
- [8] 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.
- [9] 郭韩玲,赵亚丽,梁建军. 培养基蔗糖浓度对苹果组培苗扩繁和生根的影响[J]. 山西果树,2006,(5):11-12.

[本文编校:吴毅]