

奥地利黑松不定芽增殖与伸长研究

王小玲¹, 高柱¹, 樊军锋²

(1. 江西省科学院 生物资源研究所, 江西 南昌 330029; 2 西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要:通过影响奥地利黑松不定芽增殖和伸长因素的研究发现, 接种到添加 0.8 mg/L 6-苄氨基嘌呤(6-BA)和 0.01 mg/L 萘乙酸(NAA)的 GD 培养基上的不定芽增殖率最高可达 1100%。不定芽伸长的适宜基本培养基为 MS, 添加 0.02 mg/L NAA 伸长生长效果显著。继代培养中, 用 50 g/L 食用白糖代替 30 g/L 分析纯蔗糖, 可以降低试验成本。活性炭(AC)有利于促进奥地利黑松不定芽的伸长, 而赤霉素(GA₃)则抑制伸长。

关键词:奥地利黑松; 不定芽; 增殖诱导; 伸长生长

中图分类号: S791.256.05 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-2286(2010)02-0324-06

Studies on the Propagation and Elongation of Adventitious Buds of *Pinus nigra* var. *austriaca*

WANG Xiao-ling¹, GAO Zhu¹, FAN Jun-feng²

(1. Institute of Biological Resources, Jiangxi Academy of Sciences, Nanchang 330029, China; 2 College of Forestry, Northwest A & F University, Yangling 712100, China)

Abstract: The purpose of this study was to analyze the propagation and elongation factors of *Pinus nigra* var. *austriaca* adventitious buds. The study found that GD + 0.8 mg/L 6-BA + 0.01 mg/L NAA was the best medium combination for propagation. The rate of propagation was about 1100 per cent. Then the adventitious buds were transferred onto the medium of MS + 0.02 mg/L NAA + AC 1.0 g/L, the growth of elongation was obvious. In this study, in order to reduce cost, 50 g/L white sugar could substitute 30 g/L sucrose. Activated carbon (AC) could be conducive, while GA₃ went against the growth of elongation of adventitious buds.

Key words: *Pinus nigra* var. *austriaca*; adventitious buds; induction of propagation; growth of elongation

奥地利黑松 (*Pinus nigra* var. *austriaca*) 为欧洲黑松 (*Pinus nigra*) 的一个变种, 生长迅速、根系发达、抗逆性强、适生范围广、育苗及造林成活率高, 是荒山绿化及营造水土保持林、防风林的优良树种。利用组织培养法对奥地利黑松优良种源进行繁殖, 比常规的繁殖具有更多的优点和潜力。从 20 世纪 40 年代起, 组织培养技术在松属树种上的应用已经很多, 有关奥地利黑松不定芽的诱导和生根研究也有报道^[1-2], 然而有关奥地利黑松不定芽增殖和伸长研究在国内还处于空白。不定芽增殖是工厂化生产的关键环节, 不定芽伸长效果直接影响生根质量, 而工厂化生产又是进行组织培养的最终目的, 这个问题看似简单, 解决起来却非常棘手。因此, 需要进行更多、更细致和更深入的研究。本文旨在研究奥地利黑松快速繁殖体系建立过程中影响不定芽增殖与伸长的因素, 以期掌握奥地利黑松快速繁殖的关键技术。

收稿日期: 2009-09-25 修回日期: 2010-03-04

基金项目: 国家林业局“948”项目(2000-04-03)

作者简介: 王小玲(1979-), 女, 助理研究员, 博士生, 主要从事林木与花卉育种研究, E-mail: wangxiaoling1979@126.com。

1 材料与方法

1.1 材料

选择奥地利黑松离体胚培养诱导产生的生长状态一致的不定芽作为繁殖材料。

1.2 方法

1.2.1 奥地利黑松不定芽的增殖诱导 (1)研究 4 种培养基 1/2GD、1.0GD、1/2WPM 和 1WPM 对增殖的影响 (1/2 GD 和 1/2 WPM 分别为大量元素和 Ca 元素减半的 GD 和 WPM 培养基)。

(2)在所选的适宜培养基上,分别添加 0.2, 0.5, 0.8, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0 mg/L 的细胞分裂素 6-BA, 分析其对不定芽增殖的影响。

(3)讨论生长素 NAA 不同质量浓度 (0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.2 mg/L) 对增殖的影响。

(4)研究碳源种类 (食用白糖和分析纯蔗糖, 以下分别简称为白糖和蔗糖) 及其不同质量浓度 (0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 80, 100 g/L) 对不定芽增殖的影响。

1.2.2 奥地利黑松不定芽的伸长 待不定芽在增殖培养中长至 1~2 cm, 切下转移到伸长培养基上培养, 为生根培养奠定基础。本试验采用 MS 基本培养基, 分别加入生长素 NAA (0.02, 0.05, 0.08, 0.10 mg/L), 以获得不定芽伸长的适宜生长素质量浓度。并研究 GA₃ (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 mg/L) 和 AC (0, 0.2, 0.5, 0.8, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 g/L) 在伸长生长过程中的作用。

以上各培养基均添加琼脂 4.5 g/L, pH 为 5.8, 121 °C 高温灭菌 20 min。每个试验处理重复 3 次, 一定时间后, 剔除污染材料, 统计增殖率。增殖率 = (芽总数 - 接种芽数) / 接种芽数 × 100%。

1.2.3 培养条件 培养温度 (25 ± 2) °C, 光照强度 2 000 ~ 3 000 lx, 每日光照 14 h。

2 结果与分析

2.1 影响奥地利黑松不定芽增殖的因素

2.1.1 基本培养基对增殖的影响 图 1 显示, 不定芽的增殖率在供试培养基上变化很大。GD 和 WPM 培养基诱导不定芽增殖的效果显著高于 1/2GD 和 1/2WPM, 且基本培养基 1GD 的诱导效果最好, 增殖率高达 800%, 芽生长健壮。这可能是其他 3 种培养基无机盐离子浓度太低, 培养基中的大量元素不能满足增殖后大量不定芽生长的需要, 从而导致增殖率下降, 不定芽生长瘦弱。

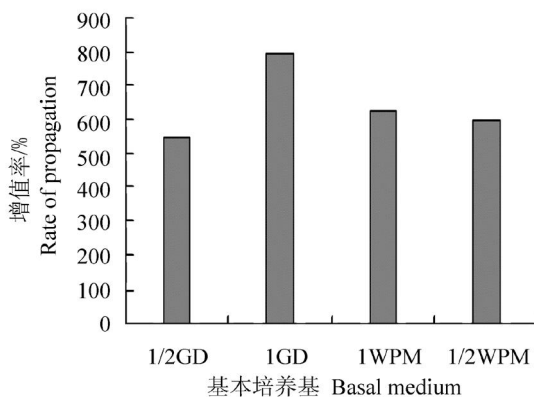


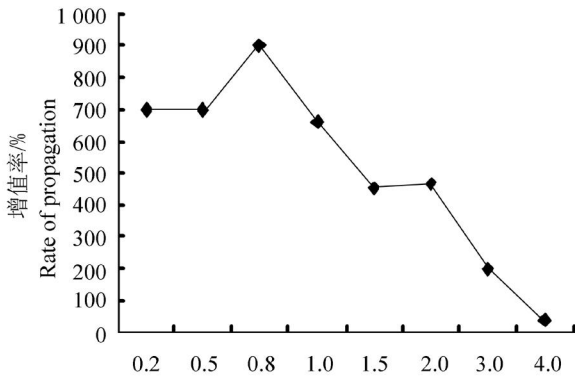
图 1 基本培养基对增殖的影响

Fig 1 Influence of basal medium on the rate of propagation

2.1.2 细胞分裂素 6-BA 对增殖的影响

6-BA 在不定芽增殖培养过程中的作用比较突出 (图 2)。当 6-BA 质量浓度 < 1.0 mg/L 时, 增殖率 > 700%, 且以 6-BA 质量浓度为 0.8 mg/L 时为最高, 增殖率达 900%, 芽生长健壮; 当 6-BA 质量浓度 = 1.0 mg/L 时, 增殖率迅速下降, 愈伤化程度加重, 且当 6-BA 质量浓度为 4.0 mg/L 时, 增殖率仅为 41%。多次重复试验结果表明, 奥地利黑松不定芽增殖的 6-BA 质量浓度以 0.8 mg/L 最为适宜。同时, 试验还发现不定芽连续培养在含细胞分裂素的增殖培养基上, 不定芽有玻璃化的趋势, 简单的避免方法就是在不含激素的培养基和含细胞分裂素的培养基上交叉培养。

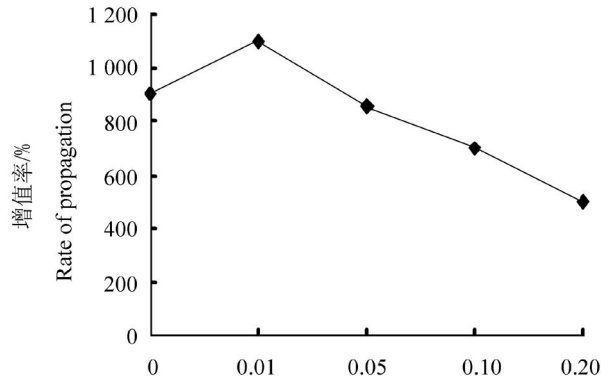
2.1.3 生长素 NAA 对增殖的影响 一般认为细胞分裂素与生长素的协同作用有利于外植体的茁壮生长, 为了确定 NAA 除了能改变对外植体的生长状况外, 是否还会影响不定芽的增殖, 进行了如下试验, 结果 (图 3) 表明: 接种在附加不同质量浓度 NAA 培养基上的不定芽, 增殖率在供试范围内的变化是 500% ~ 1100%。由此可见, NAA 对增殖率的影响是毋庸置疑的。当不添加 NAA 时, 增殖率为 900%, 而加入 0.01 mg/L 的 NAA 将使得增殖率提高了 200%; 当 NAA 质量浓度继续升高时, 不定芽增殖率不断下降, 外植体基部愈伤化程度不断增加。因此, 微量质量浓度的 NAA 对不定芽的增殖具有促进作用。



6-BA质量浓度/mg · L⁻¹ Concentration of 6-BA

图 2 6 - BA 质量浓度对增殖的影响

Fig 2 Influence of 6 - BA on the rate of propagation



NAA质量浓度/mg · L⁻¹ Concentration of NAA

图 3 NAA 质量浓度对增殖的影响

Fig 3 Influence of NAA on the rate of propagations

2.1.4 碳源种类及浓度对增殖的影响 目前的组织培养中,常用的碳源是蔗糖,且用量很大^[3]。但蔗糖市售价格要比白糖高出 10 多倍,为此有必要研究白糖和蔗糖对奥地利黑松不定芽增殖的影响,以期降低试验成本。研究发现(表 1),白糖和蔗糖对奥地利黑松不定芽的增殖虽然有影响,但差异不明显。因此,使用白糖是可行的。

表 1 碳源种类对增殖的影响

Tab 1 Influence of kind of carbonous on the rate of propagation

碳源 Kinds of carbon	接种个数 / 个 No. of explants	分化芽数 / 个 No. of propagation buds	增殖率 / % Rate of propagation
食用白糖 White sugar	89	834	837
分析纯蔗糖 G R sucrose	73	722	889

糖类物质是外植体获得碳源的主要来源,其质量浓度的变化也会影响外植体的生长状况,进而影响不定芽的增殖率。从图 4 可以看出,白糖用量明显大于蔗糖在组织培养中的用量,但与价格成本相比较,使用白糖还是比蔗糖经济、实惠,且适宜的白糖质量浓度是 50 g/L。

对图 4 的数据,采用 DPS 统计分析软件,根据坐标散点图趋势进行不定芽增殖率 (y) 与白糖浓度 (x) 回归模型拟合分析。由表 2 可知,回归分析得到的拟合模型中,最适合的拟合模型为二次曲线函数模型,因为该模型 $R^2 = 0.9137$, $R = 0.9559$ 在拟和模型中均最大,表明拟合度最高。 $F = 42.3698$ 在拟和模型中最大,表明显著水平最高,显著水平 0.0001 最小,拟合效果最显著。从专业意义分析,二次曲线动态消长趋势,体现不定芽增殖率在初始加入白糖阶段上升较快,等浓度添加到了一定范围后,缓慢降低。所以无论从模型检验结果还是从专业意义来说二次曲线函数模型 $y = -149.1845 + 30.3620x - 0.282895x^2$ 是奥地利黑松不定芽增殖率与白糖浓度变量的最佳拟合模型,其拟合曲线如图 5。

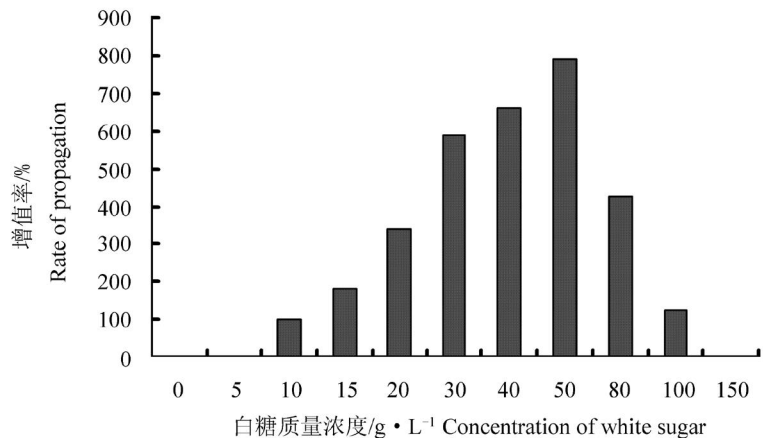


图 4 白糖浓度对不定芽增殖的影响

Fig 4 Influence of concentration of white sugar on the rate of propagation

表 2 不定芽增殖动态回归模型拟合分析

Tab 2 The analysis on evaluation model of the rate of propagation of adventitious buds

模型类型 Type of model	回归方程 Evaluation equation	R^2	F	显著水平 Significant level	R
逻辑斯蒂函数 Logistic function	$y = 520.1728 / [1 + \exp(4.8156 - 0.281751x)]$	0.5926	5.8193	0.0275	0.7698
幂函数 Power function	$y = 135.4519x^{0.298872}$	0.2281	2.6593	0.1374	0.4776
负指数函数 Negative exponential function	$y = 599.7075 \exp(-10.9189/x)$	0.4309	6.8152	0.0282	0.6565
韦布尔函数 Weibull function	$y = 872.3724 \times \{1 - \exp[-(x - 5000.0) / 100.1219]^{0.332381}\}$	0.3567	1.2936	0.3493	0.5972
S曲线函数 S - function	$y = 1 / [0.002004 + 12.320760 \exp(-x)]$	0.5453	10.7936	0.0094	0.7398
双曲线函数 Hyperbolic function	$y = 538.7880 - 3.0352124/x$	0.4465	7.2605	0.0246	0.6682
二次曲线函 Conic function	$y = -149.1845 + 30.3620x - 0.282895x^2$	0.9137	42.3698	0.0001	0.9559

2.2 影响奥地利黑松不定芽伸长的因素

2.2.1 基本培养基对不定芽伸长的影响 经增殖培养的不定芽继代到不含任何激素的 MS、GD 和 WPM 培养基上进行伸长生长。5周以后观察分析表明,在各培养基上,不定芽能平均伸长 5.3 cm 以上。但继代在 MS 培养基上的不定芽可伸长 6.5 cm 以上,明显优于生长在 GD (伸长 4.5 cm) 和 WPM (伸长 5 cm) 培养基上的不定芽。这可能与 MS 培养基可以提供充足的大量元素供不定芽伸长生长有关。

2.2.2 不同质量浓度 NAA 对不定芽伸长的影响 试验结果表明,加入微量生长素 NAA 可以促进奥地利黑松不定芽的伸长。且以添加 0.02 mg/L NAA 的 MS 培养基为最佳培养基,不定芽可伸长 7.2 cm 以上。超过 0.02 mg/L 的量容易引起不定芽基部愈伤化,愈伤化的程度与 NAA 的使用质量浓度成正相关,而且超过 0.08 mg/L 以上

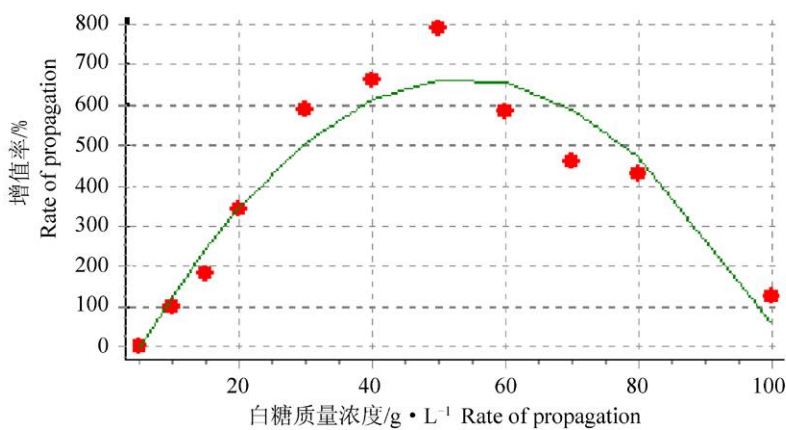


图 5 白糖质量浓度对增殖的影响

Fig 5 Influence of concentration of white sugar on the rate of propagation

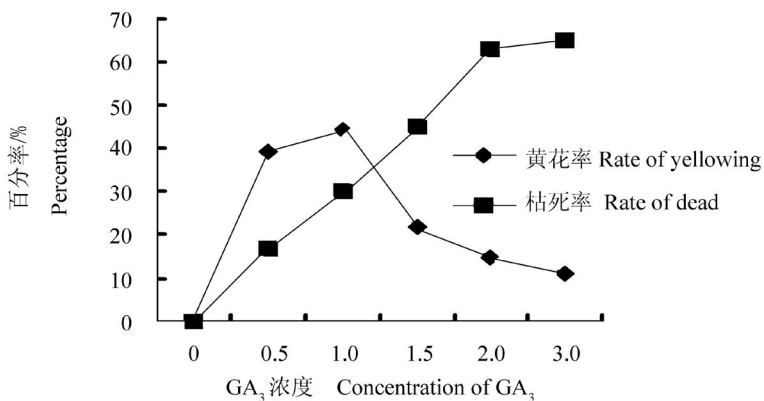


图 6 GA₃ 对不定芽伸长的影响

Fig 5 Influence of GA₃ on elongation of adventitious buds

就会导致部分不定芽玻璃化。因此适当质量浓度 NAA 的加入,不但可以促进奥地利黑松不定芽的伸长生长,而且还可以促进不定芽茁壮生长。

2.2.3 赤霉素 (GA₃)对不定芽伸长的影响 赤霉素 (GA₃)是其同系物中应用最广的植物生长激素之一。有报道^[4-5]显示,GA₃对福建山樱桃的不定芽伸长有明显效果,但通常不利于松属树种不定芽的伸长生长。本研究发现,奥地利黑松不定芽接种到加有 GA₃的培养基上培养 30 d后,黄化率和枯死率显著提高(图 6)。因此,GA₃不但对奥地利黑松不定芽的伸长没有促进作用,反而具有毒害作用。

2.2.4 活性炭 (AC)对不定芽伸长的影响 表 3显示,AC的确能促进奥地利黑松不定芽的伸长生长,这与大量研究结果表明,AC对不定芽的伸长具有促进作用的结论一致。随着 AC质量浓度的增加,继代后大于 3 cm的不定芽所占的比例从 6.67%开始增加;当 AC质量浓度等于 1.0 mg/L时,大于 3 cm的不定芽比率达到 21.05%;当 AC质量浓度继续上升时,继代后大于 3 cm的不定芽比率则迅速下降。为此,在奥地利黑松组培苗继代培养中为了使不定芽能伸长到 3 cm以上,添加适当的 AC是非常必要的。

表 3 AC对不定芽伸长的影响

Tab 3 Influence of AC on elongation of adventitious buds

活性炭 / (mg · L ⁻¹) AC	接种个数 / 个 No. of explants	继代后 >3 cm的芽数 / 个 No. of propagation buds >3 cm after elongation culture	继代后 >3 cm的百分率 / % Percentage of propagation buds >3 cm after elongation culture
0	15	1	6.67
0.2	19	2	10.53
0.5	14	2	14.29
0.8	16	3	18.75
1.0	18	4	21.05
1.5	13	2	15.38
2.0	18	1	5.56
3.0	19	1	5.26

表 3数据,根据坐标散点图趋势可确定,AC对不定芽伸长的影响符合抛物线的形式,应为二次曲线函数模型。用每升培养基中 AC的含量作自变量 x ,继代后大于 3 cm的不定芽百分率作因变量 y ,拟合的回归方程为 $y^2 = -13.5327x^2 + 26.9163x + 5.9185$, $R = 0.9834$, $R^2 = 0.9671$, $F = 58.7733$ 。

3 结论与讨论

Berlyn和 Beck发现,在大果松胚分化中,使用 1.5倍基本培养基能产生更多的芽。Ellis和 Beck在美国黄松茎芽发生中,发现 1/2 SH比 1.0 SH更好^[5]。本研究发现,供试的 GD、1/2GD、WIM和 1/2WIM 4种培养基中,GD培养基对奥地利黑松不定芽增殖率的影响最大。培养在 GD +0.01 mg/LNAA +0.8 mg/L 6-BA培养基上的不定芽增殖率最高可达 1100% (图 7)。

碳水化合物是植物组织培养的主要能源,且通常以蔗糖为主。蔗糖能支持绝大多数植物离体培养物的旺盛生长,一直被作为植物组织培养的标准碳源而广泛应用。有研究表明,白糖在某些植物组织培养中完全可以代替蔗糖,以便降低试验成本^[3]。为此,我们进行了白糖和蔗糖影响奥地利黑松不定芽增殖的对比试验,结果表明,白糖完全可以代替蔗糖。且在不定芽增殖过程中,为了避免培养基水势过高,不定芽大量吸水而影响生长,培养基必需加糖,以添加质量浓度为 50 g/L白糖的效果较好。

松属树种器官发生的不同阶段对培养基及其附加成分会有不同要求。一般而言,为使诱导产生的不定芽进一步生长并伸长,要将芽连同原组织转移到无激素^[6]或含低浓度激素、降低矿物质、维生素及蔗糖^[7]或添加活性炭^[8-9]的培养基上^[10-13]。GA₃通常不利于松属树种不定芽的伸长生长^[4],且具有毒害作用。AC的加入,在一定程度上能促进松属树种的器官分化,尤其对不定芽的伸长生长有明显的效果^[14],但对于诱导不定芽的数量上影响不大,一般尚有下降趋势。Thompe等^[15]的研究表明,AC有利



图 7 奥地利黑松增殖芽

图 8 奥地利黑松伸长芽

Fig 7 Propagation buds of *Pinus nigra* var *austriaca*Fig 8 Elongation buds of *Pinus nigra* var *austriaca*

于不定芽的伸长。本研究得出,在 MS 培养基中附加 0.02 mg/L 的 NAA 和 1.0 g/L 的 AC 能显著促进奥地利黑松不定芽的伸长(图 8)。

参考文献:

- [1] 王小玲,樊军锋,贾小明. 奥地利黑松离体胚培养诱导不定芽的研究 [J]. 西北林学院学报, 2005, 20(4): 72 - 75.
- [2] 王小玲,樊军锋,余发新,等. 奥地利黑松组培苗生根技术研究 [J]. 西北林学院学报, 2007, 22(1): 63 - 66.
- [3] 汪爱民,刘文,傅中滇. 不同碳源对红边朱蕉组培苗生长的影响 [J]. 徐州师范大学学报, 2003, 21(3): 76 - 78.
- [4] 王光萍,黄敏仁. 福建山樱花的组织培养及植株再生 [J]. 南京林业大学学报, 2002, 26(2): 73 - 75.
- [5] 张宇. 马尾松组织培养的研究 [D]. 南京:南京林业大学, 2003.
- [6] Kaul K. Factors influencing in vitro micro propagation of *Pinus strobes* L. [J]. Biologia Planta Rum, 1990, 32(4): 266 - 272.
- [7] Mathur G, Nadgouda R. In vitro plantlet regeneration from mature zygotic embryos of *Pinus wallichiana* A B Jacks [J]. Plant Cell Reports, 1999, 19(1): 74 - 80.
- [8] Gonzalez M V, Rey M, Tavazza R. In vitro adventitious shoot formation on cotyledons of *Pinus pinea* [J]. Hort Science, 1998, 33(4): 749 - 750.
- [9] Martinez Pulido C, Harry I S, Thope T A. Effect of various bud induction treatments on elongation and rooting of adventitious shoot of Canary Island pine (*Pinus canariensis*) [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1994, 39(3): 225 - 230.
- [10] Patel K R, Kim H, Thope T A. Plantlet formation in pitch pine (*Pinus rigida* Mill) by tissue culture methods [J]. Forest Ecology and Management, 1986, 15(2): 147 - 160.
- [11] Kaul K. Plant regeneration from cotyledon - hypocotyls explants of *Pinus strobes* L. [J]. Plant Cell Reports, 1987, 6(1): 57.
- [12] Patel K R, Shekhawat N S, Berlyn G P, et al. Isolation and culture of from cotyledons of *Pinus coulter* D Don [J]. Plant Cell Tissue Organ Culture, 1984, 3: 85 - 90.
- [13] Pulido C M, Harry I S, Thop T A. Optimization of bud induction in cotyledon explant of *Pinus canaries* [J]. Plant Cell Tissue Organ Culture, 1992, 29: 247 - 255.
- [14] 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.
- [15] 梅兴国,温川荣,刘凌德,等. 红豆杉离体胚培养快速育苗研究 [J]. 华中理工大学学报, 1998, 26(5): 18 - 20.