

奥地利黑松组培苗生根技术研究

王小玲¹, 樊军锋^{2*}, 余发新¹, 王娟娟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 杨陵 712100)

摘要:本试验采用了试管内生根和试管外生根两种方法:(1)把长度>3 cm的奥地利黑松无根组培苗接种到含有不同激素和碳源的1/2DCR、WPM、1/2GD培养基中生长;(2)把长度>5 cm的奥地利黑松无根组培苗,蘸取不同浓度的IBA、IAA、NAA溶液,转移至营养土中生长。结果表明:试管内生根优于试管外生根,试管内生根的最佳培养基为WPM,并添加NAA 0.02 mg·L⁻¹+IBA 0.5 mg·L⁻¹+20 g·L⁻¹蔗糖,;其生根率为55%。

关键词:奥地利黑松;组培苗;试管内生根;试管外生根

中图分类号:S791.259.05 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-7461(2007)01-0063-04

Study on Inducing Roots from *Pinus nigra* var. *austriaca* Plantlets

WANG Xiao-ling¹, FAN Jun-feng², YU Fa-xin¹, WANG Juan-juan²

(1. Biological Resources Institute, Jiangxi Academy of Sciences, Nanchang, Jiangxi 330029, China;

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

Abstract: There were two methods in inducing roots: rooting in-tube and rooting out-tube. In the same culture condition, ①Select bigger than 3 centimeters *Pinus nigra* var. *austriaca* plantlets vaccinated 1/2DCR、WPM、1/2GD mediums to induce roots, which includes different kinds of hormones and sucroses; ②Select bigger than 5 centimeters *Pinus nigra* var. plantlets dipped in different concentration IBA、IAA、NAA solution, then shifts them to the nutrition soil to grow. The result showed that rooting in-tube was better and the best medium was WPM, adding NAA 0.01 mg·L⁻¹+IBA 0.5 mg·L⁻¹+sucrose 20 g·L⁻¹, on which the rate of rooting was 55%.

Key words: *Pinus nigra* var. *austriaca*; plantlets; rooting in-tube; rooting out-tube

组织培养作为一种先进的生物技术进行快速繁殖,在许多观赏植物和经济作物培育中得到广泛应用,但在技术上或多或少存在一些问题,其中生根效果和移栽成活率以及移栽技术的掌握是决定该技术能否应用于商品化生产的关键^[1,2]。与其它木本植物相比,针叶树尤其是松属树种再生完整植株的难度较大^[3]。而只有在生根问题解决以后,离体再生的小植株才会成为人工造林的有用材料^[4],才会解决实际生产中由于奥地利黑松种子产量低,育种周期长而不能满足大规模林业生产需要的问题,为规模化开展该外来树种工厂化育苗奠定基础。

组培苗常用的生根方法主要有试管内生根、试管外生根等。奥地利黑松属于难生根的松属树种,再加上水培、气培、滤纸桥生根等方法^[5]也比较费时费工,无法应用于大规模的生产育苗。因此,本试

验采用试管内生根和试管外直接生根方法,以期寻找一种简便可行的奥地利黑松组培苗生根方法。

1 材料和方法

1.1 供试材料

奥地利黑松(*Pinus nigra* var. *austriaca*)离体胚培养诱导产生的生长健壮、长约3~5 cm的不定芽。

1.2 方法

1.2.1 试管内生根 (1)将奥地利黑松无根组培苗分别接种到1/2DCR、WPM和1/2GD培养基上(附加0.03 mg·L⁻¹NAA, 20 g·L⁻¹蔗糖),用于筛选试管内生根的最适基本培养基。

(2)将奥地利黑松无根组培苗接种到不同浓度的NAA(0, 0.02, 0.05, 0.2, 0.5 mg·L⁻¹)、IBA(0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg·L⁻¹)、NAA(0.01, 0.02,

收稿日期:2006-04-21 修回日期:2006-05-29

基金项目:国家林业局“948”项目(2000-04-03)

作者简介:王小玲(1979-),女,陕西白水人,助理研究员,主要从事林木遗传育种和林木生物技术研究工作。

* 通讯作者:樊军锋(1963-),男,陕西扶风人,副研究员,主要从事树木遗传改良和品种选育工作。

0.05 mg · L⁻¹)与 IBA(0.5,1.0,2.0 mg · L⁻¹)组合的 WPM 培养基上,研究生长素及其浓度对试管内生根的影响。

(3)将奥地利黑松无根组培苗接种到含有 2.0%的白砂糖、蔗糖和葡萄糖的 WPM 培养基上,研究碳源对试管内生根的影响。

1.2.2 试管外生根 (1)将奥地利黑松无根组培苗在不同浓度(0,200,500,800,1 000,1 500,2 000 mg · L⁻¹)的 IBA、IAA、NAA 溶液中浸泡 5 s,筛选出试管外生根的最佳生长素及浓度;

(2)蘸取时间 1 s、5 s、15 s、30 s、60 s、80 s、100 s、120 s 对试管外生根的影响。

1.3 统计指标

生根率(%)=(生根苗数/接种苗数)×100%

2 结果与分析

2.1 影响奥地利黑松组培苗试管内生根的因素

2.1.1 基本培养基对生根的影响

表 1 基本培养基对生根的影响
Table 1 Effect of basic mediums on rooting

处理	接种苗数/个	生根苗数/个	生根率/%	a=0.01
1 1/2DCR	21	2	9.52	B
2 WPM	22	6	27.27	A
3 1/2GD	32	2	6.25	C

基本培养基是影响奥地利黑松组培苗不定根分化的一个重要因子(表 1)。生长在 WPM 培养基上的组培苗不定根的分化频率最高为 27.27%;其次是 1/2DCR 为 9.52%;生长在 1/2GD 培养基上的生根率仅为 6.25%。可能是大量元素减半的 DCR 和 GD 培养基中所含的营养物质满足不了不定根的分化与生长。

2.1.2 NAA 对生根的影响 奥地利黑松组培苗接种到附加不同浓度 NAA 的 WPM 培养基上 20 d 后,有些外植体切口处有洁白的愈伤组织产生,愈伤程度与 NAA 的浓度有关,但都未见不定根的分化;35 d 后,陆续有不定根的分化;50 d 后统计结果(表 2)表明,不添加生长素时,偶尔有不定根的发生;NAA 浓度为 0.02 mg · L⁻¹时,生根率最高为 38.30%,且根茎连接处无愈伤组织;NAA 浓度继续增高时,组培苗切口处愈伤化程度加重,生根率急剧下降;当 NAA 浓度达到 0.5 mg · L⁻¹时,严重愈伤化,没有不定根的分化。

NAA 浓度同样对平均生根数有影响。当 NAA 浓度 <0.05 mg · L⁻¹时,平均生根数与 NAA 浓度成正相关;当 NAA 浓度 > 0.05 mg · L⁻¹时,为负相

关;而当 NAA 浓度等于 0.05 mg · L⁻¹时,平均生根数最多,但由于此时根茎连接处的愈伤组织会对水分输导造成影响,不利于移栽。NAA 浓度为 0.02 mg · L⁻¹时,虽然平均根数只有 1.3,但根茎连接处无愈伤组织,移栽成活率较高。

表 2 NAA 对生根的影响
Table 2 Effect of NAA on rooting

NAA/ mg · L ⁻¹	接种 苗数 /个	生根 苗数 /个	平均 生根 数/条	生根 率/%	a = 0.01	根的生长状态
0	28	1	1.0	3.57	D	根白色,细弱,无侧根
0.02	47	18	1.3	38.30	A	根粗短,发育正常健壮
0.05	50	6	2.5	12.00	B	根数较多,发育正常,有愈伤
0.2	33	2	1.6	6.06	C	根淡黄,短而粗,有少量愈伤
0.5	26	0	0	0	E	有大量愈伤,不生根

2.1.3 IBA 对生根的影响 试验结果表明,IBA 诱导奥地利黑松组培苗不定根发生的时间较 NAA 晚,而且需要量大。组培苗接种到附加不同浓度 IBA 的 WPM 生根培养基上 50 d 后,陆续有不定根的分化。表 3 显示,WPM 培养基中加入 IBA 时,奥地利黑松组培苗生根率不断上升。当 IBA 浓度为 1.0 mg · L⁻¹时,生根率达 32.61%,且平均根数较多;当 IBA 超过 1.0 mg · L⁻¹时,生根率逐渐下降;当 IBA 浓度为 4.0 mg · L⁻¹时,生根率为 0,且形成大量愈伤组织。

表 3 IBA 对生根的影响
Table 3 Effect of IBA on rooting

IBA/ mg · L ⁻¹	接种 苗数 /个	生根 苗数 /个	平均 生根 数/条	生根 率/%	a = 0.01	根的生长状态
0	21	1	1.0	4.76	E	根白色,无侧根
0.1	58	4	1.9	6.90	D	根白色,细弱,无侧根
0.5	68	9	3.0	13.24	B	根数较多,发育正常
1.0	46	15	3.0	32.61	A	根数多,发育正常健壮
2.0	18	2	1.4	11.11	C	有愈伤组织,中途停止生长
4.0	23	0	0	0	F	不生根,大量愈伤形成

2.1.4 NAA 与 IBA 的协同作用对生根的影响

表 4 NAA 与 IBA 协同作用对生根的影响
Table 4 Effect of NAA and IBA on rooting

处理	NAA /mg · L ⁻¹	IBA /mg · L ⁻¹	生根率 /%	a = 0.01
1	0.01	0.5	3.94	G
2	0.01	1.0	6.73	E
3	0.01	2.0	13.56	C
4	0.02	0.5	50.08	A
5	0.02	1.0	21.16	B
6	0.02	2.0	10.30	D
7	0.03	0.5	5.14	F
8	0.03	1.0	2.18	H
9	0.03	2.0	1.00	I

从表 4 可看出,NAA 与 IBA 的协同作用能使得

奥地利黑松组培苗生根率普遍有所上升。生长在附加 $0.02\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA 和 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA 的WPM培养基上的奥地利黑松组培苗的生根率可达50.08%,大大提高了奥地利黑松组培苗试管内生根率,并且随着时间的延长,生根率还有所上升,外植体生长状态良好。虽然单独使用NAA或IBA,也可以使生根率达到30%以上,但切口处愈伤组织明显大于两者组合使用时的愈伤组织。因此,NAA与IBA协同作用更有利于奥地利黑松组培苗试管内诱导生根,最佳浓度分别为 $0.02\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

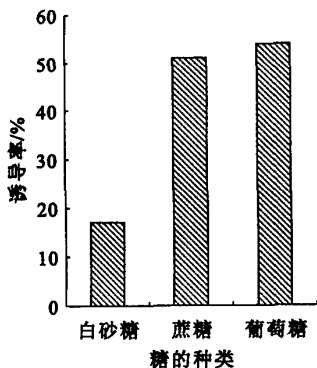


图1 碳源对生根的影响

万方数据 Fig.1 Effect of different carbonization on rooting

2.2 影响奥地利黑松组培苗试管外生根的因素

2.2.1 不同浓度的IBA、IAA和NAA对生根的影响 把大于5 cm的奥地利黑松组培苗,先在不同浓度的IBA、IAA和NAA溶液中浸泡5 s,然后移栽至试先配制好的营养土中生长。20 d后各种处理的生根率情况(图3)。

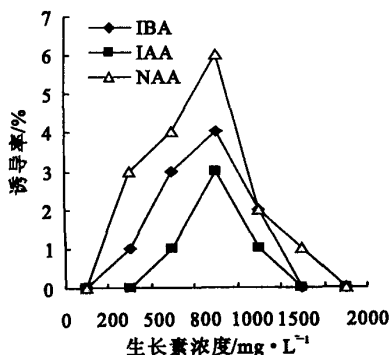


图3 不同生长素浓度对生根的影响

Fig.3 Effect of concentration of different growth hormone on rooting

图3显示,IAA对奥地利黑松组培苗试管外生根的促进效果不显著,最高诱导率仅为3%;IBA和NAA的促进效果比较显著,最高诱导率分别为5%和6%;NAA又显著优于IBA的促进作用。IAA、IBA和NAA达到最高诱导生根率的浓度都为 $800\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

L^{-1} 。

2.1.5 碳源对生根的影响 图1表明,在含有白砂糖的培养基上组培苗生根率比较小,且苗生长到最后,针叶发枯,苗枯黄而死;而在含有蔗糖和葡萄糖上的组培苗生根率相当。但使用蔗糖具有^[6]:经济实惠,节约成本;不定芽在整个生长过程中能保持旺盛的生长趋势。

图2表明,2%的蔗糖比其它浓度的蔗糖更有利于生根,生根率达55%。

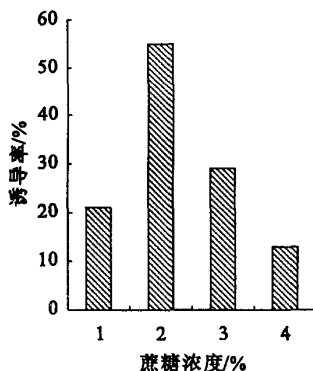


图2 蔗糖浓度对生根的影响

Fig.2 Effect of concentration of sucrose on rooting

2.2.2 NAA($800\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)蘸取时间对生根的影响 NAA($800\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)蘸取时间对奥地利黑松组培苗生根的影响由图4中显示,适合奥地利

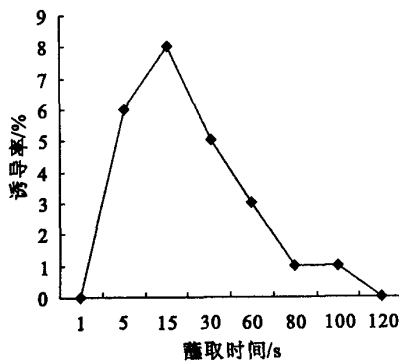


图4 蘸取时间对生根的影响

Fig.4 Effect of time of dipping in NAA on rooting

黑松组培苗瓶外生根的最适蘸取时间为15 s,诱导率可达8%。蘸取时间过长或过短都不利于奥地利黑松组培苗试管外生根。这可能是由于生长素NAA的“双重作用引起”的,即在较低质量浓度下生长素可促进组培苗生长,在高质量浓度下对生长有抑制作用^[7]。

3 结论与讨论

研究结果表明,奥地利黑松组培苗试管内生根

明显优于试管外生根。试管内生根时,培养基的种类、生长素的种类及浓度对诱导生根率都有很大影响。以往的研究者认为,松属树种组织培养中,诱导生根时以低盐含量的基本培养基效果较好^[4]。而

本试验中,大量元素减半的 DCR 和 GD 都不能有效诱导奥地利黑松组培苗生根,而 1 倍量的 WPM 培养基能诱导 27.27% 的组培苗生根,这对于难生根的奥地利黑松应是一大突破。

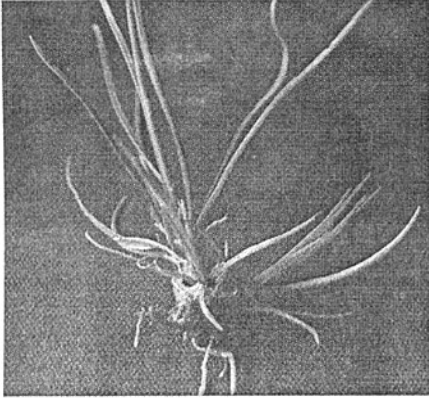


图5 试管外生根的再生植株

Fig. 5 Regeneration plantlet being induce to root out - tube

WPM 培养基中单独添加 NAA、IBA 即可诱导奥地利黑松组培苗生根,最适浓度分别为 $0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,生根率为 38.30%、32.61%。同时试验结果还表明,两种生长素 $0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NAA 和 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 IBA 同时使用,其诱导生根效果比单独使用两种生长素的效果好,诱导率达 50.08%。这一结论与有些学者研究的结果认为,2 种或 2 种以上的生长素配合使用,大大提高了刚松、火炬松等松树树种不定根的诱导率^[8]一致。

试验研究还发现,利用葡萄糖作为碳源时虽然可以获得相对较高的生根率,但是利用蔗糖作为碳源可以大大降低试验成本,并可获得生长健壮的再生植株,蔗糖浓度为 2.0%,生根率最终可达 55%。

尽管本试验已初步建立了奥地利黑松植株的再生体系,为其快速繁殖,进而开展遗传转化奠定了基础,但与大规模工厂化生产还有很长的一段距离。在今后的工作中,应继续探索适于组培苗生根的培养基,优化生根培养基以提高生根率 and 不定根的质量,增强再生植株的适应性,从而提高移栽成活率

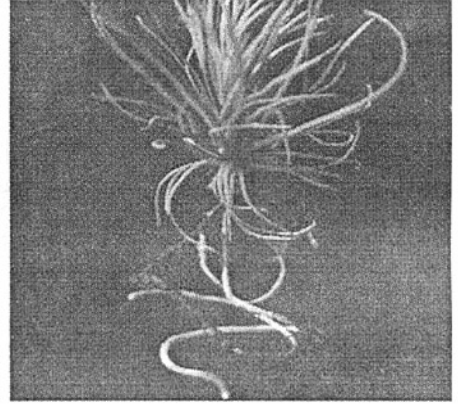


图6 试管内生根的再生植株

Fig. 6 Regeneration plantlet being induce to root in - tube

等,这些问题的突破无疑将使工厂化生产成为可能。

参考文献:

- [1] Ramage CM, Williams RR. Mineral nutrition and plant morphogenesis[J]. In *Virto Cell Dev Biol-Plant*, 2002, 38: 116-124.
- [2] Uderst G, Moncousin C, O'Rourke J. Stimulation of root formation in difficult-to-root wood cuttings by dithiothreitol[J]. *Int J Plant Sci*, 1997, 158(2): 132-135.
- [3] 王怀智. 植物造林与组织培养-通过组织培养繁殖木本植物[J]. *林业科学*, 1982, 19(3): 292-301.
- [4] 黄健秋, 卫志明. 松属树种的组织培养和原生质体培养[J]. *植物学通报*, 1994, 11(1): 34-42.
- [5] 周健, 成浩, 王丽鸳. 激素处理对茶树组培苗温室直接诱导生根的影响[J]. *茶叶科学*, 2005, 25(4): 265-269.
- [6] 王爱民, 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.
- [7] 沈惠娟. 木本植物组织培养技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 1992. 16-45.
- [8] Jang-JC; Tainter-FH. Micropropagation of shortleaf, Virginia and loblolly X shortleaf pine hybrids via organogenesis. *Plant Cell [J]*, *Tissue and Organ Culture*, 1991, 25(1): 61-67.