

## 马尾松组培苗不定根诱导及不定根解剖观察

李校雨<sup>1</sup>, 吕成群<sup>1\*</sup>, 黄宝灵<sup>1</sup>, 吴庆梅<sup>1</sup>, 张明环<sup>2</sup>

(1. 广西大学 林学院, 广西 南宁 530004; 2. 广西大学 农学院, 广西 南宁 530004)

**摘要:**对马尾松优良种源组培苗不定根诱导进行了研究。采用  $L_{16}(4^5)$  正交设计的方法研究了 NAA、IBA 和基本培养基对组培苗生根的影响, 结果表明: 最适生根培养基组合是 1/3DCR + NAA  $0.15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + 蔗糖 2% + 琼脂 0.6%, 2 个月最高生根率达到 51.7%, 须根多, 根系质量高。马尾松组培苗嫩茎无潜伏根原基, 不定根由诱导根原基发育形成, 诱导根原基源于髓射线细胞的分化。

**关键词:**马尾松; 组织培养; 不定根; 解剖结构

中图分类号: S791.248.05

文献标识码: A

文章编号: 1001-7461(2009)03-0080-05

### Adventitious Roots' Induction of *Pinus massoniana* Shoots in Test Tubes and Anatomical Observation

LI Xiao-yu<sup>1</sup>, LV Cheng-qun<sup>1</sup>, HUANG Bao-ling<sup>1</sup>, WU Qing-mei<sup>1</sup>, ZHANG Ming-huan<sup>2</sup>

(1. College of Forestry, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530004, China; 2. College of Agriculture, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530004, China)

**Abstract:** Adventitious roots induction for *Pinus massoniana* from seed source in vitro was investigated, including the influences of different media on the induction by using  $L_{16}(4^5)$  orthogonal design. The results showed that the best medium was 1/3DCR + NAA  $0.15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + sucrose 2% + agar 0.6%, the highest rate of rooting was 51.7%, with many fibrous roots, and high quality. Meanwhile, the adventitious root formation of shoots in test tube was also observed by means of the anatomical method. Latent root primordium was not found in the shoots in test tubes. The induced root primordium which originated from the division and differentiation of medullary ray cell developed into the adventitious roots.

**Key words:** *Pinus massoniana*; tissue culture; adventitious roots; anatomical structure

组织培养技术是生物工程技术的重要方面, 具有条件可人工控制, 不受地区、季节和灾害性天气等自然条件的限制, 繁殖速度快, 可全年连续生产等优点, 是为植树造林提供大量苗木的重要途径<sup>[1]</sup>。马尾松(*Pinus massoniana*)是我国亚热带地区重要的用材树种, 分布广, 生长快, 效益高。马尾松属难生根树种, 多年来, 前人对马尾松组织培养进行了很多探索, 但尚未有完整系统的生根试验报道。从现有的文献报道来看, 马尾松组培苗的生根率均很低, 已

经成为制约其大规模组织培养工厂化生产的技术瓶颈。基于以上问题, 本试验重点考察了 NAA、IBA 和培养基对不定根诱导率的影响。采用正交试验研究各因子和因子间交互作用对统计指标的影响。同时, 为了揭示马尾松组培苗茎段生根的解剖学特征, 以幼嫩马尾松组培苗茎段为材料, 利用石蜡切片法, 对其组培苗不定根发生发育过程进行解剖学研究, 为提高马尾松生根率和成活率提供理论依据和实践指导。

收稿日期: 2008-09-20 修回日期: 2008-12-11

基金项目: 广西科技攻关项目(桂科攻 0235017-6)

作者简介: 李校雨, 男, 硕士, 主要研究方向为种苗繁育与技术。

\* 通讯作者: 吕成群, 男, 博士, 教授, 硕士生导师, 主要研究方向为微生物分子生物学。E-mail: luchengqun8@126.com.

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

以马尾松优良种源广西桐棉松成熟种子(使用前种子保存于4℃冰箱)为材料。

### 1.2 方 法

1.2.1 无菌培养物的建立 选取成熟饱满的马尾松种子,24 h 浸泡催芽后种于室外沙土中发芽,出芽后选取7 d 苗龄的芽用洗涤液涮洗掉表面浮尘,并流水冲洗20 min,然后转入超净台中进行消毒,用75%酒精浸泡30 s,无菌水冲洗6次;再用0.1%升汞浸泡8 min,无菌水冲洗6次,然后用无菌纸吸干表面水分,接种于无激素 DCR 培养基上,观察消毒效果,每瓶3个芽,并及时转移尚未污染苗到新无

激素 DCR<sup>[2]</sup>培养基上,备用。

1.2.2 不定芽的诱导 在超净台上取出无菌健壮苗,剪取带子叶顶芽,接种到丛生芽诱导培养基上,待多数诱导出不定芽后转入伸长培养基中进行伸长诱导。

1.2.3 不定根的诱导 生根诱导培养基采用L<sub>16</sub>(4<sup>5</sup>)设计,取经伸长诱导长2 cm左右的嫩茎,接入分别含有NAA0、0.05、0.10、0.15 mg·L<sup>-1</sup>, IBA0、1.0、2.0、3.0 mg·L<sup>-1</sup>,培养基为2/3GD<sup>[3]</sup>(改)、1/3GD(改)、1/2DCR、1/3DCR不同组合的生根培养基中(表1),重复3次,每重复20株。统计不同组合的马尾松组培苗生根率,并进行方差分析和多重比较。

表1 生根培养基不同配方<sup>①</sup>

Table 1 Different compound media for rooting

组合	IBA/ (mg·L <sup>-1</sup> )	NAA/ (mg·L <sup>-1</sup> )	培养基	生根率/%			平均
				I	II	III	
I <sub>1</sub> N <sub>1</sub> M <sub>1</sub> (111)	0	0	2/3GD(改)	0	0	0	0
I <sub>1</sub> N <sub>2</sub> M <sub>2</sub> (122)	0	0.05	1/3GD(改)	8.50	8.71	8.89	8.70
I <sub>1</sub> N <sub>3</sub> M <sub>3</sub> (133)	0	0.10	1/2DCR	27.59	27.55	27.64	27.59
I <sub>1</sub> N <sub>4</sub> M <sub>4</sub> (144)	0	0.15	1/3DCR	52.02	51.70	51.44	51.72
I <sub>2</sub> N <sub>1</sub> M <sub>2</sub> (212)	1	0	1/3GD(改)	18.20	18.24	18.10	18.18
I <sub>2</sub> N <sub>2</sub> M <sub>1</sub> (221)	1	0.05	2/3GD(改)	8.00	7.89	9.10	8.33
I <sub>2</sub> N <sub>3</sub> M <sub>4</sub> (234)	1	0.10	1/3DCR	7.18	6.80	7.44	7.14
I <sub>2</sub> N <sub>4</sub> M <sub>3</sub> (243)	1	0.15	1/2DCR	42.50	44.40	40.78	42.56
I <sub>3</sub> N <sub>1</sub> M <sub>3</sub> (313)	2	0	1/2DCR	46.44	48.63	47.79	47.62
I <sub>3</sub> N <sub>2</sub> M <sub>4</sub> (324)	2	0.05	1/3DCR	46.03	47.05	48.10	29.06
I <sub>3</sub> N <sub>3</sub> M <sub>1</sub> (331)	2	0.10	2/3GD(改)	14.14	14.33	14.40	14.29
I <sub>3</sub> N <sub>4</sub> M <sub>2</sub> (342)	2	0.15	1/3GD(改)	5.20	5.30	4.50	5.00
I <sub>4</sub> N <sub>1</sub> M <sub>4</sub> (414)	3	0	1/3DCR	36.81	37.92	41.94	33.33
I <sub>4</sub> N <sub>2</sub> M <sub>3</sub> (423)	3	0.05	1/2DCR	25.22	24.84	24.94	25.00
I <sub>4</sub> N <sub>3</sub> M <sub>2</sub> (432)	3	0.10	1/3GD(改)	9.53	9.74	9.29	9.52
I <sub>4</sub> N <sub>4</sub> M <sub>1</sub> (441)	3	0.15	2/3GD(改)	14.63	14.92	15.55	5.00

①N、I、M 分别代表 NAA、IBA 和培养基,I 下标 1、2、3、4 分别代表不同浓度 0、1、2、3 mg·L<sup>-1</sup>; N 下标 1、2、3、4 分别代表不同浓度 0、0.05、0.10、0.15 mg·L<sup>-1</sup>; M 下标 1、2、3、4 分别代表 2/3GD(改)、1/3GD(改)、1/2DCR(改)、1/3DCR(改)。

1.2.4 不定根发育的解剖观察 在最佳生根组合培养基上进行生根诱导,接种当天取样,以后每隔10 d 取样1次。取出茎段,流水冲洗掉茎根部培养基,剪取距茎基部0.5~0.7 cm 部分,转入 FAA 固定液固定,对材料进行抽气直到材料沉入固定液底部没有气泡;采用70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、100%、2/3 无水酒精+1/3TO、1/2 无水酒精+1/2TO、1/3 无水酒精+2/3TO(TO 型生物制片透明剂)、TO<sub>1</sub>(100% TO 型生物制片透明剂)、TO<sub>2</sub>(100% TO 型生物制片透明剂)进行组织脱水透明;然后进行透蜡和包埋;用转动切片切茎段横切面,厚10 μm,进行番红固绿对染,然后用阿拉伯中性树胶封片,观察并显微拍照。

## 2 结果与分析

### 2.1 NAA、IBA 和基本培养基对组培苗生根的影响

2.1.1 NAA、IBA 和基本培养基正交试验结果 表1表明,接种于不同培养基上的马尾松幼嫩茎段其生根诱导效应差异极显著,表明培养基是影响生根效应的主要因子。接种在无植物激素上的马尾松幼嫩茎段没有生根,加入不同种类和不同量植物激素后对其生根有不同程度的促进作用;NAA 的加入有利于根的伸长和须根的产生(图1);IBA 的加入有利于大量根的产生和根的增粗,但缺少须根(图2),且浓度大于2.0 mg·L<sup>-1</sup>时产生大量愈伤组织,延迟了生根时间,平均生根时间推迟15 d 左右,并有愈伤组织生根现

象(图 3)。充分表明了组织培养过程中,合适的植物激素组合对马尾松诱导出高质量的根系也很重要(图 4)。统计结果表明,最佳生根组合为  $I_1N_4M_4$  ( $NAA 0.15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + 1/3\text{DCR}$ ),生根率达到 51.7%,其次为  $I_3N_1M_3$  ( $IBA 2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + 1/2\text{DCR}$ )和  $I_2N_4M_3$  ( $IBA 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + NAA 0.15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + 1/2\text{DCR}$ ),生根率分别为 47.6%和 42.9%。



图 1 NAA 对组培苗生根影响

Fig. 1 The rooting of shoots by tissue culture with the NAA

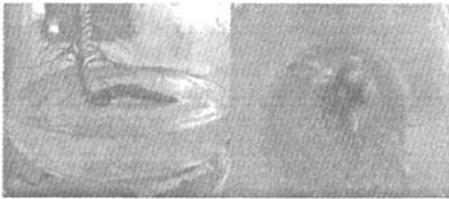


图 2 NAA 和 IBA 组合对组培苗生根影响

Fig. 2 The rooting of shoots by tissue culture with the combination of NAA and IBA



图 3 愈伤组织生根

Fig. 3 Adventitious roots in callus

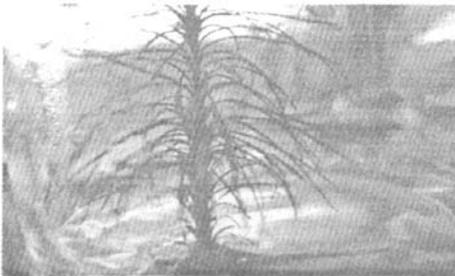


图 4 健壮生根苗

Fig. 4 Robustly rooting plant

对表 1 数据进行方差分析表明,模型差异不显著,各因素  $F$  值差异较大,只有培养基因素  $F$  值差异

显著。为分清主次,将  $F$  值最小的 IBA 项并入误差项,进行第二次方差分析,结果(表 2)表明,不同培养基对马尾松组培苗不定根生根率影响差异极显著,IBA、NAA 对生根指标的影响差异不显著,但 IBA 和 NAA 的交互作用对统计指标的影响差异显著。用  $LSD_{0.05}$  对 4 种培养进行多重比较(表 3),结果表明,1/2DCR 最有利于生根率提高,1/3DCR 次之,1/2DCR 和 1/3DCR 作用效果差异不显著,但相对于 1/3GD(改)和 1/2GD(改)对生根率影响差异显著,因此,在马尾松组织培养中最好选用 1/2DCR 或 1/3DCR 做为基本培养基对组培苗进行不定根诱导。

表 2 方差分析

Table 2 Variance analysis

方差来源	自由度	平方和	均方	$F$ 值	$P$ 值
模型	9	3 723.342	413.705	7.51	0.011 7
NAA	3	364.271	121.424	2.21	0.188 3
培养基	3	2 473.789	824.596	14.97	0.003 0
IBA×NAA	3	885.282	295.094	5.36	0.039 2
误差	6	330.398	55.066		
总变异	15	4 053.739			

由  $F$  值知,各因素对生根率影响大小为  $\text{Medium} > \text{IBA} \times \text{NAA} > \text{NAA} > \text{IBA}$ 。

表 3 多重比较表

Table 3 Multiple comparison

因素	1/2DCR	1/3DCR	1/3GD(改)	1/2GD(改)
平均值	35.768	30.400	10.350	6.905
0.05 显著水平	A	A	B	B

2.1.2 组培苗生根过程的外部形态观察 在组织培养生根过程中,马尾松组培苗表现出一系列形态变化。10 d 开始有新叶发出或针叶伸长,大部分针叶生长发育良好;20 d 后嫩茎下切口处或近下切口茎端皮孔膨大,但无不定根产生;30 d 时有少量根突破茎表皮或下切口;40~50 d 时大量根突出茎表皮或下切口;50 d 后有少量的新根产生,伸出的根进行伸长生长,个别组合有须根产生,不定根突出部位为茎基部切口和近切口茎皮孔处(图 1、图 2)。

## 2.2 马尾松组培苗不定根发育解剖学观察

2.2.1 嫩茎横切面观察 取接种于生根培养基上第一天的马尾松嫩茎做石蜡切片,观察其横切面,从内到外分别是髓、木质部、形成层、韧皮部、皮层和表皮(图 5);表皮是一层近长方形相对皮层细胞较小的排列紧密的细胞,被染成深红色(图 5),维管束呈束状,不连续辐射排列;维管束区域以内为髓部,占茎横切面比例较小。在组培苗嫩茎中没有发现潜伏根原基,不定根原基属于诱生根原基类型,这也许就是马尾松组培苗生根慢、生根难的内在原因之一。

2.2.2 不定根的起源、生长和发育过程 取接种在

生根培养基上 20~30 d 的茎基部连续组织,做切片可以观察到,不定根原始体最初由髓射线细胞分化为薄壁细胞,形成球形细胞团,该细胞团继续分裂分化形成根原基轮廓(图 6),不定根的原基细胞较薄壁细胞大,向外延伸,根原基细胞逐渐由髓部的不规则圆形变为扁长形,排列整齐,细胞被染成绿色,核为红色,与周围的细胞区别明显,在根原基处有很明显的弯曲度。随着根原基的进一步膨大,周围细胞和维管束被挤压并推到两边(图 7),此过程中可

能有一部分皮层薄壁细胞被酶降解<sup>[4-5]</sup>;随着根原基继续伸长,出现了组织分化,镜检结果显示,根原基前部细胞继续分裂,逐渐形成生长点和根冠(图 8);中后部细胞染色变浅,分生能力减弱,逐渐形成长形薄壁细胞,同时形成维管细胞并与母体维管系统相连(图 9);最后,生长点细胞继续分裂、分化,在根冠分泌物和机械压力的作用下,不定根穿越韧皮部、皮层和表皮而长出茎外(图 10)。

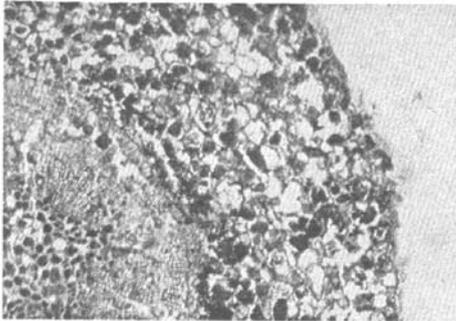


图5 诱导0 d的嫩茎解剖结构  
Fig.5 Anatomical structure induction of shoots for 0 day

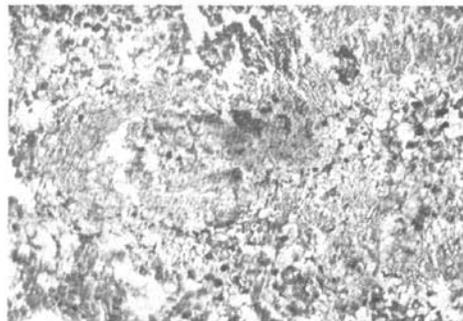


图6 诱导20 d的嫩茎解剖结构  
Fig.6 Anatomical structure induction of shoots for 20 day

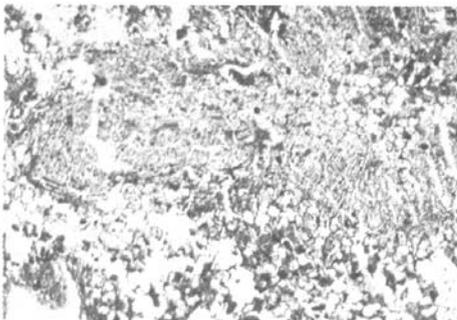


图7 膨大根原基  
Fig.7 Intumescencia rooting primordium

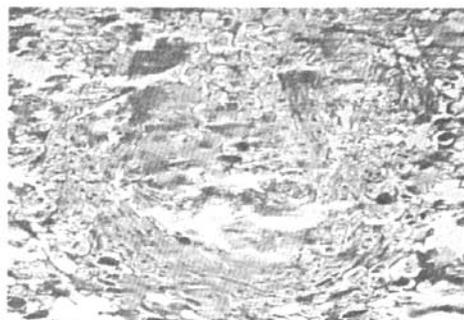


图8 形成根冠  
Fig.8 Formation root crown

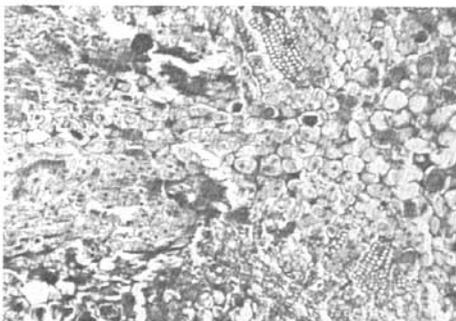


图9 根原基中后部长形薄壁细胞  
Fig.9 Postmedian parenchyma cell of rooting primordium

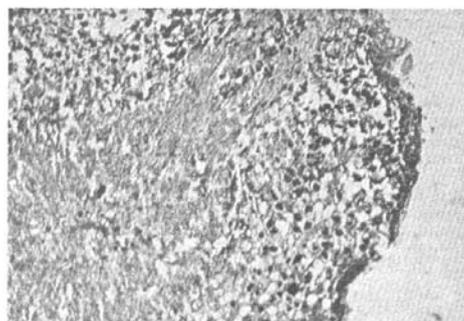


图10 不定根突破茎表皮  
Fig.10 Adventive root break through cuticle of stem

### 3 结论与讨论

松属树种组织培养普遍存在着生根难的问题,尤其是马尾松生根更困难。在前人的研究中,生根诱导通常采用降低基本培养基中大量元素含量,降低细胞分裂素浓度,提高生长素浓度,诱导初期进行暗培养,降低蔗糖浓度等方法<sup>[7-12]</sup>。研究表明,培养基是影响马尾松组培苗产生不定根的主要因素,以大量元素减半的 DCR 为最佳,在该培养基上生长的植株生根率高,根系发达,主根粗壮,有侧根和须根;嫩梢生长量大,苗木健壮,茎叶嫩绿。本试验设计中的培养基主要是大量元素含量存在差异,而造成各种培养基中的总盐含量和  $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$  比值不同,总盐含量和  $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$  比可能是造成生根率巨大差别的主要因素;单独使用 NAA 效果好于单独使用 IBA。组合使用外源激素对马尾松根诱导率影响也较大,但交互作用效果为负促进。对马尾松不定根诱导起主要促根作用的激素是 NAA,在 NAA 基础上加入 IBA 则产生减效和抑制作用,但 IBA 有利于产生粗壮不定根。

适当高浓度的 NAA 有利于生根,可能是因为适当高浓度的生长素作用于细胞时,利于与质膜上的 ATP 酶结合,细胞壁环境被酸化,一些对酸不稳定的氢键易断裂,这样细胞壁多糖分子结构交联点破裂,当在 NAA 基础上加入 IBA 时,会与质膜上 ATP 酶结合时产生竞争或弱化作用,从而不利于不定根的产生。当外源激素通过调整内源生长素起作用后,形成层、木质部、韧皮部等部位的活细胞细胞壁趋于松弛,使可形成不定根的细胞容易突破出来<sup>[6]</sup>。

不定根原始体按其形成时间分为潜伏根原始体和诱导根原始体 2 种。潜伏根原始体是在植株发育早期产生的,然后处于休眠状态,直到在适宜环境条件下才继续发育形成不定根;诱导根原始体是在接种后才形成的根原始体<sup>[10]</sup>。

树种不同,其不定根原基发生部位也不同,主要由维管射线细胞、韧皮薄壁细胞、形成层细胞、愈伤组织、皮层、芽隙薄壁组织、髓射线细胞等<sup>[13-14]</sup>发生。经过大量切片观察,马尾松组培苗根原基起源于髓

射线细胞,这与较难生根的毛白杨(*Populus tomentosa*)<sup>[15]</sup>和核桃(*Juglans regia*)<sup>[16]</sup>的根原基只起源于髓射线与形成层交叉部位相似,同属于单位点发生型,这可能是其难生根的另一原因。

#### 参考文献:

- [1] 王怀智. 经济植物组织培养[M]. 北京:科学出版社,1988,45-77.
- [2] GUPTA P K, DUMA D J. Shoot multiplication from mature trees of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugarpine (*Psenus lambertiana*) [J]. Plant Cell Rep., 1985,4,177-179.
- [3] GRESSHOFF P M, DOY C H. Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (tomato) [J]. Planta, 1972, 107,161-170.
- [4] BELL J K, MCCULLY M E. A histological study of lateral root initiation and development in *Zea mays* [J]. Potoplasma, 1970,70,179-205.
- [5] BLAKELY L M, RODAYAY S J, HOLLEN L B, et al. Control and kinetics of branch root formation in cultured root segments of *Haploppappus ravenii* [J]. Plant Physiol., 1972, 50,35-42.
- [6] 潘瑞炽,董恩德. 植物生理学[M]. 北京:高等教育出版社,1995,187-192.
- [7] J. M. Bonga, D. J. Durzan. 树木组织培养[M]. 北京:中国林业出版社,1987,23-44.
- [8] HARGREAVES C L, GRACE L J, HOLDEN G D. Nurse culture for efficient recovery of cryopreserved *Pinus radiata* D. [J]. Don Embryogenic Cell Biology and Morphogenesis, 2002, 21(1-4)40-45.
- [9] LAINE E, BADE P, DAVID A. Recovery of plants from cryopreserved embryogenic cell suspensions of *Pinus caribaea* [J]. Plant Cell Rep., 1992, 11,295-298.
- [10] 郭素娟. 林木扦插生根的解剖学及生理学研究进展[J]. 北京林业大学学报,1997,19(4),64-68.
- [11] CARLSON M C. The formation of nodal adventitious roots in *Salix cordata* [J]. Amer. Jour. Bot., 1983,25,721-725.
- [12] 李正理,胡玉熹,刘淑琼. 天竺葵属的植物离体叶柄形成不定根和芽[J]. 植物学报,1965,13(1),61-67.
- [13] GINZBURG C. Organization of the adventitious root apex in *Tamarix aphylla* [J]. Am. F. Bot., 1967,54,4-8.
- [14] SMITH A I. Adventitious roots in stem cuttings of *Tropaeolum majus* L. [J]. Amer. Jour. Bot., 1942,29,192-194.
- [15] 王瑞勤,董源. 毛白杨 1~2 年生根萌条不定根起源和发育的观察[J]. 北京林业大学学报,1987,9(3),249-256.
- [16] 王清民,彭伟秀,吕保聚,等. 核桃试管不定根组织学研究[J]. 西北植物学报,2006,26(4),719-724.