

## 湿地松组培继代增殖的影响因子

吴丽君<sup>1,2</sup>, 叶建仁<sup>1\*</sup>, 王志洁<sup>2</sup>, 翁秋媛<sup>2</sup>

(1. 南京林业大学森林资源与环境学院, 江苏 南京 210037; 2. 福建省林业科学研究院, 福建 福州 350012)

**摘要:** 以湿地松抗病家系和非抗病家系的成熟合子胚为外植体, 以不同的基本培养基成分、不同的激素成分及浓度配比和不同的培养方式, 研究湿地松离体培养继代增殖的关键技术及主要影响因子。

**关键词:** 湿地松; 合子胚; 离体培养; 继代增殖; 影响因子

中图分类号: S791.246.05

文献标识码: A

文章编号: 1001-389X(2007)02-0165-05

## The factors affecting multiplication rate in vitro culture of slash pine

WU Li-jun<sup>1,2</sup>, YE Jian-ren<sup>1</sup>, WANG Zhi-jie<sup>2</sup>, WENG Qiu-yuan<sup>2</sup>

(1. College of Forest Resources and Environment, Nanjing University of Forestry, Nanjing, Jiangsu 210037, China;

2. Fujian Academy of Forestry, Fuzhou, Fujian 350012, China)

**Abstract:** With the mature zygotic embryos of antidisease families and non-antidisease families of slash pine as explants, the key technique and main factors affecting vitro culture multiplication of slash pine were studied, which were based on different cultures, hormone compositions in different concentration ratio as well as different plant growth regulators.

**Key words:** *Pinus elliottii*; zygotic embryos; culture in vitro; subculture multiplication; affecting Factors

针叶树种的愈伤组织培养早在 20 世纪 30 年代就有相关报道, 然而直到 20 世纪 50 年代才有形态再生的报道<sup>[1]</sup>。而松属(*Pinus*)的离体培养直到 20 世纪 70 年代才开始涉及, 近年来松属的器官发生、体细胞胚胎发生及植株再生技术研究日益得到林业学者的重视, 并取得关键性的技术突破, 据不完全统计, 至今已对松属 50 多个种或变种进行过离体培养, 并从 40 余种针叶树上诱导出体细胞胚或体细胞胚的再生植株, 从 30 余种针叶树上和 20 余种针叶树上分别经器官发生和腋芽增殖途径获得了幼芽或再生小植株<sup>[2]</sup>。

湿地松(*Pinus elliottii* Engelm)是重要的绿化和造林树种, 适应性强, 生长迅速, 干形通直, 松脂含量高, 对松材线虫和松毛虫具有较强抗性, 是我国南方仅次于马尾松的大面积造林树种之一。由于松针褐斑病等病害在我国的严重发生在一定程度上影响了湿地松在我国南方地区的发展。为此在湿地松抗病育种研究的基础上, 筛选抗病家系或抗病优良无性系, 通过器官发生、胚胎发生、细胞悬浮培养及原生质体培养等途径, 开展湿地松抗病优良无性系组织培养和植株再生技术研究具有重要的应用价值。早在 1987 年 Pedro et al<sup>[3]</sup>开展了湿地松离体培养不定芽诱导的影响因子研究, 1991 年 Bronson et al<sup>[4]</sup>以湿地松子叶为外植体进行不定芽诱导和植株再生的研究, 朱丽华等<sup>[5-6]</sup>对湿地松组织培养器官发生及植株再生也做了较为系统的研究, 尤其在湿地松离体培养生根培养阶段获得突破, 湿地松组培苗生根率已达 81.3%。这些研究为湿地松组培无性快繁技术应用奠定了基础, 然而通过组培技术建立实用性和可操作性的产业化体系尚待进一步的理论和应用研究。本研究旨在从湿地松组培继代增殖培养阶段探讨提高继代增殖率、缩短继代周期、简化继代培养程序的可行技术。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料来源

经前人大量的实验证明, 成熟或未成熟的种子是松属离体培养最佳的实验材料。本试验所用的成熟的湿地松种子采自广州台山和福建官庄林场湿地松抗病无性系种子园和非抗病种子园。供试家系有抗病

基金项目: 江苏省高等学校研究生创新工程资助项目(苏教研 2004 年 5 号)。

作者简介: 吴丽君(1968 -), 女, 福建浦城人, 高级工程师, 从事林木、花卉组培技术及森林病理研究。

\* 通讯作者: 叶建仁(1958 -), 男, 浙江宁波人, 教授, 博士生导师, 从事森林病理研究。

收稿日期: 2006-06-01; 修回日期: 2006-12-25。

家系 R32、R2、R1\*8、R32\*1(R 表示抗病家系代码, R1\*8 表示以抗病 1 号单株为母本与抗病 8 号单株为父本的杂交种子), 非抗病家系 CK1、CK8(CK 表示对照的普通种子)。试验中家系号参照叶建仁等<sup>[7]</sup>方法。

### 1.2 无菌培养物的建立

湿地松成熟种子经 24 h 的浸泡处理, 剥去种壳后, 用无菌沙布包好, 用 75% 的酒精浸泡 30–60 s 进行表面灭菌后, 用无菌水冲洗 2 次后, 在 0.1% 升汞溶液中振荡消毒 3–4 min 或用 2% 的次氯酸钠消毒 4–5 min, 用无菌水冲洗 5 次以上, 然后用无菌滤纸吸干种子表面水分, 在无菌条件下剥除胚乳, 取出完整的成熟胚作外植体, 接种在不定芽诱导(或胚萌发)培养基上。

### 1.3 抗病家系与非抗病家系对继代增殖的影响

试验以 GD、MS、B5、改良 B5( $\text{KNO}_3$  质量浓度降低为  $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )、1/2MS 为基本培养基。激素选用 6-BA 2.0、4.0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2 个质量浓度水平, NAA 0、0.01、0.05  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  3 个质量浓度水平形成不同组合的不定芽增殖培养基, 各培养基均添加 400  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  水解酪蛋白(CH)、0.2% 活性炭(AC)、3% 的蔗糖, 对不同家系与不同激素种类浓度组合对继代增殖产生的影响进行方差分析及多重比较, 对影响继代增殖的关键因子进行分析。

### 1.4 继代增殖与增殖代数的相关性试验

将抗病与非抗病湿地松成熟合子胚在胚萌发培养基上所获得的无菌苗或丛生芽转接到芽增殖培养基进行培养, 每 35–40 d 转接 1 次, 记录不同家系 1–5 代的小芽平均增殖数的变化, 分析芽增殖率与增殖代数及抗病性的关系。由于湿地松同一家系的合子胚在同一继代增殖培养基培养, 其个体增殖率差异较大, 有的个体连续多代不增殖, 为此在分析继代增殖率与增殖代数相关性时, 将第 1 次继代增殖率低于和等于 2 的个体淘汰(未增殖的小芽继代增殖率计为 0), 不作为该项试验的统计数。

### 1.5 6-BA 与 NAA 对继代增殖的影响

湿地松继代增殖小芽苗转代接种在固体培养基时或在转接小芽苗 20 d 后添加: 1) 经加压灭菌的同等营养成分的不同激素浓度的液体培养基 5 mL, 液体培养基不添加琼脂; 2) 仅添加不同激素浓度的溶液 5 mL, 该溶液不含任何无机和有机养分; 在继代培养 40 d 后对芽苗增殖率及芽苗高生长状况进行调查。

### 1.6 培养条件

部分试验在人工气候箱完成, 培养室及人工气候的温度箱均设置在 25  $^{\circ}\text{C}$ , 光照度控制在 2 000 lx, 光照时间设置为 10 h, 培养基的 pH 值均在高压灭菌前调到 5.8。

## 2 结果与分析

### 2.1 胚离体培养及小苗萌发结果

参加试验的 6 个家系的完整的合子胚培养在 MS 基本培养基, 6-BA 0.2、2.0、10.0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  3 个水平及 NAA 0、0.01、0.05  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  3 个水平共形成 9 种培养基上。接种 7 d 后在各家系的 9 种培养基上均可观察到胚的子叶张开并逐渐转绿, 15–20 d 后, 胚萌发成长约 8–10 mm 的具有子叶、胚柄、下胚轴、胚根的小苗; 有的胚仅萌发为子叶, 其它部分退化; 部分胚褐化死亡。在添加 6-BA 0.2  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  组合的 3 种培养基上, 胚的平均萌发率仅有 5%–6%, 明显低于添加 6-BA 2.0(胚平均萌发率为 65%)、10.0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (平均萌发率为 35%) 组合的 6 种培养基; 而 NAA 0.05  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  组合的 3 种培养基胚萌发后顶生大量愈伤组织, 影响胚芽的继续生长。郑进等<sup>[8]</sup>开展湿地松愈伤组织的诱导研究中有同样的报道。试验结果表明 6-BA 2.0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  与 NAA 0、0.01  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  形成的 2 个组合培养基较适宜胚的离体诱导萌发, 抗病与非抗病家系间胚的萌发率无明显的差异性。

### 2.2 丛生芽分化结果与分析

2.2.1 丛生芽分化基本培养的筛选 为减少试验处理组合, 试验以 GD、MS、B5、改良 B5( $\text{KNO}_3$  质量浓度降低为  $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )、1/2MS 5 种基本培养基添加 6-BA 2.0、4.0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  与 NAA 0.01  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  形成的 2 种激素组合, 对丛生芽分化基本培养基进行筛选。胚在萌发培养基上培养 30 d 后, 截取带 5–8 mm 长胚柄的子叶顶芽转接到丛生芽分化培养基, 转接 35 d 后, 根据芽苗的增殖率及芽苗生长的状况确定

最适宜湿地松丛生芽分化的基本培养基为改良 B5 培养基。这一结果与阙国宁等<sup>[1]</sup>、Pedro et al<sup>[3]</sup>、Lopez et al<sup>[9]</sup>报道的松属适宜低盐和低  $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{NH}_4^+$  含量的培养基进行离体培养相符。

2.2.2 不同家系丛生芽分化结果与分析 截取供试的 6 个家系的子叶顶芽(带 5-8 mm 长胚柄)各 20 个(重复试验 3 次共 60 个芽), 转接到以改良 B5 为基本培养基, 添加 6-BA 2.0、4.0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  2 个水平, NAA 0、0.01、0.05  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  3 个水平形成 6 种激素组合的丛生芽分化培养基, 接种 20 d 后, 6 种培养基上不同家系芽的分化及生长表现出一定的差异性, 在 1、2、3、4 号培养基上可见 50% - 65% 以上的芽苗分化为数不等的 3-5 mm 大小的小芽, 最多可达 12 个; 而在 5、6 号培养基上小芽增殖率明显降低, 且芽基部可见 3-5 mm 大小的愈伤组织, 分化的芽苗平均 8-10 mm 高; 在 6 种培养基不同家系均可见完全未分化丛生芽的小芽苗, 其生长健壮, 高生长迅速(未分化小芽的其增殖率计为 0), 可见湿地松个体不同, 其增殖率有很大的差异性, 为此筛选增殖率高的优良基因型是组培快繁的关键之一。为进一步分析不同家系不同激素浓度组合对平均增殖倍率的影响, 将各组合试验结果统计(表 1, 所有的试验结果均扣除污染)。

表 1 不同家系、不同激素组合对平均增殖率的影响

Table 1 Effect of different families and combinations of hormone concentration on multiplication rate of buds

培养基	激素组合		抗病家系				非抗病家系	
	NAA	6-BA	R2	R32	R32 * 1	R1 * 8	CK1	CK8
1	0.00	2.0	2.30	1.76	1.80	1.18	5.80	4.68
2	0.00	4.0	2.38	1.87	1.98	1.53	6.30	5.14
3	0.01	2.0	2.05	0.98	1.65	0.78	5.28	4.23
4	0.01	4.0	2.10	1.23	1.87	1.08	5.30	5.00
5	0.05	2.0	1.30	0.54	0.98	0.50	3.45	2.98
6	0.05	4.0	1.63	0.95	1.30	1.20	3.80	3.18

对表 1 的平均增殖率进行三因素方差分析(表 2), 结果表明, 家系、6-BA、NAA 因素对芽苗的增殖率均有显著的影响, 尤其是家系因素对增殖率所产生的差异已达极显著水平。为进一步分析家系间, 尤其是抗病家系与非抗病家系间的差异性, 用  $q$  检验对 6 个家系的平均增殖率进行多重比较(表 3)。由表 3 可见抗病家系 R2、R32、R32 \* 1、R1 \* 8 与非抗病家系 CK1、CK8 间都存在显著差异, 而 4 个抗病家系之间、2 个非抗病家系间不存在显著差异。抗病家系与非抗病家系间显著差异其原因之一是抗病植物体内存在多种抗病相关酶有关, 这些酶包括过氧化物酶、多酚氧化酶、超氧化物氧化酶、苯丙氨酸解氨酶、过氧化氢酶、抗坏血酸过氧化物酶等。其中过氧化物酶、多酚氧化酶、苯丙氨酸解氨酶的共同特点就是参与多种物质的氧化活动, 合成具有抗菌活性的醌类化合物、类黄酮、生物碱、咖啡酸、绿原酸、木质素等多种抗菌化合物, 抑制病原微生物的生长和扩展<sup>[10]</sup>, 而正是这些次生代谢物质抑制了植物分化。原因之二可能与植物体内的激素含量及活性水平有关, 植物体内的激素对病害的反应有时表现出感病植株的激素含量及活性水平比抗病植株高<sup>[11]</sup>, 同理非抗病植物对离体培养(逆境条件)下的反应可能表现出激素含量与活性水平的提高。原因之三抗病植株体内固有的抗菌物质如酚类化合物及单宁含量均高于非抗病株<sup>[11]</sup>, 这些物质都是导致植物离体培养物褐化死亡, 抑制细胞分裂分化的直接因素。

可见在抗病家系中筛选既具有较强抗病性, 增殖率又高的基因型作为组培快繁材料还存在一定困难, 通过培养基成分及激素的调制还不能根本解决抗病性与增殖率这一内在矛盾, 为此还需从植物生理生化及分子生物学水平上开展更深入的研究。

表 2 家系与激素浓度组合对平均增殖率的方差分析

Table 2 Variance analysis of multiplication rate of buds with families and combinations of hormone concentration

离差来源	自由度	离差平方和	均方差	均方比	$F_{\alpha}$
家系间	5	83.677 3	16.735 5	120.312 7	$F_{0.05}(5, 27) = 2.57$
6-BA	1	0.871 3	0.871 3	6.263 8	$F_{0.05}(1, 27) = 4.21$
NAA	2	9.552 9	4.776 5	34.338 6	$F_{0.05}(2, 27) = 3.35$
误差项	27	3.755 3	0.139 1		
总和	35	97.856 8			

表3 不同家系的平均增殖率的多重比较

Table 3 Multiple comparison of average multiplication rate of different families

家系	$X_i$	$X_i - X_6$	$X_i - X_5$	$X_i - X_4$	$X_i - X_3$	$X_i - X_2$
CK1	4.988	3.943*	3.766*	3.391*	3.028*	0.786
CK8	4.202	3.157*	2.980*	2.605*	2.242*	
R2	1.960	0.915	0.738	0.363		
R32*1	1.597	0.552	0.375			
R32	1.222	0.177				
R1*8	1.045					

$q_{0.05}(6, 30) = 4.30$      $D = 1.207$

注: \* 表示两家系间平均增殖率之差大于  $D$  值, 即两家系间差异显著。

### 2.3 增殖率与增殖代数相关性试验结果与分析

湿地松抗病与非抗病家系在增殖培养基改良 B5 + 6-BA  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + NAA  $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + CH  $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + AC  $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  培养基进行培养, 记录抗病与非抗病家系 1 至 5 代连续增殖继代的小芽平均增殖数, 对肉眼可见的小芽(3 mm 以上)均计数(图 1)。试验结果表明可见芽增殖倍率与增殖代数呈负相关, 尤其在 1 至 3 代, 增殖倍率随代数增加而急剧下降, 4 至 5 代趋于平缓下降。在适宜的培养基(表 1 中 1-4 号培养基)及适宜的培养条件下, 湿地松首次转代增殖倍率均较高, 原因之一可能是植物体内存在的内源分裂素较高, 而在连续继代后离体芽对外源分裂素的敏感性降低所致; 原因二是连续在同一培养基培养后, 每代约有 10% - 20% 的小芽点褐化死亡。

湿地松继代增殖率与增殖代数的负相关性也是影响湿地松继代快繁效率的重要因素之一, 为此在湿地松继代增殖培养中, 应根据增殖代数及继代增殖率的变化, 适当提高培养基中 6-BA 的质量浓度。从本试验所开展的不同家系、不同激素组合对平均增殖率影响结果分析, 6-BA 在  $2.0 - 4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  对湿地松芽的分化均是适宜的。

### 2.4 6-BA 与 NAA 互作效应对快繁效率的影响

通过大量的试验表明 6-BA、NAA 2 种激素组合后产生的互作效应对湿地松的继代增殖快繁有明显的负作用, 即在极其微量的 NAA  $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  存在下, 对芽的伸长生长有促进作用, 但却极大降低芽的增殖率, 这与 Pedro et al<sup>[3]</sup> 开展的湿地松胚离体培养诱导不定芽的试验结果相同; 而在无生长素 NAA 的培养基上, 芽苗在分化为米粒大小的小芽后就基本上停止生长, 为克服 6-BA 与 NAA 的负互作效应, 本试验采用改进继代培养方式来简化继代培养步骤, 即固体和液体 2 层培养法来避免 6-BA 与 NAA 的直接作用。试验选用改良 B5 为基本培养基, 固体培养基单独添加 6-BA  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  不添加 NAA 和 AC, 试验用普通非抗病性家系 CK1 的第 2 代继代苗为材料。

试验结果表明, 在小芽苗转接增殖培养基 20 d 后再添加营养液或生长素溶液比在小芽苗转接同时添加营养液或生长素溶液更理想。从增殖率及苗高生长比较, 3、4、5、6 号培养基均能促进苗的增殖率及有效芽苗比率, 但 5、6 号培养基约有 13% - 15% 的芽苗基部切口有大量愈伤组织, 如图 2 所示。而 3、4 号培养基的丛生芽有效芽苗率有明显提高, 3 号的芽苗较 4 号的深绿色, 如图 3 所示。试验结果证明, 芽苗转接增殖后添加有效液体更能有效避免 6-BA 与 NAA 的负互作效应, 小芽转接在单独添加 6-BA 的固体培养基上 20 d, 芽苗的分化过程已基本完成, 在原有的固体培养基上添加含生长素 NAA 的溶液有利促进原分化小芽的伸长生长, 提高有效苗比率。

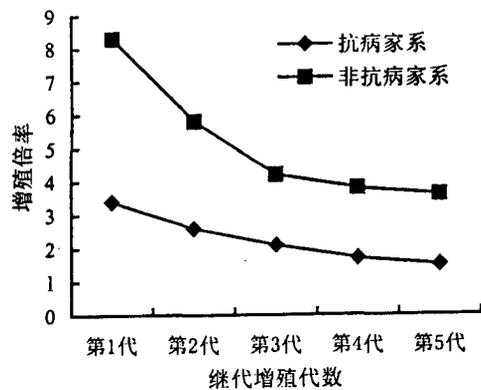


图1 芽增殖率与增殖代数的相关性

Figure 1 Relationship between multiplication rate of buds and different generations

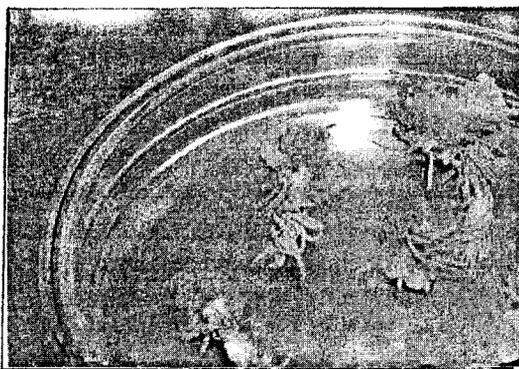


图2 NAA 促进芽苗切口愈伤组织形成

Figure 2 NAA enhancing callus forming at the cut of buds

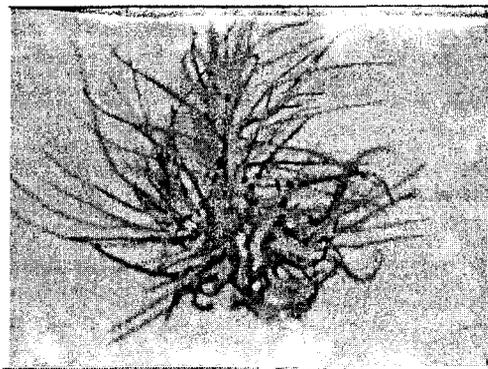


图3 在3号培养基上生长40d的丛生芽

Figure 3 Buds cultured in test No. 3 for 40 days

### 3 结语

湿地松离体培养器官发生及植株再生是湿地松组培快繁技术体系营建的重要途径之一。湿地松离体培养器官发生再生完整植株已有成功的报道, 但还未见商业应用的报道。湿地松组培技术产业应用的主要障碍不仅在于组培苗生根困难、生根低, 更重要的原因是组培继代周期长, 继代培养程序多而复杂, 增殖率不定等。

湿地松抗病家系与非抗病家系间的继代增殖率存在显著差异, 而同一家系内其个体继代增殖率也存在差异。利用家系内个体差异, 在抗病家系内筛选继代增殖率相对较高的优良基因型以促进抗病湿地松组培快繁应用。

湿地松继代增殖率与继代数间的负相关性是组培快繁的障碍。在实际应用中, 根据培养物继代增殖率, 应适当提高细胞分裂素 6-BA 的浓度, 以克服增殖率与继代代数的负相关性。同时掌握其再生过程中的生理生化变化规律, 无疑是今后研究工作的重要内容。

相关研究报道显示, 湿地松的非抗病性基因型的增殖芽可达 8-12 个<sup>[12]</sup>, 但大多为无效芽, 通过伸长生长、壮苗培养等培养过程以促进有效苗的数量, 不仅延长继代培养周期, 而且将培养程序复杂化, 增加成本, 阻碍了快繁技术的产业化应用。

继代培养通过固体培养与添加液体营养液的双层培养基的培养方式可有效解决湿地松组培继代培养中增殖率与有效芽苗率这一突出矛盾, 同时缩短继代周期, 简化培养程序。但该培养方式的产业化应用还需进一步的中试及相关操作工艺设备的改进, 以降低组培苗成本。

### 参考文献:

- [1] 阙国宁, 房建军, 葛万川. 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.
- [2] 唐巍, 欧阳藩. 针叶树体细胞无性系研究和应用进展[J]. 生物工程进展, 1997, 17(4): 2-10.
- [3] Pedro P B, Sommer H E. Factors affecting adventitious bud induction in *Pinus elliottii* embryos cultured in vitro[J]. New Forests, 1987, 5: 25-35.
- [4] 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.
- [5] 朱丽华, 张艺, 吴小芹. 湿地松的组织培养及植株再生[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2004, 28(6): 47-51.
- [6] 朱丽华, 吴小芹. 湿地松组培苗生根的影响因子[J]. 东北林业大学学报, 2005, 33(5): 15-18.
- [7] 叶建仁, 黄素红, 李传道, 等. 抗松针褐斑病湿地松体内氧化酶的变化[J]. 南京林业大学学报, 1995, 19(1): 8-14.
- [8] 郑进, 康薇, 洪华珠. 湿地松愈伤组织的诱导研究初报[J]. 湖北林业科技, 2005(4): 9-11.
- [9] Lopez E A L, Olguin S L P, Marquez J. Adventitious bud formation from mature embryos of *Picea chihuahuana* martinez, an endangered mexican spruce tree[J]. Annals of Botany, 2000, 86: 921-927.
- [10] 杨斌, 余静, 陈勃. 松针褐斑病菌毒素对紫茎泽兰抗病相关酶的影响[J]. 草业科学, 2005, 22(6): 81-84.
- [11] 叶建仁, 吴小芹. 树木抗病的生理生化学研究进展[J]. 林业科学研究, 1996, 9(3): 311-317.
- [12] 朱丽华. 湿地松、火炬松、黑松组培繁殖技术研究[D]. 南京: 南京林业大学森林资源与环境学院, 2004.

(责任编辑: 江 英)