

## 黄山松成熟胚培养与植株再生技术研究

兰延钢<sup>1</sup>, 汤明霞<sup>2</sup>, 许成芳<sup>2</sup>, 王瑞佳<sup>1</sup>, 严涵薇<sup>1</sup>, 吴敏<sup>1</sup>, 项艳<sup>1\*</sup>

(1. 安徽农业大学林学与园林学院, 合肥 230036; 2. 黄山风景区管理委员会园林局, 黄山 245899)

**摘要:**以黄山松(*Pinus taiwanensis* Hayata)成熟胚为试验材料, 进行离体培养与植株再生条件的初步研究。结果表明, 黄山松成熟胚外植体表面灭菌以75%的乙醇处理1 min, 3%的次氯酸钠处理10 min为适宜; 愈伤组织诱导培养基以MS + 1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.2 mg·L<sup>-1</sup> NAA为最佳; 适宜的不定芽分化培养基为DCR + 1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.05 mg·L<sup>-1</sup> NAA; 不定芽伸长以DCR + 0.1 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.05 mg·L<sup>-1</sup> NAA为适宜; 生根培养基以1/2 DCR + 2.0 mg·L<sup>-1</sup> IBA + 0.05 mg·L<sup>-1</sup> NAA为适宜。建立的植株再生体系为黄山松种质资源的保存、遗传改良及优质种苗繁殖等研究提供了参考。

**关键词:** 黄山松; 成熟胚; 离体培养; 植株再生

中图分类号: S791.24

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2022)03-0368-06

### Research on mature embryo culture and plant regeneration of *Pinus taiwanensis* Hayata

LAN Yangang<sup>1</sup>, TANG Mingxia<sup>2</sup>, XU Chengfang<sup>2</sup>, WANG Ruijia<sup>1</sup>, YAN Hanwei<sup>1</sup>, WU Min<sup>1</sup>, XIANG Yan<sup>1</sup>

(1. School of Forestry and Landscape Architecture, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. Landscape Bureau of Huangshan Scenic Area Management Committee, Huangshan 245899)

**Abstract:** In this study, the mature embryo of *Pinus taiwanensis* Hayata was used as the experimental material to conduct a preliminary study of *in vitro* culture and plant regeneration conditions. The results showed that the suitable surface sterilization method for mature embryos of *P. taiwanensis* Hayata was 75% alcohol treatment for 1 min and 3% sodium hypochlorite for 10 min; the optimal callus induction medium was MS + 1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.2 mg·L<sup>-1</sup> NAA; the optimal induction medium for adventitious buds was DCR + 1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.05 mg·L<sup>-1</sup> NAA; the suitable induction condition for adventitious bud elongation was DCR + 0.1 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.05 mg·L<sup>-1</sup> NAA; the optimal medium for rooting was 1/2 DCR + 2.0 mg·L<sup>-1</sup> IBA + 0.05 mg·L<sup>-1</sup> NAA. The results obtained in this study will be of great significance for the preservation, genetic improvement and high-quality seedling reproduction of *P. taiwanensis* Hayata germplasms.

**Key words:** *Pinus taiwanensis* Hayata; mature embryo; *in vitro* culture; plant regeneration

黄山松(*Pinus taiwanensis* Hayata)是中国特有针叶树种, 是我国东部亚热带高海拔地区山地绿化、造林和生态恢复的重要树种。黄山松具有较强的生态演替功能、极强的适应性、较高的生态环保功能以及独特的自然景观效果<sup>[1-3]</sup>。而松材线虫病作为一种为害松树的毁灭性病虫害, 自1982年传入我国以来, 在国内迅速蔓延, 截止2020年12月31日, 全国18个省(自治区、直辖市)726个县级行政区已受到松材线虫的危害, 严重威胁我国林业生态安全、

生物安全和经济发展<sup>[4]</sup>。黄山松也是松材线虫病的寄主之一, 2004年在安庆大龙山林场近700 m高的海拔林地中首次发现了自然状态下松材线虫侵染黄山松, 并造成数株黄山松的枯死, 这对黄山风景区内黄山松种质资源造成巨大的威胁<sup>[5]</sup>。因此, 对黄山松种质资源进行合理保护至关重要。然而, 目前关于黄山松种质资源保存以及快繁体系等研究尚鲜见报道。

植物组织培养技术是植物种质资源保存的重要

收稿日期: 2021-08-27

基金项目: 全球环境基金(GEF)赠款、联合国粮农组织(FAO)为国际执行机构、黄山风景区代表黄山市人民政府实施的“黄山地区生物多样性保护和可持续利用”项目资助。

作者简介: 兰延钢, 硕士研究生。E-mail: 1390097118@qq.com

\* 通信作者: 项艳, 教授, 博士生导师。E-mail: xiangyan@ahau.edu.cn

方式之一, 其具有生长周期短、繁殖效率高、管理方便等诸多优点, 有利于工厂化生产和自动化控制<sup>[6]</sup>。利用植物组织培养技术, 不仅可以在短时间内快速繁殖珍稀濒危植物, 使珍稀物种得以保存<sup>[7]</sup>, 而且该技术可以快速繁殖名优特新品种, 获得具有母本优良性状的植株<sup>[8]</sup>。针叶树种组培快繁体系的研究难度相对较大, 其主要原因之一是理想外植体取材难。因此, 多数针叶树种器官离体培养采用种胚、子叶、下胚轴以及无菌苗作为外植体。此外, 继代培养周期长、生根周期长以及生根率低等皆为松属植物组培关键技术难点<sup>[9]</sup>。自 20 世纪 80 年代, 以挪威云杉(*Picea abies* (L.) Karst)成熟胚为材料, 成功获得再生植株以来<sup>[10]</sup>, 针叶树的组织培养研究不断加快, 先后有多个松属植物的再生体系被建立<sup>[11-12]</sup>。目前, 针叶树组织培养广泛用于组织的超低温保存、针叶树新品种的选育、优良品种的快速繁殖、遗传变异体的产生和选择等<sup>[13]</sup>。

为解决黄山松种质资源保存和快速繁殖问题, 本试验以黄山松种子的成熟胚为外植体, 开展黄山松离体培养技术研究, 通过比较成熟胚外植体的表面灭菌条件以及对其愈伤组织诱导、不定芽分化和不定芽生根等最适培养基的筛选, 初步建立了黄山松成熟胚的离体培养和植株再生体系, 以期为进一步开展黄山松种质资源保存、遗传改良和优质种苗快速繁殖等研究提供技术基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本试验将采自安徽黄山风景区的黄山松球果置于自然光照下晾晒以获取黄山松种子, 去除黄山松种子外种皮并置于 4 °C 冰箱备用。

### 1.2 方法

**1.2.1 基本培养基的配制** 基本培养基采用 MS、DCR 和 1/2DCR<sup>[14]</sup>, 蔗糖添加量为 30 g·L<sup>-1</sup>, 琼脂粉 7.0 g·L<sup>-1</sup>。将生长调节剂 6-BA、NAA、IBA 和 2, 4-D 等分别配制不同浓度的母液, 并根据培养基的类型分别添加不同的体积, 经高压灭菌后使用。

**1.2.2 外植体的表面灭菌** 用提前配制好的 75%乙醇与 3%的次氯酸钠(有效氯含量)对种子进行处理, 并设置不同的处理时间组合(表 1)。75%乙醇的处理时间分别设置 3 个梯度(30、60 和 90 s), 3%的次氯酸钠的处理时间分别设置为 5、10 和 15 min。具体操作如下: 取出去除种皮的黄山松种子, 在超净工作台中用无菌水清洗 3 次, 每次 60 s, 再按照上述的 9 个组合进行组合时间处理, 随后再用无菌

水冲洗 5 次(每次 60 s)。将洗过的黄山松种子铺在无菌的滤纸上吸干水分, 用手术刀和镊子挑出种胚, 并接种在不添加任何生长调节剂的 MS 培养基中, 1 周后统计各处理组合下成熟胚的污染率。

表 1 外植体表面灭菌处理组合

组合	75%乙醇/s	3%次氯酸钠/min
A	30	10
B	30	15
C	30	5
D	60	10
E	60	15
F	60	5
G	90	10
H	90	15
I	90	5

**1.2.3 愈伤组织诱导** 以 MS 和 DCR 为基本培养基, 将不同浓度的 2, 4-D 和 NAA 分别和不同浓度的 6-BA 组合(共 42 个组合)进行愈伤组织的诱导。将无菌的成熟胚水平接种于不同配方的培养基上, 每种培养基配方接种 10 瓶, 每瓶接种 3 个种胚(3 次重复)。

**1.2.4 不定芽的诱导及伸长** 将长势良好的愈伤组织转接至含浓度为 0.5~2.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA 和 0.05~0.45 mg·L<sup>-1</sup> NAA 组合(共 12 个组合)的 DCR 培养基进行不定芽的诱导试验。每种培养基配方接种 10 瓶, 每瓶接种 3 个种胚(3 次重复)。将诱导的不定芽分别转接至含有 0.1、0.3 和 0.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA 与 0.05 mg·L<sup>-1</sup> NAA 组合的 DCR 培养基中进行伸长培养。

表 2 不同组合的生根培养基

组合	培养基	IBA/(mg·L <sup>-1</sup> )	NAA/(mg·L <sup>-1</sup> )
1	1/2 DCR	1.0	0.05
2		1.0	0.15
3		1.0	0.10
4		2.0	0.05
5		2.0	0.15
6		2.0	0.10
7		3.0	0.05
8		3.0	0.15
9		3.0	0.10

**1.2.5 不定根的诱导** 以 1/2 DCR 为基本培养基, 添加不同浓度的 IBA、NAA 组合进行生根诱导(表 2)。将高度为 1~2 cm 的黄山松不定芽转接至不同生

根培养基中, 40 d 左右统计黄山松不定芽生根情况。

**1.2.6 培养条件** 培养室温度为 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ , 相对湿度为 70%~80%, 光照强度 2 000~2 500 Lx, 每天光照时间 16 h, 黑暗 8 h。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同处理时间对黄山松成熟胚表面灭菌效果的影响

处理时间是影响外植体表面灭菌效果的关键因素, 设置表面灭菌时间既要考虑杀菌的效果又要保证外植体不受损伤<sup>[15-16]</sup>。长时间的处理虽然可以去除外植体表面的病菌, 但表面灭菌剂还可以渗入植物组织, 导致植物组织褐化<sup>[15]</sup>。通常, 幼嫩的植物组织需要的处理时间较短, 而成熟的植物组织需要的处理时间相对较长。本试验分别以 75%的乙醇和 3%次氯酸钠为表面灭菌剂进行组合处理。结果表明, 在表面灭菌方式 A、D、G 处理下, 黄山松成熟胚污染率显著低于其他处理组合(图 1)。其中, 处理组合 D(75%的乙醇浸泡 60 s、3%的次氯酸钠浸泡处理 10 min)为表面灭菌效果最佳的组合。

### 2.2 黄山松成熟胚愈伤组织的诱导

基本培养基的类型是影响植物组培体系建立的

关键因素。相比于被子植物, 针叶树的离体再生体系相对复杂。DCR、MS、WPM、LP 等培养基为针叶树种组织培养常用的基本培养基, 其对愈伤组织诱导的效果各不相同。本试验以 MS 和 DCR 为基本培养基, 并添加不同种类、浓度的生长素和细胞分裂素对黄山松成熟胚进行愈伤组织诱导, 共设置 21 种生长调节剂配比的愈伤组织诱导培养基(表 3), 将无菌的黄山松成熟胚接种到不同配方的培养基上, 在培养室中培养 28 d 后, 观察并统计每种培养基上愈伤组织的诱导率。

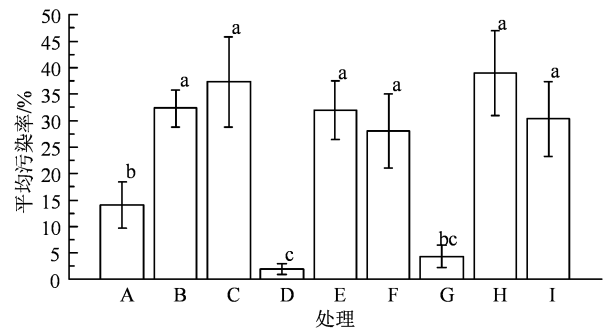


图 1 不同组合对黄山松成熟胚的表面灭菌效果

Figure 1 Effect of different combinations on surface sterilization of mature embryo of *P. taiwanensis*

表 3 不同培养基对黄山松成熟胚愈伤组织诱导的影响

Table 3 Effects of different culture media on the callus induction of *P. taiwanensis* mature embryos

组合	2, 4-D 或 NAA /( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	6-BA/ ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	愈伤组织形成率/%	
			DCR	MS
1	2, 4-D (0.5)	0.5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
2	2, 4-D (0.5)	1.0	11.1 ± 1.0	27.0 ± 5.7
3	2, 4-D (0.5)	2.0	6.2 ± 0.7	14.7 ± 1.9
4	2, 4-D (1.0)	0.5	15.7 ± 1.5	30.0 ± 3.7
5	2, 4-D (1.0)	1.0	12.0 ± 1.0	23.0 ± 0.8
6	2, 4-D (1.0)	2.0	0.0 ± 0.0	21.0 ± 1.6
7	2, 4-D (2.0)	0.5	12.5 ± 1.4	11.5 ± 1.3
8	2, 4-D (2.0)	1.0	6.5 ± 1.5	24.8 ± 3.5
9	2, 4-D (2.0)	2.0	6.0 ± 0.9	9.7 ± 1.6
10	NAA (0.05)	0.5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
11	NAA (0.1)	0.5	1.7 ± 2.9	16.3 ± 1.6
12	NAA (0.2)	0.5	0.0 ± 0.0	34.3 ± 4.6
13	NAA (0.4)	0.5	25.0 ± 3.6	38.7 ± 1.5
14	NAA (0.05)	1.0	23.7 ± 2.1	51.5 ± 2.5
15	NAA (0.1)	1.0	15.3 ± 2.1	16.3 ± 1.6
16	NAA (0.2)	1.0	12.3 ± 3.2	95.0 ± 1.4
17	NAA (0.4)	1.0	19.4 ± 1.6	49.7 ± 6.5
18	NAA (0.05)	2.0	7.1 ± 0.9	40.3 ± 1.5
19	NAA (0.1)	2.0	11.4 ± 1.0	60.0 ± 2.7
20	NAA (0.2)	2.0	12.0 ± 1.0	34.3 ± 1.5
21	NAA (0.4)	2.0	14.7 ± 1.5	51.0 ± 2.0

结果(表 3)表明, 在不同配方的培养基诱导下, 愈伤组织的诱导率各不相同。数据统计分析表明,

在 MS 基本培养基中, 黄山松成熟胚愈伤组织诱导率普遍高于 DCR 培养基。其中以 MS 为培养基, 添

加  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的 6-BA 和  $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的 NAA, 成熟胚愈伤组织诱导率最高, 达 95%。相关研究表明, 基本培养基中  $\text{NH}_4^+$  和  $\text{NO}_3^-$  浓度对针叶树成熟种胚脱分化及愈伤组织的形成具有显著的影响, 高浓度的  $\text{NH}_4^+$  和  $\text{NO}_3^-$  可有效地促进愈伤组织的诱导<sup>[17-18]</sup>。如陈芝芝发现在  $\text{NH}_4^+$  和  $\text{NO}_3^-$  含量为  $37.9 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 GD 培养基中, 马尾松合子胚愈伤诱导率明显高于  $\text{NH}_4^+$  和  $\text{NO}_3^-$  含量为  $16 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 WPM 培养基<sup>[19]</sup>。本试验结果表明具有高盐浓度的 MS 培养基相比于 DCR 培养基对黄山松成熟胚愈伤组织的诱导效果更佳。

表 4 不同浓度 6-BA 对黄山松成熟胚愈伤组织诱导率影响的 Duncan 多重比较

Table 4 Duncan's multiple range test for the effect of different concentrations of 6-BA on the induction rates of *P. taiwanensis* mature embryos callus

培养基	6-BA/( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	平均愈伤组织 形成率/%	显著水平	
			5%	1%
MS	0.5	19.0	c	C
	2.0	33.0	b	B
	1.0	48.8	a	A

表 5 不同浓度 2, 4-D、NAA 对黄山松成熟胚愈伤组织诱导率影响的 Duncan 多重比较

Table 5 Duncan's multiple range test for the effect of different concentrations of 2, 4-D or NAA on the induction rates of *P. taiwanensis* mature embryos callus

培养基	2, 4-D 或 NAA/( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	平均愈伤组织 形成率/%	显著水平	
			5%	1%
MS	2, 4-D (0.5)	15.6	e	E
	2, 4-D (2.0)	15.3	e	E
	2, 4-D (1.0)	24.7	d	D
	NAA (0.05)	34.5	c	C
	NAA (0.4)	46.4	b	B
	NAA (0.1)	48.9	b	B
	NAA (0.2)	54.5	a	A

进一步分析发现, 在 MS 培养基中, 6-BA 的浓度变化对愈伤组织的诱导效果具有极显著的影响。较低或较高浓度的 6-BA 均会降低愈伤组织的诱导效果 (表 4), 而在 6-BA 添加量为  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 种胚愈伤组织诱导效果最佳。同理, 生长素 2, 4-D 和 NAA 对愈伤组织的效率差异也较大, 培养基中添加 NAA 进行愈伤组织的诱导, 其作用效果优于添加 2, 4-D。当 NAA 添加量为  $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 其愈伤组织诱导率最高 (表 5)。此外, 过高或过低浓度的 NAA 均会影响种胚愈伤组织的诱导效果。

### 2.3 不定芽的诱导

高盐浓度的 MS 培养基虽然对黄山松种胚愈伤组织的诱导具有较好的效果, 但对诱导不定芽的分

化效果不佳。相关文献表明, 低盐含量的 DCR 培养基对针叶树不定芽的诱导具有较好的效果<sup>[20]</sup>。如郑武林<sup>[21]</sup>、张宇<sup>[22]</sup>等以 DCR 为基本培养基, 成功地诱导出马尾松的不定芽, 这表明低盐含量的 DCR 培养基在针叶树不定芽的诱导过程中具有关键的作用。因此, 本试验在不定芽的诱导中, 采用适合针叶树生长的 DCR 培养基为基本培养基, 并添加不同种类的生长调节剂组合进行黄山松不定芽的诱导。

在植物的生长发育过程中, 植物激素在植物细胞的分裂、分化以及整个植物的生长进程中具有重要的调控作用。植物品种由于其内源激素含量的差异, 对外源激素种类和需求各不相同<sup>[23]</sup>。分别采用含浓度为  $0.5\sim 2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA 和  $0.05\sim 0.45 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA 的 DCR 培养基进行不定芽的诱导。同时, 观察并记录分化培养基中各个时期的变化, 比较不同浓度的植物生长调节剂对诱导不定芽形成的影响。经过一段时间培养后, 统计不定芽的诱导数, 并且观察不定芽诱导过程中的变化。结果表明, 含有不同浓度生长素与细胞分裂素组合的 DCR 培养基对黄山松不定芽的诱导效果存在显著的差异。其中, 在 6-BA 添加量为  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , NAA 为  $0.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的 DCR 培养基中, 黄山松不定芽诱导的数量最多, 且不定芽的生长状况较好 (表 6)。

表 6 不同分化培养基对不定芽形成的影响

Table 6 Effects of different differentiation media on adventitious bud formation

培养基	6-BA/ ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	NAA/ ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	平均不定芽数/个
DCR	0.5	0.05	$3.1 \pm 0.6^{ab}$
	0.5	0.15	$2.2 \pm 0.2^{cde}$
	0.5	0.30	$1.8 \pm 0.2^{def}$
	0.5	0.45	$1.6 \pm 0.6^{ef}$
	1.0	0.05	$3.1 \pm 0.7^{ab}$
	1.0	0.15	$3.4 \pm 0.6^a$
	1.0	0.30	$2.5 \pm 0.4^{bcd}$
	1.0	0.45	$1.1 \pm 0.1^f$
	2.0	0.05	$2.6 \pm 0.3^{bc}$
	2.0	0.15	$2.2 \pm 0.4^{cde}$
	2.0	0.30	$1.3 \pm 0.2^f$
	2.0	0.45	$1.2 \pm 0.1^f$

多重比较分析表明, 6-BA 添加量为  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 黄山松种胚不定芽的诱导率最高。6-BA 浓度过高或过低, 不定芽的诱导率显著下降 (表 7)。不同浓度生长素对黄山松种胚不定芽诱导率的多重比较分析表明, 低浓度的 NAA 对黄山松种胚不定芽的诱导具有显著的作用, 而随着 NAA 浓度的升高, 其作用效果显著下降, 当 NAA 为  $0.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时的效果最佳 (表 8)。

表 7 不同浓度 6-BA 对黄山松不定芽诱导率影响的 Duncan 多重比较

Table 7 Duncan's multiple range test for the effect of different concentrations of 6-BA on the induction rates of *P. taiwanensis*

培养基	6-BA/ (mg·L <sup>-1</sup> )	平均不定 芽数/个	显著水平	
			5%	1%
DCR	2.0	1.84	c	B
	0.5	2.18	b	AB
	1.0	2.52	a	A

表 8 不同浓度 NAA 对黄山松不定芽诱导率影响的 Duncan 多重比较

Table 8 Duncan's multiple range test for the effect of different concentrations of NAA on the induction rates of *P. taiwanensis* adventitious bud

培养基	NAA/ (mg·L <sup>-1</sup> )	平均不定 芽数/个	显著水平	
			5%	1%
DCR	0.45	1.31	c	C
	0.30	1.86	b	B
	0.15	2.61	a	A
	0.05	2.93	a	A

#### 2.4 不定芽的伸长

诱导的丛生芽不能有效伸长是限制组培苗应用的一个重要方面。通常，在诱导出不定芽后应降低培养基中细胞分裂素与生长素的浓度。本试验以 DCR 培养基为基本培养基，通过及时降低培养基中 6-BA 和 NAA 的浓度，并调整生长调节剂的配比使不定芽得到快速伸长生长。通过培养 30 d，我们发现在 6-BA 添加量为 0.1 mg·L<sup>-1</sup>，NAA 添加量为 0.05 mg·L<sup>-1</sup> 的 DCR 培养基中不定芽的伸长效果最佳(图 3G)。张宇<sup>[22]</sup>发现在 BA 浓度 0.1 mg·L<sup>-1</sup>、IBA 浓度 0.2 mg·L<sup>-1</sup> 的 GD 培养基上，马尾松丛生芽伸长可以有有效的伸长，而郑武林等<sup>[21]</sup>发现马尾松芽苗在 DCR + 0.1 mg·L<sup>-1</sup> BA + 0.05 mg·L<sup>-1</sup> NAA 的培养基上伸长效果最佳。这些结果都表明低浓度的植物生长调节剂可以有效地促进松树不定芽的伸长。

#### 2.5 不定芽的生根及炼苗移栽

生根难度大是针叶树组织培养过程中普遍存在的问题。研究表明，降低基本培养基中大量元素含量，减少细胞分裂素浓度，提高生长素的含量可以显著提高针叶树不定芽的生根效率。如在添加 2.0 mg·L<sup>-1</sup> IBA 以及 0.05 mg·L<sup>-1</sup> BA 的 1/2GD 培养基中，马尾松不定芽具有较高的生根率<sup>[22]</sup>。杨模华通过试验发现，在 WPM 培养基中同时添加 2.0 mg·L<sup>-1</sup> IBA 及 0.15 mg·L<sup>-1</sup> NAA 为较好的生根诱导培养基，且马尾松幼苗基部无愈伤组织产形成，生根质量好<sup>[24]</sup>。本

试验以 1/2DCR 为基本培养基(大量元素减半)，并添加不同浓度的 IBA 和 NAA 进行比较，探索适宜的生根条件。

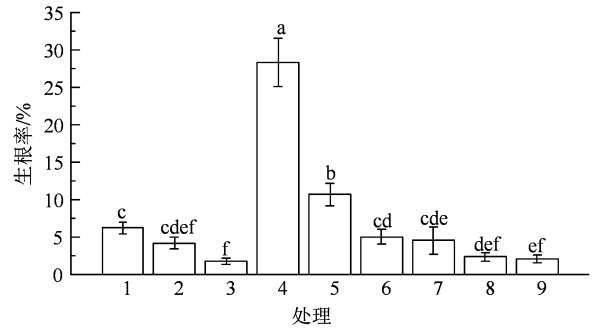
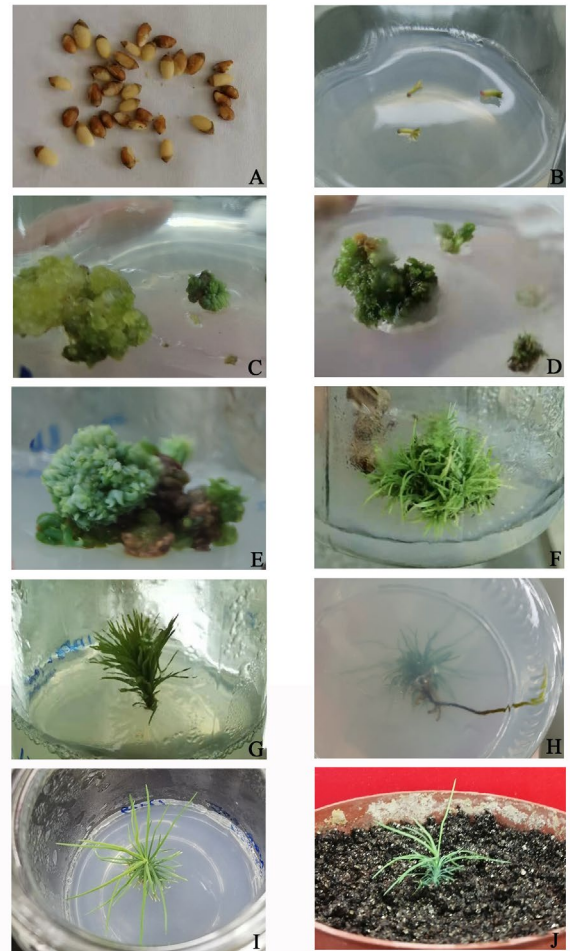


图 2 不同培养基对不定芽生根率的影响

Figure 2 Effects of different media on the rooting rates of adventitious buds



A: 去除种皮的黄山松种子; B: 接种在愈伤诱导培养基上的成熟胚; C: 诱导出的愈伤组织; D、E: 不定芽的诱导; F: 不定芽的继续生长; G: 不定芽的伸长; H: 不定芽的生根; I: 开盖炼苗; J: 生根苗的移栽。

图 3 黄山松组培繁殖流程

Figure 3 Tissue culture and propagation of *P. taiwanensis*

如图 2 所示，不同浓度的生长调节剂组合对黄山松不定芽的不定根诱导效率各不相同，当 IBA 浓

度为  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , NAA 为  $0.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时 (组合 4), 黄山松不定芽的生根率最高。在生长素 IBA 浓度为  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的 1/2DCR 培养基中, 不定芽的生根率显著高于其他浓度, 而 IBA 浓度过高或过低均会降低不定芽的生根率, 这表明  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  为 IBA 的最适浓度。此外, 最适宜黄山松不定芽生根的 NAA 浓度为  $0.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 随着 NAA 浓度的升高, 不定芽的生根率显著下降。

待黄山松生根苗长出发达的根系后, 逐步打开组培瓶盖, 炼苗 3~5 d, 期间保持培养基中水分充足 (图 3I)。随后, 将组培瓶中的培养基用玻璃棒捣碎, 用镊子将组培苗从组培瓶中取出, 用自来水将根部的培养基冲洗干净, 并移栽至装有混合营养土的花盆中。将移栽的黄山松小苗置于培养室中, 保持土壤水分充足, 使移栽的黄山松小苗成活并且开始生长 (图 3J)。

### 3 结论

黄山松是我国重要的风景园林树种, 具有较高的生态环保功能以及独特的自然景观效果, 广泛用于生产、生活以及环境建设, 具有重要的经济价值。然而目前关于黄山松组培快繁体系的研究却鲜见报道。本研究以黄山松成熟胚为材料, 通过对成熟胚外植体的表面灭菌方法、愈伤组织诱导、不定芽分化及生根诱导条件的研究, 初步建立了黄山松组培再生体系 (图 3)。本研究对黄山松种质资源的保存、遗传改良、新品种培育和优质种苗繁殖具有重要的意义。

### 参考文献:

- [1] 苏松锦, 刘金福, 兰思仁, 等. 黄山松研究综述(1960—2014)及其知识图谱分析[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2015, 44(5): 478-486.
- [2] 洪淑媛. 黄山松生理生态特性研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2006.
- [3] 陈见阳. 黄山松种子园球果产量与郁闭度的研究[J]. 浙江林业科技, 2014, 34(1): 58-60.
- [4] 张亚敏. 全国松材线虫病防控 5 年攻坚行动全面启动[J]. 国土绿化, 2021(7): 39.
- [5] 蒋丽雅, 江顺利, 汪振宇, 等. 黄山松自然状态下感染松材线虫病的初步调查[J]. 安徽农业大学学报, 2006, 33(1): 5-8.
- [6] 王秀丽, 杨煜, 徐平丽, 等. 植物组织培养的应用及进展[J]. 山东农业科学, 2005, 37(3): 78-80.
- [7] 项艳, 江海洋, 李卞宗. 正交试验法在月季离体快繁中的应用[J]. 安徽农业大学学报, 2003, 30(3): 299-303.
- [8] 黄振. 马尾松幼苗茎段和春梢茎段组织培养[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2009.
- [9] 吴丽君. 针叶树离体培养研究进展[J]. 福建农业学报, 2006, 21(4): 415-419.
- [10] CHALUPA V. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured immature and mature embryos of *Picea abies* (L.) Karst[EB/OL]. Karst Commun Inst Cech, 1985.
- [11] TANG W, NEWTON R J. Plant regeneration from callus cultures derived from mature zygotic embryos in white pine (*Pinus strobus* L.)[J]. Plant Cell Rep, 2005, 24(1): 1-9.
- [12] JIMÉNEZ V M, BANGERTH F. Endogenous hormone levels in explants and in embryogenic and non-embryogenic cultures of carrot[J]. Physiol Plant, 2001, 111(3): 389-395.
- [13] STASOLLA C, YEUNG E C. Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality[J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2003, 74(1): 15-35.
- [14] ZHANG Y, WEI Z M, XI M L, et al. Direct organogenesis and plantlet regeneration from mature zygotic embryos of Masson pine (*Pinus massoniana* L.)[J]. Plant Cell Tiss-Organ Cult, 2006, 84(1): 119-123.
- [15] 肖玉菲, 安冰, 晏巢, 等. 台湾桧木组织培养中种子消毒方法[J]. 广西林业科学, 2015, 44(4): 425-427.
- [16] 吴良欢, 陶勤南. 植物有机营养无菌培养试验方法的研究与应用[J]. 土壤学报, 1999, 36(4): 551-558.
- [17] 曹焱, 孟庆峰, 刁秋实, 等. 植物生长调节物质对成熟红松合子胚愈伤组织诱导的影响[J]. 中国林副特产, 2015(3): 10-12.
- [18] 尚瑀琪, 杨模华, 段润梅, 等. 马尾松优良家系不定芽诱导及腋芽高效增殖组培体系构建与优化[J]. 中南林业科技大学学报, 2021, 41(9): 1-13.
- [19] 陈芝芝. 马尾松合子胚器官发生和体胚诱导的研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2010.
- [20] 王可佳, 闫学彤, 郑珂媛, 等. 落叶松针叶直接不定芽发生体系的建立[J]. 分子植物育种, 2021, 19(8): 2719-2724.
- [21] 郑武林. 马尾松与落叶松高效离体再生体系建立[D]. 南昌: 江西农业大学, 2014.
- [22] 张宇. 马尾松组织培养的研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2003.
- [23] 何月秋, 池树友. 激素对诱导湿地松成熟胚胚性愈伤组织影响的初步研究[J]. 四川林业科技, 2007, 28(1): 74-76, 80.
- [24] 杨模华. 马尾松种质资源分子评价与体胚发育技术研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2012.