

蒙古栎促萌茎段的离体培养研究

高 珊¹, 林 梅¹, 崔建国¹, 林 强², 刘静宇³

(1. 沈阳农业大学 林学院, 辽宁 沈阳 110866; 2. 本溪市林业技术推广培训中心, 辽宁 本溪 117022;

3. 本溪市林业科学研究所, 辽宁 本溪 117022)

摘 要:以蒙古栎促萌枝条的幼嫩茎段为外植体,研究了不同种类的基本培养基、不同浓度的外源激素及其配比对蒙古栎器官发生及植株再生的影响。结果表明:蒙古栎促萌枝条的幼嫩茎段可通过器官发生途径获得再生植株,最佳初代培养基为 WPM+6-BA 0.5 mg/L+2,4-D 0.5 mg/L,诱导率为 76.7%;最佳不定芽增殖培养基 WPM+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L,增殖系数为 3.5;最佳生根培养基为 1/2MS+NAA 0.5 mg/L+IBA 0.1 mg/L,生根率达 76.7%。

关键词:蒙古栎;促萌;组织培养;植株再生

中图分类号:S 792.186 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)19-0102-04

蒙古栎(*Quercus mongolica*)属壳斗科栎属落叶乔木,也称柞树,主要分布在中国东北、华北、西北各地,华中地区亦有少量分布,为东北次生落叶阔叶林的主要组成树种和我国的主要用材树种。蒙古栎木材坚硬耐腐,纹理美观,是优质的经济用材;枝条发热量高,是很好的薪炭材;种子富含淀粉,树皮、壳斗含鞣质,可以提炼多种工业原料;叶片可饲蚕和饲养动物,屑材、锯末、木段可培养食用菌。蒙古栎根系发达,适应性强,抗风,有很好的抗蚀、护坡、涵养水源和保持水土的作用^[1]。

蒙古栎主要靠种子繁殖,但通过种子进行有性繁殖,后代变异性大,优良性状难以保持;其次,蒙古栎种子极易受到象鼻虫的侵害,导致其种子质量低;另外,蒙古栎结实量存在明显的大小年现象,且其种子为顽拗性种子,贮藏困难。上述原因在很大程度上制约了蒙古栎的开发利用。无性繁殖是林木繁殖的重要技术措施,但蒙古栎茎枝扦插极为困难,有人对蒙古栎的组织培养进行了探讨,认为蒙古栎可以通过微繁殖技术进行繁殖^[2-3]。该试验以蒙古栎促成培养得到的萌生茎段为外植体,研究不同种类的基本培养基、不同浓度的外源激素及其配比对蒙古栎器官发生及植株再生的影响,以期为蒙古栎组织培养技术体系的建立提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试蒙古栎枝条取自辽宁省本溪市小市林场桦皮

峪管护区,采集于 2012 年 3 月,选取生长健壮无病虫害的 10 a 生蒙古栎母树,剪取直径 3~5 cm、长度 50 cm 左右的枝条,用保鲜膜覆盖在枝条截面处^[4],并用线绳绑好,防止水分蒸发。然后将枝条放置于培养基质(沙与土的比例为 1:1)中,在温室环境下培养,经过 4 周后,萌发枝长至 10~15 cm 时,去除叶片,剪取 2~3 cm 带芽茎段作为外植体。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体消毒 将带芽茎段的腋芽处用毛笔蘸吐温 20 擦拭,然后将茎段置流水中冲洗 2 h,之后转入超净工作台。在无菌环境下,用 70% 酒精浸泡 30 s,无菌水冲洗 3 次;接着用 0.1% 的升汞分别消毒 1、3、5 min,在此过程中用镊子搅动茎段,使之与升汞充分接触,之后用无菌水冲洗 4~5 次,剪成 2~3 cm 长的茎段备用。

1.2.2 初代培养 将消毒后的外植体在无菌条件下,用无菌滤纸吸干水分,切去两端将其接种在初代培养基上。每处理 30 个茎段,3 次重复。①以 MS 和 WPM 及 1/2MS 为基本培养基,附加 0.2 mg/L 6-BA 和 0.5 mg/L 2,4-D。②以 WPM 为基本培养基,附加不同浓度(0.1、0.5、1.0 mg/L)的 6-BA 及不同浓度(0.1、0.5、1.0 mg/L)的 2,4-D。

1.2.3 增殖培养 待诱导出的芽萌长至 2 cm 长时,将其切下并转接至继代培养基上进行增殖培养。以 WPM 为基本培养基,附加不同浓度(0.1、0.5、1.0 mg/L)的 NAA 及不同浓度(0.5、1.0、2.0 mg/L)的 6-BA。

1.2.4 生根培养 将生长健壮的不定芽转入生根培养基中进行生根培养。以 1/2MS 为基本培养基,附加不同浓度(0.1、0.5、1.0 mg/L)的 NAA 和不同浓度的 IBA (0.1、0.5 mg/L)。28 d 后观察生根率。

第一作者简介:高珊(1987-),女,满族,辽宁本溪人,硕士研究生,现主要从事林业生物技术研究工作。E-mail:gaoshan2010@126.com

责任作者:崔建国(1969-),男,博士,教授,研究方向为林木遗传育种和生物技术。E-mail:cjgsau@yahoo.com.cn

收稿日期:2013-05-17

以上培养基均加入蔗糖 30 g/L、琼脂 6.5 g/L,为防止褐化,在所有培养基中加入 0.5 g/L 的 PVP,调整 pH 至 5.8,培养温度为(25±1)℃,光照强度 2 000~3 000 lx,光照周期为 16 h/d。

1.3 数据分析

定期观察蒙古栎促萌茎段生长状况并记录拍照,计算以下主要统计指标:诱导率(%)=诱导出不定芽的外植体数/接种的外植体数×100%,成活率(%)=成活外植体数/接种的外植体数×100%,污染率(%)=污染的外植体数/外植体总数×100%,褐化率(%)=褐化的茎段数/外植体数×100%,不定芽增殖系数=不定芽数/外植体数,生根率(%)=生根苗数/该生根处理总苗数×100%。

各项试验数据均采用 SPSS 19.0 软件进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 不同消毒时间对蒙古栎不定芽诱导的影响

由表 1 可知,消毒 1 min 与 3、5 min 对于不定芽的污染率和成活率差异显著,但消毒 1 min 与 3 min 对于不定芽的褐化率影响差异不显著。0.1%升汞消毒 1 min,褐化死亡率最小,但由于消毒时间较短,外植体污染率较高;消毒 5 min,蒙古栎萌发枝茎段污染率最低,但褐化死亡现象也相对最为严重,外植体成活率最低;消毒 3 min 的外植体成活率最高,21 d 后多数腋芽生长健壮,可萌发至 2.0~2.5 cm,其污染率与褐化率都相对较低,因此 0.1%升汞消毒 3 min 为最佳消毒时间。

表 1 不同消毒时间对蒙古栎不定芽诱导的影响

Table 1 Effect of different disinfection time on adventitious shoot of *Quercus mongolica*

消毒时间 /min	外植体数 /个	褐化率 /%	污染率 /%	成活率 /%
1	90	18.9±3.8a	33.3±3.4a	65.6±5.1b
3	90	27.7±5.1ab	27.8±1.9b	73.3±3.3a
5	90	32.2±5.1b	24.4±1.9b	54.4±1.9c

注:表中数据为 3 次重复的平均值±标准差,最小显著差数(LSD)法进行多重比较,同一列中相同字母间表示差异不显著 P=0.05。下同。

2.2 不同培养基对蒙古栎丛生芽诱导的影响

由表 2 可知,3 种基本培养基上丛生芽诱导率由大到小依次为 WPM 培养基、MS 培养基和 1/2MS 培养基。接种在 WPM 培养基上的茎段腋芽伸长生长明显优于 MS 及 1/2MS 培养基,产生的丛生芽也最多。外植体接种至 WPM 培养基 7 d 后,腋芽开始萌动,然后陆续展叶生长伸长,21 d 后开始有不定芽萌发,植株生长健壮。接种在 MS 及 1/2MS 培养基上的外植体在 10 d 后也开始萌动,并有愈伤组织产生,但随后生长缓慢,且叶片较小,生长势头较弱。因此,WPM 培养基为蒙古栎丛生芽诱导的最佳培养基。

表 2 不同培养基对蒙古栎丛生芽诱导的影响

Table 2 Effect of different basal medium on multiple shoot induction of *Quercus mongolica*

培养基 类型	外植体 数/个	诱导率 /%	丛生芽出 现时间/d	丛生芽发育状况
MS	90	54.1±1.7b	29	接触培养基的茎段底部逐渐膨大,并有部分愈伤产生,产生一定数量的丛生芽
WPM	90	72.2±3.0a	21	腋芽明显伸长,丛生芽生长较多,且植株比较健壮,展叶较多
1/2MS	90	47.8±2.9c	30	腋芽萌发较少,有少量愈伤分化,产生的不定芽较少

2.3 不同激素组合对蒙古栎丛生芽诱导的影响

由表 3 可知,在 9 种不同激素浓度处理中,6-BA 0.5 mg/L+2,4-D 0.5 mg/L 组合对于蒙古栎丛生芽诱导效果最佳,诱导率可达 76.7%,平均芽长可达到 2.4 cm (图 1)。6-BA 及 2,4-D 的浓度过高或过低都会降低丛生芽的诱导率,并且不利于丛生芽的伸长。当 6-BA 及 2,4-D 浓度过小时,丛生芽生长缓慢,叶片细小,展叶状况不佳,丛生芽纤细,生长势较弱,平均芽长仅为 0.6 cm;而当 6-BA 及 2,4-D 的浓度过高时,也会抑制丛生芽的生长,当 2,4-D 浓度达到 1.0 mg/L 时,在茎段周围会产生一定数量的愈伤组织,影响其正常展叶。

表 3 不同激素组合对蒙古栎丛生芽诱导的影响

Table 3 Effect of different phytohormones on multiple shoot induction of *Quercus mongolica*

处理	6-BA /mg·L ⁻¹	2,4-D /mg·L ⁻¹	外植体 数/个	产生丛生芽外 植体数/个	丛生芽诱 导率/%	平均芽长 /cm
1	0.1	0.1	90	45	50.0±3.3e	0.6±0.1f
2	0.1	0.5	90	52	57.8±6.9cde	0.9±0.2ef
3	0.1	1.0	90	50	55.6±5.1de	1.1±0.2e
4	0.5	0.1	90	59	65.6±7.7abcd	1.3±0.3de
5	0.5	0.5	90	69	76.7±6.7a	2.4±0.1a
6	0.5	1.0	90	63	70.0±6.7ab	2.1±0.2ab
7	1.0	0.1	90	61	67.8±1.9abc	1.8±0.2bc
8	1.0	0.5	90	51	56.7±3.4cde	1.3±0.4de
9	1.0	1.0	90	57	63.3±8.8bcd	1.5±0.4cd
CK	0	0	90	0	0.0±0.0f	0.0±0.0g



图 1 促萌茎段的初代培养

Fig. 1 Primary culture of the forced shoots of *Quercus mongolica*

2.4 不同激素组合对蒙古栎丛生芽增殖的影响

由表 4 可知,在 WPM 培养基中添加 0.5 mg/L NAA+2.0 mg/L 6-BA 为最佳激素组合,增殖系数可达

到 3.5, 平均芽长为 3.7 cm(图 2)。随着 6-BA 浓度的增加, 芽的增殖呈现增长趋势, 以 2.0 mg/L 时达到最大值, 芽长也随之增长。6-BA 作为有效的细胞分裂素, 具有良好的诱导芽形成的能力, 因此在增殖培养过程中, 提高其浓度, 有利于形成较多数量的丛生芽。在对柞属植物组织培养的研究中发现, 过高的 6-BA 浓度对于茎芽的增殖具有抑制作用^[4-5], 该试验未观察到此现象, 这可能与柞属树种间存在差异有关。NAA 作为被广泛应用的生长素, 可以促进丛生芽的伸长生长。当 NAA 浓度较低时, 丛生芽茎干细弱, 叶片窄小黄化, 随着 NAA 浓度增加至 0.5 mg/L, 芽长伸长明显, 丛生芽生长健壮, 当 NAA 浓度达到 1.0 mg/L 时, 外植体仍能保持较高增殖系数, 但平均芽长较短, 外植体较为弱小, 6-BA 与 NAA 的交互作用影响了丛生芽的增殖效果。

表 4 不同激素组合对蒙古栎丛生芽增殖的影响

Table 4 Effect of different phytohormones on multiple shoot proliferation of *Quercus mongolica*

处理	NAA /mg · L ⁻¹	6-BA /mg · L ⁻¹	外植体数 /个	增殖芽数 /个	增殖系数	平均芽长 /cm
1	0.1	0.5	60	63	1.1±0.1f	0.8±0.2e
2	0.1	1.0	60	97	1.6±0.2e	1.1±0.2e
3	0.1	2.0	60	118	2.0±0.1e	1.8±0.4d
4	0.5	0.5	60	123	2.1±0.2de	1.7±0.2d
5	0.5	1.0	60	172	2.9±0.2bc	2.0±0.2d
6	0.5	2.0	60	211	3.5±0.3a	3.7±0.2a
7	1.0	0.5	60	157	2.6±0.2bc	2.6±0.4c
8	1.0	1.0	60	146	2.4±0.5cd	3.1±0.4b
9	1.0	2.0	60	175	2.9±0.2b	1.0±0.3e

2.5 不同激素组合对蒙古栎生根培养的影响

由表 5 可知, 添加了 0.1 mg/L IBA+0.5 mg/L NAA 的 1/2MS 培养基为蒙古栎茎段的最佳生根培养基, 生根率达到 76.7%, 每个单株的平均根数可以达到 4.3 条(图 3)。随着 NAA 浓度增加, 生根率先增加后减小, 表明较高的 NAA 浓度会抑制生根。IBA 浓度增加对于蒙古栎的生根效果影响并不显著。在处理 2 中, 接入培养基的无菌苗 7 d 后开始诱导出根, 根系粗壮, 植株生长正常, 叶片呈绿色, 28 d 后形成较为完整的根系。而随着生长素浓度增加, 茎段基部形成较大的愈伤组织, 但分化出的根系较少, 且较为细弱, 植株生长状况较差, 叶片发黄脱落, 难以进行练苗移栽。

表 5 不同激素组合对蒙古栎丛生芽生根的影响

Table 5 Effect of different NAA concentration on multiple shoot rooting of *Quercus mongolica*

处理	IBA /mg · L ⁻¹	NAA /mg · L ⁻¹	外植体数 /个	生根率 /%	每株平均 根数/条
1	0.1	0.1	60	33.3±2.9cd	2.3±0.6b
2	0.1	0.5	60	76.7±7.6a	4.3±0.6a
3	0.1	1.0	60	55.0±8.6b	3.0±1.0ab
4	0.5	0.1	60	28.3±5.8d	2.7±1.1b
5	0.5	0.5	60	50.0±10.0bc	2.3±1.2b
6	0.5	1.0	60	43.3±7.6bcd	1.3±0.6b



图 2 增殖培养

Fig. 2 Proliferation culture

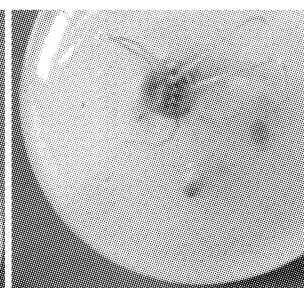


图 3 生根培养

Fig. 3 Rooting culture

3 讨论与结论

3.1 外植体消毒方法

要建立蒙古栎的组织培养体系, 植物材料的消毒至关重要。由于该试验采用的外植体为蒙古栎枝条沙培后萌生的嫩枝, 所以萌发枝暴露在空气中的时间较短, 外源杂菌较少, 故该试验中设置的消毒时间较短, 在保证将材料上附着的微生物杀死的同时避免损伤外植体, 以确保无菌体系的建立。该试验研究表明, 最适宜的外植体消毒方法为将带芽茎段放在流水下冲洗 2 h, 然后再无菌条件下用 70% 酒精浸泡 30 s, 无菌水冲洗 3 次; 接着用 0.1% 的升汞消毒 3 min, 再用无菌水冲洗 4~5 次。

3.2 初代培养

基本培养基为植物生长发育提供所需的各种营养元素, 在组织培养中起着至关重要的作用。该试验对比了 3 种基本培养基对蒙古栎不定芽诱导的效果, 结果表明 WPM 的培养效果最好。在 WPM 培养基中, 含有较低浓度的无机盐, 最利于不定芽的诱导, 也能有效促进芽的增殖, 这与何晓兰等^[6]以及 Tamta 等^[7]的研究结果一致。而 MS 培养基的钾盐、铵盐及硝酸盐含量都较高, 过高的微量元素可能抑制了蒙古栎丛生芽的分化, 因此并不是最适宜的基本培养基。植物生长调节剂是组织培养必不可少的添加剂, 尤其是细胞分裂素和生长素。该试验研究发现, 在蒙古栎初代培养中, 添加适量浓度的 6-BA 和 2,4-D, 可获得较多数量的丛生芽, 且芽生长健壮, 展叶为绿色。当 6-BA 浓度高达 1.0 mg/L 时, 虽然能获得较高数量的丛生芽, 但其平均芽长较短, 节间较短, 叶面积较小。这与高浓度的 6-BA 可能抑制节间伸长有关。杨锋利^[4]在对成龄栓皮栎茎段培养的研究中也发现, 过高或过低浓度的 6-BA 会引起叶片畸形或玻璃化。高浓度的 2,4-D 可以促进愈伤组织的形成, 但并不利于不定芽的诱导, 该试验研究发现, 当 2,4-D 浓度过高时, 茎段基部会产生较多白色颗粒状愈伤组织, 包裹在茎段周围, 抑制了丛生芽的增殖和生长。适量浓度的 2,4-D 与 6-BA 配合使用, 才可能促进蒙古栎不定芽的诱导。细胞分裂素与生长素的交互作用对于不定芽诱导影响显著, 因此二者的配比对于成功诱导不定芽起

着至关重要的作用。

3.3 增殖培养

组织培养中用腋芽或不定芽增殖的途径扩大繁殖有利于保持遗传稳定性,而且在培养许多代后仍然保持着旺盛的增殖能力^[5]。该试验采用萌发枝诱导出的不定芽增殖,获得了较高数量的丛生芽。植物生长物质在增殖培养过程中也起着至关重要的作用。考虑到由于2,4-D的适宜用量范围较狭窄,过量后会抑制芽的形成,因此该试验在增殖阶段采用了作用效果较弱的NAA作为生长素。该试验研究发现,当6-BA浓度达到2.0 mg/L并且NAA浓度达到0.5 mg/L时,增殖效果最好。因此,可以得出高浓度的细胞分裂素和低浓度的生长素配合使用,既能提高腋芽的增殖速度,也能保证腋芽的正常生长这一研究结论,这与曹昆等^[8]的研究结果一致。有研究发现,当外植体采用垂直培养方式时,经过几次继代培养后,外植体的增殖能力明显下降,而采用水平培养后,茎芽增殖速度可以显著提高^[9]。

3.4 生根培养

该试验研究发现以1/2MS为培养基添加0.1 mg/L IBA和0.5 mg/L NAA,生根效果较为显著,生根率较高,但是茎段基部均有较大愈伤组织,产生的根为愈伤根,不利于芽的生长,亦不利于练苗移栽。在生根培养阶段,很多栎属植物选择单独添加IBA,方法多为两步生根法^[10],具体方法为先将栎属植物小植株的基部在含IBA的水溶液中浸泡一段时间,一般为24 h,再转入不添加任何激素的生根培养基中培养。这种方法既能有效的促进生根率,也能避免植株基部愈伤组织的形成。

Vieitez等^[11]在对北美白栎(*Quercus alba*)的研究中发现,在生根培养初期,采用5 d暗培养,可以提高生根率,但是并不利于芽的生长,向培养基中添加活性炭既可以提高生根率也可以促进根、茎、叶的生长。

参考文献

- [1] 郑万钧. 中国树木志[M]. 北京:中国林业出版社,2004:2340-2343.
- [2] 曲来叶. 蒙古栎组织培养的研究[D]. 哈尔滨:东北林业大学,2000.
- [3] 李文文,刘希华,黄秦军. 蒙古栎茎段的离体培养[J]. 东北林业大学学报,2012,40(8):1-6.
- [4] 杨锋利. 成龄栓皮栎组培繁殖技术的研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2005.
- [5] 张存旭,宋敏,赵忠. 栓皮栎茎段离体培养的研究[J]. 西北植物学报,2004,24(7):1260-1265.
- [6] 何晓兰,刘晓华,于建明,等. 悬铃木叶片不定芽再生[J]. 江苏农业学报,2002,22(3):225-228.
- [7] Tamta S, Palni L M S, Purohit V K, et al. *In vitro* propagation of brown oak (*Quercus semecarpifolia* Sm.) from seedling explants[J]. In Vitro Cell Dev Biol-Plant, 2008,44:136-141.
- [8] 曹昆,李霞. 木本植物组织培养不定芽诱导研究进展[J]. 江苏林业科技,2008,35(5):43-48.
- [9] Vieitez A M, Sánchez M C, Amo-Marco J B, et al. Foreed flushing of branch segments as a method for obtaining reactive explants of mature *Quercus robur* trees for micropropagation[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2009(3):287-295.
- [10] 赵丹,诸葛强,唐罗忠,等. 麻栎的组织培养与快速繁殖[J]. 中国农学通报,2010,26(15):168-171.
- [11] Vieitez A M, Corredoira E, Ballester E, et al. *In vitro* regeneration of the important North American oak species *Quercus alba*, *Quercus bicolor* and *Quercus rubra*[J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2009,98:135-145.

Study on *in vitro* Culture of Forced Shoots of *Quercus mongolica*

GAO Shan¹, LIN Mei¹, CUI Jian-guo¹, LIN Qiang², LIU Jing-yu³

(1. College of Forestry, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866; 2. Forestry Technology Extension and Training Center of Benxi City, Benxi, Liaoning 117022; 3. Forestry Science Institute of Benxi City, Benxi, Liaoning 117022)

Abstract: Taking the forced shoots of *Quercus mongolica* as a source of initial explants, the effects of different types of media and different concentrations of plant growth regulators and their ratios on organogenesis and plantlet regeneration of *Quercus mongolica* were studied. The results showed that regenerated plants could be obtained from forced shoots of *Quercus mongolica* via organogenesis. The best initial medium was WPM+6-BA 0.5 mg/L+2,4-D 0.5 mg/L, the induction rate was 76.7%. The best adventitious bud proliferation medium was WPM+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L and the highest proliferation factor was 3.5. The best rooting medium was 1/2MS+NAA 0.5 mg/L+IBA 0.1 mg/L and the rooting rate was up to 76.7%.

Key words: *Quercus mongolica*; forced shoot; tissue culture; plant regeneration