

柴松胚培养诱导芽形成的初步研究

宋维秀^{1,2}, 宋西德^{1*}, 周锋利¹, 陈玉红³

(1. 西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨陵 712100; 2. 青海大学 农牧学院, 青海 西宁 810003;

3. 共和县林业工作站, 青海 共和 813000)

摘要:为了对柴松组织培养进行系统研究,分析了柴松外植体处理方法和不同 6-BA 浓度对胚培养诱导等形成的影响,结果表明:适宜于柴松芽诱导的培养基为 1/2 MS+6-BA 2.0 mg·L⁻¹;经低温沙藏的柴松成熟种胚生长良好,外植体用 0.1% HgCl₂ 最佳消毒时间为 5.0~5.5 min;外植体的最佳放置方式为水平放置。

关键词:柴松;芽诱导;外植体;培养基

中图分类号:S791.259.04

文献标识码:A

文章编号:1001-7461(2008)03-0114-03

A Preliminary Study on Inducing Buds of *Pinus tabulaeformis* f. *shekannensis*

SONG Wei-xiu^{1,2}, SONG Xi-de¹, ZHOU Feng-li¹, CHEN Yu-hong³

(1. College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2. Agricultural and Animal Husbandry College, Qinghai University, Xining, Qinghai 810003, China;

3. Forestry Working Station in Gonghe County, Gonghe, Qinghai 813000, China)

Abstract: 1/2 MS was used as the basic medium for bud proliferation of *Pinus tabulaeformis* f. *shekannensis*. The best concentration effective of 6-BA was 2.0 mg·L⁻¹. The results of selecting the optimal explants showed that the mature embryo which was preserved at low temperature in sands is the best explants, the suitable disinfectant time in 0.1% HgCl₂ for 5.0~5.5 min, the level location of explants was the best way.

Key words: *Pinus tabulaeformis* f. *shekannensis*; inducing adventitious buds; explant; selecting of medium

柴松(*Pinus tabulaeformis* f. *shekannensis*)又称陕甘油松,是油松在黄土高原的变异类型,是陕西省特有的优良用材树种,除陕西省桥北林业局和尚源林场大麦秸沟保存有成片的柴松林外,其余各地均无分布^[1]。柴松生长较油松稍快,树皮光滑,树干通直,天然整枝好,材质较油松软。由于其树体高大,干形通直,单株及林分高、径、蓄积生长都高于油松,被誉为黄土高原上的珍贵优良树种,还是陕北黄土高原不可或缺的珍贵乡土树种,因此应大力发展柴松林^[2]。

柴松主要采用种子繁殖,但其结实间隔期长,籽粒空瘪率高,播种出芽速度慢,限制了柴松的繁殖速度,也阻碍了其在生产中的推广。无性繁殖中,以组

织培养繁殖速度最快,繁殖系数最高^[3]。迄今为止,柴松组培快繁的成熟技术国内外尚未见报道。因此,对柴松组织培养进行系统研究具有一定的理论与实践意义,对芽诱导的研究是进行组织培养的基本前提和至关重要的环节。本研究以柴松外置体的处理方法、不同激素浓度对芽诱导进行研究,为柴松组织培养奠定理论和实践基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为籽粒饱满的柴松种子,来源于陕西省桥北林业局和尚源林场。

以 1/2 MS 为基本培养基,培养温度均为 25±

收稿日期:2007-09-17 修回日期:2007-10-26

基金项目: 国家科技部科技成果重点推广项目(2001FC0003222)

作者简介:宋维秀(1973),女,青海湟源人,讲师,在读硕士,主要从事林木种质理论与技术研究工作。

* 通讯作者:宋西德(1964-),男,研究员,硕士生导师,主要从事生态建设和森林培育研究工作。

2℃,每口光照12~14 h,光照强度1 000~1 500 lx,相对湿度40%~80%。

1.2 方法

1.2.1 外植体 A1为未经沙藏的柴松种子,用清水浸泡3 d。A2为沙藏种子,将种子与湿沙(含水量为沙子最大持水量60%)按1:3比例混和,置于5℃条件下4周后,取出种子,用自来水冲洗干净。

1.2.2 6-BA处理 参照相关文献^[4-5],选用基本培养基为1/2 MS,生长调节剂为6-BA,设置4个水平,分别为1.0、2.0、3.0、4.0 mg·L⁻¹,附加3%蔗糖、0.6%琼脂,pH调至5.6~5.8,采用完全随机区组设计,每处理均为20瓶,3次重复,每瓶接种2~3个生长健壮的种胚。以芽诱导率(芽诱导率=诱导出芽胚数/接种胚数)为指标,并观察不定芽的生长状况,选择适宜的6-BA浓度。

1.2.3 芽诱导最佳外植体的确定 分别选取沙藏和未沙藏的饱满柴松种子,剥去种皮后用3%KMnO₄分别消毒15 min后,用清水冲洗5~6次。将经过处理的种子再去除种皮,经70%的酒精浸泡40 s,再经0.1%HgCl₂处理,于无菌条件下剥取种胚,将2种外植体分别接种到1/2 MS+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA培养基上培养,蔗糖浓度为30 g·L⁻¹,观察

各处理最初出现丛生芽的时间,30 d后统计丛生芽数,观察丛生芽的生长状况。

1.2.4 外植体最佳消毒时间的确定 将筛选的最佳外植体洗净后,用0.3%的KMnO₄消毒15~20 min,无菌水冲洗,剥去种皮,用70%酒精消毒40 s,在0.1% HgCl₂溶液中分别浸泡4.5、5.0、5.5、6.0、6.5 min后,接种在1/2 MS+2.0 mg·L⁻¹ 6 BA+30 g·L⁻¹蔗糖的培养基上,1周后观察其污染情况和褐变情况。

1.2.5 外植体放置方式的确定 将选择出的最佳外植体按照水平放置、直立放置、倾斜放置3种方式放置于培养基中。每种放置方式各接种20瓶,1周后观察不定芽的生长状况。

2 结果与分析

在接种培养5 d后,离体胚开始萌发生长,子叶和胚轴逐渐变绿,胚根和胚轴下部有红色细胞出现;10 d后子叶展开变绿,开始膨大,胚根及下胚轴上有愈伤组织形成;2周后子叶和胚轴增粗,胚根及下胚轴完全愈伤组织化;20 d后从增粗的子叶顶端及子叶基部分化出不定芽,长出针状叶(表1)。

表1 不同种子处理与不同6-BA浓度下诱导效果^①
Table 1 Result of inoculation with different approaches and concentrations of 6-BA

处理方法	6-BA 浓度 (mg·L ⁻¹)	接种外植体 个数/个	被诱导外植 体个数/个	芽诱导率 /%	出芽时间 /d	单个胚平均 芽数/个	生长状况
未沙藏	1.0	60	25	41.7 bA	23~25	1.4 abA	胚生长缓慢,芽长势较弱,易发生褐化、枯死
	2.0	60	32	53.3 aA	19~21	2.4 aA	胚生长较快,芽长势良好,芽色浓绿
	3.0	60	23	38.3 bA	24~27	1.3 bA	胚生长缓慢,芽长势一般
	4.0	60	13	21.7 cB	29~33	0.9 bA	胚生长缓慢,芽长势一般,少数褐化、枯死
沙藏	1.0	60	36	50.9 bA	14~17	2.9 abA	胚生长较快,芽长势良好,芽色浓绿
	2.0	60	44	63.3 aA	12~15	4.5 aA	胚生长较快,芽长势很健壮,芽色浓绿
	3.0	60	33	46.7 bA	16~19	2.5 bA	胚生长缓慢,芽长势一般,少数褐化、枯死
	4.0	60	19	26.7 cB	20~23	2.1 bA	胚生长缓慢,芽长势一般

①每一处理中,同列不同小写字母表示差异显著(P<0.05);不同大写字母表示差异极显著(P<0.01)。

2.1 种子处理及6-BA对芽的诱导作用

2.1.1 种子处理与6-BA对芽诱导率的影响 对芽诱导率进行方差分析表明,不同种了处理诱导率的F值为55.08,对应的不同种了处理诱导率相同

的概率P=0.005 1<0.010 0的极显著标准,表明未经沙藏的成熟种胚的诱导率显著低于经过沙藏的成熟种胚的诱导率,主要是由于沙藏可以促进春化阶段的完成^[3]。

由表 1 可知,6-BA 浓度在 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时诱导效果最好,芽诱导率和分化率最高,生长良好;浓度小于 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,诱导率明显降低,且不定芽易出现玻璃化;浓度大于 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,芽愈伤化严重,因此,选用 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 最为适宜。

2.1.2 种子处理与 6-BA 对平均芽数的影响 研究(表 1)表明,未经沙藏的成熟种胚的每株平均芽数显著低于经过沙藏的成熟种胚的每株平均芽数。可能是由于植物在生长过程中,各部分的内源激素含量发生变化,经过沙藏,柴松种胚内部内源激素发生变化,胚被活化,产生较多的芽数。

当 6-BA 浓度为 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,每株平均芽数最多,与浓度为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的处理无显著差异,与浓度为 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的处理差异显著。说明 6-BA 浓度在 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时诱导效果最好。

2.1.3 种子处理与 6-BA 对出芽时间和芽诱导状况的影响 试验表明,经过沙藏的柴松成熟种胚不定芽发生率最高(63.3%),且产生的平均芽数最多,芽颜色浓绿,生长健壮,长势良好;未经沙藏的柴松成熟种胚产生不定芽所需的时间较长,种胚发生率较低,产生的不定芽颜色微黄,生长较差,长势较弱。因此,经过沙藏的成熟种胚作为外植体较为适宜。

2.2 外植体最佳消毒时间的确定

研究表明,升汞消毒时间越短,外植体的污染率越高,当消毒时间在 5.5 min 以上时,灭菌效果较好,污染率降低。但在消毒的同时, HgCl_2 也会引起外植体不同程度的褐变。通常消毒时间越长,褐变越严重,而褐变会导致组织代谢活动紊乱,生长停滞,最终衰老死亡^[6]。因此,综合考虑污染和褐变 2 个因素,适宜的消毒时间为 5.0~5.5 min,两者相对处于较低水平。

2.3 外植体不同接种方式对芽诱导的影响

将经过沙藏的柴松成熟种胚分别按水平放置、直立放置、倾斜放置接种在培养基上,观察柴松种胚的生长状况,结果表明,水平放置柴松种胚时,种胚迅速膨胀,生长健壮,子叶与胚轴上均分化出较多不定芽,且芽色浓绿,更有利于不定芽的诱导;倾斜放置时,种胚生长较缓慢,仅子叶上分化出少量不定芽,而且芽色淡绿;直立放置种胚生长缓慢,长势一般,仅独立分化成苗,未产生不定芽,不利于胚芽的

分化。因此在启动培养的过程中,柴松种胚接种时较适宜的放置方式为水平放置。

3 结论与讨论

柴松不定芽诱导最佳外植体为低温(5°C)沙藏 3 周的柴松成熟种胚;在启动培养过程中,污染率低、生长快,子叶和基部分化出较多不定芽,芽体健壮,颜色浓绿,长势良好,且产生较少的愈伤组织。

6-BA 适宜的浓度为 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;外植体消毒时间以 5.0~5.5 min 较适宜;接种时,外植体最佳放置方式为水平放置。

当外植体或愈伤组织诱导出不定芽后,为使芽进一步生长发育,需将其转入另一种培养基中,这一点对针叶树组织培养尤其重要^[7]。外植体的最佳消毒时间和放置方式也很关键,胚在离体培养时,可脱分化形成愈伤组织或直接发育成苗,在柴松芽诱导研究中,幼胚形成的愈伤组织存在严重的褐化和玻璃化现象。褐化是由于离体组织细胞中多酚氧化酶活性增加,致使酚类物质氧化生成棕褐色醌类物质,外植体表面的褐化会严重影响营养物质的吸收,不利于培养物的生长。为了改善培养条件,防止褐化,可以从抑制多酚氧化酶活性或减少酚类和醌类物质积累等角度入手,常用方法有外植体预处理、适宜的培养条件(温度、光照、消毒时间和放置方式)、添加防褐剂及连续转移外植体等^[8]。

参考文献:

- [1] 陕西省林业科学研究所,陕西省防护林建设工作队. 陕西主要树种造林技术[M]. 西安:陕西科学技术出版社,1992:14-15.
- [2] 刘政鸿. 黄土高原天然柴松林群落学特性初步研究[J]. 西北植物学报,2003,23(9):1486-1490.
- [3] 曹孜义,刘国民. 实用植物组织培养技术教程[M]. 兰州:甘肃科学技术出版社,1996:1-8.
- [4] 郑均宝,潘冬梅,陈正华. 油松离体胚子芽的组织分化和无根试管苗的形成[J]. 河北林学院学报,1994(2):97-101.
- [5] 初立业. 植物激素在松树离体快速繁殖中的作用[J]. 生物技术通报,1995(1):6-10.
- [6] 张红晓,经剑颖. 木本植物组织培养技术研究进展[J]. 河南科技大学学报(农学版),2003,23(3):66-69.
- [7] 黄学林,李筱菊. 高等植物组织离体培养的形态建成及其调控[M]. 北京:科学出版社,1995:81.
- [8] 韩素英,齐力旺,杨云龙,等. 几种针叶树种离体培养条件的研究[J]. 林业科技通讯,1995(10):20-22.