

奥地利黑松离体胚培养诱导不定芽的研究

王小玲, 樊军锋*, 贾小明

(西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨陵 712100)

摘要:培养基种类、激素种类及浓度、培养基中蔗糖浓度对奥地利黑松离体胚培养不定芽诱导影响显著。研究表明,以 3/4WPM 为基本培养基,附加 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA、蔗糖 3.0%,对诱导种胚产生不定芽最为有效,诱导率 56.53%。NAA 不利于外植体不定芽的产生。

关键词:奥地利黑松; 成熟合子胚; 不定芽诱导

中图分类号:S791.259.05

文献标识码:A

文章编号:1001-7461(2005)04-0072-04

A Study of Adventitious Bud Inducing from Mature Zygotic Embryos Derived from *Pinus nigra* var. *austriaca*

WANG Xiao-ling, FAN Jun-feng, JIA Xiao-ming

(College of Forestry, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The variety of basic mediums, the variety and concentration of hormones and the concentration of sugar were significantly affect the induction adventitious buds formation. 3/4WPM+ $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA+3% sucrose was the best combination to induce adventitious buds, on which 56.53% of explants were induced. Addition of NAA would inhibit the formation of adventitious buds.

Key words: *Pinus nigra* var. *austriaca*; mature zygotic embryos; inducing adventitious buds

松树是全球性的主要用材、绿化树种。传统的松树是种子繁殖,因其繁殖速度慢、周期长及育苗技术的差异,使得利用组织培养方法快繁成为人们研究和关注的焦点,并取得了一定成绩^[1]。有关松树组织培养的研究报道较多^[2~4],我国已对欧洲赤松、火炬松、白皮松、樟子松、马尾松、油松、华山松、湿地松、红松、云南松、大别山五针松、金钱松、雪松等进行了离体培养,并诱导生根产生了试管苗,至今没有关于奥地利黑松组织培养的报道。

奥地利黑松(*Pinus nigra* var. *austriaca*)为欧洲黑松(*P. nigra*)的一个变种,高大乔木,主干通直,木材坚硬,抗风力强,耐寒性强,是营造用材林和防护林的优良树种。我国自 20 世纪 70 年代开始从国外引种奥地利黑松,近年来,已成功地在“三北”地区广泛栽植,提高了林木生产力。然而,由于奥地利黑松结实间期长、种子产量低、育苗技术高,常规种子繁殖远远不能满足实际需要,因此研究奥地利黑松

组织培养技术,对于该优良树种在我国快速推广以及利用生物技术改良具有重要作用。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为从德国购进的奥地利黑松种子。

1.2 方法

1.2.1 种子预处理 种子在 4℃低温下预处理 15 d 后,选取成熟饱满的种子,自来水室温条件下过夜浸泡,使其吸水膨胀后,用 0.1%高锰酸钾溶液消毒 30 min,无菌水冲洗干净后剥掉种皮,用 70%酒精消毒 45 s,无菌水冲洗 2 遍,再用 0.1%升汞消毒 8~10 min,无菌水冲洗 5~6 遍。

将消毒后的种子用无菌滤纸吸干其表面水分,取出种胚(去除颜色发黄或子叶损坏的胚)备用。

1.2.2 基本培养基的筛选 不定芽诱导的基本培养基根据 $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$ 总含量的不同选用了 MS、

收稿日期:2005-06-02

基金项目:国家林业局“948”项目

作者简介:王小玲(1979-),女,陕西白水人,硕士研究生,主要从事林木遗传育种和林木生物技术研究工作。

* 通讯作者:樊军锋(1963-),男,陕西扶风人,副研究员,主要从事树木遗传改良和品种选育工作。

SH、GD、DCR 和 WPM 5 种基本培养基。各培养基中均添加 $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA, 蔗糖 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, pH5.8。每个处理 3 次重复。

1.2.3 培养基大量元素浓度的筛选 对上述筛选确定的基本培养基进行大量元素浓度筛选, 设置 1、3/4、1/2 等 3 个梯度。各处理培养基中附加 $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA、3.0%蔗糖, pH5.8。每个处理 3 次重复。

1.2.4 生长调节剂组合的筛选 以上述筛选的培养基及大量元素浓度为基本培养基, 附加不同浓度的 6-BA 和 NAA, 进行生长调节剂筛选。6-BA 设置 4 个浓度梯度: 1.0 、 2.0 、 3.0 、 $4.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, NAA 设置 3 个浓度梯度: 0 、 0.05 、 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。每个处理 3 次重复。

1.2.5 蔗糖浓度的筛选 对确定的培养基进行蔗糖浓度试验, 蔗糖浓度设置 1.5%、3.0%、4.5% 3 个梯度。每个处理 3 次重复。

1.2.6 统计指标 每项试验外植体接种 30 d 后, 统计诱导率与分化系数。

万方数据

诱导率(%)=(产生不定芽的外植体数/接种外植体数)×100%

分化系数=诱导的不定芽数/产生不定芽的外植体数

1.3 培养条件

培养温度 $25\pm2^{\circ}\text{C}$, 光照强度 $2\,000\sim3\,000\text{ lx}$, 每日光照 14 h。

2 结果与分析

2.1 培养基对奥地利黑松不定芽诱导的影响

研究表明(表 1), 基本培养基对不定芽诱导影响很大。WPM 培养基诱导率和分化系数均最高, 分别为 54.35% 和 3.45, 外植体及不定芽生长良好, 为最佳基本培养基。其次是 SH, 诱导率为 34.85%, 但分化系数最低, 外植体生长相对较弱, 针叶梢部发黄。GD 和 DCR 培养基虽然分化系数比较高, 但诱导率很低, 不超过 25%。MS 培养基诱导率最低, 为 18.31%, 这与高盐的 MS 培养基对大多数松属树种的器官分化不利结果一致^[5,6]。

表 1 基本培养基对奥地利黑松离体胚不定芽诱导分化的影响

Table 1 Effect of basic mediums on adventitious buds differentiation of *Pinus nigra* var. *austriaca*

基本培养基	接种个数 /个	产生芽外植体数 /个	诱导率 /%	诱导芽数 /个	分化系数
MS	71	13	18.31	34	2.62
SH	66	23	34.85	47	2.04
GD	57	14	24.57	39	2.79
DCR	89	19	21.35	57	3.00
WPM	138	75	54.35	259	3.45

方差分析表明, $F=4.90>F_{0.05}(4,10)=3.48$, 说明各培养基对不定芽诱导存在显著差异, 进一步用 q 检验法比较 ($D=31.3$), 得出奥地利黑松离体胚不定芽诱导培养基以 WPM 为最优, 与其他 4 种培养基存在显著差异。

2.2 培养基大量元素浓度对不定芽诱导的影响

研究表明(图 1), WPM 培养基大量元素的使用浓度对奥地利黑松离体胚不定芽诱导率具有影响, 其诱导率的高低为 $3/4\text{WPM}>\text{WPM}>1/2\text{WPM}$ 。说明虽然大多数学者认为低盐浓度有利于松树器官的分化, 但也因松树种类不同而不同, 并且适当的盐浓度在松树器官分化过程中是必要的。

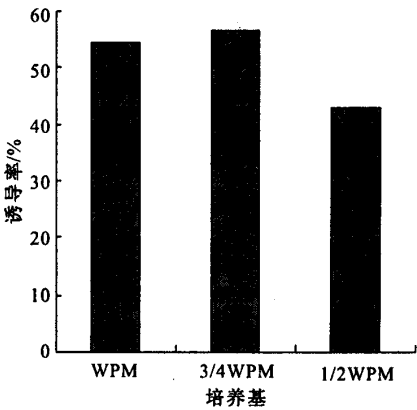


图 1 培养基浓度对外植体诱导不定芽的影响

Fig. 1 Effect of concentration of basal medium on explants to induce adventitious buds

2.3 不同浓度的 6-BA 与 NAA 组合对不定芽诱导的影响

以 3/4WPM 为基本培养基,研究不同浓度的 6-BA 与不同浓度的 NAA 组合对奥地利黑松不定芽诱导的作用。结果表明,6-BA 浓度为 $2.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、NAA 浓度为 0 的培养基上,外植体接种 5 d 后,子叶展开变绿;10 d 后子叶缩短变粗;20 d 后子叶上有新芽产生。

表 2 表明,6-BA 的浓度对不定芽诱导率的影响差异显著。当单独使用 6-BA 时,不定芽的诱导率和分化率在 $2.0\sim3.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间较高,且以 2.0

$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 为最高,生长良好;浓度小于 $2.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,诱导率明显降低,且不定芽出现玻璃化;浓度大于 $4.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,愈伤化严重。然而,NAA 的添加使得各浓度组合的诱导率和分化率均低于不添加 NAA 时的诱导率和分化率,并且奥地利黑松离体胚不定芽诱导率与 NAA 浓度存在负效应。这表明 NAA 的添加对不定芽的诱导具有抑制作用。但 NAA 浓度的提高,有利于外植体愈伤组织的诱导和分化。因此,奥地利黑松离体胚不定芽诱导过程中,3/4WPM+ $2.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 是较为理想的诱导培养基。以上结果,进一步用方差分析得到验证。

表 2 6-BA 与 NAA 组合对外植体不定芽诱导的影响

Table 2 Influence of the combination of 6-BA and NAA on the emergence of adventitious buds

培养基	6-BA / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	NAA / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	接种个数 /个	产生芽外植体数 /个	诱导率 /%	愈伤化 程度 ^①	诱导芽数 /个	分化系数
3/4WPM 万方数据	1	0	17	2	11.77	—	6	3
		0.05	21	1	4.77	—	2	2
		0.1	16	0	0	—	0	0
	2	0	46	26	56.53	—	91	3.5
		0.05	29	5	17.25	—	13	2.6
		0.1	14	3	21.43	—	9	3.0
	3	0	30	6	20.00	—	20	3.3
		0.05	13	2	15.39	+	5	2.5
		0.1	24	4	16.67	+	13	3.3
	4	0	19	1	5.27	+	3	3.0
		0.05	15	0	0	++	0	0
		0.1	33	0	0	+++	0	0

①“—”表示无愈伤,“+”表示愈伤轻微,“++”表示愈伤明显,“+++”表示愈伤严重。

2.4 蔗糖浓度对不定芽诱导的影响

图 2 表明,不同蔗糖浓度对胚分化有很大影响,蔗糖浓度在 $1.5\%\sim3.0\%$ 之间不定芽诱导率与蔗糖浓度呈正相关, 3.0% 时诱导率为 57% ,达到最高,不定芽浓绿,生长健壮;当蔗糖浓度继续上升时,诱导率明显降低,外植体褐化,蔗糖浓度大于 4.5% 时,几乎诱导不出芽,并且胚在刚开始分化就变成乳黄色,子叶不

张开。此结果与油松成熟胚离体培养一致^[13]。

3 结论与讨论

奥地利黑松离体胚培养不定芽诱导有 2 种途径:①子叶不经过愈伤组织阶段,直接形成不定芽;②子叶脱分化形成愈伤组织,然后再分化形成不定芽。试验发现,奥地利黑松离体胚脱分化比较困难,而直接再生不定芽比较容易,诱导率可达 56.53% 。因此,本文只对第 1 种途径进行研究。这与油松成熟胚离体培养不定芽的诱导有相似之处^[14]。

研究表明,基本培养基大量元素浓度对很多松属树种器官分化有很大影响,这依赖于供试的松树品种以及培养基的组成。Von Arnold 和 Eriksson (1981)在利用 Lp 培养基对扭叶松的不定芽分化研究中,发现大于 2 倍的培养基上,胚存活率极低。而所有营养成分(除蔗糖外)的最佳浓度约为 $1/4$ 倍^[7]。Ellis 和 Beck(1980)在黄松的茎芽发生中,发现 $1/2\text{SH}$ 比 SH 更好^[8]。类似结果在 Flinn(1986)等许多学者的研究中均有报道^[5,9]。

以奥地利黑松成熟种胚为外植体,在单独附加

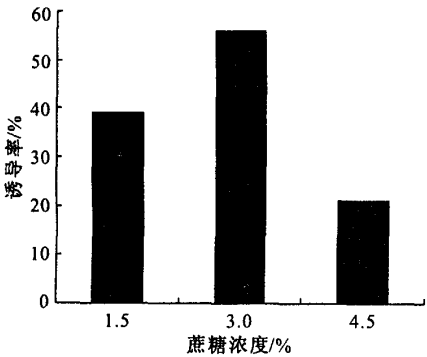


图 2 蔗糖浓度对外植体不定芽诱导的影响

Fig. 2 Effect of concentration of sucrose on the induction of adventitious buds from explants

2.0 mg · L⁻¹ 6-BA 的 3/4WPM 培养基上不定芽诱导率最高,不定芽生长健壮。6-BA 浓度高于 4.0 mg · L⁻¹ 时有利于愈伤组织的产生。NAA 的添加对不定芽的分化有抑制作用,但对愈伤组织的分化与生长有促进作用。WPM 培养基大量元素的使用浓度对不定芽诱导具有影响。

一般情况下,蔗糖浓度为 2.0%~3.0% 在大多数植物的组织培养中均适宜,但不同植物材料对糖类的反应不完全相同。在裸子植物的组织培养中,亦常采用低糖浓度^[10,11]。而白皮松(*Pinus bungeana*) 胚的离体培养中,蔗糖浓度在 3%~7% 范围内对子叶上不定芽的再生有影响,且以 7% 浓度为宜^[12]。而在奥地利黑松离体胚诱导不定芽的培养中,蔗糖浓度在 1.5%~4.5% 范围内对不定芽诱导率影响较大。

与大多数组织培养一样,适宜的蔗糖浓度为 3.0%。因此,奥地利黑松离体胚培养不定芽诱导的最佳配方为:3/4WPM+6-BA 2.0 mg · L⁻¹+30 g · L⁻¹ 蔗糖。

参考文献数据

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] 刑世岩. 松属树种细胞、组织和器官培养名录[J]. 植物生理学通讯, 1990(1): 75-79.
- [4] 李科友, 唐德瑞, 朱海兰, 等. 美国黄松离体胚培养条件下不定芽的形成与根产生的研究[J]. 林业科学, 2004, 40(4): 63-67.
- [5] 黄健秋, 卫志明. 松属树种的组织培养和原生质体培养[J]. 植物学通报, 1994, 11(1): 34-42.
- [6] Saajova T. Adventitious buds development in vitro on mature zygotic embryos of *Pinus nigra* Arn [J]. Biologia-Bratislava, 1993, 48: 105-108.
- [7] Von Arnold S, Eriksson T. Adventitious shoot formation from embryonic explants of *Pinus contorta* [J]. Physiol. Plant, 1981, 59: 872-874.
- [8] Ellis D D, Bilderback D E. Evaluation of somatic embryogenesis for clonal propagation of *Pinus ponderosa* [J]. Plant Physiol, 1984, 115: 201-204.
- [9] 阙国宁, 房建军, 葛万川, 等. 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.
- [10] Smmer H E, Brow C L, Kormank P P. Differentiation of Plantlets in long leaf pine tissue cultured in vitro [J]. Bot. Gaz., 1975, 1(36): 196-200.
- [11] Mihaljevic S, Stipkovic S, Jelaska S. Increase of root induction in *Pinus nigra* explants using agrobacteria [J]. Plant Cell Reports, 1996, 15(8): 610-614.
- [12] 桂耀林. 白皮松离体胚子叶组织分化和不定芽形成[J]. 植物学集刊, 1983(12): 91-96.
- [13] 董丽芬, 王岩. 油松胚培养芽增殖培养基的筛选[J]. 西北林学院学报, 2004, 19(3): 36-37.
- [14] 郑均宝, 潘冬梅, 陈正华. 油松离体胚子叶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.
- [15] 刑世岩. 松属树种细胞、组织和器官培养名录[J]. 植物生理学通讯, 1990(1): 75-79.
- [16] 李科友, 唐德瑞, 朱海兰, 等. 美国黄松离体胚培养条件下不定芽的形成与根产生的研究[J]. 林业科学, 2004, 40(4): 63-67.
- [17] 黄健秋, 卫志明. 松属树种的组织培养和原生质体培养[J]. 植物学通报, 1994, 11(1): 34-42.
- [18] Saajova T. Adventitious buds development in vitro on mature zygotic embryos of *Pinus nigra* Arn [J]. Biologia-Bratislava, 1993, 48: 105-108.
- [19] Von Arnold S, Eriksson T. Adventitious shoot formation from embryonic explants of *Pinus contorta* [J]. Physiol. Plant, 1981, 59: 872-874.
- [20] Ellis D D, Bilderback D E. Evaluation of somatic embryogenesis for clonal propagation of *Pinus ponderosa* [J]. Plant Physiol, 1984, 115: 201-204.
- [21] 阙国宁, 房建军, 葛万川, 等. 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.
- [22] Smmer H E, Brow C L, Kormank P P. Differentiation of Plantlets in long leaf pine tissue cultured in vitro [J]. Bot. Gaz., 1975, 1(36): 196-200.
- [23] Mihaljevic S, Stipkovic S, Jelaska S. Increase of root induction in *Pinus nigra* explants using agrobacteria [J]. Plant Cell Reports, 1996, 15(8): 610-614.
- [24] 桂耀林. 白皮松离体胚子叶组织分化和不定芽形成[J]. 植物学集刊, 1983(12): 91-96.
- [25] 董丽芬, 王岩. 油松胚培养芽增殖培养基的筛选[J]. 西北林学院学报, 2004, 19(3): 36-37.
- [26] 郑均宝, 潘冬梅, 陈正华. 油松离体胚子叶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.

(上接第 71 页)

- [2] Margareta W, Zhu L H. Proceedings of the workshop on high quality birch clonal propagation and wood properties [M]. Alnarp, Sweden. Swedish University of Agricultural Sciences, 2002. 5-13.
- [3] 陶静, 闫淑兰, 刘丹, 等. 国内外桦树育种和遗传转化研究的现状及前景展望[J]. 吉林林业科技, 1998(3): 33-37.
- [4] Ewald D, Naujoks G, Piegert H. Performance and wood quality of in vitro propagated hybrid curly birch (*Betula pendula* × *Betula pendula* var. *carelica* Sok.) [J]. Clone Silvae Genetica, 2000, 49(2): 98-101.
- [5] 陶静, 杨传平, 刘玉喜, 等. 白桦组培再生系统的研究(Ⅰ)——影响因素及培养程序[J]. 东北林业大学学报, 1998, 26(6): 1-5.
- [6] 祖元刚, 孔瑾, 吴双秀, 等. 白桦下胚轴再生系统的建立[J]. 植物研究, 2001, 21(4): 615-619.
- [7] 詹亚光, 杨传平. 白桦愈伤组织的高效诱导和不定芽分化[J]. 植物生理学通讯, 2002, 38(2): 111-114.
- [8] 陶静, 詹亚光, 姜静, 等. 白桦组培再生系统的研究(Ⅰ) [J]. 东北林业大学学报, 1998, 26(5): 6-9.
- [9] 石福臣, 孔瑾, 吴双秀, 等. 叶盘为外植体的白桦的再生[J]. 植物研究, 2001, 21(4): 611-614.
- [10] 陶静, 詹亚光, 由香玲, 等. 白桦组培再生系统的研究(Ⅱ)——组培过程中内源激素的变化[J]. 东北林业大学学报, 1998, 26(6): 6-9.
- [11] 陈正华. 木本植物组织培养及其应用 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1986. 24-99.
- [12] 詹亚光, 杨传平, 王玉成. 白桦组培离体再生的解剖学研究 [J]. 林业科学, 2002, 38(6): 142-145.
- [13] 樊国盛, 邓莉兰. 西南桦组织培养研究[J]. 西南林学院学报, 2000, 20(3): 147-151.
- [14] 谷瑞升, 蒋湘宁, 郭仲琛. 胡杨离体器官发生及试管无性系的建立[J]. 植物学报, 1999, 41(1): 29-33.
- [15] Neuman M C, Preece J E, Van Sambeek J W, et al. Somatic embryo genesis and callus production from cotyledon explant of Eastern black walnuts (*Juglans nigra* L.) [J]. Plant Cell Tiss. and Org. Cult., 1993, 32(1): 9-18.