

## 白皮松胚性愈伤组织诱导因素的研究

李茜, 张存旭\*, 郑瑞杰

(西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨陵 712100)

**摘要:**以不同发育时期的未成熟合子胚为外植体,对白皮松胚性愈伤组织诱导因素进行了研究。结果表明,DCR1 培养基为白皮松胚性愈伤组织诱导的最适培养基;6 mg · L<sup>-1</sup> 2,4-D 和 2 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA 是最优激素组合,诱导率高达 97.22%;最佳采样时期为 6 月 30 日前后。

**关键词:**白皮松;胚性愈伤组织;未成熟合子胚;体胚发生;诱导因素

**中图分类号:**S791.243

**文献标识码:**A

**文章编号:**1001-7461(2006)02-0080-04

### Factors Influencing the Initiation of Embryogenic Callus in *Pinus bungeana*

LI Qian, ZHANG Cun-xu\*, ZHENG Rui-jie

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

**Abstract:** Embryogenic callus was induced from different growth periods of immature embryos of *Pinus bungeana*. Factors affecting initiation were investigated. The results showed that DCR1 was an optimal medium for initiation. The optimal combination of hormone was 6 mg · L<sup>-1</sup> 2,4-D and 2 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA. The inducing rate was 97.22%. The best period of immature zygotic embryo sampling was around June 30.

**Key words:** *Pinus bungeana*; embryogenic callus; immature zygotic embryo; embryogenesis; initiation factors

白皮松(*Pinus bungeana*)又名白骨松,为松科松属常绿乔木,是我国特有树种,仅零散分布在河北、河南、山西、陕西、甘肃等省的中、低山地区。其自然分布的地理范围为 30°02'~38°15'N, 104°01'~113°50'E<sup>[1]</sup>。白皮松在针叶林中生长速度居中,并能形成稳定的林分,是用材、水源涵养的重要树种,但存在种子繁殖速度慢、周期长,扦插生根困难的问题。针叶树体细胞无性系的建立是加速其品种改良和良种繁育的基础。目前虽已有 30 多种松柏类植物诱导出体细胞胚<sup>[2~5]</sup>,但是松属植物的体细胞胚胎发生仍有不少困难,尤其白皮松体胚诱导的研究在国内尚属空白。本试验以白皮松未成熟合子胚为材料,研究了基本培养基、激素、采样时间及培养条件对白皮松胚性愈伤组织诱导的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

在西北农林科技大学校园内选取 10 株白皮松作为采集木,分别于 2004 年 6 月 10、20、30 日及 7 月 10、20 日 5 次分批采摘。在每株树下部的枝条顶端采摘 10 个球果,10 株树共采摘 100 个球果。随机混合放入 4℃冰箱内保存备用。

### 1.2 方法

1.2.1 外植体的消毒 剥出白皮松球果中的种子,用自来水冲洗 3 h,在超净工作台上剥去种皮,用 70%酒精浸泡 30 s,再用 0.1%升汞消毒 3~4 min,无菌水冲洗 4~5 次。无菌条件下用解剖刀剥取种

收稿日期:2005-08-24 修回日期:2005-09-20

基金项目:陕西省科技攻关项目(2001 K01-G7-01)

作者简介:李茜(1981-),女,陕西汉中,在读硕士,主要从事林木遗传育种和林木生物技术工作。

\*通讯作者:张存旭。

胚,水平接种于培养基中。

1.2.2 基本培养基的筛选 以 BM1、DCR1 和改良 MS 为基本培养基,添加  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  2,4-D,  $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA, 另外,改良 MS 中添加  $1450 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  L-谷氨酰胺,其余 2 种培养基中均添加  $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  水解酪蛋白(CH)和  $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  L-谷氨酰胺。以单因素对比试验进行筛选,确定适合胚性愈伤组织形成的最适培养基。每种培养基附加 3.0%蔗糖,0.6%琼脂,pH5.8。

1.2.3 植物激素种类及最佳浓度配比筛选试验 DCR1 培养基上分别添加 3、6、10  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  2,4-D 和 0、2、4  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA,CH 和 L-谷氨酰胺浓度各  $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,确定出 2,4-D 与 6-BA 最佳浓度配比组合。

1.2.4 合子胚采样时期试验 将 5 批采摘的未成熟合子胚接种于 1.2.3 培养基中,暗培养。

1.2.5 光照条件试验 将 2004 年 6 月 30 日所采摘的未成熟合子胚接种于 1.2.3 筛选出的培养基中,分光、暗 2 种培养条件进行培养。

培养室温度为  $(23 \pm 2)^\circ\text{C}$ ,光照强度  $1000 \sim 2000 \text{ lx}$ ,光照周期  $16 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ ,相对湿度  $40\% \sim 70\%$ 。暗培养置于同一温度条件下,无光照,并在培养瓶上覆盖 2 层黑布。

所有处理均为 12 个外植体,重复 3 次。以上各试验中,外植体首先在上述培养基中诱导 3~4 周,再转入低浓度植物激素的培养基中诱导体胚的分化和发育。6 周之后观察记录胚性愈伤组织诱导情况,采用 SAS 软件对数据进行分析处理。

## 2 结果与分析

### 2.1 基本培养基对胚性愈伤组织诱导的影响

培养基种类对胚性愈伤组织诱导率影响较大(图 1)。BM1 培养基仅使 6 月 20 日~7 月 10 日采摘的材料诱导出胚性愈伤组织,且诱导率较低,最高仅为 44.44%;DCR1 和改良 MS 培养基虽都能使 5 个时期采摘的材料诱导出胚性愈伤组织,但 DCR1 培养基的诱导率明显高于改良 MS 培养基,最高可达 94.44%。3 种培养基相比,接种于 DCR1 的未成熟合子胚生长迅速,愈伤组织较大,分化能力较强。因此,对于白皮松未成熟合子胚,DCR1 为诱导胚性愈伤组织的最适培养基。

万方数据

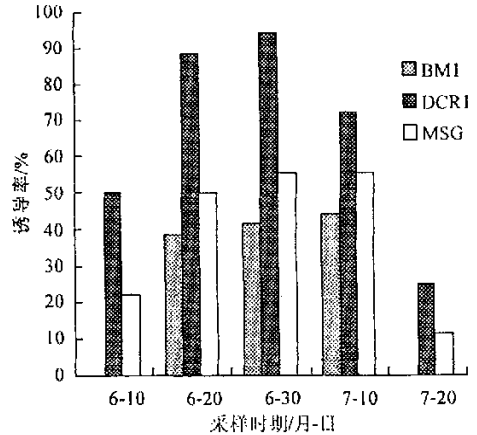


图 1 不同培养基胚性愈伤组织诱导率

Fig. 1 The induction rates of embryogenic callus in different media

### 2.2 植物激素种类及浓度对比对胚性愈伤组织诱导的影响

以 DCR1 为基本培养基,研究 2,4-D 与 6-BA 不同浓度对胚性愈伤组织诱导的影响。试验表明,白皮松胚性愈伤组织在含有较高浓度生长素 2,4-D 和较高浓度的细胞分裂素 6-BA 培养基上诱导率较高(表 1)。

由方差分析(表 2)可知,不同浓度的 2,4-D 和 6-BA 对白皮松胚性愈伤组织的诱导均存在极显著差异,2,4-D 和 6-BA 的组合存在交互作用并对其胚性愈伤组织诱导有显著差异。进一步做多重比较

$$(LSR_{0.05} = SSR_{0.05} = \sqrt{\frac{22.958}{3}} = 9.433), \text{得出 } 6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 2,4-D} + 2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ 6-BA 为诱导胚性愈伤组织的最佳激素浓度组合。}$$

### 2.3 未成熟合子胚不同采样时期对胚性愈伤组织诱导的影响

将不同时期采摘的未成熟合子胚接种于添加不同浓度 2,4-D 和 6-BA 的 DCR1 培养基中(表 1)。

白皮松未成熟合子胚采样时期对胚性愈伤组织的诱导率影响较大,由图 2 可知,6 月 30 日采摘合子胚的胚性愈伤组织诱导率明显高于其他 4 个时期,平均诱导率为 76.23%。经方差分析(表 2)得出,不同采样时期对胚性愈伤组织诱导率存在极显著差异,进一步做多重比较  $(LSR_{0.01} = SSR_{0.01} = \sqrt{\frac{22.958}{3}} = 12.559)$ ,可知 6 月 20 日和 6 月 30 日采摘的未成熟合子胚的胚性愈伤组织诱导率最高。

表 1 不同浓度组合及不同采样时期对胚性愈伤组织诱导率的影响

Table 1 The induction rates of embryogenic callus on medium with different concentrations and combinations of 2,4-D, 6-BA at different sampling dates

2,4-D /mg · L <sup>-1</sup>	6-BA /mg · L <sup>-1</sup>	诱导率/%				
		6 月 10 日	6 月 20 日	6 月 30 日	7 月 10 日	7 月 20 日
3	0	13.89	38.89	44.44	25.00	11.11
	2	41.67	83.33	83.33	41.67	25.00
	4	44.44	86.11	91.67	44.44	19.44
6	0	16.67	44.44	41.67	22.22	8.33
	2	55.56	86.11	97.22	69.44	19.44
	4	55.56	88.89	94.44	69.44	25.00
10	0	19.44	38.89	41.67	19.44	8.33
	2	55.56	91.67	94.44	69.44	25.00
	4	58.33	88.89	97.22	75.00	22.22

注:表中数据为 3 次重复的平均值

表 2 不同浓度组合及不同采样时期胚性愈伤组织诱导率方差分析

Table 2 The variance analysis of the induction rates of embryogenic callus on medium with different concentrations and combinations of 2,4-D, 6-BA at different sampling dates

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	显著性
2,4-D	499.308	2	249.654	10.875	* *
6-BA	13 733.837	2	6 866.919	299.112	* *
采样时间	20 467.576	4	5 116.894	222.884	* *
2,4-D×6-BA	303.189	4	75.797	3.302	*
2,4-D×采样时间	373.322	8	46.665	2.033	
6-BA×采样时间	1 696.292	8	212.036	9.236	* *
误差	367.322	16	22.958		
总和	37 440.847	44			

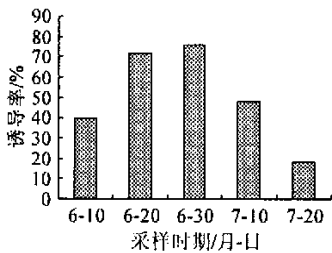


图 2 不同采样时期胚性愈伤组织诱导率

Fig. 2 The induction rates of embryogenic callus in different sampling dates

观察结果显示,6 月 10 日的未成熟合子胚初代培养 20 d 后才有少量胚性愈伤组织产生,继代后生长不明显,有的甚至停止生长;6 月 20 日和 30 日的  
万方数据

未成熟合子胚培养 10 d 左右,即产生了大量白色透明或半透明的颗粒状愈伤组织。经过 2 次继代之后,6 月 20 日接种的外植体所产生的胚性愈伤组织颜色逐渐变成深褐色,生长缓慢,而 6 月 30 日接种的外植体所产生的胚性愈伤组织生长健壮,且颜色变化不明显,有的愈伤组织已经分化成早期原胚。对于成熟度较高的后 2 批材料而言,7 月 10 日接种的合子胚 1 个月之后,才在子叶和胚轴的连接部分有透明、具粘性的颗粒状愈伤组织生成,其分化能力较差;7 月 20 日的合子胚接种 1 周左右,整个胚呈现伸长生长,子叶微微张开,淡绿色,基本无愈伤组织的形成。由此可知,6 月 30 日前后为诱导胚性愈伤组织的最佳采样时期。

2.4 光照条件对胚性愈伤组织诱导的影响

方差分析表明,光照培养条件对胚性愈伤组织诱导率无显著影响( $F_{1,4}=0.250, P=0.6431>0.05$ )。但是观察发现,随着继代次数的增加,光照条件下产生的胚性愈伤组织褐化严重,并逐步变绿,生长过快,不利于体胚形成。

表3 不同光照培养条件下胚性愈伤组织诱导率

Table 3 The induction rates of embryogenic callus in different light conditions

培养条件	外植体数	诱导胚数	诱导率
	/个	/个	/%
光培养	36	33	91.67
暗培养	36	34	94.44

注:表中数据为3次重复的平均值

3 结论与讨论

培养基的种类和浓度对植物愈伤组织及体细胞胚的诱导至关重要,合适的培养基对针叶树体细胞的成功诱导起关键作用。DCR1培养基是白皮松胚性愈伤组织诱导的最适培养基,可能由于该培养基大量元素中的 $\text{NO}_3^-$ 和 $\text{NH}_4^+$ 的总量较低。这与一些关于松柏类植物体胚诱导需要低浓度 $\text{NO}_3^-$ 和 $\text{NH}_4^+$ 的培养基的相关报道<sup>[6-8]</sup>一致。

植物激素的诱导调控作用在体胚发生理论和实践方面都占据重要的地位。大量试验表明激素种类和浓度是诱导胚性愈伤组织的最重要因素<sup>[9]</sup>。2,4-D和6-BA是松属植物未成熟合子胚诱导胚性愈伤组织常用的2种激素<sup>[7]</sup>。试验表明,6 mg·L<sup>-1</sup>2,4-D与2 mg·L<sup>-1</sup>6-BA是白皮松胚性愈伤组织诱导的最佳组合。高浓度2,4-D的使用与Jones等<sup>[10]</sup>认为松属植物的胚性愈伤组织诱导要求有较高浓度的2,4-D结论相一致。

松属植物胚性愈伤组织的诱导严格依赖于外植体发育时期的选择。一般来说,幼嫩组织的诱导率较好。Becwar等<sup>[11]</sup>研究了松属植物和云杉属植物合子胚发育时期与胚性愈伤组织诱导频率之间的关系,发现子叶前期胚是最适合松属植物胚性愈伤组

织的诱导。不同发育时期的未成熟合子胚诱导率差异很大。本试验结果表明,6月30日前后为白皮松未成熟合子胚诱导胚性愈伤组织的最佳采样时间。

暗培养对体胚发生过程中的胚性愈伤组织的诱导及胚状体的发生、发育和成熟常十分关键<sup>[9]</sup>。我们在利用DCR1培养基进行白皮松胚性愈伤组织诱导研究时发现,虽然在胚发生愈伤组织初期,光照和黑暗条件下相差不大,但是随着继代次数的增加,光照条件下产生的胚性愈伤组织褐化并局部变绿,且愈伤组织生长过快,这对于以后的体胚形成不利,这与黄键秋等<sup>[12]</sup>对马尾松体胚发生的研究相一致。

参考文献:

[1] 李斌,顾万春. 白皮松分布特点与研究进展[J]. 林业科学研究,2003,16(2):225-232.

[2] 祝朋芳,罗凤霞,陈长青,等. 日本落叶松胚性愈伤组织的诱导及体胚的形成[J]. 辽宁农业科学,2001,(5):46-47.

[3] 贺凤美,王力,刘阳. 落叶松体细胞发生研究进展[J]. 辽宁林业科技,2000,(6):33-35.

[4] 郑均宝,王进茂,杜克久,等. 油松体细胞无性系的建立[J]. 遗传学报,2000,24(1):1-6.

[5] 唐巍. 火炬松胚性愈伤组织诱导和植株再生的研究[J]. 林业科学,1998,34(3):115-119.

[6] 金晓玲,何平. 乔木树种体细胞胚胎发生的研究与应用[J]. 林业科学研究,2003,16(3):343-350.

[7] Li X Y, Huang F H, Gbur E F. Effect of basal medium, growth regulators and phytagel concentration on initiation of embryogenic cultures from immature zygotic embryos of loblolly pine[J]. Plant Cell Reports,1998,17:298-301.

[8] Ellis D D. Stable transformation of *Picea glauca* by particle acceleration[J]. Bio. Technology,1993,11:84-89.

[9] 翟晓巧,翟翠娟,刘新风. 木本植物体细胞胚胎发生及植株再生研究现状[J]. 河南林业科技,2004,24(2):7-9.

[10] Jones N B, Van stadent J. Plantlets production from somatic embryo of *Pinus patula* [J]. Plant Physiol, 1995, 145: 519-525.

[11] Becwar M R, Nagamani R, Wann S R. Initiation of embryogenic cultures and somatic embryo development in loblolly pine (*Pinus taeda*) [J]. Can. J. For. Res, 1990, 20: 810-817.

[12] 黄键秋,卫志明. 针叶树体细胞胚胎发生的研究进展[J]. 植物生理学通讯,1995,31(2):85-90.