

华山松胚性愈伤组织的诱导研究

逯 昀¹, 孙景梅^{1,2}, 侯 佳²

(1. 商丘职业技术学院 园林食品加工系, 河南 商丘 476000; 2. 西南林学院 资源学院 云南 昆明 650224)

摘 要:以华山松的成熟胚为试材,采用正交实验设计方法,研究培养基类型及所需激素浓度对胚性愈伤组织诱导的影响,寻求其形成条件。结果表明:培养基成分为 LM+2,4-D 2 mg/L+BA 2 mg/L+CH 1 000 mg/L+肌醇 1 000 mg/L+Gln 500 mg/L 可诱导华山松成熟胚愈伤组织的形成,其中类似胚性愈伤组织的诱导率达 60%。培养 30 d 后将愈伤组织转接至与诱导培养基组分相同的新鲜培养基,可观察到愈伤组织生长良好并发生体积上的扩增,但没发生分化。

关键词:华山松;成熟胚;组织培养

中图分类号:S 791.241 **文献标识码:**A **文章编号:**1001—0009(2010)11—0155—03

华山松(*Pinus armandii*)为松科,松属,单维管束亚属中白松组(Section *Strobus*)的高大乔木,耐干旱、耐寒,是南部高海拔地区重要的脂材两用树种。

华山松高大挺拔,针叶苍翠,是优良的庭院绿化树种,也是高山风景区优良风景林树种之一。其根系发达,兼具涵养水源、保持水土、保护与美化环境的显著效能。树干材质轻、干缩小、纹理直、结构细、耐腐、干燥及加工性能良好,是建筑、家具、木模的良好用材。

由于华山松种子的颗粒大,散播能力差,下种范围仅局限在母树周围。同时,种子又常为鼠类和鸟类所食,又因常采摘作为干果,致使种源大大减少,是华山松天然更新不良的原因。

而且华山松的实生苗变异较大,只有极少数能保持母树的优良性状,且林相参差不齐,其结实间期长,种子产量较低。其传统的无性繁殖方式是扦插和嫁接,但繁殖系数极低。因此进行华山松的组织培养研究,建立遗传改良和快速繁殖体系在理论和实践上均具有重要的意义。

松类植物进行器官发生型组织培养的困难在于生根难,而通过体细胞胚胎的组织培养则可绕过这一难题。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选择均匀、饱满的华山松成熟种子为试验材料,以成熟胚为外植体进行胚性愈伤组织诱导的研究。试验选择的培养基为 LM、1/2LM。试验选择的生长调节剂为 BA、2,4-D;添加物为水解酪蛋白、谷氨酰胺和肌醇。

第一作者简介:逯昀(1975-),女,硕士,讲师,现主要从事园艺与园林方面教学工作。

收稿日期:2010-02-10

主要仪器设备有高压灭菌锅、无菌超净台、干燥箱、电子天平、真空抽滤器及相关的玻璃器皿和药品等。

1.2 试验方法

将选择好的华山松种子在常温下浸泡 7~8 h,充分吸胀后剥去种皮。先用 75%酒精浸泡 0.5~1 min,无菌蒸馏水冲洗 3 次,每次 3 min;再用 0.1% HgCl₂ 表面消毒 10 min,无菌水冲洗 3 次,每次 3 min。然后在超净台上剥除胚乳,取出成熟胚待用。谷氨酰胺的添加需在超净台上进行,将配置好的溶液倒入真空抽滤器,再将过滤好的溶液倒入已配置好的灭菌后的培养基中。

以 LM、1/2LM 为基本培养基,附加不同含量的一定浓度的 2,4-D 和 BA,在 25℃暗培养条件下进行华山松胚性愈伤组织诱导。同时,在所有试验中,每升培养基附加蔗糖含量 30 g/L、琼脂含量 4 g/L、水解酪蛋白含量 1 000 mg/L、肌醇含量 1 000 mg/L、谷氨酰胺含量 500 mg/L,pH(5.8~6.2)。每个培养基接种的胚个数为 0.5~1 个,每组重复 10 次。

表 1 胚性愈伤组织诱导的因素水平表

试验因素	试验水平	
	1	2
A(基本培养基)	LM	1/2LM
B(2,4-D/mg·L ⁻¹)	2	3
C(BA/mg·L ⁻¹)	1	2

选用三因素二水平的正交设计方案,三因素分别为培养基类型、BA 含量、2,4-D 含量;二水平分布见表 2;根据三因素二水平确定选用的正交组合见表 2。

表 2 胚性愈伤组织诱导的三因素二水平正交实验设计表

编号	培养基类型	2,4-D/mg·L ⁻¹	BA/mg·L ⁻¹
1	LM	3	1
2	LM	2	2
3	1/2LM	2	1
4	1/2LM	3	2

2 结果与分析

2.1 胚性愈伤组织的诱导

2.1.1 愈伤组织诱导率的统计 试验共重复了3组,现将培育2周后,愈伤组织的诱导率统计见表3。培育4周后,将愈伤组织转至与诱导培养基组分相同的新鲜培养基,统计愈伤组织的诱导率及愈伤组织生长情况见表4.5。由表6可以发现生长素(2,4-D)与细胞分裂素(BA)的浓度比对外植体脱分化形成胚性愈伤组织,起着关键的控制作用。对于LM培养基,随着2,4-D浓度的升高,愈伤组织的颜色逐渐变淡,质地由紧密逐渐变得疏松,表面由干燥变得湿润,说明适当提高2,4-D的浓度,有利于胚性愈伤组织的生成;而随着BA浓度的升高,则不利于胚性愈伤组织的生成。

表3 2周后不同培养基和生长调节剂条件下
华山松愈伤组织诱导率的统计

编号	培养基	2,4-D		BA		愈伤组织诱导率/%			平均诱导率/%
		/mg·L ⁻¹ / mg·L ⁻¹		/mg·L ⁻¹ / mg·L ⁻¹		I	II	III	
1	LM	1	3	60.0	50.0	60.0	50.0	60.0	57.0
2	LM	2	2	50.0	70.0	80.0			67.0
3	1/2LM	1	2	50.0	60.0	60.0			57.0
4	1/2LM	2	3	50.0	50.0	60.0			53.0

注:3组分3个时间段开始:I(第1组)2009年2月25日接种 II(第2组)2009年3月17日接种 III(第3组)2009年4月15日接种 下同。

表4 4周后愈伤组织诱导率统计表

编号	培养基	2,4-D		BA		愈伤组织诱导率/%			平均诱导率/%
		/mg·L ⁻¹ / mg·L ⁻¹		/mg·L ⁻¹ / mg·L ⁻¹		I	II	III	
1	LM	1	3	30.0	20.0	20.0			23.0
2	LM	2	2	40.0	60.0	80.0			60.0
3	1/2LM	1	2	40.0	50.0	60.0			50.0
4	1/2LM	2	3	30.0	40.0	40.0			37.0

表5 4周后愈伤组织生长状况比较

处理	褐化率	愈伤颜色	愈伤质地	转接后愈伤状态
1	0.34	浅黄色	疏松	浅黄色至黄色,不透明,紧密,表面结晶状,干燥
2	0	浅黄色	疏松	浅黄色至白色,半透明,疏松,粘质状
3	0	浅绿色	疏松	浅绿色至浅黄色,半透明,疏松,粘质状
4	0.16	黄色	紧密	黄色,不透明,紧密,表面干燥

表6 不同培养基及生长调节剂
对愈伤组织诱导影响极差表

	培养基		2,4-D/mg·L ⁻¹		BA/mg·L ⁻¹	
	LM	1/2LM	1	2	2	3
T/%	41.5	43.5	36.5	48.5	55.0	30.0
极差/%	2		12		25	

注:T为因素或水平愈伤组织平均诱导率的平均值。

2.1.2 不同培养基及生长调节剂对胚性愈伤组织诱导的影响 由表7可知,不同浓度的BA对华山松愈伤组织形成的影响最显著,其次是2,4-D的影响。

2.2 胚性愈伤组织的形态学观察

从相关资料查知,松属树种诱导形成的胚性愈伤组织一般为:白色、半透明丝状、黏度高、湿度大且相对

疏松。

而华山松成熟胚诱导形成的愈伤组织主要有二种类型:一种颜色为浅黄色或黄色,透明或不透明,结构疏松,表面粗糙或显结晶状。这种愈伤组织转接至与诱导培养基组分相同的新鲜培养基上只发生体积上的扩增没有发生分化。为非胚性愈伤组织,即只具有细胞增殖能力,而没有胚胎发生能力的愈伤组织。

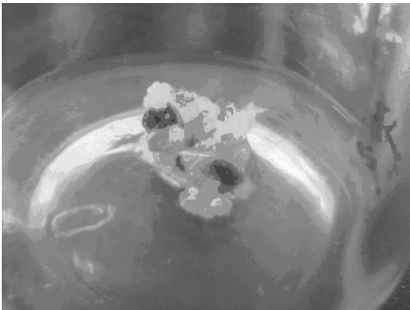


图1 华山松非胚性愈伤组织



图2 华山松类似胚性愈伤组织

另一种颜色为浅白色或白色,半透明,结构疏松,成粘质状,表面呈透明丝状。将这种愈伤组织转接至与诱导培养基组分相同的新鲜培养基上会发生愈伤状况的改变,如颜色的加深或变淡,质地的改变等,为胚性愈伤组织,即除具有细胞增殖能力外,还具有分化能力。

现以该标准评价所选择的愈伤组织是否符合胚性愈伤组织的要求。根据试验结果,可以判定第1、3、4组为非胚性愈伤组织,第2组为类似胚性愈伤组织。

3 结论与讨论

3.1 结论

当培养基为LM+2,4-D 2 mg/L+BA 2 mg/L+CH 1 000 mg/L+肌醇 1 000 mg/L+Gln 500 mg/L时,可诱导华山松类似胚性愈伤组织的生成,诱导率为60%。将诱导出的愈伤组织转至与诱导培养基组分相同的新鲜的培养基,可发现培养一段时间后,部分培养基中愈伤组织发生褐化而死亡,剩余培养基虽生长良好并发生体积上的扩增,但并没有发生分化。BA浓度的

不同对华山松愈伤组织诱导影响最大, 其次是2,4-D的影响。在华山松胚性愈伤组织诱导过程中, 对于LM+2,4-D 2 mg/L+BA 2 mg/L+CH 1 000 mg/L+肌醇1 000 mg/L+Gln 500 mg/L培养基来说, 细胞分裂素(BA)与生长素(2,4-D)的浓度比对外植体脱分化形成胚性愈伤组织, 起着重要的调控作用。而对于1/2LM+2,4-D 2 mg/L+BA 2 mg/L+CH 1 000 mg/L, 肌醇1 000 mg/L+Gln 500 mg/L培养基来说, 仍需调整各激素之间的浓度比, 探寻利于胚性愈伤组织的诱导的配比。

3.2 讨论

3.2.1 培养基的选择 基本培养基的组成及其使用浓度对松柏类植物愈伤组织的诱导至关重要。目前对针叶树体细胞胚胎发生最常用的基本培养基为MS、DCR、LM、GD、SH、LP 以及各种改良的MS培养基等。所有松柏类植物体细胞胚诱导的基本培养基的一个共性是, 其大量元素中的NO₃⁻及NH₄⁺的总量较低。试验证明只有明显降低NO₃⁻及NH₄⁺的含量时, 才能促进体细胞胚的发育和诱导产生更多的分化芽。该试验选用LM和1/2LM培养基, 对于其它类型的培养基是否也适用于华山松胚性愈伤组织的诱导仍需要进一步的试验。

3.2.2 植物生长调节剂及其添加 植物生长调节剂的种类和浓度对松柏类植物胚性愈伤组织的诱导具有重要作用。2,4-D、NAA、BA 及 KT 等常用于针叶树体细胞胚胎发生初期, 尤其是2,4-D是诱导体细胞胚胎发生的必需条件, 是胚性感受态表达的重要因子。研究表

明, 多数松属树种的胚性愈伤组织诱导总是在含高水平的生长调节剂2,4-D或NAA (2.0 ~ 10.0 mg/L), BA 或KT (1.0 ~ 5.0 mg/L)的半固体培养基上起始。有机添加物如椰乳、酵母提取液、水解酪蛋白、水解乳蛋白、谷氨酰胺及天门冬酰胺等也可以促进松属的胚性愈伤组织的形成。试验中得到类似愈伤组织的结果表明, 对于生长调节剂及其添加物的选择以及其各自浓度的选择和配比仍有待进一步研究。

参考文献

[1] 黄健秋, 卫志明. 马尾松成熟合子胚的体细胞胚胎发生和植株再生[J]. 植物学报, 1995, 37(4): 289-294.
[2] 黄健秋, 卫志明. 云南松成熟胚的体细胞胚胎发生研究[J]. 实验生物学报, 1995, 28(4): 371-379.
[3] 黄健秋, 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.
[4] 黄学林, 李枚菊. 高等植物组织离体培养的形态建成及其调控[M]. 北京: 中国科学出版社, 1995.
[5] 唐巍, 欧阳藩, 郭仲深. 火炬松成熟合子胚培养直接器官发生和植株再生[J]. 云南植物研究, 1997, 19(3): 285-288.
[6] 唐巍, 欧阳藩, 郭仲深. 湿地松体细胞胚胎发生和植株再生[J]. 植物资源与环境, 1997, 6(2): 8-11.
[7] Abdulla A A, Yeoman M M, Grace J. In vitro adventitious shoot from embryonic and cotyledonary tissues of Pinus brutia Ten [J]. Plant Cell Tissue Organ Culture, 1985(5): 35-44.
[8] Jain S M, Gupta P K, Newton R J. Somatic embryogenesis in woody plants[M]. Kuler Acad Pub, Dordrecht, 1995.
[9] 邢世岩. 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.

Induced Research on the Embryos Callus Tissue of *Pinus armandii*

LU Yun¹, SUN Jing-mei^{1,2}, HOU Jia²

(1. Shang qiu Vocational and Technical College, Gardening and Food Processing Department, Shangqiu, Henan, 476100; 2. Institute of Resources Southwest Forestry University, Kunming Yunnan 650224)

Abstract: This experiment by the mature embryo of *Pinus armandii* to the material, with the aid of the orthogonal test design method, to research the influence of culture-medium types and the hormone density of the needing to the injury which the embryo-organization induced sought the condition which it formed. The results indicated the culture medium ingredient LM+2,4-D 2 mg/L+BA 2 mg/L+hydrolisis casein 1 000 mg/L+phaseomannite 1 000 mg/L+Gln 500 mg/L might induce the injury of the mature embryo of *Pinus armandii*, the inductivity of the similar embryo-injury organization reached 0.6. Raises one month later, recovering the wound to transfer to the same-component and fresh induction culture medium might observe the injury of the organization to grow on good concurrent and volume increasing, but had not occurred splits up.

Key words: *Pinus armandii*; the mature embryo; tissue culture