

培养基和生长调节剂对油松离体胚不定芽诱导的影响

王永波, 唐德瑞, 马 佩

(西北农林科技大学 林学院 陕西 杨凌 712100)

摘 要:以油松成熟胚为外植体, 对影响不定芽诱导分化的各因子做进一步试验。结果表明: 油松成熟胚不定芽诱导的最佳组合为 1/2MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L, 诱导率为 59.3%。对其进行趋势面分析, 6-BA 浓度为 1.7 mg/L, NAA 浓度为 0.30~0.35 mg/L 时不定芽诱导率可达 65%。诱导阶段平均增殖率为 8, 愈伤组织增殖培养后平均增殖率最大可达 13。

关键词:油松; 成熟胚; 组织培养; 不定芽

中图分类号:S 791.254 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)12-0149-03

油松是我国北方重要的造林树种^[1], 目前生产中因良种不足, 繁殖困难, 采用良种造林比例偏低; 组织培养技术是解决良种繁殖的主要途径之一^[2]。油松成熟胚组织培养虽有报道^[3-4], 但均未能形成生产中可应用的系统技术。高效、快捷的油松植株再生体系是无性繁殖及获得转基因植株的前提^[5]; 通过成熟胚派生的愈伤组织诱导产生不定芽获得再生植株技术的完善和发展, 对油松无性繁殖具有重要意义。该试验旨在进一步探讨优化油松成熟合子胚不定芽诱导分化技术。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为产自内蒙的优质成熟油松种子, 2009 年 2 月购于杨凌市场。

1.2 试验方法

1.2.1 种子的预处理和外植体的选择 种子使用前在 4℃左右环境下砂藏 48 h。选择均匀、饱满的种子, 经浸泡充分, 吸胀后剥去种皮, 用 70%的酒精消毒 30 s, 无菌水中冲洗 2 次, 再重复 1 次后, 用升汞 (0.1% HgCl₂) 浸泡 5 min, 再重复 1 次, 用无菌水冲洗 3~5 次, 放入无菌滤纸覆盖的培养皿中, 在无菌条件下用小解剖刀剥去胚乳。分别以完整胚和部分胚为外植体, 按胚极性方向垂直接种到培养基中。

1.2.2 不定芽的诱导 萌发培养基: 以油松的成熟胚为

外植体, 分别采用较适合油松胚培养的 DCR、GD、SH、1/2MS、WPM 5 种基本培养基^[6]。不同培养基和生长调节剂对不定芽诱导的影响: 选择 1/2MS、DCR 和 WPM 基本培养基, 附加不同浓度的 6-BA (0.5、1.5、3.0 mg/L) 和 NAA (0.05、0.2、0.5 mg/L)^[7-8]。采用 L₉ (3⁴) 正交实验设计, 共 9 个处理。诱导率=(产生不定芽的胚数/接种胚的总数)×100%; 诱导增殖率=(诱导产生不定芽的总数/产生不定芽的胚数)×100%。

1.2.3 不定芽继代培养 选择 SH 培养基为不定芽增殖培养基, 附加 6-BA 0.1 mg/L, 2 周后转入生长培养基。不定芽生长以 SH 基本培养基, 附加 2 g/L 活性炭, 20 g/L 蔗糖^[3]。增殖率=(增殖培养后不定芽的总数/产生不定芽的胚数)×100%。

1.2.4 培养条件 试验中无特别说明培养基均附加 5.5 g/L 琼脂粉, 30 g/L 蔗糖, pH 5.8, 121℃条件下灭菌 20 min, 每个处理接种 30~35 瓶, 重复 2 次。试验材料置于温度 (25±2)℃、光照 1 500~2 000 lx 条件下光照时间 14 h/d 进行培养。定期观察记录, 6 周后统计试验结果。

1.2.5 数据处理 采用 SPSS 及 STATISTICA 5.0 软件处理数据。

2 结果与分析

2.1 培养基种类对外植体萌发生长的影响

以油松成熟胚为外植体, 将外植体接种于选择的培养基中, 3 d 后子叶张开并开始变绿, 2 周后子叶伸长成针状叶, 胚轴明显伸长, 部分胚根生长产生 1 条或多条细根, 6 周后有 30%~45% 发育成完整植株, 另一部分则形成无根苗 (表 1), 油松成熟胚在 SH、1/2MS 和 DCR 培养基上生长较好, 根器官萌发率较高, 最适萌发培养基为 SH 培养基。但在诱导愈伤组织及不定芽过程中, 离

第一作者简介: 王永波 (1983-), 男, 在读硕士, 现从事森林培育工作。

通讯作者: 唐德瑞 (1961-), 男, 教授, 现主要从事森林培育及生态学的教学和研究工作。E-mail: tangderui@sina.com。

基金项目: 国家林业局“948”资助项目 (980405)。

收稿日期: 2010-03-03

体胚生长快但产生愈伤较少。

2.2 不同培养基和生长调节剂对外植体不定芽诱导的影响

将成熟合子胚接入到 $L_9(3^4)$ 正交实验设计的不定芽培养基中, 2 d 后子叶张开, 1 周后子叶变绿膨大, 胚轴呈褐绿色, 胚根部膨大。2 周后子叶或子叶—胚轴肥厚膨大并显粗糙。3 周后子叶及近子叶的胚轴上产生绿色或黄褐色的愈伤组织, 并向四周扩散, 形成不定芽原基, 胚根无明显变化。6 周后致密的黄褐色愈伤组织上形成大量的不定芽群丛, 部分分化出带有茎段的不定芽, 在其下部形成透明疏松的愈伤组织(图 1)。

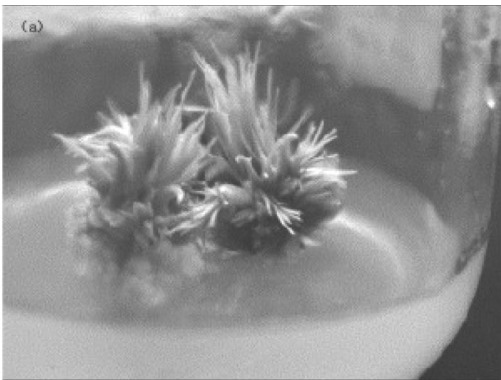


图 1 愈伤组织产生的不定芽丛

表 1 培养基对油松成熟胚萌发的影响

培养基	萌发率 /%	成苗率 /%	生长表现
1/2MS	92.3	39.5	子叶深绿展开, 胚轴伸长增粗, 有短根生成 植株健壮, 生长较快
SH	93.3	43.3	子叶深绿展开, 胚轴伸长增粗, 根白而长, 植株健 壮, 生长很快
DCR	87.1	35.4	子叶绿色展开, 胚轴伸长增粗, 有短根生成 植株健壮, 生长较快
GD	89.6	30.7	子叶浅绿展开, 胚轴伸长增粗, 根细弱, 植株长势较弱
WPM	81.5	36.8	子叶绿色展开, 胚轴伸长增粗, 有短根生成 植株健壮, 生长较快

表 2 表明, 不同处理间不定芽的诱导率存在较大差异, 不定芽诱导效果最好的组合为 1/2MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L, 诱导率可达 59.3%, 平均诱导增殖率 8。DCR+6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L 诱导效果较好, 诱导率为 53.3%, 平均诱导增殖率 7。

表 3 表明, 不同水平培养基和 6-BA 对油松成熟胚不定芽诱导率的差异显著($P<0.05$), NAA 差异不显著。

表 4 表明, 油松成熟胚不定芽诱导率与培养基及 6-BA 浓度呈正相关关系, 与 NAA 浓度呈负相关关系。基于相偏相关分析结果, 培养基对不定芽诱导率影响显

著, 偏相关系数培养基(0.788)> 6-BA(0.632)> NAA(0.306)。说明基本培养基种类是影响油松成熟胚不定芽诱导率的主要因素, 6-BA 次之, NAA 浓度不宜太高。

表 2 不同培养基和生长调节剂对油松成熟胚诱导不定芽的影响及多重比较

培养基	6-BA /mg·L ⁻¹	NAA /mg·L ⁻¹	接种外 植体数 /个	诱导率/%	增殖率 /平均	多重比较		
						因素	水平	均值
1/2MS	0.5	0.05	56	32.1	6	培养基	1/2MS	46.2a
1/2MS	1.5	0.20	64	59.3	8		DCR	42.5a
1/2MS	3.0	0.50	55	47.3	7		WPM	16.9b
DCR	0.5	0.20	60	28.3	5	6-BA	0.5	20.1b
DCR	1.5	0.50	48	45.8	6		1.5	44.7a
DCR	3.0	0.05	60	53.3	7		3.0	40.8a
WPM	0.5	0.50	44	0	0	NAA	0.05	38.1a
WPM	1.5	0.05	38	28.9	4		0.2	36.5a
WPM	3.0	0.20	64	21.9	4		0.5	31.0a

注: 多重比较中不同因素各水平的平均诱导率均值据值后不同小写字母表示二者差异显著($P<0.05$)。

表 3 不同培养基和生长调节剂对不定芽诱导影响试验结果方差分析

变异来源	离差平方和	自由度	均方	F(值)	显著水平
校正模型				31.630	0.031
截距	11 158.401	1	11 158.401	798.486	0.001
培养基	1 524.629	2	762.314	54.551	0.018
6-BA	1 045.069	2	522.534	37.392	0.026
NAA	82.382	2	41.191	2.948	0.253
误差	27.949	2	13.974		
总计	13 838.430	9			
校正的总计	2 680.029	8			

表 4 不定芽诱导率与不同培养基及生长调节剂间相关性分析

不定芽诱导率	培养基		
	偏相关系数	6-BA	NAA
	P-值	0.085	0.128
	df 自由度	5	5

通过图 2 趋势面分析, 当 6-BA 浓度为 1.7 mg/L, NAA 浓度为 0.3~0.35 mg/L 时不定芽诱导率最高 65%。

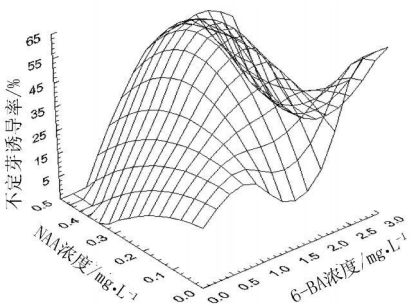


图 2 油松成熟胚不定芽诱导率随 6-BA 和 NAA 浓度变化趋势

2.3 不同外植体类型的不定芽诱导

分别以油松完整胚和部分胚为外植体, 将完整胚及经

切段后部分胚接种到优选出的 1/ 2MS+6-BA 1.5 mg/ L+NAA 0.2 mg/ L 培养基条件上(结果见表 5), 只有完整的合子胚能诱导出不定芽, 切段胚有愈伤组织出现, 但经继代培养无不定芽产生。

表 5 外植体对油松不定芽诱导的影响

外植体种	愈伤率 %	接种后表现
成熟胚	78.7	在子叶或子叶—胚轴部形成愈伤组织, 并有大量不定芽形成
子叶—胚轴	47.2	子叶变绿, 伸长卷曲, 有少量愈伤组织出现, 无不定芽产生
下胚轴	27.1	胚轴伸长, 并有少量愈伤, 但逐渐变黑死亡

2.4 不定芽的继代培养

将外植体产生的不定芽丛切割下来, 形成茎段的单独培养, 接种适于油松胚萌发和生长的 SH 培养基上附加 6-BA 0.1 mg/ L。1 周后不定芽丛及黄色较致密的愈伤组织上可生长出新的不定芽, 白色疏松愈伤组织则无不定芽产生。不定芽及愈伤组织经增殖培养后, 平均增殖率最大可达 13。2 周后将不定芽转入附加 2 mg/ L 活性炭的 SH 培养基, 进行伸长生长, 4 周后不定芽高度可达 1.1~5.6 cm。

3 结论

以油松成熟胚为外植体, SH 培养基更适于油松的直接器官发生及植株再生, 萌发率 93.3%, 成苗率 43.3%。

油松成熟合子胚通过愈伤组织再分化形成不定芽, 基本培养基种类是影响油松成熟胚不定芽诱导率的主要因素, 生长调节剂次之。油松成熟合子胚离体培养条件下 1/ 2MS 附加 6-BA 1.7 mg/ L 及 NAA 0.3~0.35 mg/ L 不定芽诱导率最高为 65%。

继代培养可进一步提高不定芽的增殖率, 平均增殖率最高可达 13。

参考文献

[1] 齐力旺, 杨云龙, 韩素英, 等. 油松的无性繁殖与离体培养研究 [J]. 林业科技通讯, 1996(11): 12-14.

[2] 陆燕元, 樊军锋. 美国花旗松离体胚愈伤组织诱导与茎芽分化的研究 [J]. 西北林学院学报, 2005, 20(2): 96-99.

[3] 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, 1996, 23(4): 307-314.

[4] 贺娜, 郑彩霞, 周巧云. 油松成熟胚的不定芽诱导及植株再生试验 [J]. 林业科学, 2009, 16: 145-148.

[5] Attree S. M., Fowke L. C. Plant Cell Tissue Organ Cult [J]. 1993, 35: 1-35.

[6] 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.

[7] 董丽芬, 王岩, 张宗勤. 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.

[8] 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, 9(2): 97-101.

The Influence of Medias and Growth Regulators on Explants to Induce Adventitious Buds of *Pinus tabulaeformis*

WANG Yong-bo, TANG De-rui, MA Pei

(College of Forestry, Northwest Agricultural and Forestry University, Yangling Shaanxi 712100)

Abstract: The mature embryo of *Pinus tabulaeformis* was used as explants. This paper made a study of the facts of multiple adventitious shoot differentiation from callus cultures. The results showed that the combination of the medium was 1/ 2MS+6-BA 1.5 mg/ L+NAA 0.2 mg/ L, on which 59.3% of explants was induced. Applying the method of trend surface model, when 6-BA 1.7 mg/ L and NAA 0.3~0.35. The highest induction rate of adventitious buds was 65%. Average rate of propagation was 8, after a generation of raise the highest average rate was 13.

Key words: *Pinus tabulaeformis*; mature embryo; tissue culture; adventitious buds