

油松成熟胚子叶-胚轴段的离体培养与不定芽诱导

马 佩, 唐德瑞, 王永波

(西北农林科技大学 林学院 陕西 杨凌 712100)

摘 要:以油松成熟胚的子叶-胚轴段为起始外植体, 进行离体培养诱导不定芽, 以不同浓度的活性炭对油松不定芽进行继代培养。结果表明: 子叶-胚轴段可以诱导出不定芽; 在 1/2MS 培养基上附加 3 mg/L 的 6-BA 和 0.5 mg/L 的 NAA, 外植体不定芽的诱导率达 46.7%, 平均增殖系数是 10, 最大增殖系数为 24; 1/2MS 培养基中附加 2 mg/L 的活性炭对油松不定芽增殖和生长最有利。

关键词:油松; 子叶-胚轴段; 不定芽; 活性炭

中图分类号: S 791.254 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2011)07-0114-04

油松(*Pinus tabulaeformis*)是我国特有针叶树种^[1], 具有耐旱、耐寒、耐贫瘠的特性^[2-4]。由于油松结实晚, 结实率低, 种子繁殖分化大, 使得苗木质量差, 很难满足生产需要, 组织培养技术是快速扩繁优良种苗的重要途径。目前国外已有 30 多种针叶树通过胚、子叶、下胚、针叶和悬浮细胞培养出再生植株^[4-13]; 国内仅见到以油松种子段为外植体诱导愈伤组织和以杉木、黑松的子叶和下胚轴诱导不定芽的报告, 尚未见以成熟胚的子叶-胚轴段进行不定芽诱导的报道。现以油松成熟胚的子叶-胚轴段为外植体进行不定芽诱导^[1, 12-13], 旨在建立以油松子叶-胚轴段为外植体的高频再生体系, 为进一步遗传转化奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为产自内蒙古赤峰的优质成熟油松种子, 2009 年 11 月购于杨凌市场。

1.2 试验方法

1.2.1 油松无菌外植体的建立 将成熟的油松种子在低温(4℃)条件下处理 30 d 后, 选取均匀、饱满的种子, 经浸泡充分, 吸胀后剥去种皮, 70% 的酒精消毒 30 s, 无菌水冲洗 3 次, 重复 1 次, 再用 0.1% HgCl₂ 处理 6 min, 无菌水冲洗 4~5 次, 重复 1 次。消毒后的种子用无菌滤

纸吸干其表面水分, 在无菌条件下剥去胚乳, 取出完整的成熟胚。再将胚从中间横向切成 2 段, 取上半段(子叶-胚轴)^[1, 10-11], 用电子天平称量重量(mg), 随后将其接种到诱导培养基上, 在 24~25℃条件下每天光照 14 h。

1.2.2 不定芽的诱导 将无菌子叶-胚轴段接种到 GD、SH、DCR 和 1/2MS^[1, 4, 8, 12] 培养基上, 同时附加 1.0、2.0、3.0、4.0 mg/L 的 6-BA 和 0.05、0.2、0.5、1.0 mg/L 的 NAA, 蔗糖 30 g/L, 琼脂 5 g/L(pH 5.8)。采用 L₁₆(4⁵) 正交实验设计^[13-14] 做 16 个处理, 每个处理接种 30 瓶, 重复 2 次, 50 d 后统计不定芽的诱导状况。不定芽的诱导率=(产生不定芽的胚段数/接种胚段的总数)×100%。

1.2.3 不定芽的增殖和生长 选择 1/2MS 为不定芽增殖的基本培养基, 生长调节剂为 2.0 mg/L 6-BA 和 0.03 mg/L IBA^[12], 20 d 后将长度为 0.6 cm 以上的不定芽转入生长培养基。不定芽生长选择 1/2MS 基本培养基, 附加活性炭(0、1、2、3 g/L)、6-BA 0.5 mg/L、蔗糖 30 g/L 和琼脂 5 g/L(pH 5.8)^[15-17], 每组接种 30 瓶, 重复 2 次。24~25℃条件下每天光照 14 h, 30 d 后统计结果。不定芽的增殖系数=(不定芽的总数/产生不定芽的胚段数)×100%。

1.2.4 外植体诱导状况评定 根据外植体诱导状况, 将萌发和分化过程分为 8 个阶段^[15]: 1 级—子叶-胚轴未生长; 2 级—子叶变绿且略有膨大; 3 级—子叶变绿, 变粗且产生少量愈伤; 4 级—产生团状、透明或白色愈伤组织, 直径约为 0.5~1.0 cm; 5 级—各个子叶顶端分别产生愈伤, 且子叶伸长至 1.0 cm; 6 级—产生团状绿色的愈伤, 直径为 1.5~2.0 cm, 未产生不定芽; 7 级—产生大量愈伤, 直径≥2.0 cm, 但部分愈伤变为褐色, 产生 2~5 个不定芽丛; 8 级—产生大量的不定芽。

第一作者简介: 马佩(1986-), 女, 在读硕士, 现从事森林培育研究工作。E-mail: mapei19861106@163.com。

责任作者: 唐德瑞(1961-), 男, 教授, 博士生导师, 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: 2011-01-07

2 结果与分析

2.1 不同外植体类型的不定芽诱导

在 1/2MS、DCR、SH 和 GD 培养基上, 子叶-胚轴段接种 3 d 后子叶开始张开, 5 d 后子叶完全张开, 10 d 后

子叶明显变绿长大, 20 d 后子叶变粗(图 1a)、膨大并分化出愈伤组织, 40 d 后部分愈伤组织开始产生不定芽原基(图 1b、c), 50 d 后愈伤组织产生大量的不定芽或者膨大的子叶直接产生不定芽(图 1d、e)。

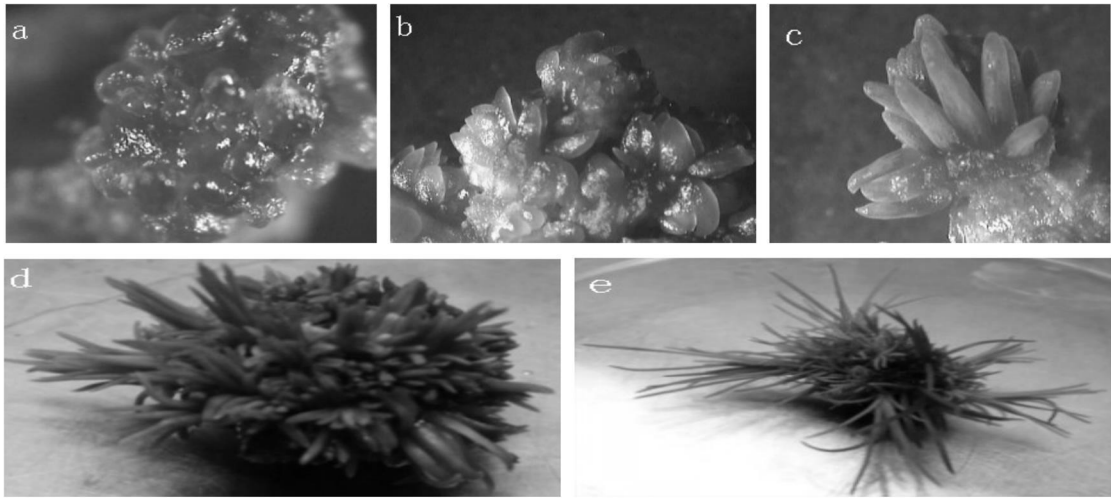


图1 愈伤组织及不定芽丛

2.2 不同培养基、生长调节剂配比对外植体不定芽诱导的影响

2.2.1 对不定芽诱导率和增殖系数的影响 接种 50 d 后统计(表 1), 培养基类型的方差分析表明 $F=166.87>F_{0.01}(3, 4)=16.69$; 6-BA 浓度的方差分析表明, $F=17.85>F_{0.01}(3, 4)=16.69$; NAA 浓度的方差分析表明, $F=26.44>F_{0.01}(3, 4)=16.69$, 培养基、NAA 浓度和

6-BA 浓度对不定芽的诱导率影响均极显著。多重比较表明, 培养基 1/2MS 与 GD、DCR 和 SH 间差异显著, 不定芽诱导在 1/2MS 培养基、3.0 mg/L 6-BA 和 0.5 mg/L NAA 处理下最好, 油松不定芽诱导最佳培养基和植物生长调节剂组合是 1/2MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L, 最大诱导率为 48.3%, 平均增殖系数是 10, 最大增殖系数为 24。

表 1 不同培养基和激素处理对外植体不定芽诱导结果及多重比较

| 培养基 | 6-BA / mg · L ⁻¹ | NAA / mg · L ⁻¹ | 接种外植体数 | 诱导率 / % | 平均增殖系数 | 多重比较 | | |
|-------|--------------------------------|-------------------------------|--------|------------|--------|------|-------|---------|
| | | | | | | 因素 | 水平 | 均值 |
| GD | 1.0 | 0.05 | 60 | 3.30 | 3 | 培养基 | | |
| GD | 2.0 | 0.20 | 58 | 1.63 | 0 | | GD | 4.57d |
| GD | 3.0 | 0.50 | 60 | 10.0 | 0 | | DCR | 27.91b |
| GD | 4.0 | 1.00 | 59 | 5.08 | 0 | | SH | 23.33c |
| DCR | 1.0 | 0.20 | 60 | 20.0 | 7 | | 1/2MS | 34.60a |
| DCR | 2.0 | 0.05 | 60 | 21.6 | 5 | | | |
| DCR | 3.0 | 1.00 | 60 | 31.6 | 8 | | 1.0 | 21.25 b |
| DCR | 4.0 | 0.50 | 60 | 38.3 | 9 | | 2.0 | 19.16b |
| SH | 1.0 | 0.50 | 60 | 35.0 | 8 | 6-BA | 3.0 | 28.75 a |
| SH | 2.0 | 1.00 | 60 | 16.7 | 8 | | 4.0 | 21.26 b |
| SH | 3.0 | 0.05 | 60 | 25.0 | 8 | | | |
| SH | 4.0 | 0.20 | 60 | 16.3 | 7 | | 0.05 | 18.35 b |
| 1/2MS | 1.0 | 1.00 | 60 | 28.3 | 8 | NAA | 0.20 | 21.67 b |
| 1/2MS | 2.0 | 0.50 | 60 | 36.7 | 8 | | 0.50 | 30.01 a |
| 1/2MS | 3.0 | 0.20 | 60 | 48.3 | 10 | | 1.00 | 20.41bc |
| 1/2MS | 4.0 | 0.05 | 60 | 25.0 | 9 | | | |

注: 各处理接种外植体 60 个; 多重比较中不同因素各水平的平均诱导率均值后不同小写字母表示二者差异显著($P>0.05$)。

2.2.2 外植体重量与不定芽诱导状况的关系 根据子叶-胚轴段不定芽诱导的 16 个处理的评价结果, 选出优、

中、差 3 组, 即: 第 15 组 培养条件为 1/2MS+6-BA 3.0 mg/L+NAA 0.20 mg/L; 第 5 组, 培养条件为 DCR+

6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.20 mg/L; 第2组, 培养条件为GD+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.20 mg/L。对子叶-胚轴段的重量与不定芽诱导状况进行回归拟合(图2)。第2组的不定芽诱导状况最差, 其等级 y 与外植体重量 x (mg) 的回归拟合方程为 $y = -1.0629x^2 + 10.973x - 19.954$, 相关系数达到0.8219, 计算得到不定芽诱导状况等级最高处的外植体重量为5.16 mg; 第5组的回归拟合方程为 $y = -0.7226x^2 + 7.2908x - 10.215$, 相关系数达

到0.6758, 外植体重量为5.04 mg; 第15组的回归拟合方程为 $y = -0.4929x^2 + 5.0655x - 7.2671$, 相关系数达到0.8328, 外植体重量为5.25。结果表明 子叶-胚轴段不定芽诱导过程中, 外植体的重量作为影响不定芽诱导的重要因子, 在第2、5、15组外植体重量分别为5.16、5.04和5.25 mg 时对不定芽诱导最有利, 但当外植体重量超过或低于最佳重量时又会抑制不定芽的诱导。

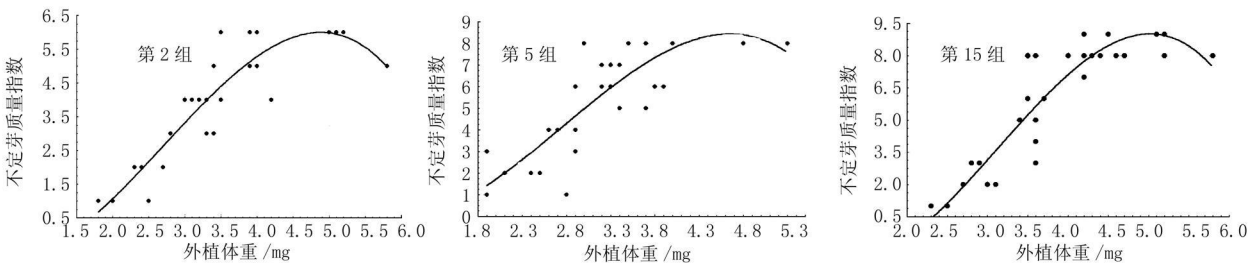


图2 子叶-胚轴的重量与不定芽诱导状况的回归曲线

2.3 不定芽的继代培养

2.3.1 不定芽的增殖 将子叶-胚轴段分化出来的不定芽转接到1/2MS+6-BA 0.1 mg/L 培养基中, 15 d后颜色深绿且结构紧密的愈伤组织产生新的不定芽或不定芽原基, 白色、黄绿色的愈伤组织未进行分化, 后期开始变枯至死亡。

2.3.2 活性炭浓度对不定芽生长的影响 在1/2MS+6-BA 0.5 mg/L 条件下, 添加不同浓度的活性炭培养50 d后, 不定芽生长统计结果见表2 方差分析表明, $F=18.12 > F_{0.01}(3, 4) = 16.69$ 说明各浓度活性炭对油松不定芽生长存在极显著差异, Duncan 多重比较结果表明 油松不定芽生长以2 g/L 活性炭为最优, 与其它3种存在极显著差异, 不定芽在添加2 g/L 活性炭的培养基上产生长度大于2 cm 的嫩梢率最大, 为45%。

体胚的子叶-胚轴段不定芽诱导的影响很大, 油松子叶-胚轴段不定芽诱导的最适培养基为1/2MS, 在1/2MS+6-BA 3 mg/L+ NAA 0.5 mg/L 条件下, 诱导率可达48.3%。不定芽诱导过程中, 诱导状况差、中、优3组的外植体重量分别为5.16、5.04和5.25 mg 时对不定芽诱导最有利, 但当外植体重量超过或低于最佳重量时又会抑制不定芽的诱导。继代培养可进一步提高不定芽的增值率, 2 g/L 的活性炭对油松不定芽生长最有利。

参考文献

[1] 周巧云, 郑彩霞, 赵程亮. 油松种胚愈伤诱导的初探[J]. 江西农业大学学报, 2007, 29(3): 409-412.
[2] 齐力旺, 杨云龙, 韩素英, 等. 油松封顶芽的组织培养[J]. 植物生理学通讯, 1995, 31(1): 40-44.
[3] 车少辉, 唐德瑞, 潘静, 等. 油松针叶束水培生根的研究[J]. 西北林学院学报, 2008, 23(3): 110-113.
[4] 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.
[5] 李科友, 唐德瑞, 刘永红, 等. 美国黄松成熟胚的离体培养与不定芽的形成[J]. 西北植物学报, 2001, 21(6): 1223-1227.
[6] 李科友, 唐德瑞, 朱海兰, 等. 美国黄松组织培养不定根诱导的研究[J]. 西北植物学报, 2003, 23(3): 464-467.
[7] 彭丽萍. 樟子松组织培养不定根诱导的研究[J]. 西北林学院学报, 2008, 28(1): 93-97.
[8] 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]. 现代农业科技, 2009, 16: 145-148.
[9] 乐海波, 张成高, 范柏林. 油松针叶束繁殖研究[J]. 湖北林业科技, 2007, 143: 26-31.
[10] 朱丽华, 郑丹, 吴小芹. 黑松丛生芽的诱导及植株再生[J]. 南京林业大学学报, 2006, 30(3): 27-31.
[11] 席梦利, 施季森. 杉木子叶和下胚轴的器官发生与体胚发生[J]. 分子植物育种, 2005, 3(6): 846-852.

表2 活性炭浓度对不定芽生长的影响

| 活性炭含量 /g · L ⁻¹ | 嫩梢≥2 cm/% | | 均值多重比较 |
|-------------------------------|-----------|------|--------|
| | 重复1 | 重复2 | |
| 0 | 27.7 | 31.6 | 29.65c |
| 1 | 38.8 | 36.8 | 37.80b |
| 2 | 45.0 | 42.1 | 43.55a |
| 3 | 33.3 | 35.0 | 34.15c |

3 结论与讨论

以种子段或子叶、下胚轴为外植体培养出再生植株, 在多数针叶树中都有报告, 且不同段位均可以诱导出不定芽。当油松子叶-胚轴段诱导出不定芽, 再以胚轴-胚根段为外植体诱导不定芽时, 成熟胚的子叶-胚轴和胚轴-胚根两部分总的诱导率应该是子叶-胚轴段不定芽诱导率的2倍。培养基和植物生长调节剂对油松离

不同分组取样方法初步构建山葡萄核心种质的研究

吴子龙^{1,2}, 王 军¹, 沈育杰³, 路文鹏³

(1. 东北林业大学 林学院, 黑龙江 哈尔滨 150040 2. 邯郸学院 生物科学系, 邯郸市资源植物重点实验室 河北 邯郸 056005;
3. 中国农业科学院 特产研究所, 吉林 吉林 132109)

摘 要: 根据 SSR 分析结果的聚类情况, 采用 3 种方法构建 124 份山葡萄种质资源的核心种质, 通过比较基因型数、等位基因、有效等位基因、Shannon 多样性指数和基因多样性, 证明采用逐步聚类法构建的核心种质代表性较好。在此基础上, 考虑到雄花山葡萄的特异性和山葡萄品种在实际生产、科学研究上的重要性, 人为补充了未入选的雄花山葡萄和山葡萄品种(共 10 份资源)。利用该法构建了由 41 份材料组成的山葡萄资源核心种质(取样比例占总样本的 33.1%), 其中野生种质资源 33 份, 占核心种质的 80.5%; 选育品种 8 份, 占核心种质的 19.5%; 从花型来看, 雌花资源 27 份, 占核心种质的 65.8%, 两性花和雄花资源各 7 份, 各占核心种质的 17.1%。山葡萄核心种质的基因型数、等位基因、有效等位基因、Shannon 多样性指数和基因多样性的保留率分别为 86.7%、97.9%、100.0%、99.0%和 99.8%, 表明构建的 41 个山葡萄样本的核心种质能在遗传多样性上很好地代表初始种质。

关键词: 山葡萄; 核心种质; 分组取样

中图分类号: S 602.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001—0009(2011)07—0117—06

第一作者简介: 吴子龙(1977-), 男, 讲师, 现从事植物遗传多样性研究工作。E-mail: zhaoxinmdj@yahoo.com.cn.
责任作者: 王军(1966-), 男, 教授, 现从事葡萄遗传育种研究工作。
基金项目: 黑龙江省留学归国人员科学基金资助项目(LC08C07)。
收稿日期: 2011—01—20

山葡萄(*Vitis amurensis*)原产于我国东北、华北及俄罗斯远东地区, 是葡萄属中最抗寒的一个种, 是我国特有的种质资源^[1], 也是目前国内外葡萄抗寒育种的主要种质资源^[2]。由于山葡萄树体较大、多年生, 散落分布, 种质资源的收集、保存和管理较为困难, 合理有效地管理和利用种质资源的方法之一就是构建核心种质。核心种质是以最小的资源份数和遗传重复最大限度地代

[12] 董丽芬, 王岩, 张宗勤. 油松胚培养芽增值培养基的筛选[J]. 西北林学院学报, 2004, 19(3): 36-37.
[13] 唐德瑞, 李林, 李科友. 白皮松成熟胚的离体培养[J]. 西北植物学报, 2006, 26(7): 1346-1350.
[14] Huang J Q, Wei Z M. Tissue and protoplast culture of pinus species [J]. Chinese Bulletin of Botany, 1994, 11(1): 34-42.

[15] 郑钧宝, 潘冬梅, 陈正华. 油松离体胚子叶组织分化和无根试管苗的形成[J]. 河北林学院学报, 1994, 9(2): 97-100.
[16] 王丽萍, 董丽芬, 贾彩霞等. 油松试管苗培养中活性炭最适交替周期及浓度的研究[J]. 西北林学院学报, 2008, 23(5): 79-83.
[17] Thomas T D. The role of activated charcoal in plant tissue culture [web-page]. Biotechnology Advances, 2008, 26: 618-631.

In Vitro Formation of Adventitious Buds From the Embryos' Cotyledon-epicotyl of *Pinus tabulaeformis* and Adventitious Buds Culture

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

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

Abstract: The mature embryos' cotyledon-epicotyl of *Pinus tabulaeformis* were used as explants to induce adventitious buds and the different concentration of activated charcoal on *Pinus tabulaeformis* adventitious buds culture relation. The results showed that the cotyledon-epicotyl of mature embryos can induce adventitious buds, the optimal combination of the media was 1/2MS with 3 mg/L 6-BA and 0.5 mg/L NAA, on which 46.7% explants was induced, average rate of propagation was 10 and the highest rate of propagation was 24. The optimum activated charcoal on 1/2MS to the elongation of adventitious buds.

Key words: *Pinus tabulaeformis*; cotyledon-epicotyl; adventitious bud; activated charcoal