

# 华北落叶松胚性愈伤组织诱导影响因子的研究

韩登媛, 李 旦, 赵 健, 李 慧, 张金凤\*

(林木育种国家工程实验室/林木、花卉遗传育种教育部重点实验室/国家林业局树木花卉育种与生物工程重点开放实验室/北京林业大学生物科学与技术学院,北京 100083)

**摘要:**以成熟合子胚为外植体,用完全随机、正交设计等试验方法加之组培技术来研究影响华北落叶松(*Larix principis-rupprechtii*)胚性愈伤组织诱导的几种主要因子。结果表明:诱导胚性愈伤组织过程中的最佳灭菌方式为2% NaClO 灭菌30 min,剥皮、去胚乳处理。其中污染率和NaClO的灭菌时间呈负相关;NaClO 灭菌时间越长,污染率越低。诱导胚性愈伤组织的最佳琼脂浓度为 $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,且过高和过低的琼脂浓度不仅降低了其诱导率,提高了愈伤组织的褐化水平,也影响了外植体的发育形态。外源激素的正交试验结果表明:2,4-D 是主要影响因子,对诱导率的影响显著,其次是KT,最后是6-BA。最佳的植物外源激素配比是2,4-D  $1.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + 6-BA  $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + KT  $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

**关键词:**华北落叶松;体细胞胚胎发生;诱导;培养基;胚性愈伤组织

中图分类号:S722.3

文献标识码:A

## Factors Affecting Induction of Embryogenic Callus of *Larix principis-rupprechtii*

HAN Deng-yuan, LI Dan, ZHAO Jian, LI Hui, ZHANG Jin-feng

(National Engineering Laboratory for Tree Breeding/Key Laboratory of Genetics and Breeding in Forest Trees and Ornamental Plants, Ministry of Education/The Tree and Ornamental Plant Breeding and Biotechnology Laboratory of State Forestry Administration/College of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

**Abstract:** Taking mature zygotic embryos of *Larix principis-rupprechtii* as explants to induce embryogenic callus. Several factors influencing the induction were assayed by using completely random design, orthogonal design together with tissue culture technology in order to explore embryogenic callus induction in the early stage in larch and optimize its somatic embryogenesis system. The results show that the best way of disinfection during the induction of embryogenic callus is peeling, removing endosperm after disinfection of 30 minutes with 2% NaClO. The contamination rate and disinfection time are negatively correlated; the longer the sterilization time, the lower the contamination rate. The optimal agar concentration of embryogenic callus induction is  $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , and the higher or lower of the agar concentration will not only reduce the induction rate, increase the level of callus browning, but also affect the development of explants. The results of orthogonal design for plant growth exogenous hormone show that the 2,4-D is the key factor and has a significant influence, followed is KT and 6-BA. The best combination of plant growth exogenous hormone is 2,4-D  $1.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + 6-BA  $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + KT  $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ .

**Key words:** *Larix principis-rupprechtii*; somatic embryogenesis; induction; culture medium; embryogenic callus

收稿日期:2013-02-28

基金项目:国家自然科学基金项目“科研训练及科研能力提高项目”(J1103516);国家林业局林业公益性行业专项“重要乡土树种核心种质评价及高效育种共性技术研究”(201004009);北京市与中央在京高校共建项目“华北落叶松遗传资源收集评价及新品种选育(GJ2011-2)”

作者简介:韩登媛(1988—),女,陕西人,在读硕士,主要从事植物遗传育种方向研究。E-mail:handeng2007@sina.com

\* 通讯作者:张金凤(1964—),女,内蒙古人,教授,博士,主要研究针叶树良种繁育。E-mail:zjf@bjfu.edu.cn

华北落叶松(*Larix principis-rupprechtii* Mayr.)为松科落叶松属植物,是我国主要的速生用材树种和绿化树种<sup>[1]</sup>。近年来华北落叶松的人工造林面积日益扩大,对其优良种质资源的需求也越来越多。

目前虽然已建立了一些种子园和母树林,但华北落叶松人工林仍需40~60 a才到结实龄,球果出种率低(仅为2%~4%),大小年现象严重,种子产量不稳定,并且种子具中等休眠特性,给良种应用和实生繁殖带来一定的困难<sup>[2-6]</sup>。依托体胚培养的无性快繁技术,可以克服传统育种的缺点,最大程度地保持优树的遗传增益。对于华北落叶松体胚发生的研究,国外尚未见报道。国内有齐力旺等<sup>[7-8]</sup>对华北落叶松未成熟胚做过体胚发生的一些研究,但是以成熟胚作为外植体的研究迄今尚未查找到相关报导。采用成熟胚,具有取材方便容易,不受时间地点限制等优点,具有大规模产业化的潜力。本研究以低价,环境污染小的NaClO代替以往的HgCl<sub>2</sub>灭菌,通过诱导成熟合子胚体细胞胚性愈伤组织的研究,为华北落叶松的体胚研究提供初步的试验支撑。本研究的结果将有助于华北落叶松体胚研究的进一步深入,具有很好的实用价值。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

成熟种子购于河北承德落叶松基地(千粒质量3.8~4.2 g)室温放置备用。琼脂购于北京宏宝达生物科技有限公司,产地Sigma,凝胶强度大于900 g·cm<sup>-2</sup>。

### 1.2 试验方法

1.2.1 外植体处理 将种子先用洗涤液清洗后用水冲洗干净并浸泡至充分吸胀(4~6 h),后在超净工作台上用70%的酒精处理1 min后做如下处理:1、分别用2% NaClO溶液灭菌处理10、20、30、40 min;2、将上述处理种子用无菌水冲洗3次后分别按照以下设置处理(1)不剥种皮只划伤到胚(PA), (2)剥去种皮,留下胚和胚乳并划伤到胚(PB), (3)剥去种皮并去掉胚乳,留下胚(PC)。把处理后的种子接种到添加1.8 mg·L<sup>-1</sup>的2, 4-D、0.6 mg·L<sup>-1</sup>的BA和0.6 mg·L<sup>-1</sup>的KT的S培养基<sup>[6-7]</sup>中培养。重复3次,每次20个外植体。7 d后统计污染率,21 d时统计胚的存活率。

1.2.2 琼脂浓度试验 将成熟种子的外植体,接种于添加1.8 mg·L<sup>-1</sup>的2, 4-D、0.6 mg·L<sup>-1</sup>的BA

和0.6 mg·L<sup>-1</sup>的KT的S培养基中,琼脂浓度分别为3、4、5、6、7 g·L<sup>-1</sup>,重复3次,每次20个外植体。其中琼脂产于Sigma,凝胶强度大于900 g·cm<sup>-2</sup>。

1.2.3 外源激素浓度试验 以S为基本培养基,外源激素种类和浓度组合采用正交设计L<sub>16</sub>(4<sup>5</sup>) (表1),共16个处理,另外设置1个空白对照。20 d后统计胚性愈伤组织诱导率并进行分析。重复3次,每次15个外植体。

表1 正交试验因素及水平L<sub>16</sub>(4<sup>5</sup>)

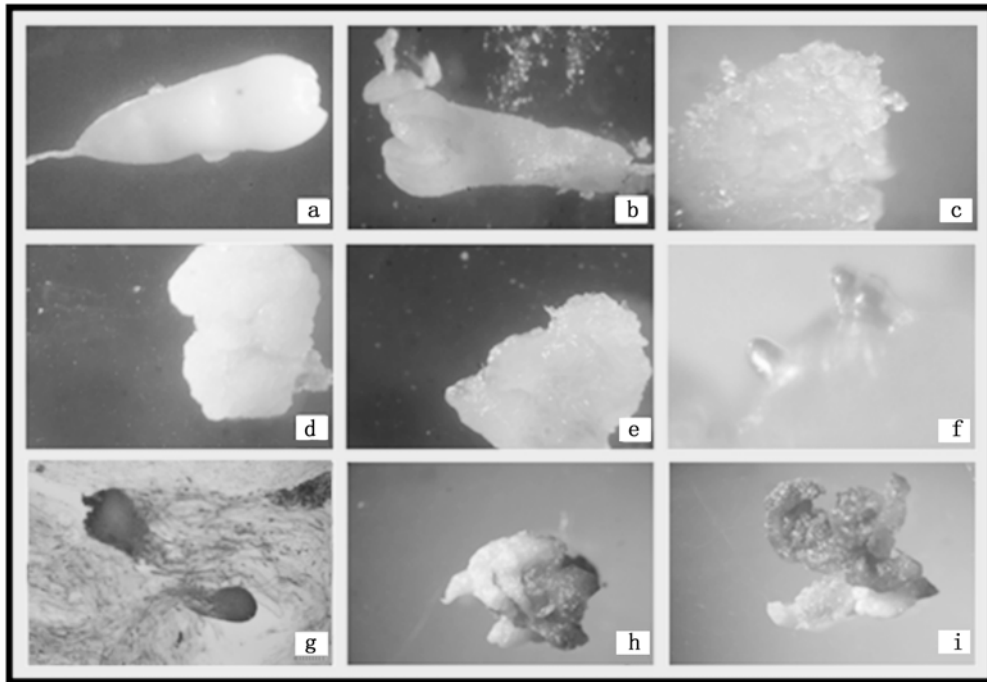
水平(外源激素浓度)/ (mg·L <sup>-1</sup> )	因素(外源激素种类)		
	2, 4-D	6-BA	KT
1	0.6	0	0
2	1.2	0.3	0.3
3	1.8	0.6	0.6
4	2.4	0.9	0.9

以上培养基均添加1 000 mg·L<sup>-1</sup>肌醇,450 mg·L<sup>-1</sup>的L2谷氨酰胺,500 mg·L<sup>-1</sup>水解酪蛋白,30 g·L<sup>-1</sup>蔗糖,琼脂浓度为4 g·L<sup>-1</sup>,培养在(23±2)℃,pH值5.7~5.8,相对湿度40%~70%,用遮光布遮住进行暗培养。21 d左右继代1次,继代增殖培养基分别以原培养基外源激素浓度的1/2、1/5、1/10的顺序递减。

## 2 结果与分析

### 2.1 形态学和细胞学观察

初取出的胚体积比较小,在培养基中培养1 d后,胚吸收水分和营养物质,体积明显变大,表面仍保持光滑(图1a);培养3 d后,外植体明显膨大,表面开始变得不如之前光滑(图1b);培养5~10 d后,先后从胚根、胚轴、子叶基部,产生乳白色透明、半透明粘状组织(图1c);15 d后部分愈伤组织表面产生白色,透明丝状组织(图1d);培养21 d,根据愈伤组织的形态可区分出非胚性愈伤组织和胚性愈伤组织。非胚性愈伤组织:表面光滑,颗粒状,黄褐色或棕褐色,表面没有丝状组织产生(图1d);胚性愈伤组织:胚轴和子叶基部产生白色略黄,透明、半透明丝状愈伤组织,结构松软,继代培养增殖较快(图1e),在解剖镜下可观察丝状突起(图1f);在显微镜下,可见细胞核大,细胞质浓厚(图1g)。这就是在松柏类植物组织培养中常提到的胚性胚柄团(Embryogenic Suspensor Mass, ESM),即胚性愈伤组织。



a: 培养 1 d 的成熟合子胚; b: 培养 3 d 的成熟合子胚; c: 培养 15 d 的成熟合子胚; d: 非胚性愈伤组织; e: 胚性愈伤组织; f: 丝状突起; g: 胚性细胞 (100 ×); h, i:  $6.7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  琼脂上的种子褐化严重

图 1 合子胚发育观察图

## 2.2 数据统计分析

2.2.1 外植体处理 通过对 3~5 d 外植体污染情况的观察, 和 21 d 后胚成活的观察, 制作成表格(表 2)。可以看出采取 PA 处理的不论 2% NaClO 灭菌多长时间污染率都为 100%, 而 PB 处理的污染率也都在 60% 以上, 只有 PC 处理的外植体随灭菌时间的增长污染率在逐渐降低, 最终达到 5%。而且由此可见在种皮和胚乳之间的空隙有很多内生菌。值得注意的是灭菌时间在 10 min 和 20 min 时, PB 处

理的部分外植体出现在 3~5 d 观察没有长菌, 在 10 d 左右时没有长愈伤组织, 而从外植体周围开始长菌的现象。移出同瓶中没有长菌而长愈伤的外植体到新的培养瓶中, 可以继续生长, 而 PC 处理的没有这一现象。说明胚乳层也有内生菌, 而胚和愈伤组织有一定的抑菌效果。从不同处理方法下的胚成活率和胚成活活性可以看出种子的活性相对比而言还是比较高的, 可以达到 85.71%。

表 2 灭菌试验结果

种子处理时间/min	外植体数/个	污染数/个	胚成活数/个	污染率/%	胚成活率/%	胚成活活性/%
T1	10(PA)	60	0	100	0	—
T2	10(PB)	60	4	88.33	6.67	57.14
T3	10(PC)	60	29	26.67	48.33	55.88
T4	20(PA)	60	0	100	0	—
T5	20(PB)	60	10	75	16.67	66.67
T6	20(PC)	60	43	15	71.67	84.31
T7	30(PA)	60	0	100	0	—
T8	30(PB)	60	10	76.67	16.67	71.43
T9	30(PC)	60	48	6.7	80	85.71
T10	40(PA)	60	0	100	0	—
T11	40(PB)	60	13	63.33	21.67	59.1
T12	40(PC)	60	46	5	76.67	80.7

进一步通过方差分析可以判断灭菌处理方法间差异极显著。而 Duncan 多重比较则表明 T12 > T9

> T6。所以, 就降低污染率而言, T12 处理最好。在以上的处理中虽然 T12 的污染率比 T9 低, 但是 T9

(2% NaClO 灭菌 30 min 后剥去种皮,去掉胚乳)胚的成活率和种子的成活活性都是最高的,就诱导愈伤组织而言这种处理方法最好。以后的试验均是在 T9 处理下完成的。

2.2.2 琼脂浓度试验 培养 7 d 时观察,3、4、5  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  明显产生乳白色透明、半透明粘状组织,且 4、5  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  较 3  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  多,而 6、7  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  则表现为子叶张开,胚轴比原来稍长。当 21 d 时,前 3 种比较正常产生愈伤组织,而琼脂浓度为 6、7  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的培养基中,多数胚轴伸长、子叶张开,只有一小部分从子叶基部及胚根处长出晶状透明愈伤组织,质感较硬且随继代培养时间的延长褐化严重直至死亡(图 1h、i)。由图 2 可以看出,胚性愈伤组织诱导率最高时,琼脂的浓度为 4  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

进一步对其进行方差分析  $P = 0.0623 > 0.05$ , 显示不同处理间的差异不显著,所以琼脂的浓度为 4  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  结果最好。

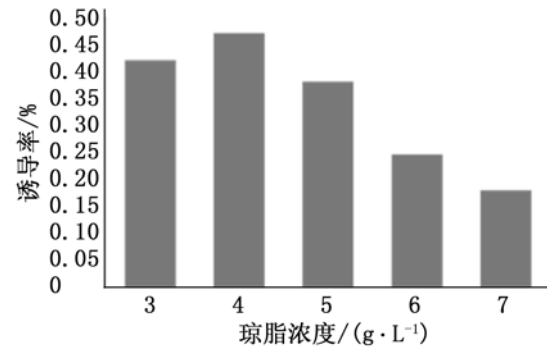


图 2 琼脂浓度试验结果

2.2.3 外源激素浓度试验 培养基所含的外源激素的不同组合对华北落叶松合子胚性愈伤组织的诱导有着明显的影响,在不加任何外源激素的培养基(空白试验 0)上培养时,成熟胚胚轴伸长,子叶伸展,并不进一步产生愈伤组织。而在添加外源激素的培养基中培养的外植体变化明显,且 2,4-D、BA、KT 的共同使用可显著提高诱导率,如表 3 所示。

表 3 外源激素试验结果

处理	外源激素组合/( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )			外植体总数	胚性愈伤组织个数	胚性愈伤组织得率/%
	2,4-D	6-BA	KT			
1	0.6	0	0	45	7	0.16
2	0.6	0.3	0.3	45	13	0.43
3	0.6	0.6	0.6	45	5	0.17
4	0.6	0.9	0.9	45	4	0.09
5	1.2	0	0.6	45	16	0.36
6	1.2	0.3	0.9	45	17	0.38
7	1.2	0.6	0	45	24	0.53
8	1.2	0.9	0.3	45	22	0.49
9	1.8	0	0.9	45	21	0.47
10	1.8	0.3	0.6	45	23	0.51
11	1.8	0.6	0.3	45	20	0.44
12	1.8	0.9	0	45	18	0.40
13	2.4	0	0.3	45	16	0.36
14	2.4	0.3	0	45	18	0.40
15	2.4	0.6	0.9	45	14	0.31
16	2.4	0.9	0.6	45	11	0.24

对试验结果进行极差分析,2,4-D、6-BA、KT 的极差分别是 4.420,1.308,1.330,说明 2,4-D 是主要影响因子,其次是 KT,最后是 6-BA。从效应曲线可以看出最好的处理是 2,4-D 第三个水平、6-BA 第二个水平和 KT 第二个水平组合,也就是外源激素浓度为 2,4-D 1.8  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + 6-BA 0.3  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + KT 0.3  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  处理诱导效果最好。为此,进行处理 17,外植体接种于添加 2,4-D 浓度为

1.8  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、6-BA 浓度为 0.3  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  和 KT 浓度为 0.3  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 S 培养基上,重复 3 次,每次 15 个外植体,结果显示其诱导率 55.56%,略大于处理 7,证实了其最佳处理。对试验进行方差分析表明,2,4-D 对诱导率的影响显著,其他因子不显著。对 2,4-D 进行多重比较,显示水平三最佳,符合试验结果。

### 3 结论与讨论

#### 3.1 灭菌处理的影响

前人的研究表明,不同的外植体灭菌处理方法对其污染率和愈伤组织诱导有显著影响<sup>[7-9]</sup>。大量文献指出 HgCl<sub>2</sub> 对外植体的灭菌效果好,但因其有剧毒作用,灭菌后难除残毒。本试验选择 NaClO 为处理落叶松的灭菌剂,其污染率可以降低到 5%,完全可以达到试验要求。NaClO 能分解产生具有杀菌能力的氯气,易除去,对环境的影响也较小,又易购买,故选择 NaClO 为处理华北落叶松的灭菌剂。

#### 3.2 琼脂浓度与胚性愈伤组织的诱导的关系

琼脂在诱导培养基中常用作凝胶剂,前人的研究中表明较高浓度的琼脂可降低试管苗玻璃化,提高水稻胚性愈伤组织分化率,并改善胚性愈伤组织块的质量,而过高或过低的琼脂浓度则容易使继代培养物褐化<sup>[10-11]</sup>。虽然方差分析表明琼脂的不同浓度对胚性愈伤组织诱导的影响不显著,但是在本试验中发现琼脂浓度不同对胚性愈伤组织的产生有很大的影响,尤其是浓度过高明显使继代培养物褐化严重。试验中还发现,随着琼脂浓度的不同,愈伤组织产生的形态,大小,胚性愈伤组织的诱导率都有很大的不同,且其胚性愈伤组织的诱导率呈现一定的分布趋势,本试验以 4 g · L<sup>-1</sup> 为最佳,达到极限。

#### 3.3 外源激素组合及浓度与胚性愈伤组织诱导的关系

植物组织在离体培养条件下,自生缺乏合成生长素和细胞分裂素的能力,因此,在配制培养基中通常要加入一定的植物外源激素调控植物组织脱分化、再分化形成再生植株。亦不例外,在细胞的胚性化过程中,在培养基中适当的应用植物外源激素不仅是成功诱导胚性愈伤组织的决定因素,也是影响体细胞胚诱导率的主要因子。据报道,影响松树未成熟胚性愈伤组织发生的主要外源激素有 2, 4-D、BA 和 KT<sup>[12-14]</sup>。而本试验经方差分析只得出 2, 4-D 对华北落叶松成熟体细胞胚性愈伤组织诱导具有显著作用,而 BA、KT 的作用并未达到显著水平。这表明 2, 4-D 是促进外植体细胞脱分化形成胚

性愈伤组织起主导作用的植物外源激素,但是本研究发现不可单独使用 2, 4-D, 只有三者的合理配合、相互作用才能使胚性愈伤组织的诱导率显著提高。最后经过极差分析,得出试验所获得的最好结果应为 2, 4-D 1.8 mg · L<sup>-1</sup> + 6-BA 0.3 mg · L<sup>-1</sup> + KT 0.3 mg · L<sup>-1</sup> 的组合为最佳。

#### 参考文献:

- [1] 李进军, 马存世. 华北落叶松生长分析[J]. 林业实用技术, 2008(10): 10-12
- [2] 李建华, 田 军. 华北落叶松植苗造林关键技术探讨[J]. 林业科技开发, 2007, 21(5): 95-96
- [3] 杨秀云, 韩有志. 关帝山华北落叶松人工林细根生物量空间分布及季节变化[J]. 植物资源与环境学报, 2008, 17(4): 37-40
- [4] 王宏星, 孙晓梅, 陈东升, 等. 甘肃小陇山日本落叶松人工林不同发育阶段土壤理化性质的变化[J]. 林业科学研究, 2012, 25(3): 294-301
- [5] Attree S M, Dunstan D I, Fowke L C. Plantlet regeneration from embryogenic protoplasts of white spruce (*Picea glauca*) [J]. Bio Technology, 1989(7): 54-60
- [6] 王笑山, 马 浩, 王建华, 等. 落叶松杂种大规模繁殖配套技术研究[J]. 林业科学研究, 2000, 13(5): 469-476
- [7] 齐力旺, 韩一凡, 李 玲. 华北落叶松体细胞胚发生及植株再生实验系统的建立[J]. 实验生物学报, 2000, 33(4): 357-365
- [8] 齐力旺, 韩一凡, 李 玲. 应用 3112A 最优回归设计研究 ABA、PEG4000 及 AgNO<sub>3</sub> 对落叶松体细胞胚发生数量的影响[J]. 生物工程学报, 2001, 17(1): 84-89
- [9] Klimaszewska K. Recovery of somatic embryos and plantlets from protoplast cultures of *Larix x eurlepus* [J]. Plant Cell Rep, 1992(11): 295-299
- [10] Tautoris T E, Bekkaoui F, Pilon M, et al. Factors affecting transient gene expression in electroporated black spruce and jack pine [J]. Thev Appl Gevet, 1989, 78(4): 531-536
- [11] 赖忠雄, 桑庆亮. 荔枝胚性愈伤组织体胚发生系统的优化及转化抗性愈伤组织培养再生植株[J]. 应用环境生物学报, 2003, 9(2): 131-136
- [12] 唐 巍, 欧阳藩, 郭仲琛. 火炬松的合子胚愈伤组织的器官发生和植株再生[J]. 林业科学, 1998, 34(3): 115-119
- [13] 张华通, 翟应昌, 周志坚, 等. 火炬松胚性愈伤组织的诱导及体胚的形成[J]. 广东林业科技, 1994(4): 74-93
- [14] 陈夜江, 赖钟雄. 果树和林木体细胞胚胎发生的研究与利用[J]. 福建农业大学学报, 2001, 30(3): 20-24