

# 落叶松愈伤组织诱导体系优化

方骄阳,冯德明,贺梦莹,贺曙春,王晶鑫,张磊\*

(东北林业大学,林学院,哈尔滨 150040)

**摘要:**以落叶松成熟合子胚为作为外植体材料,对其按照不同处理方式进行消毒,且以不同种类培养基和激素种类及浓度进行愈伤组织的诱导,测算愈伤组织的体积。统计分析结果表明:将去皮种子用流水冲洗2 d,用70%酒精消毒1 min,转入4% NaClO消毒10 min后,再将剥出的胚放入0.5% NaClO消毒2 min,胚存活率最高;在光照条件下,MS培养基为愈伤组织诱导的优良培养基,2.0 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA或1.0 mg·L<sup>-1</sup> NAA+0.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA激素组合为最佳。

**关键词:**落叶松;愈伤组织;诱导

中图分类号:S722.3 文献标识码:A 文章编号:1003-5508(2015)05-0072-03

## The Callus Induction Medium Optimization of Larch

FANG Jiao-yang FENG De-ming HE Meng-ying HE Shu-chun

WANG Jing-xin ZHANG Lei

(Northeast Forestry University, School of Forestry, Harbin 150040, China)

**Abstract:** The Larch mature zygotic embryos were taken as the explants. They were disinfected according to different treatment methods, and induced by use of different medium and hormone types and concentration, then the callus volume were calculated. Statistical analysis results showed that the peeled seeds were washed with water for 24 hours ~48 hours, disinfected in 70% alcohol for 1 minute and disinfected into 4% NaClO for 10 minutes, and then the embryo was stripped out in the 0.5% NaClO disinfection for 2 minutes and the survival rate of embryos was the highest; In the light conditions, MS medium was good medium for callus induction. It could be seen that 2.0 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D+1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA or 1.0 mg·L<sup>-1</sup> NAA+0.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA were the best hormone combination.

**Key words:** Larch, Callus, Inducation

落叶松是我国东北地区主要的针叶用材树种,具有分布面积广,适应性强,生长迅速,耐寒能力强等特点,在林业生产中占有重要地位<sup>[1]</sup>。林木生长周期长,常规育种对品种遗传改良有耗时长、见效慢,某些优良性状在繁殖过程中无法控制的缺点。落叶松改良急需解决的是落叶松的无性繁殖,组织培养是无性繁殖的一种重要技术手段,而其中愈伤组织的诱导是组织培养过程的第一步,也是十分重

要的一步,高效稳定的诱导愈伤组织可以为落叶松组织培养体系的构建提供基础。

### 1 试验材料与方法

#### 1.1 试验材料

供试材料为2013年采自黑龙江省牡丹江市林口县青山种子园的成熟种子。

收稿日期:2015-05-27

国家科技计划课题(2013AA102704)。

作者简介:方骄阳(1995-),女,东北林业大学林学院学生,“落叶松遗传转化体系构建优化”科研训练组长。

通信作者:张磊,东北林业大学林木遗传育种国家重点实验室,讲师。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 外植体的消毒

选择成熟、饱满的落叶松种子,剥去种皮后,流水冲洗 24 h 以上。用 70% 的酒精消毒 1 min 后,分别在 4% NaClO 消毒 10 min、20 min,或者 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 消毒 20 min、30 min,或者 0.1% HgCl<sub>2</sub> 消毒 6 min、10 min(消毒时间过长会将胚杀死),然后无菌水洗净,剥去胚乳,将胚用 0.5% NaClO 消毒 2 min,无菌水洗净并用灭菌滤纸吸干水分,接种到培养基上,7 d 后统计存活率。

### 1.2.2 基本培养基及激素组合、浓度的筛选

以 MS、S 和 BM 为基本培养基,置于暗培养环境中,按设计的激素组合及浓度(详情参加表 2)分别添加至基本培养基中,培养温度控制为 23℃ ~ 25℃,观察愈伤组织形态及生长状况并统计愈伤率。

### 1.2.3 愈伤组织的长、宽、厚(mm)的测量及体积的计算

统计愈伤组织长 L、宽 W、厚 H。将接种日期记为第 1 天,每隔 7 d 用游标卡尺测量长 L、宽 W、厚 H,测 12 次,计算体积(mm<sup>3</sup>)。其中,1~3 次按长方体计算体积 V<sub>长</sub>,4 次~7 次按圆锥体计算 V<sub>锥</sub>,8 次~12 次按球体计算 V<sub>球</sub>,并对所得数据进行统计分析。V 的计算公式依次如下:

$$V_{\text{长}} = L * W * H;$$

$$V_{\text{锥}} = (1/48) * 3.14 * L * (W + H)^2;$$

$$V_{\text{球}} = (1/162) * 3.14 * (L + W + H)^3$$

### 1.2.4 统计及分析

数据统计时以试验中每一培养皿作基本单元分别统计,然后按处理方式的不同进行分类,求得平均值、标准差等,根据数据的情况进行方差分析、多重比较、时序分析等。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同消毒处理结果的分析

NaClO、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、HgCl<sub>2</sub> 不同消毒时间对胚存活率的影响结果见表 1。由表可得,不同的处理方式中,以 NaClO(4%) 消毒 10 min 及 HgCl<sub>2</sub>(0.1%) 消毒 10 min 为佳,未染菌胚的存活率分别为 62.4% 和 83.6%。由于 HgCl<sub>2</sub> 的毒性较强且易污染环境,因此最终确定以 NaClO(4%) 消毒 10 min 作为落叶松胚消毒的条件。

表 1 NaClO、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、HgCl<sub>2</sub> 不同消毒时间对胚存活率的影响

Table 1 Impact of different disinfection time by NaClO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, HgCl<sub>2</sub> on the embryo survival rate

灭菌剂种类及浓度	处理时间 (min)	外植体总数 (个)	胚存活数 (个)	胚存活率 (%)	胚整体存活率 (%)
NaClO(4%)	10	56	35	62.4 abc	68.0 a
	20	64	31	48.5 cd	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%)	20	48	28	59.0 bcd	49.0 b
	30	70	22	31.4 de	
HgCl <sub>2</sub> (0.1%)	6	60	8	13.3 e	48.1 b
	10	56	47	83.6 ab	

注:多重比较采用 Duncan 法,无共享字母表示在 0.05 水平上差异显著。

### 2.2 基本培养基及激素组合、浓度对愈伤组织诱导的影响

#### 2.2.1 基本培养基对愈伤组织诱导的影响

基本培养基对愈伤组织诱导影响的结果见表 2。由表 2 可得,MS 培养基上的愈伤率为 23.5% ~ 59.8%,平均值为 40 ~ 0%,愈伤组织大多呈现白色,生长速度一般;S 培养基上的愈伤率为 7.9% ~ 25.7%,平均值为 15.3%,愈伤组织大多呈现白色,生长速度慢,且更易褐化死亡;根据试验结果可知 MS 培养基适合于落叶松成熟胚愈伤组织的诱导。

表 2 培养基和激素组合对愈伤组织诱导的影响

Table 2 Impact of different medium and hormone combinations on callus induction

培养基	激素组合及浓度 (mg · L <sup>-1</sup> )	愈伤率 (%)	愈伤组织的生长情况
MS	0.5a + 0.05b	23.5	白色,紧实,含水量大,生长慢
	0.5a + 0.5b	31.4	白色,紧实,生长较慢
	0.5a + 1.0b	42.7	白色、乳白色,疏松,生长一般
	1.0a + 0.05b	44.3	白色、乳白色,疏松,生长一般
	1.0a + 0.5b	47.6	黄白色、黄绿色,疏松,生长快
	1.0a + 1.0b	40.9	白色,疏松,生长一般
	2.0a + 0.05b	48.1	黄白色、黄绿色,疏松,生长快
	2.0a + 0.5b	52.5	黄白色、黄绿色,疏松,生长较快
	2.0a + 1.0b	59.8	黄白色、黄绿色,疏松,生长较快
	0.05b + 0.5c	26.7	白色,紧实,含水量大,生长慢
	0.5b + 0.5c	32.8	白色,紧实,生长慢
	0.05b + 1.0c	39.5	白色,紧实,生长一般
	0.5b + 1.0c	45.2	白色、乳白色,疏松,生长快
	0.05b + 2.0c	33.1	白色,紧实,生长慢
0.5b + 2.0c	31.9	白色,紧实,生长慢	
S	0.5a + 0.5b + 0.5d	17.6	白色、黄白色,质地硬,致密,生长慢
	0.5a + 0.5b + 1.0d	10.3	含水量大,后期逐渐褐化死亡
	0.5a + 1.0b + 0.5d	15.8	白色、黄白色,质地硬,致密,生长慢
	0.5a + 1.0b + 1.0d	12.4	白色,紧实,生长较慢
	1.0a + 0.5b + 0.5d	14.2	白色,紧实,生长较慢
	1.0a + 0.5b + 1.0d	7.9	含水量大,后期逐渐褐化死亡
	1.0a + 1.0b + 0.5d	16.8	白色、黄白色,质地硬,致密,生长慢
	1.0a + 1.0b + 1.0d	9.8	含水量大,后期逐渐褐化死亡
	2.0a + 0.5b + 0.5d	18.3	白色、黄白色,质地硬,致密,生长慢
	2.0a + 0.5b + 1.0d	14.4	白色,紧实,生长较慢
2.0a + 1.0b + 0.5d	25.7	黄白色,紧实,生长慢	
2.0a + 1.0b + 1.0d	20.2	黄白色,紧实,生长慢	

注: a b c d 依此代表 2 A - D β - BA, NAA, KT。

### 2.2.2 激素组合、浓度对愈伤组织诱导的影响

激素组合、浓度对愈伤组织诱导影响的结果见表2。由表2可得,MS培养基中主要包括2*A*-D+6-BA与NAA+6-BA两种激素组合类型。当2*A*-D与6-BA组合使用时,愈伤率为23.5%~59.8%,平均值43.4%,以2.0 mg·L<sup>-1</sup>2*A*-D+1.0 mg·L<sup>-1</sup>6-BA组合为最佳,愈伤组织呈白色或黄白色,质地疏松,生长速度一般(图1);当添加激素为NAA与6-BA组合时,愈伤率为26.7%~45.2%,平均值34.9%,其中1.0 mg·L<sup>-1</sup>NAA+0.5 mg·L<sup>-1</sup>6-BA组合为最佳,愈伤组织呈白色,紧实,生长速度较慢(图2)。

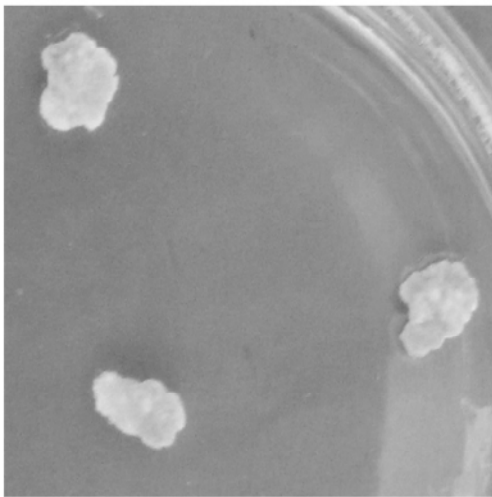


图1 在MS上添加2.0 mg·L<sup>-1</sup>2*A*-D+1.0 mg·L<sup>-1</sup>6-BA生长的愈伤组织

Fig. 1 Growth of callus on the MS with 2.0 mg·L<sup>-1</sup>2*A*-D+1.0 mg·L<sup>-1</sup>6-BA

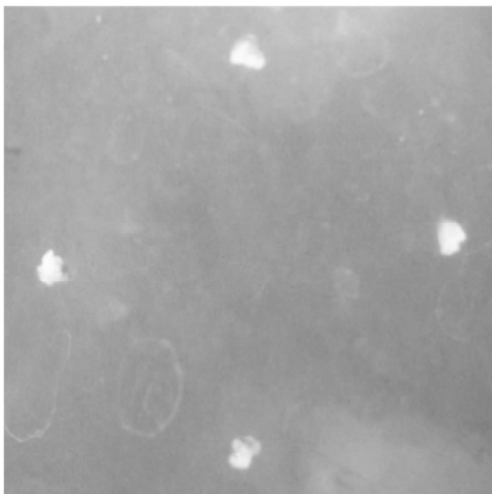


图2 在MS上添加1.0 mg·L<sup>-1</sup>NAA+0.5 mg·L<sup>-1</sup>6-BA生长的愈伤组织

Fig. 2 Growth of callus on the MS with 1.0 mg·L<sup>-1</sup>NAA+0.5 mg·L<sup>-1</sup>6-BA

S培养基上2*A*-D、6-BA与KT3种激素组合使用时,愈伤率为7.9%~25.7%,平均值15.3%,以2.0 mg·L<sup>-1</sup>2*A*-D+1.0 mg·L<sup>-1</sup>6-BA+0.5 mg·L<sup>-1</sup>KT组合为最佳,愈伤组织呈白色或黄白色,紧实,生长速度慢且一段时间后褐化死亡(图3)。

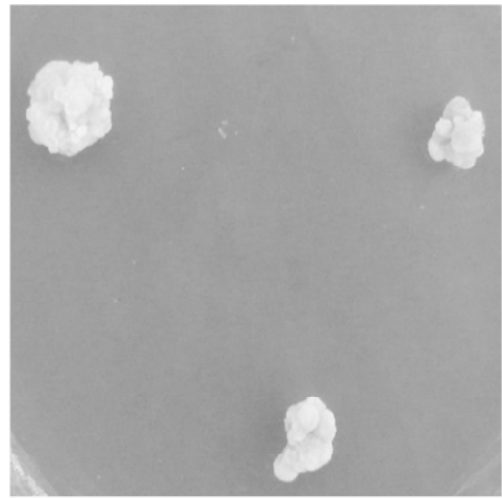


图3 在S上添加2.0 mg·L<sup>-1</sup>2*A*-D+1.0 mg·L<sup>-1</sup>6-BA+0.5 mg·L<sup>-1</sup>KT生长的愈伤组织

Growth of callus on the S with 2.0 mg·L<sup>-1</sup>2*A*-D+1.0 mg·L<sup>-1</sup>6-BA+0.5 mg·L<sup>-1</sup>KT

### 3 结论

组织培养过程中,获得无菌的外植体是植物组织培养取得成功的最基本前提。落叶松成熟种子多带有内生菌,消毒非常困难,对种子表面消毒不能完全杀死内生菌外植体消毒方式<sup>[3]</sup>。本试验证明以4%NaClO对去皮种子消毒处理10 min后,洗净,剥去胚乳再用0.5%次氯酸钠对胚消毒2 min,洗净,胚的污染率最低,存活率达到88.9%,此方法可以作为落叶松外植体的消毒方法。

试验以落叶松成熟合子胚为材料,进行愈伤组织的诱导和增殖,尽管本试验在诱导、继代过程中都出现过褐化、死亡现象,但是最终还是有部分生长旺盛且具胚性的愈伤组织能够长期继代增殖,在MS培养基为愈伤组织诱导的优良培养基,当2*A*-D与6-BA组合使用时,以2.0 mg·L<sup>-1</sup>2*A*-D+1.0 mg·L<sup>-1</sup>6-BA组合为最佳,当添加激素为NAA与6-BA组合时,愈伤率为26.7%~45.2%,平均值34.9%,其中1.0 mg·L<sup>-1</sup>NAA+0.5 mg·L<sup>-1</sup>6-BA组合为最佳,该结论符合在诱导愈伤组织时,生长素(下转第55页)

### 5.2 加强领导, 强化管理

保护区要加强科学管理, 把未建立的制度建立起来, 未完善的规章制度予以完善, 建立健全目标管理责任制, 层层落实, 明确每个职工的责、权、利, 使保护、科研及各项工作落到实处。

### 5.3 加强职工学习和培训

保护区虽然经过了多年的建设和管理, 但在野外工作人员的业务素质还较低, 不能满足保护工作的需要, 需对他们进行思想及业务知识教育, 提高他们的业务水平和保护责任感。

### 5.4 开展科学研究

保护区自身开展的科学研究基本上是空白, 现缺乏对保护区内的资源分布及人为干扰状况的全面了解。根据保护区现有的力量, 可以进行基本的监测工作及简单的科研调查和观察工作, 为保护区的保护管理提供基本的决策依据。建议在此基础上有计划的引进专业人员和加强与大专院校和科研机构的协作, 以加强保护区的基础科研及管理工作。

### 5.5 关于保护区的旅游

保护区内具有一定的旅游资源, 编制了旅游规划, 现正在积极准备开展旅游活动。保护区的旅游特色是野外观看金丝猴, 这就要求保护区要具备非常严格和科学的管理, 规范旅游活动, 坚决制止游客的不良行为。同时, 由于旅游人员要驻扎野外, 必定要烧火煮饭, 产生生活垃圾, 如何避免人类活动对保护区资源的破坏和对环境的污染, 是保护区需认真对待和解决的问题。要开展生态旅游就需要有一定的监测基础和相应的人员能力, 保护区在这方面还比较弱, 还需要加强。总的来说, 在保护区内开展有限的生态旅游活动是可以的, 但由于保护区面积较小, 金丝猴活动范围较为集中, 如果不能有效的管理和控制旅游人员数量, 对保护区的破坏是不可估量

的, 保护区就不可能做到可持续的保护和发展。

### 参考文献:

- [1] 易同培主编. 四川竹类植物志 [M]. 北京: 中国林业出版社, 1997.
- [2] 孙义男, 郑昕. 穆棱东北红豆杉国家级自然保护区景观斑块特征分析 [J]. 森林工程, 2014, 30(4): 46~49.
- [3] 马文宝, 周强, 郑宛, 等. 小寨子沟自然保护区槭树科植物资源及开发利用研究 [J]. 四川林业科技, 2014, 05: 54~58.
- [4] 四川植被协作组. 四川植被 [M]. 成都: 四川人民出版社, 1980.
- [5] 吴征镒主编. 中国植被 [M]. 北京: 科学出版社, 1995.
- [6] 程跃红, 乔麦菊, 唐莉, 等. 卧龙国家级自然保护区外来植物调查 [J]. 四川林业科技, 2015, 03: 125~132.
- [7] 翟鹏辉, 李晔, 李正山. 汗马国家级自然保护区生物多样性现状及其评价 [J]. 森林工程, 2015, 31(1): 26~29+131.
- [8] 秦明生, 等. 四川真菌 [M]. 成都: 四川科学出版社, 1995.
- [9] 卯晓岚. 中国大型真菌 [M]. 河南: 河南科学技术出版社, 2000.
- [10] 卯晓岚, 等. 西藏大型经济真菌 [M]. 北京: 北京科学技术出版社, 1993.
- [11] 中国科学院青藏高原综合科学考察队. 横断山区真菌 [M]. 北京: 科学出版社, 1996.
- [12] 黄年来. 中国大型真菌原色图鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [13] 金鉴明, 王礼婧, 薛达元. 自然保护概论 [M]. 中国环境科学出版社, 1991.
- [14] 陈灵芝. 中国的生物多样性 [M]. 北京: 科学出版社, 1993.
- [15] 苏泽源, 邓会蓉. 江油观雾山省级自然保护区种子植物区系研究 [J]. 四川林业科技, 2015, 36(2): 71~76.
- [16] 孙馨, 路雪梅, 张蕊, 等. 汗马自然保护区景观标识系统研究 [J]. 森林工程, 2013, 05: 16~18.
- [17] 九寨沟县志 1949-2010.
- [18] 九寨沟县森林资源汇编 1949-2010.
- [19] 九寨沟县森林资源 I 类、II 类调查 1985-2005.
- [20] 白河区志, 九寨沟县林业志, 九寨沟县农业志, 九寨沟县工业志, 九寨沟县交通志.

(上接第 74 页)

与细胞分裂素组合使用, 当生长素浓度高于细胞分裂素浓度时, 能提高愈伤率的规律<sup>[5]</sup>, 这为愈伤组织的分化及不定芽的诱导提供了前提。

### 参考文献:

- [1] 孙晓梅, 张守攻. 日本落叶松纸浆材优良家系多性状联合选择. 林业科学 [J]. 2005, 4(41): 48~54.
- [2] 崔海涛, 张玲敏. 长白落叶松形态特征与生物学特性. 现代农业科技 [J]. 2012, 7: 212.
- [3] 王伟达, 李成浩, 张含国, 等. 长白落叶松愈伤组织诱导与不定芽分化. 东北林业大学学报 [J]. 2008, 2(36): 6~7.
- [4] Roberts D R, Flinn B S, Webb D T *et al.* Abscisic acid and indole-3-butyric acid regulation of maturation and accumulation of storage proteins in somatic embryos of interior spruce [J]. Physiologia Plantarum, 1990, 78: 355~360.
- [5] Kim Y W, Moon H K. Enhancement of somatic embryogenesis and plant regeneration in Japanese larch. Plant Cell [J]. Tissue Organ Culture, 2007, 88: 241~245.
- [6] 齐力旺. 华北落叶松体细胞胚胎发生与遗传转化系统建立的研究 [D]. 中国林业科学院, 2000.
- [7] 罗士伟. 植物组织与细胞培养研究工作的进展 - 全国细胞与体细胞杂交先例体呼吸代谢与杂种优势会议 [C]. 1978.
- [8] 赵晓敏. 兴安落叶松胚性愈伤组织诱导研究 [D]. 东北林业大学, 2007.