

# 南京椴胚性愈伤组织的诱导

黄 犀,王欢利,严灵君,罗会婷,汤诗杰\*

(江苏省中国科学院植物研究所,江苏 南京 210014)

**摘要:**以江苏省中国科学院植物研究所保存的南京椴组织培养无菌幼苗为材料,通过对不同组织来源的植物材料、不同光照强度及植物生长调节剂处理条件下愈伤组织的诱导速度及诱导率进行观察统计,确定出适宜的南京椴胚性愈伤组织诱导培养基配方及条件。试验结果表明,高效诱导南京椴愈伤组织最佳外植体为叶柄;诱导培养基配方为MS+0.1 mg/L BA+1.5 mg/L 2,4-D;处理条件为外植体暗培养10 d,之后在光照强度500 lx下光培养5—7 d,然后再转到光照强度2 000 lx下培养。

**关键词:**南京椴;胚性愈伤组织;外植体;植物生长调节剂;光照强度

**中图分类号:**Q943.1;Q944.6;S792.36

**文献标志码:**A

**doi:**10.3969/j.issn.1001-7380.2020.05.004

南京椴(*Tilia miqueliana* Maxim)属椴树科椴树属,是少数以南京命名的树种之一,为我国特有种<sup>[1-2]</sup>。南京椴应用价值广泛,不仅可用于园林观赏,作为蜜源,还具有一定的生态价值和文化价值<sup>[3-4]</sup>。然而,南京椴资源十分有限,国内主要集中在江苏、安徽和浙江等地,呈点状分散分布,群体数量较少,自然更新能力差,种群结构呈衰退型,部分种群仅有少数单株散生于林间,种群极不稳定;加之南京椴生境受人为破坏严重,群体数量及个体数量不断减少<sup>[5-8]</sup>。目前,南京椴的育苗繁殖工作仍处于起步阶段,其研究主要集中于种子发芽<sup>[9-10]</sup>、扦插繁殖<sup>[11-12]</sup>与直接器官发生的组织培养<sup>[13-15]</sup>方面。国内椴属植物研究中,仅有少量关于南京椴愈伤组织诱导的研究报道<sup>[16]</sup>。究其原因,主要是南京椴分布范围不断缩小,社会认知度不高,其应用价值没有被充分挖掘和利用,而批量化繁育南京椴种苗的企业则倾向于通过简单增加播种量的方式提高育苗量,对其他繁育方式关注度不高。本研究旨在通过摸索植物生长调节剂、光照和外植体等条件,简化并明确南京椴胚性愈伤组织诱导所需的条件,为种苗繁育和遗传转化提供技术支持,为种质资源的

保存和创新打下基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 外植体选择试验

试验材料选取江苏省中国科学院植物研究所继代保存的南京椴组织培养无菌幼苗<sup>[15]</sup>。在长势良好的无菌苗高度5 cm左右时,分别剪下叶片、茎和叶柄。选取的叶要尽量大,以便后续切割,选取的茎段应尽量长且粗壮。同批次无菌苗的叶片、茎和叶柄以手术刀分离后,将叶片切成大小为1.5 cm<sup>2</sup>左右的小块,叶柄和茎段则切成长1.5 cm左右的小段。将各外植体分别接种于培养基上,置培养瓶于纸箱中进行愈伤组织诱导的暗培养,温度在24℃左右。待有愈伤组织长出后,转入相应强度的光照下培养。根据前期预试验结果及他人研究结果<sup>[16]</sup>,选择在光照培养后第20天进行统计,并对出愈率、褐化率和死亡率分别进行统计分析( $n>30$ )。出愈率(%)=(诱导出愈伤组织的外植体个数/接种的外植体个数)×100;褐化率(%)=(褐化的外植体个数/接种的外植体个数)×100;死亡率(%)=(死亡的外植体个数/接种的外植体个数)×100。

收稿日期:2020-06-08;修回日期:2020-08-25

**基金项目:**南京市科技计划项目“珍贵乡土树种南京椴种苗繁育技术集成与创新”(201805033);南京市绿化园林局项目“乡土树种南京椴标准化容器育苗技术研究示范”(YLKJ201815ZD);中央财政林业科技推广示范资金项目“大别山冬青等珍贵树种的高效繁育技术集成与示范”(苏[2018]TG01);江苏省林业科技创新与推广项目“珍贵乡土树种南京椴标准化育苗技术集成与示范”(LYKJ[2019]06)

**作者简介:**黄 犀(1981—),男,江苏南京人,助理研究员,博士。主要从事林木育种的研究工作。E-mail:huangxi@cnbj.net。

\* **通信作者:**汤诗杰(1969—),男,安徽东至人,研究员,博士。主要从事园林植物资源发掘、育种、繁殖栽培、示范推广以及植物多样性保护研究。E-mail:tangshijie69@aliyun.com。

### 1.2 植物生长调节剂筛选试验

愈伤组织诱导及其继代培养在 MS 基础培养基中进行,培养基添加 30 g/L 蔗糖与 8 g/L 琼脂后,分别加入对应质量浓度的植物生长调节剂,pH 调整在 5.8—6.0,每个培养瓶中分装 40 mL,在 121 ℃ 下灭菌 20 min。植物生长调节剂配比见表 1。

表 1 植物生长调节剂质量浓度 mg/L

配方编号	6-BA	2,4-D
A	0	0
B	0.1	1.0
C	0.1	1.5
D	0.1	2.0
E	0.1	3.0

### 1.3 光照强度选择试验

待愈伤组织长出后,放入光照下培养,培养基配方为 MS+ 0.1 mg/LBA+1.5 mg/L 2,4-D,光照度分别为低光照强度(500 lx)和高光照强度(2 000

lx)。使用不同层数的半透明黑塑料膜包裹培养瓶以获得不同光照强度,使用光照强度计(HANNA, HI97500)测定相应光照强度。比较在高光照强度下培养 20 d 后,再转入低光照强度培养 3, 6, 10 d 时,愈伤组织的褐变情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同培养基配方中不同外植体来源的愈伤组织诱导结果

不同培养基配方中不同外植体来源的愈伤组织诱导结果见表 2, 其出愈率、褐化率、死亡率的结果统计分析如表 3。可以看出, 2,4-D 和 6-BA 对于南京椴诱导愈伤组织是必需的。但是高质量浓度或者低质量浓度的 2,4-D 对于愈伤组织的诱导都会产生负面的影响。在 2,4-D 质量浓度为 1.5 mg/L 时, 诱导愈伤组织的效果最佳。

表2 不同培养基配方中各种外植体愈伤组织诱导状况

配方编号	叶柄				茎段				叶片			
	样本数/块	出愈数/块	褐化数/块	死亡数/块	样本数/块	出愈数/块	褐化数/块	死亡数/块	样本数/块	出愈数/块	褐化数/块	死亡数/块
A	66	0	0	35	60	0	0	37	65	0	0	39
B	65	56	0	7	65	40	1	5	66	47	1	7
C	65	65	0	0	66	64	0	0	67	60	0	3
D	67	67	5	0	64	64	7	0	65	65	5	0
E	66	53	7	0	65	50	8	0	65	52	6	0

表 3 不同培养基配方中出愈率、褐化率及死亡率

指标	外植体	配方编号				
		A	B	C	D	E
出愈率	叶柄	0	86.15	100.00	100.00	80.30
	茎段	0	61.54	96.97	100.00	76.92
	叶片	0	71.21	89.55	100.00	80.00
褐化率	叶柄	0	0	0	7.46	10.61
	茎段	0	1.54	0	10.94	12.31
	叶片	0	1.52	0	7.69	9.23
死亡率	叶柄	53.03	10.77	0	0	0
	茎段	61.67	7.69	0	0	0
	叶片	60.00	10.61	4.48	0	0

A 配方为不含植物生长调节剂的基础培养基,暗培养阶段各外植体均没有任何愈伤组织形成,转入光培养阶段后部分外植体死亡;在含植物生长调节剂的处理组中,D 配方 3 种外植体的出愈率均为

100.00%,且死亡率均为0,但其褐化率分别为叶柄7.46%、茎段10.94%及叶片7.69%;C配方出愈率略低,分别为叶柄100.00%、茎段96.97%(64/66)及叶片89.55%(60/67),但愈伤褐化率均为0,死亡

率分别为叶柄 0、茎段 0 及叶片 4.48%;B,E 配方的出愈率接近,均未超过 90%,C 配方褐化率较低,死亡率较高,而 E 配方则相反,褐化率在所有配方中是最高的,但其愈伤死亡率均为 0。

2.2 不同外植体对愈伤诱导的影响

由表 4 可以看出,3 种外植体的诱导情况具有

一定差异,叶柄的出愈率为 73.25%,高于茎段和叶片,后 2 者出愈率接近,分别为 68.13%和 68.29%。而死亡率则相反,叶片最高为 14.94%,其次为茎段 13.13%,最低为叶柄 12.77%。茎段褐化率最高,为 5.00%,叶柄和叶片褐化率分别为 3.65%和 3.66%。

表 4 不同外植体的诱导结果

外植体	样本数/块	出愈数/块	死亡数/块	褐化数/块	出愈率%	死亡率%	褐化率%
叶柄	329	241	42	12	73.25	12.77	3.65
茎段	320	218	42	16	68.13	13.13	5.00
叶片	328	224	49	12	68.29	14.94	3.66

2.3 光照条件对南京椴愈伤组织诱导的影响

试验发现,在暗培养之后的光培养过程中,低光照强度(500 lx)的培养明显减缓了愈伤组织的褐化(见表 5)。直接转入高光照强度(2 000 lx)的愈伤组织,在培养 20 d 后,褐化率为 80%。随着低光照强度培养时间的增加,褐化率逐渐下降。3 d 低光照强度培养组的褐化率为 26.67%,6 d 后的褐化率为 16.67%,9 d 后的褐化率为 13.33%。

表 5 不同光照条件下愈伤组织褐化率

500 lx 培养时间/d	样本数/块	褐化数/块	褐化率%
0	30	24	80.00
3	30	8	26.67
6	30	5	16.67
9	30	4	13.33

3 结论与讨论

2020 年度国家自然科学基金项目指南专门指出:一些重要领域如森林培育学、经济林学和林木遗传育种学等未能凝练出本领域重要的基础科学问题,林木遗传育种研究缺少完善的辅助育种和早期选择体系,关于基因同源克隆及异源功能验证项目仍旧多属跟踪性研究,存在同质化现象<sup>[17]</sup>。这一问题在南京椴遗传育种及基础研究里十分突出,目前已发表的各项研究仅限于对其生理生化方面的分析讨论,分子生物学相关研究工作尚处于起步阶段。虽然目前对南京椴的研究不够深入,但及时建立一个成熟的南京椴同源转化体系不仅可以方便分子生物学研究工作的开展与深入,完成对南京椴重要基因的功能验证,更能加速种质资源创新速度,成为南京椴林木育种的加速器。同时也可以在此基础上为其他椴树属植物的同源转化体系的构

建提供借鉴。而提供大量合格愈伤组织,则是建立南京椴同源转化体系的基础。

本研究旨在通过摸索植物生长调节剂条件、光照条件和外植体条件,简化南京椴胚性愈伤组织诱导需要的外部因素,从而能为下一步体胚诱导试验生产合格愈伤组织。同类型工作之前仅刘芳在其硕士学位论文中进行了探索<sup>[16]</sup>。

不同植物生长调节剂质量浓度配比条件对南京椴愈伤诱导的影响有决定性作用。研究表明,许多木本植物的愈伤组织诱导需要 2,4-D 的参与<sup>[18-20]</sup>。本研究结果分析表明,MS 基础培养基加上 30 g/L 蔗糖和 8 g/L 琼脂后,植物生长调节剂质量浓度为 0.1 mg/L BA + 2.0 mg/L 2,4-D 的培养基配方对诱导南京椴愈伤组织的诱导率最高、死亡率最低,但褐化率在 7.46%—10.94%。0.1 mg/L BA+1.5 mg/L 2,4-D 的培养基配方对诱导愈伤组织的诱导率次高,为 89.55%—100%,但其褐化率均为 0,且死亡率仅叶片有 4.48%,其余 2 种外植体均为 0。刘芳在试验中使用了 BA+2,4-D 及 BA+NAA 植物生长调节剂组合,分别进行浓度梯度差异试验,发现 BA+NAA 无法诱导愈伤形成;而 BA+2,4-D 组合中,2,4-D 的最佳质量浓度区间为 0.5—1.0 mg/L。其 2,4-D 的最佳质量浓度区间与本试验结论略有差异,可能与使用外植体材料的生理状态及物种基因型有关。

在外植体的选择上,叶柄要比叶片和茎段在出愈率、褐化率上更加适合作为诱导愈伤组织的外植体。但组织培养生产的无菌叶片数量上要远远多于叶柄,大批量生产愈伤组织时,叶片也可作为外植体加以使用。刘芳试验则选择叶片、茎段及根尖作为外植体来源,认为叶片最适宜作为外植体,但

其试验中也发现叶片近叶柄部位诱导速度最快,愈伤组织质量最好。

组织培养褐变的成因是复杂的,外植体材料的生理状态、基因型、生长部位与大小,培养基成分、培养温度与光照等多种因素,都会导致褐变的发生。多酚氧化酶(PPO)在受伤组织中的活性升高,通过作用于酚类物质,将其氧化为醌类物质,从而引起外植体和愈伤组织褐化<sup>[21-22]</sup>。在培养基中加入抗氧化剂或吸附剂,是防止外植体褐变的有效方法。刘芳在培养基中添加抗氧化剂 Vc,发现在暗培养条件下,Vc 的抗褐化效果较好,能够有效控制愈伤组织褐化现象;但光培养条件下,基本不能发挥抗褐化的功效。研究表明,低温驯化也可以显著提高某些植物愈伤组织的抗氧化酶活性<sup>[23]</sup>。本试验从简化愈伤组织诱导的外部条件考虑,选择 2 种不同光照度条件进行对比,发现过早、过高的光照培养,对愈伤组织的生长有显著负作用,高光照度条件下,愈伤组织死亡率及褐化率均高于低光照度条件。

通过对试验结果的分析,以叶柄为外植体,在 MS+ 0.1 mg/L BA+ 1.5 mg/L 2,4-D 的培养基上暗培养 10 d 后在光照强度 500 lx 下光培养 5—7 d,然后再转到正常光照(2 000 lx)培养,为高效诱导南京椴愈伤组织的方法。

#### 参考文献:

- [1] 唐 亚,诸葛仁.椴树属的地理分布[J].植物分类学报,1996,34(3):254-264.
- [2] 诸葛仁,唐 亚.椴树属形态演化于生物地理学[J].西南林学院学报,1995,15(4):1-14.
- [3] 汤诗杰,汤庚国.南京椴的资源现状及园林应用前景[J].江苏农业科学,2007(1):234-236.
- [4] 汤诗杰.南京椴生态学及园林应用研究[D].南京:南京林业大学,2008.
- [5] 史锋厚,卢 芳,沈永宝,等.椴树属植物研究进展[J].林业科技开发,2006,20(1):12-15.
- [6] 史锋厚,沈永宝,施季森.南京椴资源的保护和开发利用[J].林业科技开发,2012,26(3):11-14.
- [7] 汤诗杰,汤庚国.安徽皇藏峪自然保护区南京椴种群结构分析[J].植物资源与环境学报,2007,16(3):58-63.
- [8] 汤诗杰,彭 志,汤庚国.宝华山南京椴群落的特征分析[J].扬州大学学报(农业与生命科学版),2008,29(1):90-94.
- [9] 史锋厚,朱灿灿,沈永宝,等.南京椴种子的萌发与休眠[J].福建林学院学报,2008,28(1):48-51.
- [10] 史锋厚,沈永宝,姚文飞,等.一种磁处理促进南京椴种子发芽的方法:CN201410611943.8[P].2014-10-30.
- [11] 杨 虹,李乃伟,郭忠仁,等.南京椴扦插繁殖技术研究[J].安徽农业科学,2010,38(26):14390-14391,14397.
- [12] 史锋厚,郑 晨,罗 帅,等.南京椴嫩枝扦插技术研究[J].中南林业科技大学学报,2017,37(8):9-13.
- [13] 汤诗杰,李乃伟,汤庚国.南京椴组织培养快繁体系的建立[J].江苏农业科学,2008(6):87-89.
- [14] 汤诗杰,李乃伟,束晓春,等.一种南京椴的微繁方法:ZL201510717419.3[P].2015-10-28.
- [15] 束晓春,汤诗杰,李乃伟,等.南京椴组织培养快繁体系的优化[J].分子植物育种,2019,17(5):1605-1610.
- [16] 刘 芳.南京椴组织培养的研究[D].南京:南京林业大学,2007.
- [17] 国家自然科学基金委员会.2020 年度国家自然科学基金项目指南[M].北京:科学出版社,2020.
- [18] 陈 红,陆小清,王传永,等.屋久岛紫薇子叶愈伤组织诱导及植株再生技术初探[J].江苏林业科技,2018,45(5):14-16.
- [19] 王红玲,孙 倩,黄瑞芳.椴叶泡桐杂种无性系 9503 的组织培养技术研究[J].江苏林业科技,2019,46(2):43-45.
- [20] 周 鹏,吴晓清,黄 婧,等.构树胚性愈伤组织及体胚诱导研究[J].江苏林业科技,2019,46(6):27-30.
- [21] 罗春梅,刘爱民.仙茅组织培养的褐变因素及防治措施[J].南方农业,2019,13(30):137-139.
- [22] 冯 莹,钱莲文,林庆良.不同激素对青钱柳外植体和愈伤组织褐化的影响[J].植物学报,2019,54(5):634-641.
- [23] 余露露,王伟娟,宋静静,等.低温驯化对西藏绵头雪莲愈伤组织抗冻性及抗氧化能力的影响[J].南京林业大学学报(自然科学版),2019,43(5):181-186.