

秃杉组织培养研究

贺竹梅

(云南省农科院遗传工程研究室, 昆明 650223)

杨貌仙

(云南大学生物系, 昆明)

摘要 本文详细报道了从秃杉 (*Taiwania flousiana* Gaussen) 离体胚诱导不定芽、不定根及从无菌苗茎端培养再生植株的过程。诱导不定芽要求较低的蔗糖浓度(以 3% 最好); 同时 BA 是必须的, 在附加 0.1—3 mg/l BA 的 White 培养基上, 从离体胚的子叶或胚轴上诱导了不定芽的发生(以 1 mg/l 最好); NAA 与 BA 结合使用, 对不定芽诱导无促进作用; 适当提高光照有利于不定芽的诱导。在诱导不定芽的同时, 在子叶表面还观察到有许多无结构的“不定突起”。不定芽起源于子叶表皮下 1—2 层细胞。IBA 对诱导离体胚上产生不定根效果较好。在有或无生长素的培养基上, 从生长 1 月龄的无菌苗茎端培养获得了不定根的产生, 在加有细胞分裂素的培养基上, 从无菌苗上产生了腋芽。

关键词 秃杉; 离体胚培养; 无菌苗茎端培养; 植株再生

虽然裸子植物的组织培养研究在本世纪二十年代就已开始^[1], 但直到 1950 年 Ball^[2] 才从红杉茎段培养获得了芽的分化。由于这一划时代成果的鼓舞, 人们才开始重视裸子植物的组织培养。但在以后的二十多年里, 一直没有能获得完整植株的再生, 直到 1973 年, Brown 等^[3,4] 才首次从长叶松 (*Pinus palustris*)、湿地松 (*P. elliottii*) 和火炬松 (*P. taeda*) 成熟胚培养的子叶上获得了再生小植株。近十几年来, 这方面的研究进展很快, 已有许多作者进行了综述和概括^[1,5-8]。

秃杉 (*Taiwania flousiana* Gaussen) 属杉科、台湾杉属, 是我国的重点保护植物。由于它的营养生长周期长, 加上其树干高大, 种子采收困难, 故种子供应不足, 同时其营养繁殖也存在一定困难, 因此, 我们对其进行了组织培养方面的研究。本文在研究了不同培养条件对秃杉离体胚萌发生长影响的基础上^[9], 对从其离体胚培养诱导不定芽、不定根发生及从无菌苗茎端培养再生植株进行了研究, 以期秃杉的快速繁殖和裸子植物的组织培养提供资料。

材料和方 法

种子来源、消毒方法、培养条件均同前文^[9]所述。

种子消毒后, 将剥出的胚横卧接种在固体培养基表面。基本培养基为 White (1963) 改良培养基。在不定芽诱导试验中, 另外还采用了如下培养基(以“BD”表示): 大量元素为 1/2 LP, 微量元素及有机物为(单位: mg/l) 1/10 MS 铁盐, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 1.1, KI 0.32, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.0025, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.4, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.0025, H_3BO_3 0.3, $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.025, 肌醇 50, 硫胺素 0.5, 吡哆醇 0.5, 烟酸 0.3, DL-半胱氨酸 0.01, 蔗

糖30000, 琼脂7000, BA 2, pH调整为5.4—5.8。

无茵苗茎端培养。离体胚在 White基本培养基上萌发生长1月后, 将正常发育植株的茎端切下, 苗长3—8 mm, 垂直插入培养基中, 深1mm左右。

取不同培养时期的胚用 FAA 固定, 在脱水过程中用苯胺番红整体染色20小时, 用常规石蜡制片法制片, 切片厚度为10 μ , 固绿复染。

结果与讨论

一、不定芽诱导的影响因素

1. 蔗糖浓度的影响

以White+BA0.5 mg/l+NAA 0.01 mg/l为培养基, 补加1—11%不同浓度的蔗糖, 试验了其不定芽诱导的影响, 其结果如表1所示。

从表1可以看出, 在3—7%蔗糖浓度范围内均可诱导秃杉离体胚发生不定芽, 其中以3%效果较理想。

在裸子植物离体胚培养中, 不同种对诱导产生不定芽所要求的蔗糖浓度不同。如在0.7—7%蔗糖浓度范围内, 欧洲赤松(*Pinus sylvestris*)和小干松(*P. con-*

torta) 离体胚培养不定芽的形成能力基本一样^[10]; 3—10%的蔗糖浓度范围对白皮松(*P. bungeana*)^[11] 离体胚子叶上不定芽的诱导均有效应, 在7%时效果特别明显。

2. 植物激素和光照强度的影响

关于裸子植物离体胚培养中不定芽的诱导已有不少报道, 植物激素对不定芽的诱导有明显的作用^[1, 4, 8, 11-14]。如美国乔松(*Pinus strobus*)、长叶松、小干松、白皮松及北美黄杉(*Pseudotsuga menziesii*)的离体胚分别在含有IBA 1—5 mg/l、BA 1—5 mg/l + NAA 2 mg/l、BA 0.005—5 mg/l、BA 0.5—1 mg/l + NAA 0.5 mg/l及BA 0.1—16 mg/l的培养基上诱导了不定芽的发生。在我们的实验中, 通过一系列BA浓度试验, 发现随着BA浓度的增加, 秃杉离体胚的胚芽、胚根发育受阻, 胚发生膨大的数目越来越多, 在适当的BA浓度范围内, 诱导了不定芽的分化, 其结果如表2所示。

表2 BA浓度及光照强度对秃杉不定芽诱导的影响*

BA浓度(mg/l)	0.01	0.1	0.5	1	2	3	5
光照强度(Lx)	400	400	400	2000	400	2000	400
接种胚数(个)	83	78	65	55	60	70	74
发生不定芽胚数(个)	0	0	2	2	4	7	2
百分率	0	0	3.1	3.6	6.7	10	2.7

*培养70天统计结果。

从表2可以看出,在0.5—3 mg/l BA范围内均诱导了不定芽的分化,其中以BA 1 mg/l最为有利。适当提高光照强度有利于不定芽的分化。

另外,在BD培养基上(见“材料和方法”部分,光照强度为2000 Lx),离体胚培养三周后,发现个别胚其与培养基相接触的子叶尖端出现有许多绿色小突起,五周后,这些突起发育成明显的不定芽。每个子叶尖端约有10个左右不定芽(图版1:3)。

生长素(NAA)与细胞分裂素(BA)结合使用,对秃杉离体胚培养产生不定芽的影响取决于它们的相对含量和绝对含量。表3示NAA与BA结合使用时的情况。当固定BA浓度为0.5 mg/l时,NAA在0.001—0.1 mg/l范围内均有不定芽的发生,但随着NAA浓度的增加,发生膨大的胚数亦增加,当NAA浓度达到0.5 mg/l时,整个胚全部愈伤组织化,无不定芽发生;当固定NAA浓度为0.01 mg/l时,在三种BA浓度中,以BA 0.5 mg/l对不定芽诱导最为有利。比较表2与表3,可以看出BA与NAA结合使用对不定芽的诱导并无促进作用。NAA单独使用均不能诱导不定芽的发生。

表3 BA与NAA结合使用对秃杉离体胚培养诱导不定芽、不定根的影响*

BA 浓度 (mg/l)	0.5					0.5	1	2
	0.001	0.01	0.05	0.1	0.5	0.01		
接种胚数(个)	55	67	67	64	60	67	70	74
发生不定芽胚数(个)	2	3	2	1	0	3	1	0
发生不定根胚数(个)	0	0	1	3	2	0	0	0

*培养80天统计结果。

从以上这些结果表明,不同植物种其胚培养分化不定芽所要求的外源激素种类和浓度存在较大差异,这可能是与不同树种的胚内所含内源激素的种类和量不同有关。

在秃杉胚培养中,不定芽可发生在子叶或胚轴上,这与欧洲赤松^[10]、小干松^[12]、辐射松(*Pinus radiata*)^[16]、加勒比松(*P. caribaea*)^[16]等胚培养时结果一致。而在另一些植物,如白皮松^[11]、长叶松^[13]胚培养时,仅在子叶上产生不定芽。桂耀林认为,不定芽发生部位上的这些差异,可能与材料及培养基的组成不同有关^[11]。根据我们对秃杉的试验,在不同培养基条件(主要是激素的变化)下,从子叶和胚轴上均可发生不定芽或不定根,只是诱导不定芽与不定根所要求的激素种类和浓度不同,及不定芽更多的发生在子叶上,而不定根更多的发生在胚轴上,这可能是由于胚内各部分内源激素分布不同,因而对外源激素的刺激反应不一所致。

二、不定芽的发生

关于裸子植物离体胚培养中不定芽发生的组织学研究,已有过一些报道。在长叶松^[13]中,不定芽起源于子叶的外层细胞(表皮或下表皮细胞);在白皮松^[11]中,不定芽是由子叶表皮细胞分裂而来;花旗松^[17]子叶的下表皮层细胞在培养4天后开始分裂,20天后可看

到芽原基。将秃杉离体胚接种在 White + BA 0.5 mg/l + NAA 0.01 mg/l 培养基上, 培养 4 天后, 仅子叶略为张开, 胚呈淡黄色, 此时胚的各部分细胞正处于分裂前的准备阶段, 核仁明显, 很少细胞内具双核仁; 但此时还未观察到核的分裂相。培养 12 天的胚, 大多数子叶和胚轴变成绿色, 细胞分裂活跃, 可观察到有丝分裂的各个时期, 这时胚略有膨大, 在靠近表皮的 1—2 层下表皮细胞中可见到分生细胞团 (图版 1: 7)。培养 20 天时, 肉眼可见在子叶表面有许多小的瘤状突起, 从切片上可观察到不定芽 (图版 1: 6), 同时在少数胚上亦可用肉眼观察到少数不定芽, 在原培养基上继续培养 1 月后, 不定芽停止了生长发育 (图版 1: 1), 子叶细胞积累淀粉粒。在大多数情况下, 用肉眼观察每个胚上仅有 1—2 个不定芽, 但从切片上有时能观察到多个不定芽的发生。这说明从秃杉离体胚培养诱导不定芽发生的潜力是较大的, 只是可能由于培养条件的原因, 不能使其进一步发育。

在上述培养基上培养 20 天后, 在子叶上除观察到不定芽外, 还观察到一些表面无结构的指状突起, 我们称之为“不定突起 (Adventitious protuberance)” (图版 1: 2), 这些突起在子叶尖端特别丰富, 对于它的产生, BA 是必需的。切片观察表明, 不定突起内无分化的结构。将其转入无 BA 的培养基上后, 亦未观察到进一步的分化, 扫描电镜观察表明, 其表面结构与培养的子叶表面一样, 凸凹不平 (图版 1: 8)。关于类似的结构, Campbell 报道在白云杉 (*Picea glauca*) 下胚轴培养中, 在其上发生有鳞片状器官 (Scale-like organ)^[18] 或称鳞片状的赘疣 (Outgrowth)^[19], BA 对这些鳞片状器官的诱导是必须的, 但它抑制其进一步的发育, 当将诱导了这些结构的外植体转移到无 BA 的培养基上后, 这些结构可以发育成针叶或芽的结构。这些鳞片状器官是表层起源的, 这与秃杉离体胚培养中发生的“不定突起”相同, 只是在这些“器官”内可观察到维管束或形成层的分化。在秃杉的实验中, 我们发现不定突起与不定芽二者在发育初期并无明显区别, 可能由于某些因素的影响, 它只是继续分裂而不进行分化。在植物组织培养中, 这种现象时有发生。在秃杉离体胚培养中, 是否可以考虑利用不定突起和不定芽的起源相同, 根据不同的培养时期采用不同的培养条件, 使不定突起数目减少, 而向不定芽方向发展的数目增多, 这对秃杉的大量、快速繁殖有着重要的意义。

表 4 不同生长素对秃杉离体胚培养产生不定根的作用*

生长素种类	接种胚数 (个)	发生不定根胚数 (个)	百分率	说 明
IAA	47	5	10.6	大多数胚根、子叶发育正常, 基本上不产生愈伤组织, 胚根、不定根细长。
NAA	52	7	13.5	整个胚成一团愈伤组织, 胚根及不定根粗壮、较短。
2,4-D	43	6	14	胚根基部、胚轴及部分子叶产生愈伤组织, 胚根粗壮, 不定根短小。
IBA	42	7	16.7	在胚轴或子叶上有少量愈伤组织, 胚根及不定根粗壮。

*培养 80 天统计结果。生长素浓度为 0.5 mg/l。在四种情况下, 胚芽均不发育。

三、不定根诱导及完整植株的再生

用秃杉离体胚、萌发1月的无菌苗茎端切段进行生根试验,结果表明从这些外植体上均可诱导不定根的产生。表4示不同生长素对离体胚培养产生不定根的作用。

在以上4种生长素中,所诱导的不定根既可发生在子叶上,也可发生在胚轴上。通常每个胚产生1—2条不定根,偶有3—4条,一般不定根的生长长度较胚根短。

从表4可以看出,在这4种生长素中,IBA对不定根的诱导最为有利,不但其诱导率较高,且不定根的发育也较理想。在White+IBA 0.5 mg/l培养基上,一般培养20天就能观察到不定根。

生长素的量对不定根的诱导有很大影响,如NAA在0.05—0.5 mg/l范围内均可诱导离体胚产生不定根,而在NAA 1 mg/l时,就不能从外表观察到不定根,但在此培养基上培养40天后,将胚轴外面的愈伤组织剥去就能观察到一些小的不定根突起,在原培养基上继续培养半年以上,仍不能从愈伤组织表面见到不定根,只有将其转入无激素的基本培养基后,才能观察到这些小的不定根生长、穿过愈伤组织成为明显可见的不定根。由此可见,在生长素浓度较高时,也可诱导不定根的发生,但只有在消除了外源生长素的抑制作用后,这些小根才能进一步生长发育。

从表3也可以看出,生长素的量对诱导离体胚产生不定根起着关键性作用。同时比较表3、表4可见细胞分裂素的加入对不定根的诱导反而有抑制作用。

无菌苗茎端培养。将萌发1月的无菌苗茎端切下接种于(A)、(B)、(C)三种培养基上,其结果如表5所示(图版1:4示从苗茎端培养再生的小植株)。

表5 不同培养基对诱导秃杉无菌苗茎端切段生根的影响*

培养基	接种苗数	发生不定根苗数	百分率
(A) White	10	1	10
(B) White+KT 0.5+ NAA 0.05	22	2	10
(C) White+IBA 0.5	9	5	55.6

*培养80天统计结果。

从表上看,在(A)、(B)两种培养基上,无菌苗的发根率均为10%,但在(B)培养基上,除生根的10%以外,另还有40%左右的苗段发生了小的不定根突起,由此可见生长素对不定根诱导的作用。目前,我们对秃杉无菌苗培养仅能获得一些较短的不定根,至于不定根的进一步生长和发育,还有待于进一步的研究。

关于裸子植物培养中腋芽的形成,David在《树木组织培养》一书中进行了综述^[8]。David和David在含有BA (10^{-5} mol)的培养基上培养南欧海松(*Pinus pinaster*)外植体,从嫩叶和子叶的腋部出现了芽;David和Isemukali等从20天苗龄的南欧海松上采取含有顶端分生组织和子叶的下胚轴片段外植体,培养在含有BA (10^{-5} mol)和NAA (2.5×10^{-3} mol)的培养基上,15天后,出现了具有良好组织化的腋芽,作者认为在外源激素的作用下,子叶的存在刺激了芽的发生。在我们的实验中,不带子叶的秃杉无菌苗在外源细胞

分裂素 (KT) 的作用下也刺激了腋芽的发生 (B 培养基上)。Boulay 研究建立了离体繁殖花旗松的系统, 在这一系统中, 腋芽的发育并不依靠生长物质^[17]。当然, 腋芽的发育与子叶、生长物质及其它条件之间究竟有多大关系, 这是一个比较复杂的问题, 有待于深入的研究。

利用从裸子植物离体胚或其它幼嫩材料为外植体发展起来的培养技术, 有些已经应用于以成年树为材料的培养^[8, 16], 但由于植物体在成熟过程中, 其生理状态的改变, 使得在幼嫩材料中发展起来的技术不可能完全应用, 甚至完全不能应用于成年植物材料的培养上。在我们对 7—8 年生树的秃杉当年生枝条的生根试验中, 仅能获得愈伤组织, 因此, 对于秃杉组织培养技术的实际应用, 还需作进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] Dodds, J. H., 1983: Tissue culture of trees. 6—12, the Avi Publishing Company, Inc.
- [2] Ball, E., 1950: Differentiation in a callus culture of *Sequoia sempervirens*. Growth, 14: 295—325.
- [3] Sommer, H. E. and C. L. Brown, 1974: Plantlet formation in pine tissue culture. Amer. J. Bot. 61 (Suppl): 11.
- [4] Brown, C. L. and H. E. Sommer, 1977: Bud and root differentiation in conifer cultures. Tappi, 60(6): 72—73.
- [5] Karnosky, D. F., 1981: Potential for forest tree improvement via tissue culture, BioScience, 31: 114—120.
- [6] 罗士韦, 1979: 我国植物组织培养工作的进展。自然杂志年鉴, 1, 54—1.72.
- [7] 王怀智, 1983: 植树造林与组织培养。林业科学, 19: 292—301.
- [8] David, A., 1982: In vitro propagation of gymnosperms, In tissue culture in forestry, J. M. Bonga and D. J. Durzan ed., 72—108, Martinus Nijhoff/Dr. Junk Publishers.
- [9] 贺竹梅等, 1989: 不同培养条件对秃杉离体胚萌发生长的影响。云南植物研究, 11: 227—230.
- [10] 沈熙环等, 1982: 由欧洲赤松 (*Pinus sylvestris* L.) 胚离体培养出完整小植株的初步研究。林业科学, 18: 405—408.
- [11] 桂耀林, 1983: 白皮松离体胚子叶的组织分化和不定芽的形成。植物学集刊 (第 1 集), 91—96.
- [12] Arnold, S. V. and T. Eriksson, 1981: In vitro studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta*. Can. J. Bot. 59: 870—874.
- [13] Sommer, H. E. et al., 1975: Differentiation of plantlets in longleaf pine (*Pinus palustris* Mill) tissue culture in vitro. Bot. Gaz. 136: 196—200.
- [14] Minocha, S. C., 1980: Callus and adventitious shoot formation in excised embryos of white pine (*Pinus strobus*). Can. J. Bot. 58: 366—370.
- [15] Reilly, K. and J. Wasker, 1977: Vegetative propagation of radiata pine by tissue culture: plant formation from embryonic tissue. N. Z. J. For. Sci. 7: 199.

- [16] Webb, D. T. and O. D. Santlago, 1983: Cytokinin induced and formation on caribbean pine (*Pinus caribaea*) embryo in vitro. *Plant Science Letters*, 32: 17—21.
- [17] 江苏省植物组织培养研究协会, 1988: 经济植物组织培养实用技术. 233, 江苏科技出版社.
- [18] Campbell, R. A. and D. J. Durzan, 1975: Induction of multiple buds and needles in tissue cultures of *Picea glauca*. *Can. J. Bot.* 53: 1652—1657.
- [19] Campbell, R. A. and D. J. Durzan, 1976: Vegetation of *Picea glauca* by tissue culture. *Can. J. For. Res.* 6: 240—243.

STUDIES ON THE TISSUE CULTURE OF TAIWANIA FLOUSIANA

He Zhumei

(Genetic Engineering Laboratory, Yunnan Academy of
Agricultural Sciences, Kunming 650223)

Yang Maoxian

(Department of Biology, Yunnan University, Kunming)

Abstract The present paper reports the processes that adventitious buds and roots are induced from excised embryos and plantlets are regenerated from bacteria-free shoots of one-month-old seedling of *Taiwania flousiana* Gaussen. For inducing of adventitious buds, BA is necessary and sucrose of lower concentration is required (the best concentration of BA is 1 mg/l, sucrose's is 3%), and increasing light intensity properly is advantage. Adventitious protuberance is seen when adventitious bud is induced. The best auxin to induce adventitious roots from the excised embryos is IBA among IBA, IAA, NAA, and 2, 4-D. Bacteria-free shoots of one-month-old seedlings are induced to form adventitious roots when cultured on media containing auxin or not and to develop axillary buds when cultured on media containing cytokinin. Cytohistological examination showed that the adventitious buds originated from cells of 1st to 2nd layer under epidermis of the cotyledon.

Key words *Taiwania flousiana*; in vitro culture of embryos; bacteria-free shoot culture; regeneration of intact plantlets

图 版 说 明

图 1. 子叶尖端的不定芽;

图 2. 子叶上的不定突起;

图 3. 子叶尖端的不定芽丛;

图 4. 从无菌苗苗端培养再生的小植株;

图 5. 无菌苗培养, 示其腋芽发育;

图 6. 从子叶上发生的不定芽的纵切面;

图 7. 子叶横切面, 示表皮下的分生细胞团;

图 8. 不定突起的扫描电镜观察, 示其表面凹凸不平。

Fig. 1. Adventitious buds (arrows) at the tip of cotyledon of a *Taiwania flousiana* embryo.

Fig. 2. Adventitious protuberances on the cotyledon.

Fig. 3. Adventitious bud-cluster at the tip of *Taiwania flousiana* cotyledon (arrow).

Fig. 4. Plantlets regenerated from bacteria-free shoots.

Fig. 5. Bacteria-free shoots which were cultured on the medium containing cytokinin showing the development of several shoots from the axillary buds.

Fig. 6. Longitudinal section of adventitious bud which was induced on the cotyledon.

Fig. 7. Transverse section of the cotyledon showing meristematic cell group.

Fig. 8. Scanning electron microscope observation of adventitious protuberance showing its uneven surface.

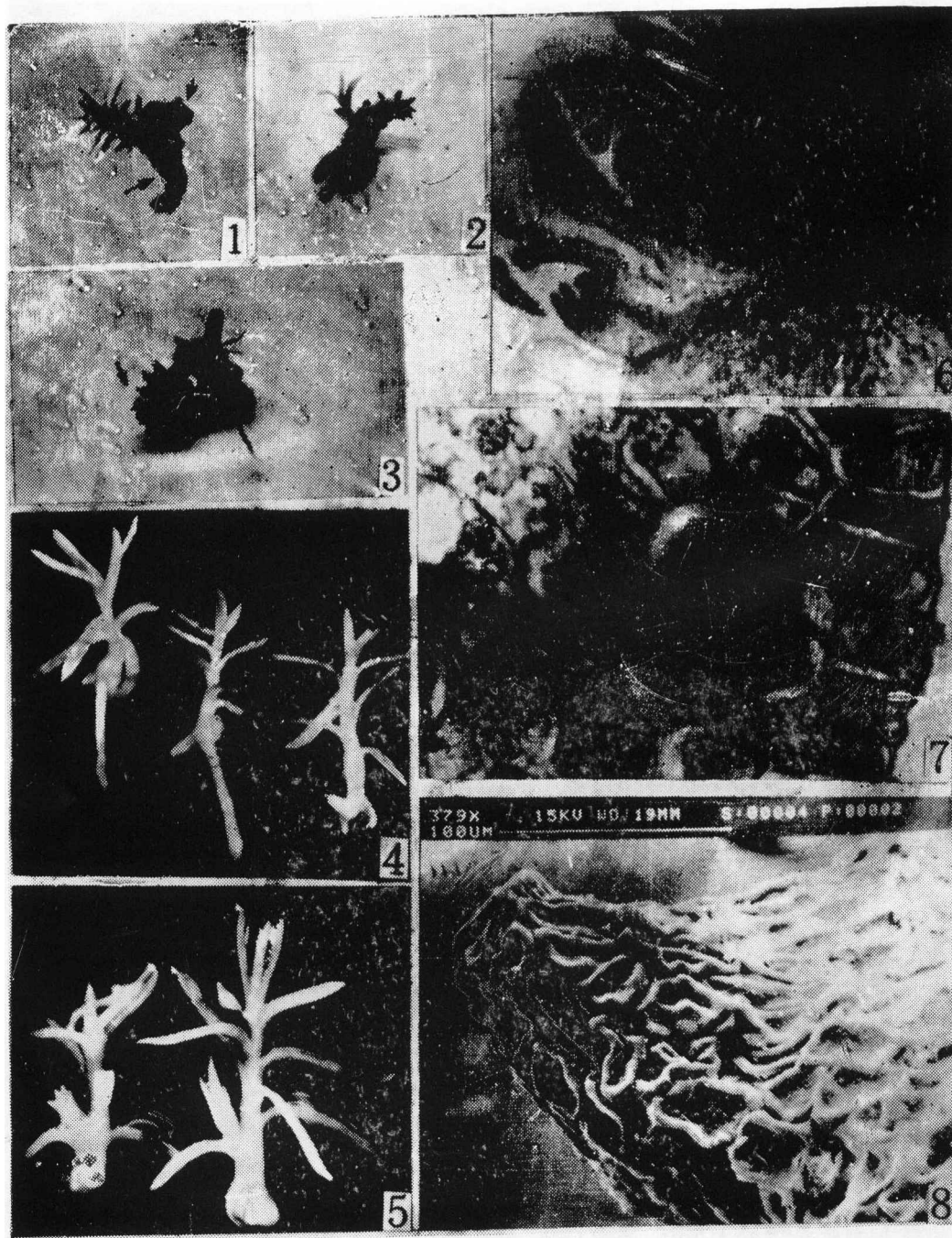
新书信息

研究、开发利用植物资源的工具书 《广西植物志》第一卷出版

《广西植物志》记载广西野生及习见栽培的维管束植物, 包括蕨类植物、裸子植物和被子植物, 分为四卷出版。由李树刚、梁畴芬两教授编辑, 并有王文采、路安民、张宏达、陈德昭、高蕴璋、李秉滔、莫新礼、方鼎、高成芝、陈秀香、毛宗铮、韦裕宗、韦发南等教授、学者参加撰写的本志第一卷已由广西科学技术出版社出版。

《广西植物志》第一卷收载裸子植物和被子植物的木兰科到桃金娘科(按哈钦松系统), 共48科、353属、1380种、3亚种、121变种、17变型, 对科、属、种(含亚种、变种和变型)的名称、形态特征(着重对比特征)、产地、生境、分布及经济用途等均有扼要记述, 科下有比较详细的分属和分种检索表, 并有植物形态特征比较图或全图的图版356幅(含982种), 占收载植物种类总数的64.6%, 以便认辨。本志可供植物学、农业、林业、园艺、医药、轻工等部门工作者及有关的教学、生产部门参考应用。

本志为16开本, 共157万字, 975页, 每本定价平装30元, 精装35元。欲购此书者, 可向当地新华书店购买或向广西植物研究所分类室邮购, 每本加收挂号邮费5元。书款可信汇或邮汇到广西桂林市雁山广西植物研究所分类室, 邮政编码541006, 开户银行: 广西桂林市农行雁山营业所, 帐号43103, 请写清楚购买书名、册数及购买人姓名、邮址。



See explanation at the end of text