维普资讯 http://www.cqvip.com

武汉植物学研究 2006,24(1):83~86
Journal of Wuhan Botanical Research

美洲黑杨(中嘉8号)离体叶片再生研究

康 薇,郑 进,刘凯于,彭建新,洪华珠*

(华中师范大学农药与化学生物学教育部重点实验室,武汉 430079)

摘 要:用中嘉8号杨[*Populus deltoids*(I-63×I-69)]试管苗叶片作外植体,在添加不同生长素和细胞分裂素浓度配比的1/2(N)MS培养基上,筛选出叶片直接分化不定芽的最适培养基1/2(N)MS +0.2 mg/L BA +0.02 mg/L NAA +25 g/L 蔗糖 +7 g/L 琼脂,不定芽分化率为85%。同时发现,一定浓度的KT对生根具有促进作用,最适生根培养基为MS +0.08 mg/L KT +0.02 mg/L NAA +25 g/L 蔗糖 +8 g/L 琼脂,生根率为82.2%。

关键词:美洲黑杨[*Populus deltoids*(I-63×I-69)];叶片;再生;生长调节物质

中图分类号:Q943.1 **文献标识码**:A **文章编号**:1000-470X(2006)01-0083-04

Study on Plant Regeneration of Excised Leaf from *Populus deltoids*(I-63×I-69)

KANG Wei, ZHENG Jin, LIU Kai-Yu, PENG Jian-Xin, HONG Hua-Zhu*

(*Key Laboratory of Pesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, Central China Normal University*, Wuhan 430079, China)

Abstract: The leaves from aseptuly plantets of *Populus deltoids*(I-63×I-69) were cultured as explants on 1/2(N)MS medium containing various combination of auxin and cytokinin. The results showed that the best medium for buds differentiation directly is 1/2(N)MS +0.2 mg/L BA +0.02 mg/L NAA +25 g/L sucrose +7 g/L agar, with the bud differentiation rate of 85%. In the experiments we also found KT has the stimulation to the plants rooting of I-63×I-69, the better rooting medium is MS +0.08 mg/L KT + 0.02 mg/L NAA +25 g/L sucrose +7 g/L agar, with the rooting rate of 82.2%.

Key words: *Populus deltoids*; Leaf; Regeneration; Growth regulator

杨树(Poplar)是重要的速生经济树种[1,2]。扦插是杨树的传统繁殖方式,由于年龄效应,多代扦插后容易出现退化,通过脱毒复壮和杂交育种后,性状才能恢复[3]。近年来,生物技术的发展为杨树快繁和遗传改良开辟了广阔的前景。通过嫩枝、幼茎、嫩叶、叶柄、生长点和原生质体等的离体培养[4-9],可在短期内获得大量优质杨树苗木。美洲黑杨(*Populus deltoids*)原产北美洲,20世纪70年代引入中国,与中国乡土树种相比,具有早期速生、树干通直、材质优良等特性,但也存在有性繁殖困难,扦插成活率低的问题,不利于苗木大量生产[1]。中嘉8号杨是湖北省林业厅与中国林科院合作,从美洲黑杨I-63×I-69实生后代中选育的速生、丰产、优质、抗性强的杨树新品系[10]。目前,杨树组织培养与植株再生主要通过外植体诱导愈伤组织分化不定芽的途径实现[11,12],存在繁殖周期较长、分化频率较低的问题。笔者以中嘉8号杨为材料,研究了美洲黑杨离体叶片直接分化不定芽的再生体系,为美洲黑杨的快繁和遗传转化奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试无菌中嘉8号杨*Populus deltoids*(I-63×I-69)组培苗由本实验室培育。供试生长素NAA(α-Naphthaleneacetic)、IBA(Indole-3-Butyric Acid)、2,4-D(2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid)和细胞分裂素BA(Benzy Laminopurine)、ZT(Trans-Zeatin)、KT(Kinetin)由Phytechnology Laboratories, LLC生产。在继代25 d的试管苗上选取颜色正常、充分展开的第4~5片叶为外植体。叶的大小、形状和色泽基本一致,每片叶剪去叶尖(深达主脉)和边缘,以叶尖剪口处与培养基接触方式接种。

收稿日期:2005-06-02,修回日期:2005-12-20。

作者简介:康薇(1983-),女,硕士研究生,从事林木转基因研究。

* 通讯作者(E-mail:hzhong@mail.ccnu.edu.cn)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.2 方法

1.2.1 几种生长素对杨树叶片的处理 将外植体分别接种于附加生长素 NAA、IBA 和 2,4-D 的 1/2(N)MS +0.2 mg/L BA +25 g/L 蔗糖 +7 g/L 琼脂培养基上,每种生长素质量浓度设 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05(mg/L)5 个处理。每个处理接种 15 个外植体。3 次重复,接种后 25 d 统计实验结果。培养条件:温度 25℃、相对湿度 75%、光照 16 h/d、光强 2 000 lx(下同)。

1.2.2 几种细胞分裂素对杨树叶片的处理 将外植体分别接种于附加细胞分裂素 BA、KT 和 ZT 的 1/2(N) MS +0.02 mg/L NAA +25 g/L 蔗糖 +7 g/L 琼脂培养基上。每种细胞分裂素质量浓度设0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 (mg/L)5 个处理。

1.2.3 最佳激素配比筛选 以上述实验结果为基础,进行 NAA、BA 配合实验(3^2 析因设计)。用 NAA 0.01、0.02、0.05(mg/L) 与 BA 0.2、0.5、0.8 (mg/L)配合。25 d 后调查分化不定芽的外植体数、有效芽数(衡量不定芽的生长状况),并计算分化率。

1.2.4 生根激素的配比 基本培养基为 MS + 25 g/L 蔗糖 +8 g/L 琼脂。KT 质量浓度设 0.05、0.1、0.15、0.20、0.25 (mg/L) 5 个处理,以不加 KT 为对照。选取长 2 cm、长势好的芽苗接种在含不同植物激素的生根培养基上。

2 结果与分析

2.1 生长素对杨树叶片分化不定芽的影响

生长素种类及浓度对杨树叶片分化不定芽有较大影响,供试生长素与 0.2 mg/L BA 配合都能促进不定芽分化,但是作用程度明显不同(图 1)。其中NAA诱导不定芽分化所需的时间最短,分化率最高,浓度为0.02 mg/L时分化率达80%;IBA次之;不定芽分化对2,4-D用量较为敏感,浓度为0.01 mg/L时分化率为42.2%,之后随着浓度升高,分化率明显下降,浓度为0.03 mg/L时分化率仅为6.7%,浓度高于0.04 mg/L时对外植体有毒害作用,外值体褐化或死亡。

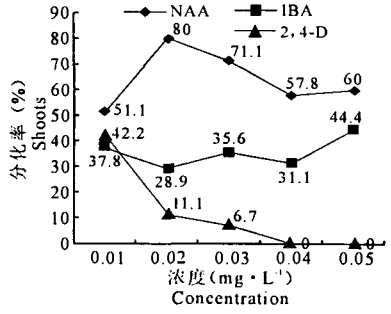

图 1 生长素对叶片分化不定芽的影响
Fig. 1 Effects of auxins on buds induction of *Populus deltoids*(I-63 × I-69) leaf

2.2 细胞分裂素对杨树叶片分化不定芽的影响

3 种细胞分裂素与0.02 mg/L NAA 配合都能诱导叶片分化不定芽,但效果差异明显(图 2)。其中 BA 最好,浓度在 0.2 mg/L 时分化率达 91.1%;ZT 次之;KT 浓度小于 0.2 mg/L 叶片只分化根(0.1 mg/L时分化率 67.4%),浓度为 0.3 mg/L 时既分化根又分化芽(根分化率 2.2%),浓度大于 0.4 mg/L时只分化芽,但分化率不高。

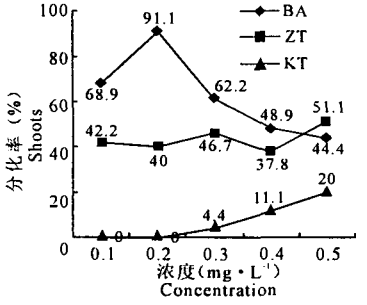

图 2 细胞分裂素对叶片分化不定芽的影响
Fig. 2 Effects of cytokinins on buds induction of *P. deltoids*(I-63 × I-69) leaf

2.3 生长素与细胞分裂素的配比

将叶片接种于 **1.2.3** 所述组合的培养基上,10 d后陆续从叶片切口处出现嫩绿色或褐色小突起,15 d 后分化出少量不定芽,20 d 后不定芽数量增多,且生长状况良好。将不定芽接种到生长培养基[1/2(N) MS +0.08 mg/L BA +0.015 mg/L IBA +25 g/L 蔗糖 +7 g/L 琼脂]上,10 d 即可成苗。在表 1 配合设计的所有培养基中,0.2 mg/L BA、0.02 mg/L NAA 不定芽分化率最高,有效芽数最多;0.5 mg/L BA、0.02 mg/L NAA 次之。初步说明,在 BA、NAA 合适的配比下,叶片不经过愈伤组织的诱导,在短时间内能够直接分化不定芽。

对表 1 的分化率反正弦转换后,进行方差分析(见表 2),结果表明,NAA 对叶片分化不定芽的影响达到显著水平,BA 的影响不显著。

对 NAA 的作用效果进行多重比较,结果表明,不定芽的分化对 NAA 浓度的变化非常敏感,在 0.02 mg/L NAA 时不定芽分化率最高,与 0.01 mg/L NAA 有极显著差异,而 0.01 mg/L NAA 与

维普资讯 http://www.cqvip.com

0.05 mg/L NAA 的不定芽分化率差异不明显。

以上数据分析可以得出:0.02 mg/L NAA、0.2 mg/L BA 比较适合杨树叶片分化不定芽,分化率达到 85%。

表 1　NAA、BA 不同浓度配合对杨树叶片分化不定芽的影响

Table 1　Effects of different NAA and BA levels on adventitious shoots differentiation from poplar

组合 Combination	接种外植体数 Amount of folioles	分化的外植体 Amount of folioles differentiated	分化率(%) Differentiation rate	有效芽数 Amount of effective shoots
I_0N^0(00)	45	29	48.33	133
I_1N^0(10)	45	26	43.33	89
I_2N^0(20)	45	23	38.33	56
I_0N^1(01)	45	51	85.00	201
I_1N^1(11)	45	39	65.00	176
I_2N^1(21)	45	25	41.67	101
I_0N^2(20)	45	24	40.00	68
I_1N^2(21)	45	11	18.33	43
I_2N^2(22)	45	14	23.33	54

表 2　方差分析

Table 2　TVariance analysis

差异源 Source of variance	平方和 Sum of squares	自由度 Freedom	均方 Mean squares	F
NAA	0.132454	2	0.066227	3.576309
BA	0.296068	2	0.148034	7.993924
误差 Error	0.074073	4	0.018518	
总计 Total variation	0.502596	8		

2.4　生根培养

根据实验 2.2 结果,将无菌苗接种在组合培养基上(表 3),10 d 后在无菌苗基部出现白色突起,15 d 开始生根。由表 3 可知,NAA 单用可以诱导生根,0.02 mg/L NAA 时生根为 68.9%。低浓度的 KT 与 NAA 配合促进生根,0.08 mg/L KT 时生根率最高(82.2%),比对照高出 16.2%,且根发育粗壮;随着 KT 浓度的增加,生根率逐渐降低。0.25 mg/L KT 时生根率仅 11.1%,且根较细、叶片发黄。

表 3　NAA、KT 不同浓度配合对杨树无菌苗生根的影响

Table 3　Effects of different NAA and KT levels on plant rooting

组合(mg/L) Combination	接种数(株) Num. of plants	生根数(株) Num. of rooting	生根率(%) Rooting rates	备注 Note
0 KT+0.02 NAA	45	31	68.9	根较壮,有愈伤产生
0.08 KT+0.02 NAA	45	37	82.2	根粗壮
0.1 KT+0.02 NAA	45	26	57.8	
0.15 KT+0.02 NAA	45	26	57.8	
0.25 KT+0.02 NAA	45	5	11.1	根较细,叶片发黄

3　结论与讨论

据 Block 报道[13],在有些杨树如杂交杨 *P. alba* ×*P. tremula* 和 *P. trichocarpa* ×*P. deltoides* 的组织培养中,铵离子会富集在叶或茎段内,不利于外植体的分化。本实验采用 1/2(N)MS 作为叶片分化不定芽的基本培养基,在基本培养基中添加适当配比的细胞分裂素和生长素能够诱导杨树离体叶片直接分化不定芽(图 3),较好的配比是 0.2 mg/L BA、0.02 mg/L NAA,接种后 20 d 不定芽分化率达 85%。这种直接分化方式解决了杨树组织培养中由愈伤分化不定芽途径获得完整植株所需时间长、培养程序复杂和分化率较低的问题,对生产上提高美洲黑杨的繁殖系数具有重要意义。

图 3　杨树叶片直接分化不定芽

Fig. 3　buds induction of *P. deltoids* (I-63×I-69) leaf

植物组织培养中,生长素被用于诱导细胞的分裂和根的分化,细胞分裂素主要是促进细胞分裂和由愈伤组织或器官上分化不定芽[14-16],而对根的产生具有抑制作用[8]。实验中,KT 与 NAA 配比诱导叶片分化不定芽时外植体表现出芽和根的两极分化,KT 浓度小于 0.2 mg/L 时分化根,大于 0.4 mg/L 时分化芽。针对这一结果,我们对 KT 诱导杨树芽苗生根情况作了进一步研究。结果显示,0.08 mg/L KT 与 0.02 mg/L NAA 配比生根率高达 82.2%,比单用 0.02 mg/L NAA 高出 16.2%,且根发育粗壮(图 4),但随着 KT 浓度的增加生根率逐渐降低,且根较细、

图 4　杨树芽苗生根

Fig. 4　*P. deltoids* (I-63×I-69) rooting

维普资讯 http://www.cqvip.com

叶片发黄。这表明适当浓度的KT对杨树生根具有促进作用,其作用机理有待进一步研究。

参考文献:

[1] 张绮纹,苏晓华,李金花. 中国杨树遗传改良[J]. 中国农业科技导报,1999(2):54-58.

[2] 汪建亚,蒋祥娥,蔡桁. 山地杨快速繁殖研究[J]. 湖北林业科技,2004,**39**:1-7.

[3] 赵天赐,苏晓华主编. 中国杨树集约栽培[M]. 北京:中国科技出版社,1994.

[4] Victor B Busov, Richard Meilan, David W Pearce, *et al*. Activation tagging of a dominant gibberellin catabolism gene from popular that regulates tree stature[J]. *Plant Physiol*, 2003, **132**: 1 283-1 291.

[5] Coleman G D, Erst S G. *In vitro* shoot regeneration of *Populus deltiodes*: effect of cytokinin and genotype[J]. *Plant Cell Rep*, 1989, **8**:459-462.

[6] Auja M R. Micropagation of Woody Plants[M]. Dordrecht: Klauwer Academic Publishers, 2002. 187-194.

[7] 朱大保. 国外杨树组培微繁殖技术的进展[J]. 北京林业大学学报,1996,**12**(1):84-90.

[8] 祁春芳,郑智礼. 白杨派杨树组培技术研究[J]. 山西林业科技,2000(4):22-24.

[9] 施季森. 迎接21世纪现代林木生物技术育种的挑战[J]. 南京林业大学学报,2000,**24**(1):1-6.

[10] 王宏乾, 邱本旺, 陈永新,徐邦兴. 中嘉8号等杨树杂交新品系选育[J]. 林业科技开发,2003,**17**(6):21-23.

[11] 张福明,高照海,徐希玉,李承永. 转基因杨树的组培快繁[J]. 湖北林业科技,2000(4):19.

[12] 于志水,金红,尚时军,王丽钧,赵继梅,梁德军. 黑杨派杨树组培再生系统的研究[J]. 辽宁林业科技,2002(6):12-13.

[13] Block M. Factors influencing the tissue culture and the *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of hybrid aspen and polar clones[J]. *Plant physiol*, 1990, **93**:1 110-1 116.

[14] 李浚明编译. 植物组织培养教程[M]. 北京:中国农业大学出版社,2003.

[15] 何生根,刘伟,许恩光,文李编著. 植物生长调节剂在观赏植物和林木上的应用[M]. 北京:化学工业出版社. 2003.

[16] 王小青,李玲编. 植物生长调节剂在植物组织培养中的应用[M]. 北京:化学工业出版社. 2003.