

文章编号:1002-4026(2008)01-0035-04

741 杨离体快繁和叶片再生体系的建立

于学宁,曹帮华,曹玉翠,王爱喜

(山东农业大学林学院,山东 泰安 271018)

摘要:选用 741 杨的茎段和生根组培苗叶片为外植体,采用不同浓度组合的 BA 和 NAA 对 741 杨的离体快繁和叶片再生体系进行了研究。结果表明:741 杨芽增值的最佳培养基为 MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L; 最佳生根培养基为 MS + IBA 0.3 mg/L; 741 杨叶片不定芽诱导的最佳培养基为 MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L。试验还研究了不同着生位置的叶片以及叶片在培养基上的放置方式对 741 杨叶片再生的影响。

关键词:741 杨;离体快繁;叶片再生;生根

中图分类号:S722.37 **文献标识码:**A

Rapid Micro-propagation and Establishment of Leaf Regeneration System of Poplar 741

YU Xue-Ning, CAO Bang-hua*, CAO Yu-cui, WANG Ai-Xi

(School of Forestry, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China)

Abstract: Under the conditions of different concentrations of 6-BA and NAA, we employed such explants as stem segments and plantlet leaves of poplar 741 to investigate its micro-propagation and leaf regeneration system. Results indicate that the optimal medium for bud multiplication is MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L; the best rooting medium is MS + IBA 0.3 mg/L; the appropriate medium for shoot regeneration of a leaf is MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L. The experiment also studied the position effects of different leaves and the effects of placement of a leaf in media.

Key words: poplar 741; micro-propagation; leaf regeneration; rooting

杨树容易进行种间杂交和无性繁殖,生长迅速,基因组相对较小,易进行遗传研究,适应性强,生长迅速,丰产性强,成为林业研究的模式木本植物^[1]。目前已有多个杨树品种从不同外植体再生成功^[2-6]。741 杨为原河北林学院现河北农大于 1974 年经过两次有性杂交选育的优良白杨派杂种,杂交组合为[银白杨 × (山杨 + 小叶杨)] × 毛白杨。材积生长量超过易县毛白杨 50% ~ 70%,其木材为杨树中最优者,适栽区广泛。本文建立了 741 杨快繁体系,以及叶片外植体再生体系,以期为杨树的快速无性繁殖和基因的遗传转化奠定基础。

收稿日期:2007-10-28

基金项目:山东省农业良种工程项目计划资助(鲁科农字[2006]90号)

作者简介:于学宁(1980-),女,硕士研究生,研究方向为林木遗传育种。

1 材料与方法

1.1 供试材料及培养条件

供试外植体取自山东农业大学林学试验站1年生741杨扦插苗的去叶带腋芽茎段。外植体先用自来水冲洗30 min,再用75%酒精浸泡30 s,无菌水冲洗3次,再用0.1%的升汞消毒5~6 min,最后用无菌水冲洗4次,置于超净工作台上切成长1.5~2 cm的带腋芽茎段,接种于培养基上,建立无菌体系。用生根无菌苗的叶片作为建立再生体系的材料。所用基本培养基为MS培养基,琼脂粉为6.5‰,除生根培养基所用蔗糖浓度为2.0%,其它培养基所用蔗糖浓度均为3.0%,pH 5.8,光照强度为2000~2500 Lx,温度为 25 ± 2 °C,光照时间为16 h/d。

1.2 试验方法

1.2.1 芽的增殖

将经过消毒的外植体接种于MS空白培养基上进行预培养。待腋芽长至2 cm左右,以MS为基本培养基,将芽转接到含有不同浓度6-BA和NAA的培养基上继代培养,共12个处理,每处理15瓶,每瓶3个外植体,培养30 d后统计芽(芽长大于1 cm)的分化率。

$$\text{增值芽数} = \text{产生腋芽总数} / \text{接种外植体总数}$$

1.2.2 生根

将继代培养获得的芽(高大于1 cm)进行生根培养,以MS为基本培养基,生长素IBA、NAA分别采用3种不同浓度(0.1、0.3、0.5 mg/L),分别为3个处理,每处理15瓶,每瓶3个外植体,培养30 d后观察小苗生根情况,统计生根率。

$$\text{生根率}(\%) = \text{生根植株数} / \text{接种芽数} \times 100\%$$

$$\text{平均根数} = \text{总生根数} / \text{总植株}$$

1.2.3 叶片不定芽诱导

1.2.3.1 植物激素对叶片不定芽分化的影响

取试管苗的幼嫩叶片,剪去叶缘,从叶片一侧横切叶脉,剪成0.5~1 cm大小的叶片,置于含不同浓度6-BA和NAA的MS分化培养基中,共9个处理,每处理3瓶,每瓶10个外植体,培养40 d后观察不定芽生长情况。

$$\text{叶片分化芽数}(\text{个}/\text{叶片}) = \text{再生芽总数} / \text{接种叶块数}$$

$$\text{不定芽再生率} = \text{产生不定芽的外植体数} / \text{接种外植体总数} \times 100\%$$

1.2.3.2 不同着生部位的叶片对不定芽诱导的影响

剪下幼苗的第一至第三片叶,第五至第六片叶,分别放在培养基MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L上,共2个处理,每处理3瓶,每瓶10个外植体,培养40 d后观察不定芽分化情况。

1.2.3.3 叶外植体不同放置方式对不定芽诱导的影响

取幼嫩叶片剪去叶缘,从叶片一侧横切叶脉,剪成0.5~1 cm大小的叶片,按两种不同放置方式放置在MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L培养基上培养。其中一种远轴面向上接触培养基,一种远轴面向下接触培养基。共2个处理,每处理3瓶,每瓶10个外植体,培养40 d后观察不定芽诱导情况。

2 结果与分析

2.1 以茎段为基础的741杨离体快繁

2.1.1 不同浓度的NAA与6-BA配合对芽增值的影响

用初代培养长出的健壮芽接入不同浓度NAA与6-BA配合的培养基中,培养2周后,各处理均能诱导出丛生芽,但不同组合间存在差异(表1)。当6-BA浓度为0.3~0.5 mg/L时,NAA浓度在0.1~1.0 mg/L的范

围内,芽的诱导数量随 NAA 浓度的增加而降低。当 NAA 和 6-BA 浓度都为 1.0mg/L 时,芽的增值数量最大,为 8.6,但是,出现了较严重的玻璃化苗现象,这个现象与杨传平^[3]的报道相似。因此,通过综合比较,以 6-BA 浓度为 0.5 mg/L, NAA 浓度为 0.1 mg/L 时,最适于丛生芽的形成。

表 1 不同浓度的 NAA 与 6-BA 配合对 741 杨试管苗芽诱导的影响

处理	6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)	接种芽数	增值芽数 (≥1cm)	备注
1	0.3	0.1	45	5.7	
2	0.3	0.5	43	4.2	
3	0.3	1.0	45	3.9	
4	0.5	0.1	45	7.8	
5	0.5	0.5	45	6.7	
6	0.5	1.0	44	4.4	
7	1.0	0.1	42	6.5	轻微玻璃化
8	1.0	0.5	40	5.1	轻微玻璃化
9	1.0	1.0	40	8.6	玻璃化较严重
10	1.5	0.1	40	6.5	玻璃化
11	1.5	0.5	43	3.8	玻璃化
12	1.5	1.0	39	5.1	玻璃化

2.1.2 不同生长素及浓度对生根的影响

当继代培养的芽苗长到大于 1 cm 时,剪下接种于生根培养基中,经 30 d 培养后(表 2)发现,在不同浓度的 IBA 的培养基上,均能生根,根系健壮。当 IBA 浓度为 0.3 mg/L 时,生根率最高,为 78.3%,生根均匀,单株生根数量也多,不定根质量好。使用 NAA 诱导出的根系较短,在培养基接触空气的面长出毛状根,根与生根茎段缺乏维管联系,移栽不利于成活。研究还发现,使用 NAA 诱导出的根系,移栽时根容易脱落,研究结果与周瑞金^[7]报道相似。研究认为,741 杨试管苗生根以使用 IBA 为好,其浓度为 0.3 mg/L。

表 2 不同生长素及浓度对 741 杨试管苗生根的影响

生长素	浓度 (mg/L)	植株 总数	平均生 根数(个)	生根率 (%)	生根状况
IBA	0.1	45	2.1	62.6	根较长,主根上有较多须根,数量较少
	0.3	42	3.7	78.3	根长,主根上有很多须根,数量较多
	0.5	45	1.4	63.3	根较短,主根上有较多须根,数量较少
NAA	0.1	45	3.8	64.3	根较短,在培养基上接触空气的地方有毛状根,主根数量较多
	0.3	43	4.4	82.4	根短,在培养基上接触空气的地方有毛状根,主根数量较多
	0.5	44	2.7	68.2	根短,在培养基上接触空气的地方有毛状根,主根数量少

2.2 741 杨试管苗叶片再生体系的建立

2.2.1 不同浓度的 NAA 与 6-BA 配合对叶片不定芽诱导的影响

叶片接种于培养基上 5 d 左右叶片切口边缘出现绿色愈伤组织,10 d 左右在愈伤组织上开始出现芽点,30 d 左右芽的分化达到高峰。研究发现,不定芽诱导效果不仅取决于培养基中 BA 和 NAA 的绝对数量,而且取决于二者相对比例,激素配比对不定芽的分化影响很大。由表 3 看出,当 6-BA 与 NAA 的比值高时,有利于诱导不定芽,比值低时利于生根。当 BA 浓度为 1.0 mg/L 时,不定芽分化率随 NAA 浓度升高而降低,当 NAA 浓度为 0.3 mg/L 时,芽不分化而仅产生不定根。说明高浓度的 NAA 刺激根的分化。当 BA 浓度为 1.0 mg/L, NAA 浓度为 0.1 mg/L 时,叶片不定芽的分化率最高,达 100%。

2.2.2 叶片的不同着生部位对不定芽诱导的影响

结果见表 4,试管苗上部第 1~3 片的幼叶不定芽诱导率和分化芽数分别为 100% 和 3.1 个,而下部较老的叶片不定芽分化率和分化芽数仅为 64.2% 和 2.1 个,说明不同着生部位的叶片,不定芽的分化不同,幼嫩叶片的再生能力强,这可能是由于幼嫩叶片细胞分裂能力强,有利于芽的分化。这个结果与李际红、李慧等^[8,9]的报道相似。

2.2.3 叶片外植体不同放置方式对不定芽诱导的影响

从表 5 看出,叶片外植体不同放置方式对不定芽诱导的影响不同。远轴面向下放置的叶片分化率和分化芽数分别为 100% 和 2.8 个,而远轴面向上放置的叶片分化率和分化芽数分别为 73.7% 和 1.9 个。发现叶

片远轴面放置在培养基上,有利于芽的分化。这个结果与黄文江等^[10]的报道相似,但是与丁霞等^[11]、赵凌泉等^[12]报道不同,他们试验发现叶片正面向上或正面向下接种培养,对其形成不定芽无显著影响。

表3 不同浓度的 NAA 与 6-BA 配合对叶片不定芽诱导的影响 表4 叶片不同着生部位对不定芽诱导的影响

处理	6-BA (mg/L)	NAA (mg/L)	接种 个数	分化芽数 (个/叶片)	分化率 (%)	备注
1	1.0	0.1	30	3.4	100	
2	1.0	0.2	30	0.7	46.2	
3	1.0	0.3	30	0	0	均生根
4	2.0	0.1	30	3.2	92.3	
5	2.0	0.2	30	2.1	53.8	
6	2.0	0.3	30	1.8	62.5	
7	3.0	0.1	30	2.6	66.7	
8	3.0	0.2	30	0.5	28.6	
9	3.0	0.3	30	1.4	71.4	

取材部位	接种个数	分化芽数(个)	分化率(%)
第1-3片叶	30	3.1	100
第5-6片叶	30	2.1	64.2

表5 叶片外植体不同放置方式对不定芽诱导的影响

放置方式	接种个数	分化芽数(个)	分化率(%)
远轴面向下	30	2.8	100
远轴面向上	30	1.9	73.7

3 讨论

在茎段离体快繁试验中发现,当 BA 与 NAA 的比值为 1 时,尽管诱导出不定芽的数最大,但玻璃化现象严重。在生产中,为了保证幼苗较高的移栽成活率高,必须首选植株生长健壮,生根质量好的苗子。因此,741 杨芽增殖培养基以 MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L 为最佳,每个接种芽可增殖 7.8 个新芽,芽也健壮;研究发现,NAA 诱导生根,产生毛状根较多,移栽时根系容易脱落;而 IBA 对根系的诱导率最高,其最佳生根培养基为 MS + IBA 0.3 mg/L,生根率为 78.3%,根系生长均匀,利于移栽。

叶片再生的试验中发现,处于植株顶端叶片,近轴面的叶片最适宜叶片诱导不定芽。741 杨叶片不定芽诱导的最佳培养基为 MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L。叶片不定芽分化率达 100%。

有试验证明 TDZ 对叶片不定芽的再生效果明显优于 BA(13,14),但 TDZ 代替 6-BA 对 741 杨叶片诱导不定芽效果尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] 张勇,张守攻,齐力旺,陈小强,陈瑞阳,宋文芹.杨树——林木基因组学研究的模式物种[J].植物学通报,2006,23(3):286-293.
- [2] 王树耀,田宗城,黄白红,徐艳.84K 杨叶片再生体系的建立[J].湖南文理学院学报(自然科学版),2004,16(4):50-55.
- [3] 杨传平,郑琼,马徐俊,姜静,刘桂丰,董京祥.欧美杨“山地1号”组织培养再生体系的建立[J].分子植物育种,2006,4(4):579-582.
- [4] 郑均宝,张玉满,杨文芝.741 杨离体叶片再生及抗虫基因转化[J].河北农业大学学报,1995,18(3):20-25.
- [5] 吴双秀,吴汪黔生,祖元刚.一种快速有效的 741 杨离体叶片再生芽方法[J].植物研究,2004,24(3):247-350.
- [6] 康薇,郑进,刘凯于,彭建新,洪华珠.美洲黑杨(中嘉8号)离体叶片再生研究[J].武汉植物学研究,2006,24(1):83-86.
- [7] 周瑞金,刘孟军.枣叶片再生试管苗生根研究[J].河北农业大学学报,2006,29(2):19-21.
- [8] 李际红,张友朋,旁金宣,孙仲序.窄冠黑青杨叶片再生体系的建立[J].山东农业大学学报,2006,27(1):6-10.
- [9] 李慧,陈晓阳,李云,李伟,郭海.银白杨叶片不定芽再生影响因素的研究[J].北京林业大学学报,2004,26(3):46-50.
- [10] 黄文江,刘庆忠,樊圣华,赵红军,马锋旺.甜樱桃砧木吉塞拉(Gisela)叶片再生体系研究[J].园艺学报,2004,31(2):221-223.
- [11] 丁霞,陈晓阳,李云,李伟.胡杨叶片不定芽再生体系的研究[J].北京林业大学学报,2003,25(2):28-31.
- [12] 赵凌泉,史绍林,徐连峰,应亚琳.利用山新杨萌生枝叶片建立无菌系的研究[J].防护林科技,2006,73(4):14-16.
- [13] 张志宏,景士西,王关林.TDZ 对苹果叶片离体再生不定芽的效应[J].植物生理学通讯,1997,33(6):420-423.
- [14] 吴雪梅,汤浩茹,文国琴,李燕.不同培养条件对‘丰香’草莓离体叶片再生的影响[J].园艺学报,2004,31(5):657-659.