

文章编号:1008-8245(2007)05-0019-05

中嘉8号杨的组织培养和植株再生^{*}郑进¹ 康薇¹ 洪华珠²(¹ 黄石理工学院,湖北黄石 435003; ² 华中师范大学,湖北武汉 430079)

摘要:选用中嘉8号杨(*P. deltoides*, I-69×I-63)叶片进行组织培养,结果表明,诱导愈伤组织和分化不定芽,主要取决于细胞分裂素和生长素的配比。在温度(25±2)℃、相对湿度75%、光照16h/d、光强3000lx条件下,适宜的愈伤组织诱导培养基是MS+BA 1.0 mg/L+2,4-D 0.1 mg/L+蔗糖30g/L+琼脂6.5g/L;愈伤组织分化不定芽培养基是BA 0.5mg/L+2,4-D 0.1mg/L+蔗糖30g/L+琼脂6.5g/L。试管苗在室温下炼苗10~15 d,移栽前开瓶炼苗2~3d,移栽成活率达90%以上。

关键词:美洲黑杨;组织培养;生根培养

中图分类号:Q943.1

文献标识码:A

The Tissue Culture and Plantlet Regeneration of *Populus deltoides* (I-69×I-63)

Zheng Jin¹ Kang Wei¹ Hong Huazhu²(¹ Huangshi Institute of Technology, Huangshi Hubei 435003;² Central China Normal University, Wuhan Hubei 430079)

Abstract: The leaves from *Populus deltoides* (I-69×I-63) are cultured. The results show that the best medium for callus induction is MS + BA 1.0 mg/L + 2,4-D 0.1 mg/L + 30g/L sucrose + 6.5g/L agar, and for buds differentiation is BA 0.5mg/L + 2,4-D 0.1mg/L + 30g/L sucrose + 6.5g/L agar, culture temperature (25±2)℃, relative humidity 75%, light intensity 3000 lux or so, sunshine time 16 hours per day. The test tube of the plantlets are sealed for 10~15 days under the room temperature, and is kept unsealed for 2~3 days. The survival rate of transplanting is over 90%.

Key words: *Populus deltoides*; tissue culture; rooting

杨树(*poplar*)是杨柳科(*Salicaceae*)杨属(*Populus*)植物落叶乔木的通称。杨属有100多种,分白杨、黑杨、青杨、胡杨和大叶杨等五大派系,主要分布在欧洲、亚洲、北美洲的温带、寒带及地中海沿岸的国家和中东地区。我国杨树资源丰富,种类多,杨属100多种杨树中我国有57种,主要分布在北纬25°~53°,东经76°~134°,遍及东北、华北以及西南地区,是重要的行道树、防护林及速生用材树种。杨木被广泛用作生产胶合板、纤维板和木浆纸,是重要的轻工业原料材,对国民经济

起着非常重要的作用^[1]。

湖北地处亚热带向暖温带过渡的区域,是杨树的适生区。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(*Populus deltoides*) I-69×I-63的实生后代中选育的速生、丰产、优质杨树无性系^[2],是长江中下游平原湖区公路绿化、速生丰产用材林基地造林和世行贷款工程造林的主要树种。

目前,中嘉8号杨的组织培养鲜见报道,生产上主要通过扦插进行繁殖,由于存在年龄效应,多

收稿日期:2007-09-04

^{*} 基金项目:湖北省林业局重点科技项目(编号:200622210);黄石理工学院科研项目(编号:07YJZ02R)

作者简介:郑进(1962—),男,湖北蕲春人,教授,博士。

代扦插后容易出现退化,只有通过脱毒复壮和杂交育种,性状才能恢复^[3]。杨树组织培养使用的外植体主要有叶片、腋芽、茎尖、茎段、子叶、下胚轴等;基本培养基为 MS、WPM、盐浓度减半或大量元素减半的 1/2MS、MH 和 MS30 等;生长调节物质为生长素类(NAA、IBA、2,4-D、IAA 等)、细胞分裂素类(BA、ZEA、KT、TDZ、2-ip 等)和赤霉素(GA₃)^[4-8]。本研究以中嘉 8 号杨为材料,筛选愈伤组织诱导、不定芽分化及植株再生的最佳培养基、生长调节物质配比和培养方式,以建立高效的中嘉 8 号杨离体快繁体系,为大规模生产中嘉 8 号杨组培苗和基因转化打基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料

中嘉 8 号杨(*P. deltoides*, I-69 × I-63)取自湖北生态工程职业技术学院实验苗圃。春季萌芽以前,剪取长约 30cm、无病虫、粗壮、芽饱满的中嘉 8 号杨一年生枝条,置于室内水培复幼(图 1),15d 后,取幼嫩叶片,用自来水冲洗 1h,将叶片转入超净工作台,用 70% 酒精消毒 10~15s,再用 0.1% 升汞溶液(加吐温 2 滴)消毒 3~5min,接着用无菌水冲洗 5~6 次,置于无菌滤纸上吸干多余的水分后备用。



图 1 中嘉 8 号杨水培复幼

1.1.2 基本培养基

MS(Murashige Skoog)。

1.1.3 试剂

生长素:NAA(α -Naphthaleneacetic)、IBA(Indole-3-Butyric Acid)、2,4-D(2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid);细胞分裂素:BA(Benzy Lamin-

opurine)、ZT(Trans-Zeatin)、KT(Kinetin)。

1.2 方法

1.2.1 愈伤组织的诱导

以叶盘为外植体(大小为 0.5cm × 0.5cm),以 BA、NAA 和 2,4-D 3 个因素进行 L₉(3⁴) 正交试验^[9]。BA 用量为 0.5,1.0,1.5mg/L,NAA、2,4-D 用量分别为 0,0.1,0.5mg/L。MS 培养基,含蔗糖 30g/L、琼脂 6.5g/L,pH 值 5.8。每个处理接种 45 个外植体,3 次重复(下同)。接种后 30d 统计实验结果。培养条件:温度(25 ± 2)℃、相对湿度 75%、光照 16h/d、光强 3klx(下同)。

1.2.2 激素对愈伤组织分化不定芽的影响

1.2.2.1 生长素的影响

将外植体分别接种于附加生长素 NAA、IBA 和 2,4-D 的 MS + BA 0.5 mg/L + 蔗糖 30g/L + 琼脂 6.5g/L 培养基上,每种生长素设 0.01,0.05,0.1,0.2,0.5mg/L 5 个处理。接种后 30d 统计不定芽分化率。其公式为(下同):

$$\text{不定芽分化率} = \frac{\text{分化出不定芽外植体个数}}{\text{接种外植体个数}} \times 100\%$$

1.2.2.2 细胞分裂素的影响

将外植体接种于附加细胞分裂素 BA、KT 和 ZT 的 MS + 2,4-D 0.1 mg/L + 蔗糖 30g/L + 琼脂 6.5g/L 培养基上,每种细胞分裂素设 0.1,0.5,1.0,1.5,2.0mg/L 5 个处理。

1.2.2.3 最佳激素配比

进行 2,4-D、BA 配合实验(3² 析因设计)^[9]。用 2,4-D:0.05,0.1,0.5mg/L 与 BA:0.1,0.5,1.0mg/L 配合。

2 结果与分析

2.1 激素对比对愈伤组织诱导的影响

表 1 结果显示,叶盘接种在 9 种不同激素组合的 MS 培养基后,所有组合都有愈伤组织产生,但各组合的启动时间、愈伤组织的诱导率、颜色、质地及生长情况存在明显差异。愈伤组织出现的时间,IV、V 号组合最短,均为 5d,Ⅶ号组合最长,达 11d。愈伤组织诱导率,I、V、Ⅵ号组合最高,均为 100%;其次是 II、III、IV 号组合,依次为 95.6%,97.8% 和 91.1%;较低的是 VII、VIII、IX 号组合,分别为 46.7%,62.2% 和 51.1%。实验中发现,在细胞分裂素含量低的培养基上,愈伤组织呈淡绿色,质地偏软;在细胞分裂素含量高的培养

基上,愈伤组织逐步变褐,后期死亡率增高。

将表1的愈伤组织诱导率反正弦转换后,进行方差分析,结果表明,BA对愈伤组织的诱导率有显著的影响,而2,4-D和NAA的作用不显著。

对BA的作用效果进行多重比较,BA用量为1.0mg/L时愈伤组织诱导率最高,与BA 0.5mg/L

和BA 1.5mg/L有显著差异。BA用量为1.0mg/L时组合V和VI的愈伤组织诱导率均为100%,但组合V的启动时间短,激素用量少,愈伤组织生长状况优。综合考虑,叶盘愈伤组织诱导的合适培养基为MS + BA 1.0mg/L + 2,4-D 0.1mg/L + 蔗糖30g/L + 琼脂6.5g/L。

表1 不同激素配比中嘉8号杨叶盘愈伤组织的诱导效果

处理	激素组合(mg/L)			启动天数	诱导率(%)	愈伤组织生长情况
	BA	2,4-D	NAA			
I	0.5	0.0	0.5	7	100	淡绿色,偏软,生长较快
II	0.5	0.1	0.1	8	95.6	淡黄色,中偏软,生长较快
III	0.5	0.5	0.0	9	97.8	淡绿色,偏软,生长较快
IV	1.0	0.0	0.1	5	91.1	淡黄色,中偏软,生长较快
V	1.0	0.1	0.0	5	100	淡黄色,中偏软,有光泽,生长快
VI	1.0	0.5	0.5	7	100	淡绿色,偏软,生长较快
VII	1.5	0.0	0.0	11	46.7	结构松散,前期生长快,很快变褐
VIII	1.5	0.1	0.5	8	62.2	淡黄色,偏软,有光泽,生长较快
IX	1.5	0.1	0.1	9	51.1	结构松散,前期生长快,后期变褐

2.2 生长素对愈伤组织分化不定芽的影响

接种后30d,各处理都有不定芽分化,表明供试生长素都可促进愈伤组织再分化,但作用程度明显不同。由图2可知,不定芽分化率2,4-D最高(0.1mg/L时达68.9%),NAA次之,IBA最低;浓度低于0.01mg/L时,NAA、IBA的不定芽分化率仅为17.8%和22.2%;浓度高于0.5mg/L时,2,4-D、NAA和IBA的不定芽分化率都较低,分别为28.9%、15.6%和13.3%。

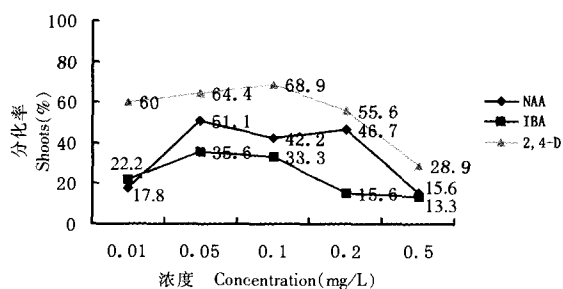


图2 生长素对愈伤组织分化不定芽的影响

2.3 细胞分裂素对愈伤组织分化不定芽的影响

由图3可知,除BA 0.5mg/L具有较高的分化率外,三种细胞分裂素对愈伤组织分化不定芽的作用效果相似,各浓度分化率都较低且细胞分裂

素间差别不大;浓度大于2.0mg/L时分化率BA最低(仅4.4%),此时KT、ZT没有不定芽产生,且愈伤组织很快褐化死亡。实验同时观察到,培养后期处理KT0.1mg/L中不定芽出现生根现象,但根系较纤细。

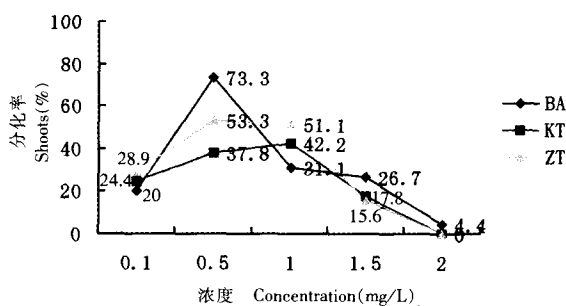


图3 细胞分裂素对愈伤组织分化不定芽的影响

2.4 生长素与细胞分裂素的配比

将愈伤组织接种在表2所示的组合培养基上,15d后开始分化出大量不定芽,初期不定芽有玻璃化现象,随着培养时间的延长不定芽生长逐渐转好。当不定芽长到2~3cm时,转入生根培养基中几乎都可成苗。处理BA 0.5mg/L + 2,4-D 0.1mg/L的启动时间最短,不定芽平均分化率最高,达71.7%;其次是BA 0.5mg/L + 2,4-D 0.05mg/L;BA 0.1mg/L + 2,4-D 0.5mg/L无

不定芽产生,但愈伤组织量有所增加。

将表 2 中不定芽分化率反正弦转换后,进行方差分析,结果表明,BA、2,4-D 对愈伤组织分

化不定芽的影响都不显著。综合考虑,最优配比为 BA 0.5mg/L + 2,4-D 0.1mg/L,此时不定芽长势最优(图 4)。

表 2 BA 与 2,4-D 不同浓度对比对愈伤组织分化不定芽的影响

处理	激素/mg/L		接种外植体数	启动天数 (平均)		分化外植体数 (小计)		不定芽分化率(%) (平均)	
	2,4-D	BA							
(1)	0.05	0.1	15	15		10		66.7	60 ±5.47
			15	17	16	8	27	54.3	
			15	16		9		60	
(2)	0.05	0.5	15	16		10		66.7	64.4 ±8.45
			15	22	19	11	29	73.3	
			15	18		8		53.3	
(3)	0.05	1.0	15	16		9		60	53.3 ±9.43
			15	16	17	6	24	40	
			15	19		9		60	
(4)	0.1	0.1	15	27		3		20	20 ±8.18
			15	26	26	5	9	33.3	
			15	31		2		13.3	
(5)	0.1	0.5	15	14		9		60	71.1 ±8.31
			15	15	15	12	32	80	
			15	16		11		73.3	
(6)	0.1	1.0	15	18		8		53.3	42.2 ±8.31
			15	23	21	5	19	33.3	
			15	22		6		40	
(7)	0.5	0.1	15	-		0		0	0
			15	-	-	0	0	0	
			15	-		0		0	
(8)	0.5	0.5	15	26		4		26.7	24.4 ±13.69
			15	21	24	6	11	40	
			15	25		1		6.7	
(9)	0.5	1.0	15	18		7		46.7	46.7 ±10.9
			15	15	18	5	21	33.3	
			15	21		9		60	



图 4 中嘉 8 号杨愈伤组织分化不定芽
(启动时间 15d,激素比:BA 0.5mg/L + 2,4-D 0.1mg/L)

2.5 生根苗移栽

选择 2~3cm 长、长势好的无根组培苗接种在培养基 MS + KT 0.05mg/L + NAA 0.02 mg/L + 蔗糖 30g/L + 琼脂 7g/L^[3] 进行生根培养(图 5)。组培苗根长达到 1~1.5cm 时,连同培养瓶移至室温炼苗 10~15d,移栽前 2~3d 将封口膜打开,移栽时用清水洗去培养基,用 0.1% ABT 生根粉溶液蘸根后,移栽至灭过菌的园土:山沙(4: 1)营养盆中,浇透水后置于遮荫网(70%)下。当小苗长到 5cm 左右高度时,便可移栽到苗圃中,幼苗成活率可达 90% 以上(图 6)。

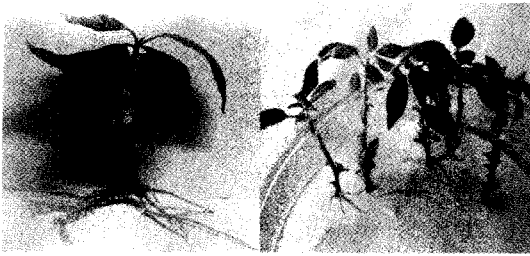


图5 中嘉8号杨生根组培苗(生根培养25d)



图6 中嘉8号杨盆栽组培苗(移栽后15d)

3 讨论

目前,植物组织培养常用的消毒剂有次氯酸钙(5%~10%,5~30min)、次氯酸钠(2%,5~30min)、过氧化氢(3%~10%,5~15min)、氯化汞(0.1%~1%,2~10min)等,实验时使用何种消毒剂要因外植体类型而定。不同植物材料对消毒剂的敏感性不同^[10],消毒剂毒性太强或消毒时间过长,容易导致外植体死亡,毒性不够或消毒时间过短,外植体污染率增加。本实验所用的中嘉8号杨来自苗圃地,为了减少外植体的污染,实验时先从田间剪取健康的杨树枝条室内水培复幼,用枝条上长出的幼嫩叶片作外植体,经消毒剂短暂处理后,外植体污染率明显降低。

植物组培快繁过程中,同一器官不同部位的再生能力具有差异,外植体的选择比较重要。赵芳等(2004)^[11]以引进的速生型刺槐(*Robinia pseudoacacia* L.)为材料,研究子叶轴和小叶的再生能力,发现叶轴比小叶容易诱导愈伤组织,也容易分化不定芽。宋国庆等(2000)^[12]以草莓为材料,研究发现叶盘的再生能力高于叶柄,而且再生频率达到最高时所需的BA浓度也高于叶柄,推测是由于叶盘和叶柄中内源植物激素的含量及二

者利用外源激素的差异,造成二者再生的差异。陈维伦等(1980)^[13]对山新杨叶外植体分化的研究表明,带有叶柄的下段,极易在叶柄的切口处形成芽且分化频率最高,达75%,而中、上段芽从叶脉处产生且分化频率较低。笔者在预备实验时,比较了中嘉8号杨叶盘和叶柄外植体诱导愈伤组织的差异,叶盘平均为26.7%~75.6%,最高达86.7%,叶柄平均为17.8%~48.9%,最高为60%,但没有不定芽发生。因此,本实验直接选用叶盘作外植体,获得了较好的效果。

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,而对根的形成具有抑制作用^[10]。本实验中,KT与生长素配比诱导愈伤组织分化不定芽时外植体表现出根和芽的两极分化,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] 尹伟伦. 中国杨树栽培与利用研究[M]. 北京: 中国林业出版社, 2005: 3
- [2] 王宏乾, 邱本旺, 陈永新. 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
- [3] 郑进. 中嘉8号杨转BtCry1A基因的研究[D]. 武汉: 华中师范大学博士学位论文, 2006: 34
- [4] 司少鹏, 周萍, 陈家美. 84K杨树的离体快速繁殖试验[J]. 江苏林业科技, 2002, 29(3): 29-29
- [5] 于志水, 金红, 蔺胜军, 等. 黑杨派杨树组培再生系统的研究[J]. 辽宁林业科技, 2002(6): 11-13
- [6] 海燕, 何宁, 康明辉, 等. 抗虫杨的组织培养[J]. 河南林业科技, 2004, 24(4): 13-14
- [7] 惠楠. 单倍体小黑杨抗生素敏感试验[J]. 林业科技, 2004, 29(4): 7-9
- [8] 马宗新, 高玉祥, 赵红, 等. 三倍体速生杨树的组织培养及应用[J]. 安徽农业科学, 2004, 32(4): 715-716
- [9] 杜荣骞. 生物统计学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2005: 241
- [10] 刘青林, 马祎, 郑玉梅. 花卉组织培养[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003: 25-26
- [11] 赵芳, 李云. 生长物质对刺槐复叶离体再生的影响[J]. 核农学报, 2004, 18(3): 207-212
- [12] 宋国庆, 肖兴国, 李绍华, 等. 草莓叶片和叶柄再生体系的建立[J]. 落叶果树, 2000(2): 5-8
- [13] 陈维伦, 郭东红, 杨善英, 等. 山新杨(*P. davidiana* × *P. bolleana* Louche)叶外植体器官化以及生长调节物质对它的影响[J]. 植物学报, 1980(22): 311-315