

北美悬铃木的组织培养

邹永梅^{1,2}, 施季森^{1*}

(1. 国家林业局、江苏省林木遗传和基因工程重点实验室(南京林业大学), 江苏 南京 210037;

2. 江苏教育学院生物系, 江苏 南京 210013)

摘 要:从北美一球悬铃木截冠植株上采当年生萌蘖枝条作为起始外植体进行组培试验, 当用其茎段作为外植体诱导腋芽时, MS+NAA(0.1 mg/L)+6-BA(1.0 mg/L)+蔗糖(30 g/L)为适合的培养基, 而在系统研究基本培养基、植物激素等因素对北美一球悬铃木不定芽增殖的影响后发现: 以 DCR 为基本培养基, 添加 NAA(0.1 mg/L)+6-BA(1.0 mg/L)+KT(0.3 mg/L)+蔗糖(30 g/L)可促进北美一球悬铃木不定芽的增殖, 产生的不定芽生长情况良好、增殖系数高, 是比较适合芽增殖的培养基。生根培养时, 笔者在实验中设计了两条生根技术路线: 一步法生根, 将芽直接接种在含添加物 R(150 mg/L)的 DCR 培养基上; 二步生根法, 先将芽接种在含添加物 R(60 mg/L)的 DCR 培养基上 15 d 左右, 再转接至 DCR 基本培养基上。结果表明两条生根培养途径下的生根率均达 100%。

关键词:北美悬铃木; 组织培养; 外植体**中图分类号:** S722**文献标识码:** A**文章编号:** 1000-2006(2006)06-0061-05Tissue Culture and Mass Propagation of *Platanus occidentalis* LinnZOU Yong-mei^{1,2}, SHI Jisen^{1*}

(1. The Key Laboratory of Forest Genetics and Gene Engineering of the State Forestry Administration and Jiangsu

Province(Nanjing Forestry University), Nanjing 210037, China; 2. Department of Biology

Jiangsu Institute of Education, Nanjing 210013, China)

Abstract: Top cut pruning was made on an American sycamore crown, and segments from new sprout were collected as tissue culture initial explants. The results indicated that as for shoot segments induction buds the optimal medium was MS+NAA(0.1 mg/L)+6-BA(1.0 mg/L)+sucrose(30 g/L), and DCR+NAA(0.1 mg/L)+6-BA(1.0 mg/L)+KT(0.3 mg/L)+sucrose(30 g/L) was the optimal medium for induction buds proliferation, on which induction buds grew well and coefficient of multiplication reached 6.4 times. We developed two ways to get adventitious buds to root. One was that adventitious buds were transferred on the DCR medium with 150 mg/L R. The other, on the DCR medium with 60 mg/L R about for 15 d and then, transferred on a garniture-free DCR. By the two ways, both of the rooting percentages were up to 100%.

Key words: *Platanus occidentalis* Linn; Tissue culture; Explant

北美一球悬铃木(*Platanus occidentalis* Linn)树形伟岸, 树姿优美, 树冠圆满, 枝叶繁茂, 耐修剪, 易整形, 能适应城市城区复杂的立地环境, 具有良好的环境生态效益; 其木材结构细致, 淡黄微红, 纹理清晰细腻, 有光泽, 硬度适中, 较易干燥, 适于旋刨单板, 制作胶合板、刨花板、纤维板的贴面, 板材供家具、食品包装箱及制浆造纸材等, 是重要的园林绿化和工业用材树种^[1-2]。

国外对北美一球悬铃木的研究主要集中在无性繁殖、生长量遗传变异、木材性状遗传变异及抗逆性遗传变异等方面^[3-5]。我国于 19 世纪末开始引种北美一球悬铃木, 但仅作为绿化树种栽培。随着短周

收稿日期: 2006-04-17

修回日期: 2006-09-18

基金项目: 国家林业局 2003 年度重点课题

作者简介: 邹永梅(1967-), 女, 讲师, 博士生, 主要从事木本植物细胞和基因工程研究。

* 通讯作者 (Corresponding Author): 施季森, 男, 教授, 博士生导师。

期工业用材林的大量营造,要求引进和开发更多的树种,以缓解树种单一和日趋严重的病虫害问题。而北美一球悬铃木既可以满足园林绿化对树种的需要,又可以提供大量的工业用材。为此,1999年冬南京林业大学与美国密西西比大学及美国林业局南方林业试验站合作,系统地收集了美国南方分布区的北美一球悬铃木12个种源的48个半同胞家系,分别作了苗期测定和5个省份的多点生长和抗性测定^[6-7],同时对其种质资源的遗传变异进行了分子研究^[8]。笔者利用组织培养途径,进行了北美悬铃木的无性系育种和无性系生产研究,以期为扦插繁殖北美一球悬铃木时在激素种类、扦插材料、基质选择及其生产管理等方面提供理论参考。

1 材料与方 法

1.1 试材及外植体处理

供试材料为1999年从美国引种的北美一球悬铃木18号种源种子,在江苏句容播种的2年生植株,于2002年3月移栽到南京林业大学并进行截冠处理,5、6月份取当年萌生的枝条且中部带腋芽的茎段为外植体。

从截冠的北美一球悬铃木植株上取萌生的10 cm长带芽的茎段,除去叶片(但保留叶柄),在自来水下冲洗2 h,用洗衣粉液(质量分数约2%)泡洗10 min,再用自来水冲洗干净。将材料放入高温灭菌过的三角瓶中加入70%的酒精,浸30 s后倒出酒精,用0.1%的 HgCl_2 消毒10 min,然后用无菌水冲洗6遍,无菌滤纸吸干表面水分。

1.2 芽的诱导及继代增殖

用镊子拽去叶柄,使腋芽裸露,将带芽茎段切成长度为0.5~1.0 cm的单芽小段,接种在芽诱导培养基上(腋芽不能接触到培养基,否则易长出愈伤组织),芽诱导培养基为MS+NAA(0.1 mg/L)+6-BA(0.1~5.0 mg/L),蔗糖加30 g/L,琼脂粉7.5 g/L(pH5.8)。置于26℃下光照(2 000 lx)培养16 h/d。

将芽诱导培养基上得到的芽体转移到增殖培养基上,增殖培养基为MS和DCR,并分别附加了NAA(0.1 mg/L)+6-BA(1.0~5.0 mg/L)+KT(0~0.3 mg/L),蔗糖30 g/L,琼脂粉7.5 g/L(pH5.8)。以后每4周继代1次。

将丛生芽切成0.6~0.8 cm长的单芽,矮的丛生芽愈伤组织切块,接种于增殖培养基上进行继代培养。每4周继代1次,连续继代12次。

1.3 壮苗和生根

将芽体从增殖培养基产生的芽丛上单个切下,转入壮苗培养基。壮苗培养基为DCR基本培养基附加一定量的添加物R,加蔗糖30 g/L,琼脂粉7.5 g/L(pH5.8)。2周后,将1~1.5 cm长的芽转移到生根培养基上,生根培养基为DCR基本培养基,不加任何激素或其他物质。

1.4 移苗

在试管苗长5~6 cm时,开瓶炼苗3 d,取出苗后用自来水把培养基冲洗干净,移植到装有蛭石的塑料容器内,上罩塑料薄膜以保持湿度。1周后不再覆盖塑料薄膜,4周后移入大田。

1.5 数据统计方法

(1)在外植体接种60 d后观察统计结果并计算芽的诱导率。芽的诱导率=诱导出芽的外植体数/接种的外植体数 $\times 100\%$ 。

(2)在接种28 d后观察生长情况,统计结果并计算芽的增殖系数。芽的增殖系数=再生出的芽总数/接种芽个数。

(3)每次继代接种28 d后观察生长情况,统计结果并计算不同次数继代后的增殖系数。有效芽增殖系数=再生出的有效芽总数/接种芽个数;无效芽增殖系数=再生出的无效芽总数/接种芽个数。

(4)将苗接种在生根培养基上30 d后观察生根情况,统计结果并计算芽的生根率。芽的生根率=长出不定根的芽数/接种芽数;平均不定根数=不定根的总数/诱导出不定根的芽数;不定根形成能力=平均不定根数 $\times$ 生根率。

2 结果与分析

2.1 不同浓度激素对芽诱导的影响

外植体接种到芽诱导培养基上,3周内腋芽无明显的生长迹象,3周后,有的腋芽开始萌动生长,再经2~4周的培养,腋芽部位能长出2~3个不定芽。为了提高芽的诱导率,对细胞分裂素(6-BA)以不同浓度配比进行筛选试验,在接种60 d后观察并统计结果(表1)。从表1可以看出,不同浓度配比的细胞分裂素(6-BA)对诱导腋芽分化效果具有明显差异。在附加不同浓度6-BA的培养基上,部分腋芽能萌发长出不定芽来,但萌发频率不尽相同,随着6-BA浓度的增加,芽的萌发频率也明显地提高,长出芽所需的时间也有缩短的趋势,但芽的玻璃化现象加重,这可能是细胞分裂素浓度过高所致。在附加1.0 mg/L 6-BA的培养基上,芽的萌发频率不是最高,比附加1.0 mg/L 6-BA的培养基上萌发频率低了4%,但芽的形态正常。所以笔者认为MS+NAA(0.1 mg/L)+BA(1.0 mg/L)比较适合北美悬铃木用茎段作为外植体时诱导腋芽的萌发。

2.2 不同培养基对芽增殖生长的影响

将培养外植体得到的无菌芽苗转接到增殖培养基上,实验发现在对芽进行增殖培养时,MS作为基本培养是不合适的,因为在MS基本培养基上无论附加何种激素,芽体在其上生长2~3周后都容易出现黄叶,个别芽体甚至枯死。而基本培养基为DCR时,芽体生长较正常。故以DCR作为基本培养基并附加0.1 mg/L NAA和不同浓度的6-BA和KT,结果见表2。

由表2可知,不同浓度的6-BA和KT组合配方均能诱导芽的分化和增殖。一般而言,培养10 d后材料的切口处均出现愈伤组织,芽苗明显增高,且在基部的腋芽处开始有不定芽萌动迹象,15 d后不定芽陆续长出,30 d时芽苗增殖明显增多,芽体繁殖达4~8倍。但接种在只附加6-BA而没有附加KT的培养基上的材料,在培养10 d后其切口处长出较多的愈伤组织,而接种在同时附加有KT和6-BA的培养基上的材料在培养10 d后,其切口处只有较少的愈伤组织,总体的生长情况好于前者。

0.3 mg/L的KT与1 mg/L的6-BA配合使用,可使芽的增殖系数为6.4,与其他较高浓度的6-BA(F)处理相比稍低,但在实验过程中发现繁殖系数提高的同时也出现芽丛过密、芽苗较矮、有效苗减少且芽苗的玻璃化程度趋严重等问题。

通过实验结果的比较,认为DCR+NAA(0.1 mg/L)+BA(1.0 mg/L)+KT(0.3 mg/L)培养基既可实现高效增殖,又能保证分化出的芽健壮,芽苗生长良好,可视为最适的激素配比培养基。

2.3 不同继代次数对芽增殖系数的影响

随着继代次数的增加,芽的增殖系数有一定的变化。实验中对北美一球悬铃木继代培养的前12代试管苗的增殖系数进行了观察统计,结果见图1。由图1可见,在4代之前,每次继代芽的增殖水平无变化;继代4次以后,随着继代次数的增加,增殖系数有明显的递增趋势;8代以前,在增殖培养基上得到的芽均为有效芽,从第9代起开始出现玻璃化苗,而且随后几代虽然增殖系数显著增加,但玻璃化越趋严重,玻璃化苗所占比例由第9代的23%迅速增至第12代的82%,且有效芽的增殖系数显著降低,

表1 不同6-BA浓度对芽诱导的影响

Table1 Effects of hormone on bud induction

激素 Hormone/(mg·L ⁻¹)		出芽时间 Time/d	芽诱导率 Induction frequency of buds%	玻璃化 Vitrification%
NAA	6-BA			
0.1	0.5	41	56	0
0.1	1.0	35	72	0
0.1	1.5	32	72	0
0.1	2.0	28	76	15.8
0.1	2.5	25	64	21.1
0.1	3.0	25	64	31.6

注:外植体数为25。

表2 6-BA和KT联合使用对不定芽增殖的影响

Table 2 The effect of 6-BA and KT on adventitious bud increase

激素浓度 Concentration of hormone/(mg·L ⁻¹)			接种芽数 Amount of buds	再生芽数 Amount of adventitious buds	增殖系数 Coefficient of regenerating shoot
NAA	6-BA	KT			
0.1	1	0.1	40	147	3.7
0.1	2	0.1	40	171	4.3
0.1	1	0.2	40	201	5.0
0.1	2	0.2	40	223	5.6
0.1	1	0.3	40	256	6.4
0.1	2	0.3	40	277	6.9
0.1	1	0.4	40	290	7.3
0.1	2	0.4	40	299	7.5
0.1	1	0.5	40	289	7.3
0.1	2	0.5	40	302	7.6

第12代芽的总增殖系数为11.9,而有效芽的增殖系数仅为2.1,也就是说继代至第12代所得到的绝大部分为无效的玻璃化苗。这种变化趋势是试管苗自身的原因,还是与内源激素含量变化有关,尚需进行深入探讨。

为了克服随着继代次数增加玻璃化越趋严重而有效芽的增殖系数显著降低的问题,笔者用实验中经生根培养基培养得到的生了根的无菌苗,取其茎段接种在芽诱导培养基 MS+NAA(0.1 mg/L)+6-BA(1.0 mg/L)上,结果与实验起始阶段用外植体定瓶的效果相像,能诱导出芽,这些芽在增殖培养基上开始几代的增殖系数也有6.5左右,而后连续继代至8、9代后又开始有玻璃化苗出现。

2.4 生根和壮苗

实验中采用一步生根法和两步生根法两种方法。培养基对不定芽生根的影响见表3。

表3 培养基对不定芽生根的影响

Table 3 The effect of different media on induction roots from buds

培养基 Medium	生根率 Rooting ratio %	平均根数 No. of roots per shoot/ 条	不定根形 成能力 Root forming capacity	平均根长 Average length of root/cm	培养基 Medium	生根率 Rooting ratio %	平均根数 No. of roots per shoot/ 条	不定根 形成能力 Root forming capacity	平均根长 Average length of root/cm
MS	20	1.7	0.34	1.7	DCR	23	3.8	0.87	2.9
MS+IBA(0.5 mg/L)	27	2.1	0.57	1.9	DCR+IBA(0.5 mg/L)	62	5.1	3.16	2.8
MS+IBA(1.0 mg/L)	51	2.3	1.17	2.2	DCR+IBA(1.0 mg/L)	73	5.7	4.16	2.7
MS+IBA(1.5 mg/L)	69	3.1	2.14	2.1	DCR+IBA(1.5 mg/L)	72	5.9	4.25	3.3
MS+IBA(2.0 mg/L)	56	2.6	1.46	2.2	DCR+IBA(2.0 mg/L)	75	5.5	4.13	3.0
MS+R(50 mg/L)	63	3.0	1.89	2.6	DCR+R(50 mg/L)	61	6.8	4.15	2.8
MS+R(100 mg/L)	84	3.4	2.86	2.4	DCR+R(100 mg/L)	92	7.4	6.8	3.1
MS+R(150 mg/L)	88	4.23	3.72	2.7	DCR+R(150 mg/L)	100	8.2	8.2	3.2
MS+R(200 mg/L)	100	3.89	3.89	2.6	DCR+R(200 mg/L)	97	8.5	8.2	3.2

注:接种外植体数均为25。

一步生根法中,将芽增殖培养基上得到的健壮且有2~3个叶片的芽单个切下,接种到以MS、DCR为基本培养基并分别附加不同浓度的IBA和添加物R的生根培养基上,11 d后可观察到有根原基陆续分化出来,15 d后根原基开始伸长,到30 d时,最长的根可达3.3 cm。

在DCR基本培养基上小苗生根率很低,附加1 mg/L的IBA则使生根率有明显提高,可达73%。如加150 mg/L的添加物R,小苗全部都能生根,即生根率达到100%,而且生根状态比其他培养基上的小苗的生根状态好,每苗平均有8.2条根,平均根长3.2 cm。所以在生产上选用DCR基本培养基附加150 mg/L的R,不仅小苗生根质量好,而且成本也低。

二步生根法中,第一步:将芽体从增殖培养基产生的芽丛上单个切下,转入壮苗培养基DCR+60 mg/L上;第二步:2周后,芽体明显伸长,将1~1.5 cm的芽转移到生根培养基上,生根培养用DCR作基本培养基,不用加任何激素或其他物质,20 d后开始长根,生根率也达100%;40 d时,苗高8~10 cm,且苗的叶片面积是用一步生根方法得到的小苗叶面积的2倍。

2.5 移苗

当生根培养基上的苗根长3 cm左右、苗高2~3 cm时,将培养瓶移至自然室温下揭开封口膜,并在培养瓶里加0.5 cm高的一层水,炼苗4 d。炼苗后将小苗取出,洗净苗上附着的培养基,移栽蛭石中。移栽后盖上塑料薄膜进行保温保湿,并加以遮荫,每天掀开薄膜1次使其透气并适量喷水,2周后去掉薄膜,并注意保持蛭石湿润。移栽25 d后,苗高2~5 cm,叶片明显长大,在埋入蛭石中的节上又长出1~2条新根,根长2~3 cm,原来生的根又伸长1~2 cm。调查发现,移苗成活率达89.5%。

3 讨论

(1)继代次数多少会影响到芽的增殖系数且嫩茎的增殖倍数高于初培养茎段嫩茎的增殖倍数。何

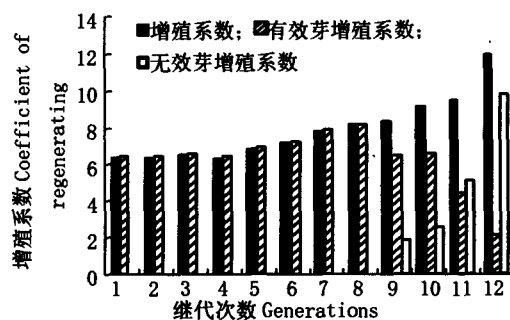


图1 不同继代次数后的增殖系数

Fig. 1 The effect of different generations on adventitious bud increase coefficient

水涛等也观察到苹果继代培养中,某一阶段会出现有效芽最多,且芽均匀整齐的“代期”(临界期),超过这一“代期”,新梢增殖虽多但有效芽减少,生长不整齐^[1]。而植物组织或细胞的变异率随培养时间的延长而增加。笔者发现随继代次数增加不定芽的增殖率呈递增趋势,但到 13 代以后,虽然增殖系数能高达 8 以上,但不定芽质量下降,出现玻璃化苗。笔者认为这主要是由细胞分裂素在植物细胞内的积累所致。

(2)在适当浓度的激素作用下,北美悬铃木嫩茎能直接从外植体上产生丛生芽。北美悬铃木这种以芽繁芽进行快速繁殖的方式,有利于其保持母株基因型的稳定性。另外,该试验在对北美悬铃木嫩茎进行不定芽诱导培养中,同时实现了芽的诱导与增殖,将培养程序简化为初始培养→继代培养→生根培养 3 个阶段,明显地缩短了培养时间,降低了生产成本。

(3)通过组织培养途径,芽苗的生根率可高达 100%,这与组织培养方法给芽苗提供一个无菌环境和营养较为丰富的生根条件不无关系。当前,扦插苗由于具有成本低,易管理等优点,在林木的育苗生产中仍具有十分重要的地位和作用。该研究结果可以为北美悬铃木扦插繁殖在激素种类、扦插材料、扦插基质选择及其生产管理等方面提供一定的借鉴。

[参 考 文 献]

- [1] Land S B, Elam W W, Mohammad Khan. Rejuvenated sycamore cuttings for energy plantations[J]. Biomass and Biogenery, 1995, 8(4): 255—264.
- [2] Robert C Hare, Samul B, Land JR. Effect of cold storage and chemical treatment on rooting of hardwood sycamore cuttings[J]. Can J For Res, 1994, 12: 417—419.
- [3] Merz Robert W. Amercian sycamore (*Platanus occidentalis* L), in Silvis of forest trees of the United Stated[C]// Fowells H A. Agriculture Handbook. Washington D C; Comp US Department of Agriculture, 1965.
- [4] Tang Zhenmin, Samul B, Land J R. Genetic and reciprocal effect on first-year growth and leaf area development of sycamore seedlings[R]. 24th Southern Forest Tree Improvement Conference, 1997.
- [5] Congeshall M V, Land S B J R. Mmon V D A, et al. Genetic variation in resistance to canker disease of young American sycamore [J]. Plant Disease, 1981, 65(2): 215—220.
- [6] Merz, Robert W. American sycamore(*Platanus occidentalis* L.) In Silvics of forest tree of the United States[C]// Fowells H A. Agriculture Handbook 271. Washington DC; Comp U S Department of American, 1965.
- [7] 江文波. 一球悬铃木种源内家系生长遗传变异及遗传多样性[D]. 南京:南京林业大学, 2004.
- [8] 狄香香, 江文波, 施季森. 美国梧桐种质资源遗传变异的分子研究[J]. 东北林业大学学报, 2005, 33(1): 4—6.
- [9] 何水涛, 刘沛镇, 崔怀玉, 等. 培养条件对长富 2 号苹果新梢增殖和生长的影响[J]. 果树科学, 1996, 13(4): 219—222.

(责任编辑 郑瑛鼓)