

南抗杨叶片快速繁殖体系的建立

杨茹, 项艳*

(安徽农业大学林学与园林学院, 合肥 230036)

摘要:以南抗杨叶片为材料, 对其快繁体系进行研究。选用9种分化培养基、4种增殖培养基和6种生根培养基, 研究不同激素组合对快速繁殖体系建立的影响。结果表明, 适宜的诱导分化培养基为MS + 6-BA 1.5 mg·L⁻¹ + NAA 0.5 mg·L⁻¹ + KT 0.1 mg·L⁻¹; 丛生芽增殖培养基为MS + 6-BA 1.2 mg·L⁻¹ + NAA 0.3 mg·L⁻¹ + KT 0.1 mg·L⁻¹; 最佳生根培养基为1/2MS + IBA 0.5 mg·L⁻¹ + NAA 0.01 mg·L⁻¹。

关键词: 南抗杨; 组织培养; 快繁体系

中图分类号: S792.11

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2011)02-0208-04

Establishment of fast regeneration system from leaves of *Populus deltoides* cl. Nankang

YANG Ru, XIANG Yan

(School of Forestry and Landscape Architecture, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: This paper developed fast reproduction system from leaves of *Populus deltoides* cl. Nankang with 9 differentiation media, 4 multiplication media and 6 rooting media. The effect of hormone concentration was also studied. The results indicated that the best differentiation media was MS + 6-BA 1.5 mg·L⁻¹ + NAA 0.5 mg·L⁻¹ + KT 0.1 mg·L⁻¹; the best multiplication media was MS + 6-BA 1.2 mg·L⁻¹ + NAA 0.3 mg·L⁻¹ + KT 0.1 mg·L⁻¹; the best rooting media was 1/2MS + IBA 0.5 mg·L⁻¹ + NAA 0.01 mg·L⁻¹.

Key words: *Populus deltoides* cl. Nankang; tissue culture; fast regeneration system

杨树是我国重要的经济树种, 还在水土保持和生物抗虫抗病等方面发挥重要的作用^[1-2]。南抗杨 (*Populus deltoides* cl. Nankang) 为美洲黑杨杂种, 是速生新品种^[3], 具有适应性强, 生长速度快和丰产等特性, 特别对云斑天牛、光肩星天牛有较强的抗性^[4]。在安徽省淮北、沿江、江淮地区, 南抗杨为主要繁育推广树种, 它耐瘠薄、抗旱、喜水、耐涝, 根部于水下 50 d 不死, 河滩地栽植成活率高达 95% 以上, 是沙滩荒地、固沙护堤的首选树种之一。

本研究以南抗杨叶片为材料, 对该品种在快速繁殖体系建立过程中生长调节激素的种类及浓度进行了系统研究, 获得最佳的培养效果。初步建立了高效的叶片快繁体系, 促进杨树的微体快繁和基因转化技术的快速发展^[5], 对治理我国生态环境、解决木材短缺问题具有极大的现实意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

栽植于安徽省合肥市高新技术农业园内的南抗杨, 外植体为中、下部健壮枝条上的新生叶片, 采集时间为 5 月~8 月晴天的上午 10:00 到下午 2:00 之间^[6]。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的消毒 将采集到的南抗杨新生叶片先用洗衣粉水浸泡、清洗, 再在流水下冲洗 2 h 以上。选取 75% 的酒精和 0.1% 的升汞溶液作为消毒剂, 先用 75% 的酒精浸泡 8~10 s, 无菌水冲洗 2 次, 再用 0.1% 的升汞溶液浸泡 4 min, 无菌水冲洗 8 次。最后用灭过菌的滤纸 (或纱布) 擦干叶片。将叶片切成 0.5 cm × 0.5 cm 的小块, 尽量使每个小块里含

收稿日期: 2010-08-31

基金项目: 国家科技支撑计划子课题 (2009BADA6B06-1) 和安徽省科技攻关重大专项 (08010302073) 共同资助。

作者简介: 杨茹, 女, 硕士研究生。

* 通讯作者: 项艳, 女, 博士, 教授。E-mail: xiangyan@ahau.edu.cn

有叶脉^[7-8]。

1.2.2 丛生芽的诱导培养 分化培养基是以 MS 为基本培养基^[9], pH 为 5.8~6.2。附加激素 6-BA (1.0、1.5、2.0 mg·L⁻¹)、NAA (0.2、0.3、0.5 mg·L⁻¹)、KT (0.1、0.2、0.3 mg·L⁻¹)、蔗糖 (20、25、30 g·L⁻¹)，采用正交设计中的 4 因素 3 水平 L₉(3⁴)表设计，共设计了 9 个处理，每个处理设了 3 次重复，每个重复接种叶片 30 小块。在温度 21±1℃、光照 1 500~2 000 lx、12~14 h·d⁻¹ 下培养 40 d，统计叶片分化率，筛选诱导丛生芽的最佳分化培养基。

分化率=(分化出芽的外植体数/接种的外植体数)×100%

1.2.3 丛生芽的增殖培养 将分化的丛生芽接种到以 MS 为基本培养基, pH 为 5.8~6.2, 附加激素 6-BA (1.0、1.2 mg·L⁻¹)、NAA (0.3、0.5 mg·L⁻¹)、KT 和蔗糖, 在温度 23~26℃、光照 2 000~3 000 lx、10~12 h·d⁻¹ 下培养 30~40 d，观察试验结果。

增殖倍数=(增长后的分化芽数/增长前的分化芽数)×100%，即经过一个继代周期的培养后，每一瓶能稳定地转接多少瓶的数目。

1.2.4 生根培养 在丛生芽中选取生长健壮，长度为 2~3 cm 的嫩茎，转入以 1/2 MS 为基本培养基，附加蔗糖 15 g·L⁻¹，激素 IBA (0.3、0.5、0.7 mg·L⁻¹)、NAA (0.01、0.02 mg·L⁻¹) 的培养基中诱导生根^[10]，45 d 观察生根结果。

1.2.5 炼苗与移栽 选择根系发达、主茎高达 3~5 cm 的幼苗，将其组培瓶打开，用灭菌的镊子轻轻捣碎培养基，注入灭菌后的双蒸水，水位高度超过培养基表面 1~2 cm，在组培室炼苗 1 周左右。将幼苗取出，用水清洗根部的培养基，移栽至基质（选用泥炭土或腐殖土与细砂按 3:1 体积比配制，用 3% 硫酸亚铁进行土壤消毒）中，遮光喷雾保湿 4 d，再经

过漫射光照射 1 周，逐渐转入直射光环境中或移栽至大田中培养。

2 结果与分析

2.1 不用培养基对丛生芽诱导分化的影响

根据正交设计中的 4 因素 3 水平 L₉(3⁴)设计，将切成小块的叶片接在 9 个处理的培养基上，25 d 转接 1 次，50 d 的结果分析见表 1、表 2 和表 3。

在叶片接到分化培养基上的第 6 天开始，叶片边缘普遍逐渐肿胀、皱曲，大概 10 d 左右，叶片切口侧脉及脉梢处有淡绿色小的愈伤组织产生，大概 20 d 左右，愈伤组织停止生长，有小的不定芽产生。

由表 1 和表 2 可以看出，极差 R 代表 4 个不同因素对南抗杨叶片诱导分化影响大小：C>A>D>B，最佳培养基组合为 A₂B₃C₁D₂，即南抗杨诱导分化的最佳培养基为 MS + 6-BA 1.5 mg·L⁻¹ + NAA 0.5 mg·L⁻¹ + KT 0.1 mg·L⁻¹ + 蔗糖 25 g·L⁻¹。

对表 2 的结果做进一步的方差分析可知：6-BA 和 KT 的影响达到了极显著 ($P<0.01$)，说明这 2 种激素对诱导叶片分化有明显的作用，是叶片诱导分化的主要因素；蔗糖和 NAA 的影响均达到了显著 ($P<0.05$)，说明这 2 种物质对诱导分化有促进作用，也是重要因素。诱导分化的效果与 6-BA/NAA 的比值有一定的相关性，其比值大体在 3:1~5:1 之间，当 6-BA 的浓度低于 1.0 mg·L⁻¹ 时，诱导分化的效果会显著下降，分化芽数量较少而且芽的生长状况也较差。

2.2 不同培养基对丛生芽增殖培养的影响

将在分化培养基上诱导出的分化芽转接到增殖培养基中，不仅降低细胞分裂素 6-BA 的浓度适应生根需要，还能使分化芽成倍的增长^[11]，达到试验的目的。

表 1 不同分化培养基对南抗杨叶片诱导分化的试验结果

Table 1 Differentiation results of leaves of *Populus deltoides* cl. Nankang in 9 differentiation media

处理号 No	A(6-BA) /mg·L ⁻¹	B(NAA) /mg·L ⁻¹	C(KT) /mg·L ⁻¹	D(蔗糖 Suger) /g·L ⁻¹	分化叶片数/个 Number of blades with differentiation	分化率/% Differentiation rate
I-1	1(1.0)	1(0.2)	1(0.1)	1(20)	22.29	74.30
I-2	1(1.0)	2(0.3)	2(0.2)	2(25)	17.12	57.07
I-3	1(1.0)	3(0.5)	3(0.3)	3(30)	14.54	48.47
I-4	2(1.5)	1(0.2)	2(0.2)	3(30)	21.45	71.50
I-5	2(1.5)	2(0.3)	3(0.3)	1(20)	20.59	68.63
I-6	2(1.5)	3(0.5)	1(0.1)	2(25)	24.05	80.17
I-7	3(2.0)	1(0.2)	3(0.3)	2(25)	18.88	62.93
I-8	3(2.0)	2(0.3)	1(0.1)	3(30)	21.40	71.33
I-9	3(2.0)	3(0.5)	2(0.2)	1(20)	21.73	72.43

注：分化数为 3 次重复试验的平均值，每个重复接种叶片为 30 个。

Note: The number of blades with differentiation is the average value of triplicates, and every repeat contains 30 blades.

表 2 不同分化培养基对南抗杨叶片诱导分化的试验结果分析
Table 2 Analysis of 9 differentiation media to leaves of *Populus deltoides* cl.Nankang

项目 Item	A(6-BA)	B(NAA)	C(KT)	D(蔗糖)
K ₁	53.95	62.62	67.74	64.61
K ₂	66.09	59.11	60.30	60.05
K ₃	62.01	60.32	54.01	57.39
k ₁	17.98	20.87	22.58	21.54
k ₂	22.03	19.70	20.10	20.03
k ₃	20.67	20.11	18.00	19.13
极差 R	4.05	1.17	4.58	2.41
因素主次 Order	C>A>D>B			
优化方案 Optimization	A ₂ B ₃ C ₁ D ₂			

注: (1)K_i表示第一列上水平号为*i*时所对应的试验结果之和; (2)*ki* = *Ki/s*, 其中*s*为任一列上各水平出现的次数; (3)极差 $R = k_{\max} - k_{\min}$ 。

Note: (1) K_i means the first column on the level *i* and corresponding to the number of test results; (2) *ki* = *Ki/s*, and *s* means the times of every different levels appearing in a column.

表 3 不同分化培养基对南抗杨叶片诱导分化的方差分析
Table 3 Variance analysis of 9 differentiation media to leaves of *Populus deltoides* cl.Nankang

变异来源 Origin	自由度 Df	平方和 Sum of square	均方 Mean square	F 值 F value	P < F
处理间 Inter-groups	5	9 855.0	1917.0	185.6	< 0.0001
误差 Error	18	191.16	10.62		
总变异 Total variance	23	10 046.15			

表 4 不同培养基对丛生芽增殖培养的试验结果
Table 4 The result of 4 multiplication media to cluster buds

处理号 No	6-BA /mg·L ⁻¹	NAA /mg·L ⁻¹	KT /mg·L ⁻¹	接种芽数/个 Inoculation sprout	增长倍数 Multiplication	分化芽生长状况 Growth condition of cluster buds
II-1	1.0	0.3	0.1	30	12.33	芽绿色、较高、较多, 生长健壮
II-2	1.0	0.5	0.1	30	10.92	芽绿色, 长势较好, 有少量玻璃化
II-3	1.2	0.3	0.1	30	15.40	芽绿色、较高、较多, 生长健壮
II-4	1.2	0.5	0.1	30	8.47	芽绿中带黄, 生长一般, 有少量玻璃化

表 5 不同培养基对试管苗生根的试验结果
Table 5 The result of 6 rooting media to seedlings

处理号 No	激素浓度 Concentration of hormone		接种苗数/个 Inoculation seedling	生根数/个 Rooting number	生根率/% Rooting rate	平均根长/cm Average length of root
	IBA/mg·L ⁻¹	NAA/mg·L ⁻¹				
III-1	0.3	0.01	30	28	93	1.78
III-2	0.3	0.02	30	27	90	1.66
III-3	0.5	0.01	30	30	100	2.77
III-4	0.5	0.02	30	30	100	2.23
III-5	0.7	0.01	30	24	80	1.35
III-6	0.7	0.02	30	23	76	1.09

从表 4 中可以看出, II-1 和 II-3 的分化芽生长状况都很健康, 都适合南抗杨丛生芽增殖培养, 但根据增殖倍数的计算得出: 第 3 个处理即 MS + 6-BA 1.2 mg·L⁻¹ + NAA 0.3 mg·L⁻¹ + KT 0.1 mg·L⁻¹, 使分化芽增殖的倍数最高, 为 15.4。

2.3 不同培养基对试管苗生根的影响

将从生芽转入到生根培养基中, 10 d 左右从芽基部长出白色小根, 20 d 后根变的较粗壮, 同时苗也在进一步长壮, 叶片变大。45 d 观察生根数和根长, 见表 5。

处理 3 和 4 中, 在含 IBA 0.5 mg·L⁻¹ 的 2 种培养

基上生长的试管苗生根率都达到了 100%，当 NAA $0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，平均根长为 2.77 cm，明显高于其它几个处理。当 IBA 浓度为 $0.7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，生根数减少，说明 IBA 浓度过高会抑制根的生长。所以 $1/2\text{MS} + \text{IBA } 0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 为最适合南抗杨试管苗生根的培养基配方。

2.4 炼苗与移栽

选择根系发达、主茎高达 3~5 cm 的幼苗进行炼苗。等在培养室炼苗 1 周后，将其接到基质中，再经过喷雾保湿和漫射光照射后，最后移栽至大田中。

3 小结与讨论

杨树适宜的外植体有很多，如叶片、腋芽、茎尖等。本试验选用叶片为外植体，是因为叶片取材时间充足，生长状况较好，消毒时间容易掌握。

许多植物生长的好坏由所用的植物激素得种类、浓度所决定的。在南抗杨快速繁殖体系建立的过程中发现，诱导分化芽最适宜的配方中，6-BA/NAA 为 3:1~5:1，当高于这个比例时，分化芽的数量为最少，是因为通过激素调节，可诱导形成丛生芽或者是愈伤组织，在 20 d 左右，有的愈伤组织停止了生长。丛生芽是快繁的重要途径，不产生变异，可以保持原来植株的优良性状，而愈伤组织容易发生变异^[12]，所以当 6-BA/NAA 为 3:1~5:1 时最大限度抑制了愈伤组织的形成。最佳增殖培养基配方中，6-BA/NAA 为 4:1，可使分化芽增殖的倍数最高，分化芽生长最健康。

植物激素可调控器官发生对很多物种都适用，但对一具体的形态发生过程来说，所要求的外源激素是不同的。本实验中，在诱导分化培养基和增殖培养基中都添加了少量的激动素 KT，KT 不仅具有促进细胞分裂作用，还可以延缓离体叶片、诱导芽

分化和发育等作用。

南抗杨属于黑杨派，其快繁体系的建立是在前人研究的基础上，做了大量实验总结出来的，但仍存在一些问题，如蔗糖量、琼脂量的影响等，还需进一步研究。

参考文献:

- [1] 赵华燕, 卢善发, 晁瑞堂. 杨树的组织培养及其基因工程的研究[J]. 植物学通报, 2001, 18(2): 169-176.
- [2] Liu B, Li H S, Wang Q H, et al. Transformation of *Populus tomentosa* with anti-PLD gene[J]. Hereditas, 2002, 24(1): 40-44.
- [3] 毛新琳, 黄丽莉, 吕立纯. 四季杨、南抗杨扦插育苗技术[J]. 江西林业科技, 2006(5): 32-33.
- [4] 吴建功, 寇启春, 王天录, 等. 抗虫树种——南抗杨引种繁育初报[J]. 森林病虫害通讯, 1999(4): 43-44.
- [5] 郑进, 康薇. 杨树组织培养中应注意的几个问题[J]. 黄石理工学院学报, 2010(3): 21-23.
- [6] 沈周高, 项艳, 蔡诚, 等. 3 个杨树品种叶片再生体系的建立[J]. 中国农学通报, 2006(11): 90-96.
- [7] 程明珠, 项艳. 中涡 1 号杨树叶片再生体系的建立[J]. 林业实用技术, 2010(3): 6-8.
- [8] 郑琼, 马旭俊, 杨传平, 等. 欧美杨“山地 1 号”组织培养再生系统的建立[J]. 分子植物育种, 2006(4): 579-582.
- [9] 李浚明. 植物组织培养教程[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1992: 26-32.
- [10] 朱湘渝, 王瑞玲. 几种难生根杨树组织培养的研究[C]// 杨树遗传改良. 北京: 北京农业大学出版社, 1991: 331-336.
- [11] 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.
- [12] 于志水, 金红, 尚胜军, 等. 黑杨派杨树组培再生体系的研究[J]. 辽宁林业科技, 2002(6): 11-13.