

725 杨组培繁殖技术研究

汪玲^{1,2}, 项艳^{2*}

(1. 宿州学院特色种植业苗种生产工程技术研究中心, 宿州 234000; 2. 安徽农业大学林学与园林学院, 合肥 230036)

摘要: 以美洲黑杨 725 杨树 (*Populus deltoides* cl. '725') 叶片为材料, 对其再生体系的建立及其分化和生根苗对潮霉素 B 的浓度筛选进行了研究。结果表明, 叶片的最佳消毒体系为 75% 的酒精消毒时间 8 s, 0.1% 的升汞消毒 3 min, 最佳诱导愈伤的培养基是 MS+6-BA 0.2 mg·L⁻¹+2,4-D 1.5 mg·L⁻¹+蔗糖 25 g·L⁻¹+琼脂 6 g·L⁻¹; 最佳诱导分化培养基为 MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+NAA 0.3 mg·L⁻¹+KT 0.3 mg·L⁻¹+蔗糖 25 g·L⁻¹+琼脂 6 g·L⁻¹; 适宜的继代增殖培养基为 MS+6-BA 0.3 mg·L⁻¹+NAA 0.05 mg·L⁻¹+蔗糖 25 g·L⁻¹+琼脂 6 g·L⁻¹; 最佳生根培养基为 1/2MS+NAA 0.01 mg·L⁻¹+IBA 0.7 mg·L⁻¹+蔗糖 20 g·L⁻¹+琼脂 6 g·L⁻¹; 对 725 杨叶片分化和不定芽生根进行了潮霉素 B 的敏感性试验, 确定叶片分化的临界浓度为 2.5 mg·L⁻¹, 生根的临界浓度为 1.5 mg·L⁻¹。

关键词: 725 杨树; 组织培养; 再生体系; 潮霉素 B; 浓度筛选

中图分类号: S792.11

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2013)04-0612-06

Research on tissue culture and propagation of *Populus deltoides* cl. '725'

WANG Ling^{1,2}, XIANG Yan²

(1. Engineering Technical Research Center of Characteristic Planting and Seedling Production, Suzhou University, Suzhou 234000;

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

Abstract: In this study, the regeneration system was established from leave explants of *Populus deltoides* cl. '725'. Meanwhile, the buds and rooting seedlings of *Populus deltoides* cl. '725' were screened using hygromycin B. The results indicated that the best disinfection time of leaves was using 75% of the alcohol for 8 s and 0.1% HgCl₂ for 3 min; The best suitable medium of *deltoides* cl. '725' leaves for callus induction was MS+6-BA 0.2 mg·L⁻¹+2,4-D 1.5 mg·L⁻¹+sucrose 25 g·L⁻¹+agar 6 g·L⁻¹; appropriate induction differentiation medium was MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+NAA 0.3 mg·L⁻¹+KT 0.3 mg·L⁻¹+ sucrose 25 g·L⁻¹+agar 6 g·L⁻¹; the best multiplication media was MS+6-BA 0.3 mg·L⁻¹+NAA 0.05 mg·L⁻¹+sucrose 25 g·L⁻¹+agar 6 g·L⁻¹; the best medium for rooting was 1/2 MS+ NAA 0.01 mg·L⁻¹+ IBA 0.7 mg·L⁻¹+ sucrose 20 g·L⁻¹+agar 6 g·L⁻¹; the critical hygromycin B sensitive concentrations for inducing shoots and roots of the poplar were 2.5 mg·L⁻¹ and 1.5 mg·L⁻¹, respectively.

Key words: *Populus deltoides* cl. '725'; tissue culture; regeneration system; hygromycin B; screen concentration

杨树属于杨柳科(Saliceae)杨属(Populus), 是一种适应能力很强的造林树种^[1], 在世界上分布最广泛。1934 年, 法国 Gautheret 等人最早通过培养欧洲黑杨的的形成层, 成功获得其愈伤组织^[2]。1964 年, 美国学者 Mathes 等利用三倍体美洲山杨的茎作为组织培养的外植体得到了愈伤组织, 并进一步诱导出了根和茎^[3]。1968 年, Wolter 等在培养基中加入苯基腺嘌呤后, 诱导出美洲山杨的茎和根^[4]。20

世纪 70 年代后, 杨树不同外植体的选用和高效改良的培养基在组织培养上的应用都已经达到一定的水平^[5]。近年来, 杨树的组织培养技术有了极大的发展, 杨属中的新疆杨^[6]、银白杨^[7]、欧美黑杨^[8]、毛果杨^[9]、山新杨^[10]、黑林 1 号^[11]、中涡 1 号^[12]、南林 95 杨、中林 2001、南抗杨^[13]等都有离体再生的报道。

组织培养技术在杨树中的应用主要可以表现为

收稿日期: 2013-01-18

基金项目: 安徽省自然科学基金 (1308085MC36) 和宿州学院特色种植业苗种生产工程技术研究中心开放课题 (2013YKF10) 共同资助。

作者简介: 汪玲, 女, 助教。E-mail: wangling0910@yahoo.cn

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

如下几个方面: 扩大繁殖生根比较困难的树种; 为杨树的基因工程的提供了基础; 在其脱毒和快速繁殖方面的应用; 在种植资源保存和交换方面的应用等, 杨树的组织培养体系作为一种模式体系, 为研究林木生长、分化及幼嫩、成熟和复幼的分子机制提供了依据^[14]。

美洲黑杨 725 杨(*P. deltoides* cl. '725')具有优良的耐水淹能力, 对洪灾和风浪有很强的抵御能力, 适合于安徽淮河以南, 长江以北江边、江中岛湖区等水湿地区栽植; 该品种造林成活率、耐水淹能力以及对蛀干害虫的抗性优于 I-69 杨, 适宜作工业原材料^[15]。本实验选用 725 杨树叶片作为外植体材料, 对这一优良品种进行了再生体系的建立。在此基础上, 研究了潮霉素 B 对 725 杨的生长、分化和生根的影响, 筛选出潮霉素 B 的临界浓度, 为 725 杨的遗传转化研究提供依据。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

实验所选用的 725 杨栽植于安徽省合肥市高科技农业园内。采集时间为 2010 年 4 月下旬及 7 月上旬晴天, 采集叶片部位为健壮枝条上没有虫害的幼叶。

1.2 实验方法

1.2.1 美洲黑杨 725 杨树再生体系的建立 (1) 叶片消毒方法的筛选。将采集回来的 725 杨幼叶, 用洗衣粉洗去叶片表面污垢, 用清水洗净泡沫后, 在流水下至少冲洗 2 h。选取 75% 的酒精和 0.1% 的 HgCl₂ 溶液作为消毒试剂, 在超净工作台上, 对外植体先用 75% 的酒精分别浸泡 8 s, 12 s, 16 s, 无菌水冲洗 3~4 次。再将外植体用 0.1% 的 HgCl₂ 溶液分别浸泡 3 min, 5 min, 7 min, 无菌水冲洗 7~8 次, 共 9 个处理, 3 次重复。用灭过菌的滤纸或者纱布将处理过的叶片表面擦拭干净。将叶片沿着主叶脉切开, 并沿着主叶脉将叶片切成 0.5 cm×0.5 cm 的小块, 接种到预先设计好的培养基(MS+6-BA 0.5 mg·L⁻¹+2,4-D 0.5 mg·L⁻¹+蔗糖 25 g·L⁻¹+琼脂 6 g·L⁻¹) 上, 观察结果。

(2) 诱导愈伤组织培养基的筛选。参照上述方法筛选出的最佳消毒方法, 将 725 杨树叶片切成 0.5 cm×0.5 cm 的小块, 正面向上放置于培养基表面。培养基以 MS 为基本培养基, pH 为 5.8~6.2 之间。附加蔗糖 25 g·L⁻¹、琼脂 6 g·L⁻¹、激素 6-BA (0.2、0.3 和 0.5 mg·L⁻¹) 和 2,4-D (0.5、1.0、1.5 和 2.0 mg·L⁻¹), 共 12 个处理, 每个处理接种 90 片, 3 次

重复实验。出愈率=(形成愈伤的外植体数/接种外植体数)×100%

(3) 诱导分化培养基的筛选。选取上述长势相同且良好的愈伤组织为材料, 接种到 MS 为基本培养基, pH 为 5.8~6.2、琼脂 6 g·L⁻¹、附加蔗糖 (15、20 和 25 g·L⁻¹)、激素 6-BA (0.5、1.0 和 2.0 mg·L⁻¹)、NAA (0.2、0.3 和 0.5 mg·L⁻¹) 和 KT (0.1、0.3 和 0.5 mg·L⁻¹)。实验采用正交设计 4 因素 3 水平 L₉(3⁴) 表设计, 共设计了 9 个处理, 每个处理复接种叶片 60 片, 3 次重复。分化率=(分化出芽的外植体数/接种的外植体数)×100%

(4) 继代增殖培养基的筛选。将上述的分化丛生芽接种到 MS 基本培养基上, pH 为 5.8~6.2、琼脂 6 g·L⁻¹、蔗糖为 25 g·L⁻¹ 上, 附加植物激素为 6-BA (0.3 和 0.5 mg·L⁻¹)、NAA (0.05 和 0.1 mg·L⁻¹), 共 4 个处理, 每个处理接种 30 个丛生芽, 3 次重复实验。在温度 23~26℃、光照 2 000~3 000 lx、10~12 h·d⁻¹ 下培养 30~40 d。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。

(5) 诱导生根培养基的筛选。选取上述长势相同, 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 20 g·L⁻¹、激素 NAA 0.01 mg·L⁻¹ 和 IBA(0.3、0.5、0.7 和 0.9 mg·L⁻¹) 的培养基中诱导生根, 每个处理重复 3 次试验。

(6) 炼苗与移栽。选择根系发达、主茎粗壮且高达 3~5 cm 的组培苗, 将其组培瓶打开, 在组培室炼苗 1 周左右, 待小苗茎叶颜色加深, 小心取出, 用清水洗净根部附着的培养基, 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, 适时适量浇水。

1.2.2 725 杨对潮霉素 B 敏感性试验 (1) 725 杨叶片的潮霉素 B 的敏感性试验。将 725 杨的组培苗叶片切成 0.5 cm×0.5 cm 的大小后, 接种到普通 MS 分化培养基上预培养 2~4 d 后, 转入到含有不同潮霉素 B 浓度(0、2.5、5、7.5、10 和 20 mg·L⁻¹) 的分化培养基上, 每 10 d 换 1 次培养基, 30 d 后统计观察结果, 3 次重复试验。从而确定适宜的潮霉素 B 的临界浓度。

(2) 725 杨不定芽生根潮霉素 B 的敏感性试验。在生根培养基中, 附加卡那霉素的浓度分别为 (0、0.5、1.5、3、4 和 5 mg·L⁻¹), 30 d 后统计观察结果, 3 次重复试验, 最终确定潮霉素 B 的临界浓度。

2 结果与分析

2.1 725 杨树叶片再生体系的建立

2.1.1 外植体消毒体系的筛选 将从大田采集的杨树叶片在流水冲洗 2 h 以后, 经过以下处理, 20 d 后观察叶片污染率和出愈率情况, 其结果见表 1。

从表 1 可知, 当用 75%酒精消毒时间一定时, 0.1%的升汞消毒时间越长, 污染率反而越高; 但是当 0.1%的升汞消毒时间一定时, 延长 75%酒精消毒时间, 污染率并没有发生规律性变化。污染率与出愈率成反比关系, 并且用升汞消毒时间越长, 出愈率越低。而酒精的消毒时间与出愈率没有明显的关系。由此可知, 和酒精相比较, 升汞溶液对外植体的细胞活性伤害程度更大。

本研究中, 酒精消毒 8 s, 升汞消毒 3 min 为最佳消毒体系, 此时的污染率仅为 5.7%, 且出愈率达到最高值 67.2%。

2.1.2 不同培养基诱导愈伤组织的影响 将无菌外

植体接种到 12 个不同处理的培养基上, 每个处理接种 90 小块叶片。9 d 后叶片肿胀, 叶表面隆起, 皱曲, 处理 3 和 6 叶脉切口处及四周开始长出紫红色和淡绿色愈伤, 14 d 后除了处理 5 没有长出愈伤外, 其他处理均长出愈伤, 叶脉切口处最先长出愈伤, 叶片出现褐化现象。20 d 后愈伤迅速膨胀成淡绿色瘤状, 30 d 的实验结果见图 1。

由图 1 可知, 当 2, 4-D 浓度达到 1.5 mg·L⁻¹ 时, 出愈率最高。2, 4-D 浓度超过 1.5 mg·L⁻¹ 时出愈率反而有所降低。当 2, 4-D 浓度达到 1.5 mg·L⁻¹ 时, 6-BA 的浓度越低出愈率越高。最佳诱导愈伤的培养基是处理 3 (MS+6-BA 0.2 mg·L⁻¹+2,4-D 1.5 mg·L⁻¹+蔗糖 25 g·L⁻¹+琼脂 6 g·L⁻¹)。

2.1.3 不同培养基对诱导分化芽的影响 将 2.1.2 实验中得到的长势相同的愈伤组织转接到由正交试验(四因素三水平, L₉(3⁴))得到的诱导芽培养基上, 30 d 转接 1 次, 50 d 观察结果如表 2。对观察到得结果进行正交试验分析结果如表 3。

表 1 不同处理对外植体消毒的影响

Table 1 Effects of different treatments on the sterilization of explants

编号 Number	75%酒精/s Sterilization time with 75% alcohol	0.1%升汞/min Sterilization time with 0.1% HgCl ₂	叶片总数 Total number of leaves	平均污染率/% Rate of contamination	平均出愈率/% Rate of callus
1	8	3	90	5.7	67.2
2		5	90	11.0	58.5
3		7	90	25.2	53.4
4	12	3	90	12.1	54.2
5		5	90	16.1	57.5
6		7	90	17.4	63.3
7	16	3	90	15.4	60.5
8		5	90	17.3	59.4
9		7	90	23.4	52.3

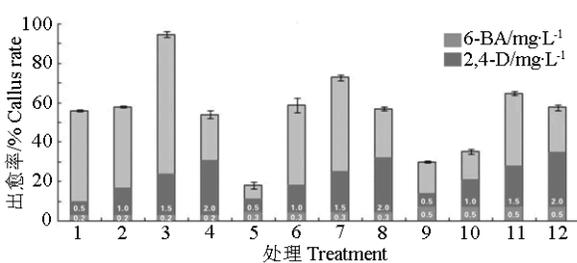


图 1 不同培养基对叶片出愈率的影响

Figure 1 Effects of different culture media on the callus induction of leaves

分析结果可知, 实验选取的 4 个因素对诱导不定芽的影响都极其显著, 4 个因素的影响程度为 A>B>C>D, 再根据表 2 中的 Ki 值可知, 最佳分化培养基为: A₂B₂C₂D₃, 即 MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+NAA 0.3

mg·L⁻¹+KT 0.3 mg·L⁻¹+蔗糖 25 g·L⁻¹+琼脂 6 g·L⁻¹。

2.1.4 不同培养基对分化芽继代增殖的影响 将在分化培养基上诱导出的分化芽转接到继代增殖培养基中, 不仅能使分化芽成倍的增长, 也会因降低了细胞分裂素 6-BA 的浓度而利于分化芽下一步的生根培养, 达到实验的目的。将 2.1.3 生长状况相似的分化芽转接到不同处理的培养基上, 30 d 后观察的结果如表 4。从表 4 中可以看出, 处理 1 和 2 的分化芽生长状况都很健康, 都适合 725 杨丛生芽增殖培养, 但根据增殖倍数的计算得出: 第 1 个处理即 MS+6-BA 0.3 mg·L⁻¹+NAA 0.05 mg·L⁻¹+蔗糖 25 g·L⁻¹+琼脂 6 g·L⁻¹, 增殖倍数最高。

2.1.5 不同培养基对组培苗的生根的影响 待上述丛生芽长到 2~3 cm 是将丛生芽转入到 1/2MS 基本

培养基中, 5 d 左右从芽基部膨大, 10 d 左右膨大部位开始发出根, 20 d 后根变的较粗壮且主根上长了许多侧根, 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。

表 2 9 种分化培养基对不定芽诱导的结果

Table 2 The differentiation results of bud differentiation in 9 differentiation culture media

处理 Treatment	因素 Factor				接种数/个 Total number	分化数/个 Differentiated number	分化率/% Differentiation rate
	A (6-BA/mg·L ⁻¹)	B (NAA/mg·L ⁻¹)	C (KT/mg·L ⁻¹)	D (蔗糖/g·L ⁻¹)			
1	1(0.5)	1(0.2)	1(0.1)	1(15)	60	40.91	68.19
2	1(0.5)	2(0.3)	2(0.3)	2(20)	60	46.63	77.71
3	1(0.5)	3(0.5)	3(0.5)	3(25)	60	37.45	62.41
4	2(1.0)	1(0.2)	2(0.3)	3(25)	60	44.09	73.48
5	2(1.0)	2(0.3)	3(0.5)	1(15)	60	42.34	70.57
6	2(1.0)	3(0.5)	1(0.1)	2(20)	60	41.84	69.74
7	3(2.0)	1(0.2)	3(0.5)	2(20)	60	33.24	55.40
8	3(2.0)	2(0.3)	1(0.1)	3(25)	60	41.52	69.20
9	3(2.0)	3(0.5)	2(0.3)	1(15)	60	35.71	59.51
K_1	124.99	118.24	123.27	118.96			
K_2	128.27	130.49	126.43	121.71			
K_3	110.47	115.00	113.03	123.06			
k_1	41.66	39.41	41.42	39.65			
k_2	42.76	43.50	42.14	40.57			
k_3	36.82	38.33	37.67	41.02			
极差 Range	5.94	5.17	4.47	1.37			

注: 分化数为 3 次重复抽样平均值。(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) $k_i = K_i/s$, 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: Differentiated number is the average value of triplicates. (1) K_i represents the sum of the tested results in the first column with the row number to be i ; (2) $k_i = K_i/s$, s represents the times at different levels in any column; (3) $R = k_{\max} - k_{\min}$.

表 3 $L_9(3^4)$ 方差分析Table 3 Analysis of variance of $L_9(3^4)$

变异来源 Source	自由度 DF	平方和 SS	均方 MS	F value	Pr > F
处理 Treatment	8	417.567 066 7	52.195 883 3	16.12	<0.0001
误差 Error	18	58.289 600 0	3.238 311 1		
总变异 Corrected total	26	475.856 666 7			

变异来源 Source	自由度 DF	平方和 SS	均方 MS	F value	Pr > F
A	2	175.619 466 7	87.809 733 3	27.12	<0.000 1
B	2	132.440 466 7	66.220 233 3	20.45	<0.000 1
C	2	100.585 866 7	50.292 933 3	15.53	0.000 1
D	2	8.921 266 7	4.460 633 3	1.38	0.277 6

注: A、B、C、D 分别代表的是 6-BA、NAA、KT、蔗糖。Note: A, B, C and D represent 6-BA, NAA, KT and sugar, respectively.

表 4 不同培养基对分化芽增殖的影响

Table 4 Effects of different culture media on the cluster buds

处理 Treatment	6-BA /mg·L ⁻¹	NAA /mg·L ⁻¹	接种芽数/个 Total number	增长倍数 Multiplication	分化芽生长状况 Growth condition of cluster buds
1	0.3	0.05	30	14.45	芽呈绿色, 健壮, 较高
2	0.3	0.10	30	12.36	芽绿色, 健壮, 叶片狭长
3	0.5	0.05	30	8.43	芽绿色, 贴近培养基处叶片变黄
4	0.5	0.10	30	9.78	芽绿色, 有少量的玻璃化现象

处理 1 根长得最慢最短; 处理 2 叶片展开面积, 须根短且多; 处理 3 茎最粗且叶片狭长, 平均发出

的主根数也最多; 处理 4 主根最长, 须根明显短少。当 IBA 浓度为 0.7 mg·L⁻¹ 时, 生根数最多, 当低于

或高于 $0.7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时平均的生根数目都有所下降, 且长势变差, 说明 IBA 浓度过低或者过高都会抑制根的生长。由此看出 $1/2\text{MS}+\text{NAA } 0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{IBA}$

$0.7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{蔗糖 } 25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}+\text{琼脂 } 6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 为最适合 725 杨树试管苗生根。

表 5 不同浓度 IBA 对试管苗生根的影响

Table 5 Effects of different IBA combinations on induction of rooting

处理 Treatment	NAA $/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	IBA $/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	接种苗个数/个 Total number	平均生根数/条 Average rooting number	生根率/% Rooting rate	平均根长/cm Average length of root
1	0.01	0.3	30	5	96	0.97
2	0.01	0.5	30	11	93	1.78
3	0.01	0.7	30	23	100	2.06
4	0.01	0.9	30	19	100	2.53

表 6 潮霉素对叶片分化抗性筛选结果

Table 6 Flitration results of different resistant Hgy concentration

潮霉素 B 的浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Hgy concentration	叶片个数 Total leaves	平均发芽个数 Number of germination	发芽率/% Germination percentage	生长状况 Growth condition
0	20	20	100	叶片绿色边缘可见分化芽
2.5	20	3	1.5	叶片边缘枯萎部分叶片开始变黄
5	20	1	0.5	大部分叶片枯黄, 少数呈淡黄色
7.5	20	0	0	所有叶片都枯黄
10	20	0	0	叶片全部褐化
20	20	0	0	叶片全部褐化且中间泛白色

表 7 潮霉素对生根抗性筛选结果

Table 7 Effects of Hgy on shoots rooting under different concentrations

潮霉素 B 浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Hgy concentration	组培苗个数 Number of plants	平均生根个数 Number of rooted plants	生根率/% Rooting rate
0	20	8.2	100
0.5	20	3.6	80
1.5	20	1.1	12
3	20	0	0
4	20	0	0

2.1.6 炼苗与移栽 选择根系发达、主茎粗壮且高达 3~5 cm 的组培苗, 在组培室中打开瓶盖炼苗, 待组培苗茎叶颜色加深后, 将苗根部的培养基清洗干净后转入到大田中。

2.2 潮霉素 B 临界浓度的确定

2.2.1 潮霉素 B 对 725 杨叶片分化的影响 潮霉素 B 对于许多植物都有很强的毒性, 是一种很强的生长抑制剂^[16]。只有当具有潮霉素抗性的目的基因导入到植物体内之后, 转基因植株才具有潮霉素抗性, 而未转化的植株则不能正常生长和分化^[17]。在对外植体进行遗传转化时进行敏感性试验筛选出适当的选择压力, 既可以有效抑制非细胞生长又对转化细胞影响较小, 最终达到最大限度的降低了假阳性转化苗。因此必须确定杨树对照株对潮霉素 B 的最低敏感浓度。本研究将 0、2.5、5、7.5、10 和 $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 不同浓度的潮霉素 B 加入到分化培养基上, 20 d 后观察结果, 结果详见表 6。

从表 6 中可以看出, 叶片对潮霉素 B 非常敏感, 随着潮霉素 B 的浓度的增加明显可以看出, 浓度越高叶片的分化能力越差, 甚至不分化; 且随着浓度的升高绿色叶片的颜色逐渐变淡、黄化、褐化甚至是白化的现象。当外植体在含 $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 潮霉素 B 的培养基生长时, 有 95% 以上的材料迅速变黑并死亡; 当潮霉素 B 的浓度达到 $7.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 外植体分化率为 0, 全部褐化。为了提高转化率、避免幼嫩叶片所产生的抗性芽死亡, 故选择稍低于选择压的浓度。因此, 本试验选择 2.5 mg/L 作为合适的转化植株筛选浓度。

2.2.2 潮霉素 B 对 725 杨生根苗的影响 将由叶片分化的不定芽转接到不同浓度的潮霉素 B 的生根培养基上, 根对抗生素的敏感性很强, 即使非转化的植株能在选择培养基上生长, 却很难在高浓度的潮霉素 B 的生根培养基上生根。本实验在生根培养基上附加的潮霉素 B 的浓度分别为 0、0.5、1.5、3、4

和 $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。30 d 后观察结果如表 7 所示。

当潮霉素 B 的浓度为 0 时, 7 d 左右茎段底部膨大, 10 d 左右就能产生不定根; 当把茎段接种到不同浓度潮霉素 B 的生根培养基上时, 生根时间推迟且生根率明显下降且根的生长状态变差。当潮霉素 B 的浓度达到 $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 不生根, 植株也逐渐变黄直至死亡。所以选取 $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 这一浓度作为筛选生根的选择压。

3 小结与讨论

3.1 725 杨组织培养研究

美洲黑杨 725 杨的叶片容易获得且容易对其进行消毒, 采集叶片的时候应该在连续晴天的情况下, 在上午 10:00 到 14:00 的时候采集。在经过多次重复实验比较后发现: (1) 725 杨上刚抽出来的嫩叶并没有幼叶产生的愈伤组织能力强, 而且容易褐化, 但是嫩叶不容易污染, 导致这种原因可能是嫩叶发育不完全, 细胞组织更容易被消毒过程中的酒精和升汞破坏。(2) 沿着主叶脉把叶片切开更容易产生愈伤组织。

有研究表明, 2,4-D 利于植物愈伤组织的诱导但是不利于产生丛生苗^[18], 故本实验在随后的分化培养基上选择了 NAA 来代替 2,4-D。在诱导愈伤的过程中可以明显看出当 2,4-D 的浓度高于 $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 反而抑制了外植体形成愈伤的能力。在诱导愈伤分化的过程中, 选用了 6-BA 和 KT 2 种细胞分裂素配合使用, 因为分裂素的配合使用对不定芽的诱导有协同促进作用^[19]。出现这种现象的原因可能与不同细胞分裂素的作用机理差异有关, 配合使用可以是他们生物学效应达到互补^[20]。

本实验是在总结前人实验经验的基础上完成的, 实验仅仅研究了激素和糖类物质对美洲黑杨 725 杨树的再生体系的影响, 而对于光照, 温度, 湿度等一些影响因子没有进行一个系统的有对比性的研究, 这还需要进行更深一层次的探索。

3.2 潮霉素 B 临界浓度筛选研究

由于根癌农杆菌介导法操作简单、经济有效、遗传转化机理明确且整合后的外源基因结构变异小^[21], 使得根癌农杆菌介导法是杨树遗传转化最常用的方法。在遗传转化过程中进行抗生素敏感性实验是非常重要的, 当抗生素的浓度达到杨树的临界值时, 不仅能有效地抑制非转化细胞的生长, 又能够使之缓慢地死亡, 且不影响转化细胞的正常生长。潮霉素 B 作为遗传转化的初步筛选剂已经成功运用

于多种单子叶和双子叶植物的转基因筛选试验。本实验对潮霉素 B 的临界浓度筛选有助于推进潮霉素 B 在杨树遗传转化中的应用。

参考文献:

- [1] 杨春霞, 李火根, 程强, 等. 南林 895 杨抗旱耐盐基因 DREB1C 的转化[J]. 林业科学研究, 2009, 45(2): 17-21.
- [2] Gautheret R J. Plant tissue culture: A history[J]. Journal of Plant Research, 1983, 96(4): 393-410.
- [3] Mc Mathes. The in vitro formation of plantlets from isolated aspen tissue[J]. Phytion, 1964, 21: 137-141.
- [4] Wolter K E. Root and shoot initiation in aspen callus cultures[J]. Nature, 1968, 219: 509-510.
- [5] 朱大保. 国外杨树组培微繁技术的进展[J]. 北京林业大学学报, 1990, 12(1): 84-91.
- [6] 贾小明, 樊军锋, 王娟娟. 河北杨和新疆杨离体叶片诱导不定芽研究[J]. 西北农林科技大学学报, 2006, 34(12): 109-114.
- [7] 李慧, 陈晓阳, 李云. 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.
- [8] 康冰, 王关平, 陈彦生. 速生欧美黑杨愈伤组织诱导及植株再生[J]. 植物生理学通讯, 2004, 40(4): 582.
- [9] 张红梅, 夏新莉, 尹伟伦. 毛果杨的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2009, 45(1): 53.
- [10] 陈维伦, 郭东红, 杨善英, 等. 山新杨 (*Populus daoidiana* × *P.bolleana* Louene) 叶外植体的器官分化以及生长调节物质对它的影响[J]. 植物学报, 1980, 22(4): 313-315.
- [11] 金顺玉, 刘桂丰, 杨传平, 等. 黑林 1 号杨(小黑杨 × 波兰 15A) 的组织培养与植株再生[J]. 植物生理学通讯, 2003, 39(6): 639.
- [12] 程明珠, 项艳. 中阔 1 号杨树叶片再生体系的建立[J]. 林业实用技术, 2010(3): 6-8.
- [13] 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.
- [14] 张勇, 张守攻, 齐力旺, 等. 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.
- [15] 张绮纹, 李金花. 杨树工业用材林新品种[M]. 北京: 中国林业出版社, 2003.
- [16] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [17] 王丹, 邹莉, 王义, 等. 杨树对潮霉素的敏感性研究[J]. 吉林农业大学学报, 2010, 32(1): 47-50.
- [18] 金红, 于志水, 尚胜军, 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.
- [19] 王关林, 方宏筠, 那杰. 高活性细胞激动素 TDZ 在植物组织培养中的应用[J]. 植物学通报, 1997, 14(3): 47-53.
- [20] 赵华燕, 卢善发, 晁瑞堂. 杨树的组织培养及其基因工程研究[J]. 植物学通报, 2001, 18(2): 169-176.
- [21] Hamilton C M, Fray A, Lewis C. Stable transfer of intact high molecular weight DNA into plant chromosomes[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996, 93: 9975-9979.