

# 欧美杨热杨1号离体叶片快繁体系的研究

黄海杰, 王颖, 张秀鹃, 陈庭\* (中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海南海口571101)

**摘要** [目的] 研究欧美杨热杨1号离体叶片快繁技术。[方法] 以欧美杨热杨1号为材料, 研究了不同植物生长调节剂组合诱导愈伤组织、芽及根的效果。[结果] 在附加25种不同植物生长调节剂组合的培养基中, 添加6-BA 0.5 ng/L和NAA 0.05 ng/L的MS培养基愈伤组织的诱导率最高, 达到100%。36种诱导芽再生培养基中, 最佳的诱导芽培养基是MS+6-BA 0.5 ng/L+NAA 0.05 ng/L+IBA 0.1 ng/L, 出芽率达到100%, 且芽质量较高。6-BA和NAA及IBA过高过低都不利出芽。培养基中IBA和NAA两者混合使用时有利于根的形成, 诱导生根的最佳培养基是1/2MS+NAA 0.5 ng/L+IBA 0.15 ng/L, 生根的小苗被移植在温室条件下生长良好。[结论] 以欧美杨热杨1号叶片为外植体, 建立了高效植株再生体系。

**关键词** 热杨1号; 再生体系; 植物生长调节剂

中图分类号 S722.3<sup>+</sup>7 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)15-06199-03

## Study on Fast Regeneration System for in Vitro Leaves of Poplar Reyang 1

HUANG Hai-jie et al (Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101)

**Abstract** [Objective] This study was to explore the rapid regeneration technique of in Vitro leaves in poplar Reyang 1. [Method] With poplar Reyang 1 as tested material, the effects of different plant growth regulators on inducing callus, sprouts and roots were investigated. [Result] Among 25 MS mediums added different combinations of plant growth regulators, the MS medium added with 6-BA 0.5 ng/L and NAA 0.05 ng/L had the highest rate of inducing callus, reaching 100%. Among 36 mediums of inducing regenerative sprouts, the best was MS+6-BA 0.5 ng/L+NAA 0.05 ng/L+IBA 0.1 ng/L and it had 100% of inducing rate, with high quality sprouts. Too higher or lower concentration of 6-BA, NAA and IBA had no benefit for sprouting. Mixed application of IBA and NAA benefited for root generation, and the best medium for rooting was 1/2 MS+NAA 0.5 ng/L+IBA 0.15 ng/L. The rooted seedlings could grow well after being transplanted in greenhouse. [Conclusion] With the leaves of poplar Reyang 1 as explants, the high efficient regeneration system was established.

**Key words** Reyang 1; Regeneration system; Plant growth regulator

杨树是重要的造林树种, 因其速生丰产、无性繁殖能力强, 且基因组较少, 被认为是理想的林木遗传改良模式植物<sup>[1]</sup>, 具有较高的经济价值。目前关于各种杨树组培再生系统的研究前人曾有报道<sup>[2-10]</sup>, 但欧美杨热杨1号再生体系的建立目前尚未见报道。现代基因工程技术为培养更新奇的欧美杨热杨1号品种提供了可能。在基因工程育种过程中, 不论是用基因枪法, 还是通过农杆菌介导法进行转基因, 都需要经过细胞的脱分化和再分化过程。笔者通过以欧美杨热杨1号叶片作为外植体进行培养, 诱导愈伤组织和芽, 探索不同基因型和植物生长调节剂对愈伤组织、增殖芽和根诱导的影响, 建立高效的再生体系, 为欧美杨热杨1号基因工程育种奠定基础。

## 1 材料与方

**1.1 材料** 欧美杨热杨1号, 由中国热带农业科学院苗圃提供。

## 1.2 方法

**1.2.1 培养基配制。** 以MS培养基为基本培养基, 蔗糖30 g/L, 琼脂6 g/L, 根据外植体不同培养阶段对植物生长调节剂的不同要求, 设计了多种不同激素的组合和配比, pH 5.8, 121 高压灭菌25 min。

**1.2.2 外植体选择和处理。** 选取完全展开、绿色无病害的叶片。先用自来水冲洗, 用棉花或纱布轻轻刷材料表面, 然后用75%酒精消毒约50 s, 再用2 g/L的升汞(HgCl<sub>2</sub>)溶液, 并加数滴吐温浸泡4 min, 最后用无菌蒸馏水冲洗4次。叶片经过消毒后用无菌滤纸吸干叶片上的水分, 切去主叶脉两边的

叶肉部分, 取叶柄及主叶脉部位, 切成0.5~1.0 cm长的切段, 然后叶面向上接种到培养基上。

**1.2.3 培养条件。** 白天除自然散射光照外, 每天用荧光灯补充光照9 h, 光照2 500 lx, 温度25~30℃。

表1 不同浓度激素对愈伤诱导率的影响

Table 1 Effects of different concentrations of hormone on callus induction

代号 No.	培养基激素浓度 ng/L Hormone concentration in culture medium		愈伤数 块 Number of callus	愈伤诱导率 % Induction rate of callus
	6-BA	NAA		
1	1.0	0.01	27	54.0
2	1.0	0.03	28	56.0
3	1.0	0.05	30	60.0
4	1.0	0.07	28	56.0
5	1.0	0.10	25	50.0
6	0.7	0.01	27	54.0
7	0.7	0.03	29	58.0
8	0.7	0.05	29	58.0
9	0.7	0.07	29	58.0
10	0.7	0.10	24	48.0
11	0.5	0.01	29	58.0
12	0.5	0.03	38	76.0
13	0.5	0.05	50	100
14	0.5	0.07	41	82.0
15	0.5	0.10	34	68.0
16	0.3	0.01	26	52.0
17	0.3	0.03	28	56.0
18	0.3	0.05	29	58.0
19	0.3	0.07	29	58.0
20	0.3	0.10	25	50.0
21	0.1	0.01	25	50.0
22	0.1	0.03	27	54.0
23	0.1	0.05	27	54.0
24	0.1	0.07	26	52.0
25	0.1	0.10	26	52.0

注: 培养基基本成分均为MS; 外植体接种数均为50。

Note: Culture medium in the table is MS; inoculation number of explants is 50.

基金项目 热带作物种质资源平台项目(2005DKA21000-5-62)子专题。

作者简介 黄海杰(1979-), 男, 海南儋州人, 硕士研究生, 研究方向: 遗传育种。\* 通讯作者, 博士生导师, 研究员, E-mail: CXT66988063@163.com。

收稿日期 2008-03-21

## 2 结果与分析

**2.1 不同植物生长调节剂组合对愈伤组织诱导的影响** 试验设计了25种不同植物生长调节剂组合的培养基处理。每处理接种10瓶,每瓶接种5块。在13号培养基上培养约8d后(图1),外植体切口部分逐渐膨大形成愈伤组织,19d后接种的叶片有明显的白色愈伤组织产生(图2),由表1可知,13号培养基愈伤的诱导率最高,达100%。愈伤数并不是随细胞分裂素和生长素增加而增多,细胞分裂素和生长素两者处于一定平衡质量浓度时才有利于愈伤组织的形成。

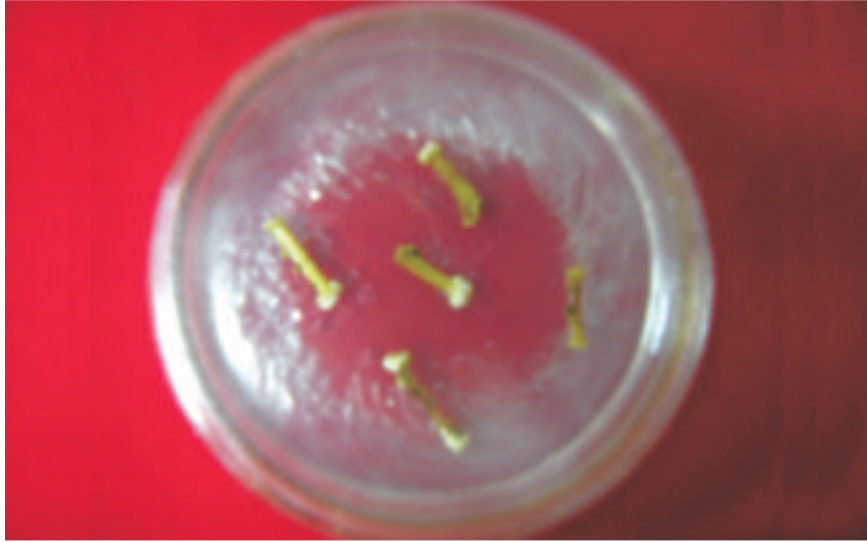


图1 8d后叶脉诱导愈伤

Fig.1 Callus induction from vein after 8 d

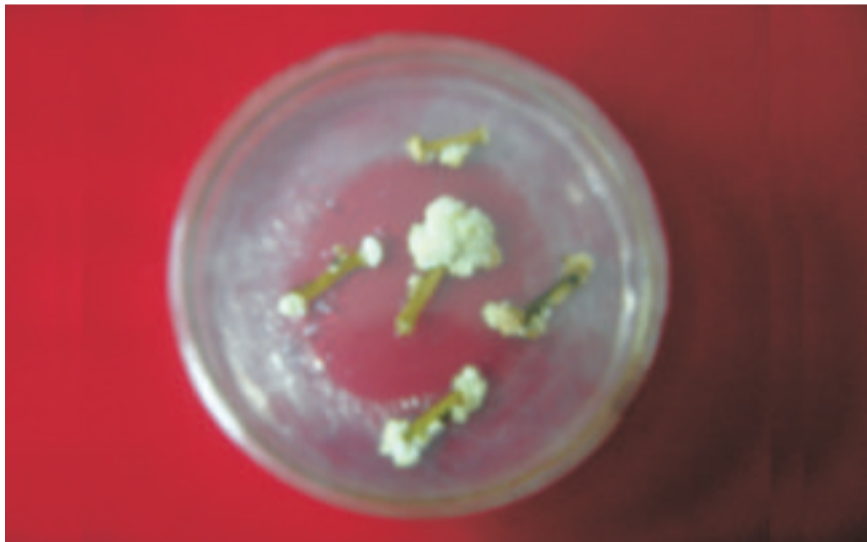


图2 19d后叶脉诱导愈伤

Fig.2 Callus induction from vein after 19 d



图3 14d愈伤诱导芽

Fig.3 Buds differentiation from callus after 14 d

**2.2 不同植物生长调节剂组合对芽诱导的影响** 设计了36种诱导芽再生培养基(表2),叶脉在诱导愈伤培养基上培养19d后,在叶柄及叶脉的边缘伤口已形成愈伤组织块。选择愈伤组织生长良好的外植体,在超净工作台上用手术刀切成小块,把愈伤组织块接种到诱导芽的培养基上,每种培养基

接种10瓶,每瓶接种4块,观察诱导芽的情况,培养条件与愈伤组织诱导条件相同。带有愈伤组织的外植体接种到芽诱导培养基上进行培养,接种的愈伤组织继续膨胀,14d后,愈伤组织的边缘处可看到出芽(图3)。24d后,芽开始从边缘芽点上长出来,随后,中部芽点也开始分化出芽。38d后观

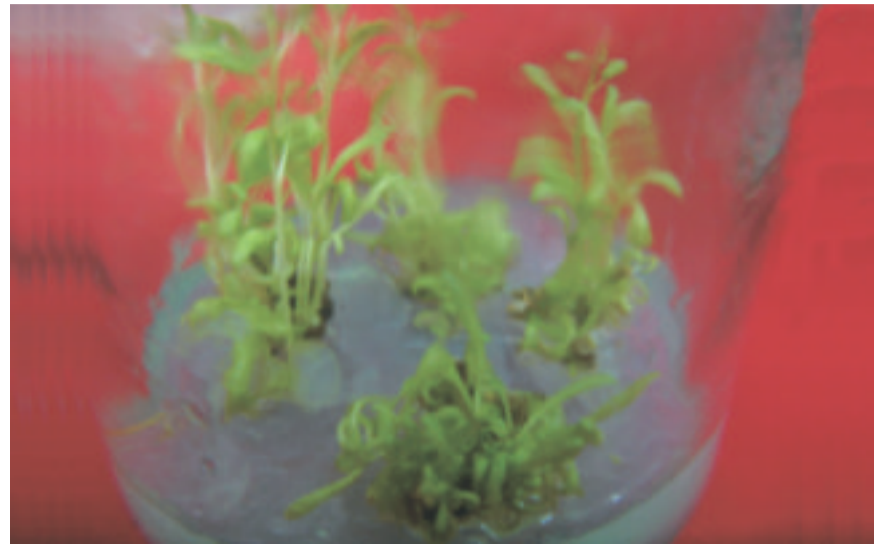


图4 38d愈伤诱导芽

Fig.4 Buds differentiation from callus after 38 d

表2 不同激素浓度和对比对芽诱导率的影响

Table 2 Effects of different concentrations and ratios of hormone on bud induction

代号 No.	培养基激素浓度 ng/L Hormone concentration in culture medium			出芽数 块 Number of callus	出芽率 % Induction rate of callus
	6-BA	NAA	IBA		
	1	0.7	0.03		
2	0.7	0.03	0.05	26	65.0
3	0.7	0.03	0.1	28	70.0
4	0.7	0.03	0.2	25	62.5
5	0.7	0.05	0	0	0
6	0.7	0.05	0.05	27	67.5
7	0.7	0.05	0.1	30	75.0
8	0.7	0.05	0.2	24	60.0
9	0.7	0.07	0	0	0
10	0.7	0.07	0.05	24	60.0
11	0.7	0.07	0.1	27	67.5
12	0.7	0.07	0.2	22	55.0
13	0.5	0.03	0	0	0
14	0.5	0.03	0.05	28	70.0
15	0.5	0.03	0.1	30	75.0
16	0.5	0.03	0.2	25	62.5
17	0.5	0.05	0	0	0
18	0.5	0.05	0.05	32	80.0
19	0.5	0.05	0.1	40	100
20	0.5	0.05	0.2	31	77.5
21	0.5	0.07	0	0	0
22	0.5	0.07	0.05	28	70.0
23	0.5	0.07	0.1	32	80.0
24	0.5	0.07	0.2	26	65.0
25	0.3	0.03	0	0	0
26	0.3	0.03	0.05	25	62.5
27	0.3	0.03	0.1	28	70.0
28	0.3	0.03	0.2	22	55.0
29	0.3	0.05	0	0	0
30	0.3	0.05	0.05	28	70.0
31	0.3	0.05	0.1	31	77.5
32	0.3	0.05	0.2	27	67.5
33	0.3	0.07	0	0	0
34	0.3	0.07	0.05	23	57.5
35	0.3	0.07	0.1	26	65.0
36	0.3	0.07	0.2	21	52.5

注:培养基基本成分均为MS;接种数均为40个。

Nte: Culture medium in the table is MS; inoculation number is 40.



察诱导芽的情况(图4),计长度在2 cm 以上芽的数目,计算芽诱导率。其中19 号培养基的出芽率达100%,而且芽的数量、质量均较高。1、5、9、13、17、21、25、29、33 号培养基由于没有加入IBA 而不出芽,6-BA 和NAA 及IBA 浓度过高过低都不利于出芽。经对比筛选,诱导芽的最佳培养基是MS + 6-BA 0.5 ng/L + NAA 0.05 ng/L + IBA 0.1 ng/L(表2)。

**2.3 不同植物生长调节剂组合对根诱导的影响** 1/2MS 培养基用于诱导欧美杨热杨1 号茎段生根,设计了24 种培养基,每种培养基接种5 瓶,每瓶接种4 棵。当芽长度超过2 cm 时,从芽丛上把茎段切下来,接种到生根培养基上,在光下培养诱导生根。培养26 d 后统计根长度超过5 mm 的根数,并选择适合生根的培养基。结果表明(表3),培养基中单独使用IBA 就能诱导生根,单独使用NAA 不能诱导生根。当IBA 和NAA 两者混合使用时更有利于根的形成。10 号是诱导生根的最佳培养基(图5)。19 号培养基中没有加生长调节剂没有根的发生,1、7、13 号培养基中没有加IBA 也没有根的发生。20、21、22、23、24 号培养基中没加NAA,诱导的根很少。

在芽苗生根后15 d 左右,将瓶装苗从组培室转移到有阳光的地方练苗,练苗1 周后,将小苗取出,小心用流水冲洗去根表面的培养基残留物,移栽到培养土中,遮阴,1 周后即可成活,成活率达96% 以上。

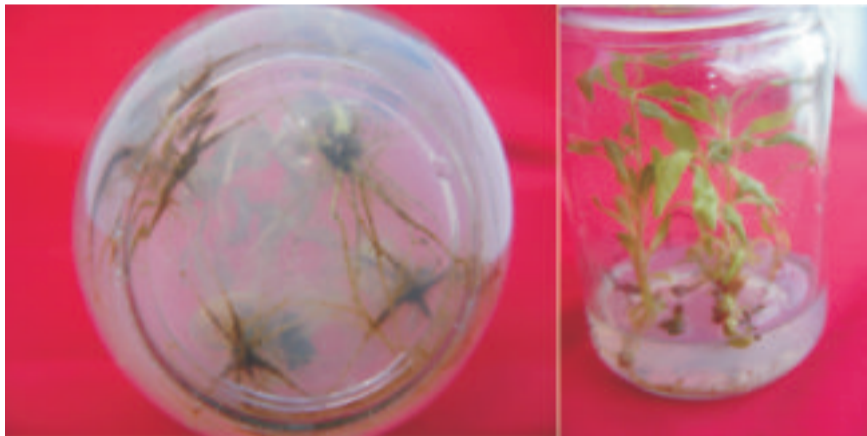


图5 10 号培养基中的生根情况

Fig.5 Rooting situation in culture medium No. 10

### 3 结论与讨论

**3.1 外植体的选择** 杨树能作为外植体的部位很多,除了叶片外,还有嫩茎、嫩叶、小芽尖、叶芽尖、形成层、顶芽、腋芽、茎尖、花药、子房、幼胚、茎段和根等<sup>[3,11-13]</sup>。由于杨树叶片较薄,用叶片作为外植体时,消毒时间不能过长,否则容易把外植体杀死。另外,以叶片为外植体培养植株的变异率有待进一步研究。

**3.2 激素水平和芽、根的分化** 培养基中的生长素和细胞分裂素合适的搭配比例是决定芽和根生长的关键。仅提高细胞分裂素或生长素浓度都不利于芽的形成,试验表明,加入IBA 有利于根的形成;细胞分裂素和生长素两者配比浓度合适有利于愈伤组织的形成。该试验在培养初期,采用细胞分裂素和生长素较低的培养基(MS + 6-BA 0.5 ng/L + NAA 0.05 ng/L) 培养8~19 d,在愈伤组织生长高峰期前最适合诱导出芽。诱导不定芽再生时,6-BA 0.5 ng/L 和 NAA 0.05 ng/L 时适当地增加IBA 有利于再生频率的提高,试验结果表明,IBA 浓度为0.1 ng/L 时比没有加IBA 的处理出芽率明显提高。

在根诱导中,仅加IBA 对诱导不定芽生根有促进作用,而仅加NAA 对诱导芽生根影响不明显,然而当IBA 和NAA 两者处于一定平衡质量浓度时则更有利于根的形成,最适合浓度为IBA 0.15 ng/L、NAA 0.05 ng/L,而无生长剂的培养基没有根的发生。

表3 不同激素浓度和对比对生根诱导的影响

Table 3 Effects of different concentrations and ratios of hormone on rooting induction

代号 No.	培养基激素浓度 ng/L Hormone concentration in culture medium		根数 条 Root number
	NAA	IBA	
	1	0.07	
2	0.07	0.05	65
3	0.07	0.1	77
4	0.07	0.15	76
5	0.07	0.2	63
6	0.07	0.25	51
7	0.05	0	0
8	0.05	0.05	110
9	0.05	0.1	136
10	0.05	0.15	153
11	0.05	0.2	128
12	0.05	0.25	123
13	0.03	0	0
14	0.03	0.05	142
15	0.03	0.1	143
16	0.03	0.15	146
17	0.03	0.2	142
18	0.03	0.25	139
19	0	0	0
20	0	0.05	37
21	0	0.1	41
22	0	0.15	42
23	0	0.2	42
24	0	0.25	38

注:培养基基本成分为1/2MS;接种数均为20 棵。

Note: Culture medium in the table is 1/2 MS; inoculation number is 20 plants.

**3.3 初期管理与移栽成活率** 由于室内组织培养苗一直在比较优越的环境下生长,幼苗抗病和抗干旱等能力较弱,所以移栽初期的管理是移栽成功的关键。刚移栽的幼苗由于根系供水缓慢,要避免强光照射和增加表面湿度。但这一时期不宜维持时间过长,长时间的高湿度有利于猝倒病菌的繁殖,幼嫩的欧美热杨1 号苗最易受到病菌侵害,所以在移栽2 d 后要适当增加光照和减少湿度。

### 参考文献

- [1] ZHANG D Q,ZHANG ZHYI, YANG KAI. Advances of molecular marker researches in poplar[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2000, 22(6): 79-83.
- [2] WHITEHEAD HC M 用组织培养法快速繁殖杨树[J]. 新西兰林业科学, 1977, 7(1): 40-43.
- [3] 徐妙珍, 吴克贤, 解奇明. 杨树组织离体培养育苗初获成功[J]. 林业科技通讯, 1987(12): 1-2.
- [4] CHEN Y, HAN Y F, LI L, et al. Study on the plant regeneration from Populus deltoides explant transformed with BT. Toxin gene[J]. Scientia Silvae Sinicae, 1995, 31(2): 97-103.
- [5] YU Z S, JIN H, MAN S J. Research on tissue-culture reproductive systems of black poplar group[J]. Journal of Liaoning Forestry Science & Technology, 2002(6): 11-13.
- [6] MOHDABADI A J K, MAZIK TOKEL K, GERGACZ E, et al. Callus induction and haploid plant regeneration from meristem culture of two poplar species[J]. Silvae Genetica, 1995, 44(2/3): 141-145.

(下转第6253 页)

表2 覆膜与对照土壤各土层水分含量测定结果 %

Table 2 Determination results of soil moisture in film mulching and control

处理 Treatment	0~10 cm	10~20 cm	20~30 cm	30~40 cm
覆膜 Film mulching	18.13	17.21	16.83	16.22
对照 CK	14.39	15.28	15.46	15.46

由表2 可见,0~10,10~20,20~30,30~40 cm 各土层覆膜土壤水分含量比CK 分别提高3.74,1.93,1.37,0.76 个百分点。棉苗期至开花土壤水分适宜,有利于壮苗早发<sup>[3]</sup>。

**2.3 地膜覆盖对棉花生长发育的影响** 表3 表明,短季棉麦后直播地膜覆盖与不覆盖相比,现蕾期早4 d,开花期早6 d,吐絮期早8~10 d。据2006年7月25日调查,平均株高比对照高3.1 cm,单株叶片多2.2个,果枝增1.3个,棉蕾增加2.7个。说明地膜覆盖由于增温保墒性能好,显著促进了生长发育,加快了生育进程。为棉花早熟、高产、优质,奠定了良好的生理基础<sup>[4]</sup>。

**2.4 地膜覆盖对棉花生育前期叶面积增长的影响** 由表4 可以看出,短季棉地膜覆盖叶面积的增长速度明显高于对照。特别是在苗、蕾期增长速度最快,叶面积系数分别比对照高0.21和0.55;而对照叶面积增长最快的时间出现在初

表5 覆膜对产量及其构成因素的影响

Table 5 Effects of film mulching on yield and its component factors

处理 Treatment	株高 cm Plant height	单株果枝 个 Fruit branch per plant	单株结铃 个 Boll per plant	单铃重 g Single boll weight	衣分 % Lint percentage	产量 kg/hm <sup>2</sup> Yield	霜前花率 % Pre-frost yield
覆膜 Film mulching	72.13	7.98	8.12	5.17	40.53	1389.0	94.76
对照 CK	65.21	6.39	7.07	4.82	38.91	941.3	83.61

### 3 结论与讨论

短季棉麦后直播地膜覆盖便于机械作业,有利于促进种植制度改革。可扩大短季棉种植面积,提高复种指数,增加经济效益<sup>[6]</sup>。

短季棉麦后直播地膜覆盖还具有良好的增温保墒作用。能更好地利用光、热、水等自然资源,从而促进棉花壮苗早发,达到早熟、高产、优质的目的;是解决麦后直播短季棉播种晚,积温不足等不利因素,提高产量水平和霜前花率的有效措施<sup>[7]</sup>。

此外,短季棉麦后直播地膜覆盖,需施足基肥,留苗12万株/hm<sup>2</sup>以上,并结合全程系统化控制。地膜覆盖改善了棉田生态条件,加速了生育进程。使生育期前期叶面积上升快,有利于干物质的合成和积累;开花结铃早、铃大铃多、衣

花期,至花铃期两者差异逐渐缩小。由于地膜棉早发、早熟,叶生衰退快,后期叶面积系数稍低于对照<sup>[5]</sup>。

表3 地膜覆盖对棉花生长发育进程的影响

Table 3 Effects of film mulching on cotton growth

处理 Treatment	播种期 Sowing stage	出苗期 Seedling emergence stage	现蕾期 Bud emergence stage	开花期 Flowering stage	吐絮期 Boll opening stage
覆膜 Film mulching	06-05	06-09	07-03	07-25	09-07
对照 CK	06-05	06-09	07-07	07-31	09-18

表4 生育前期棉花叶面积系数

Table 4 Leaf area index of cotton at early growth stage

处理 Treatment	现蕾期 Bud emergence stage	初花期 Early flowering stage	花铃期 Flowering and boll setting stage	叶絮期 Boll stage
覆膜 Film mulching	0.48	2.26	3.97	2.61
对照 CK	0.27	1.71	3.64	2.73

**2.5 覆膜对产量及其构成因素的影响** 从表5 可以看出,覆膜棉与对照相比,单株铃数、单铃量、霜前花明显增加,皮棉产量显著提高。覆膜比对照增产33.2%,霜前花率提高11.15%。

分高、吐絮畅而集中;并且霜前花率高、优质、高产<sup>[8]</sup>。

### 参考文献

(上接第6201页)

- [7] CONFALONIERI M, BALESTRAZZI A, CELLA R. Genetic transformation of *Populus deltoides* and *P. x. euramericana* clones using *Ago 6-BA* dectiumunfaciens[J]. *Plant Cell Tissue & Organ Culture*, 1997, 48(1): 53-61.
- [8] WANG Y, HUANG MR, WEI Z M, et al. Regeneration of *Populus simonii* from protoplast culture[J]. *Plant Cell Reports*, 1995, 14(7): 442-445.
- [9] WANG G W, WU Y Q, SONG Y S, et al. The nursing technology for the cultivation of *Populus Langfangyang 3*[J]. *Practical Forestry Technology*, 2002(6): 8-

- [1] 翟学军,王彦立,李悦有,等.超早熟短季棉麦后直播生育特性的初步研究[J].*中国棉花*,2005,32(5):5-18.
- [2] 易福华,华国雄,王鉴远,等.机械化麦后直播短季棉早熟高产栽培技术研究[J].*扬州大学学报*,2000,21(2):47-52.
- [3] 刘士信,刘晓峰.河南省热量与短季棉熟性分析[J].*中国棉花*,1994,21(5):17.
- [4] 周治国,孟亚利,施培,等.麦棉两熟,棉铃铃重与铃期气象因子关系之研究[J].*棉花学报*,2000,12(3):122-126.
- [5] 李伶俐,谢德义,马宗斌,等.麦后直播短季棉不同群体光合特性及产量研究[J].*河南农业大学学报*,2005,39(3):239-242.
- [6] 周治国,沈煜清.种植方式和播移栽期对麦棉两熟棉铃发育的影响[J].*作物学报*,2000,26(4):268-472.
- [7] 喻树迅.短季棉优质高产新技术[M].北京:中国农业出版社,1998.
- [8] 董合忠.短季棉栽培[M].济南:山东科学技术出版社,1995.

9.

- [10] PCOLEMAN G D, ERNST S G. Protein differences among *populus deltoides* internodal stem explants determined for shooting regeneration or callus growth[J]. *Plant Science (Linnick)*, 1991, 75(1): 29-33.
- [11] 吴克贤,徐妙珍,李伟.杨树组织培养中茎和根的诱导[J].*植物生理学通讯*,1981(3):35-37.
- [12] 徐妙珍.杨树的组织培养及其应用[J].*林业科技*,1986(5):13-15,24.
- [13] 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.