

### 3 个杨树品种叶片再生体系的建立

沈周高, 项艳, 蔡诚, 吴大强

(安徽农业大学林学与园林学院, 合肥 230036)

**摘要:**以中林 2001 杨、南林 95 杨、南抗杨等 3 个杨树品种叶片为材料, 选用 15 种诱导愈伤组织培养基、9 种分化培养基和 7 种生根培养基, 研究不同基因型、激素组合以及外植体状态对再生体系建立的影响。结果表明: 3 个品种的愈伤组织诱导、分化效果与 NAA/6-BA 比值有一定相关性, 在愈伤组织诱导中 NAA/6-BA 比值在 4:1~5:1 之间, 愈伤组织分化中 NAA/6-BA 比值大体在 1:4~1:10 之间; 不同品种在上下表皮气孔数、诱导愈伤、分化再生培养上都存在一定的基因型差异; 接种叶片的不同放置方式、叶片上的不同部分对愈伤组织诱导具有显著影响。

**关键词:**杨树; 叶片; 组织培养; 再生体系

**中图分类号:**S722.3 **文献标识码:**A

#### Establishment of Regeneration System from Leaves of 3 *Populus* Varieties

Shen Zhougao, Xiang Yan, Cai Cheng, Wu Daqiang

(College of Forestry and Gardening, Anhui Agricultural University Hefei 230036)

**Abstract:** This paper deals with regeneration system from leaves of 3 *Populus* varieties (*Populus deltoides* cv. 'zhonglin-2001', *Populus deltoides* Bartr. cv. *Lux* × *P. euramericana* (Dode) Guineir cv. I-45 / 51, *Populus deltoides* cl. *Nankang*) with fifteen induced callus media, six differentiation media and seven rooting media. The effects of genotype, hormone concentration and explants condition were investigated. The results indicated that the effect on induced callus and differentiation of the three *Populus* varieties were related to the ratio of NAA to 6-BA. The ratio of NAA to 6-BA on induced callus was 4:1~5:1. The stoma number of leaves face and back, induced callus and plant regeneration of different varieties were different. There were significant effects on induced callus from leaves which were culture on medium with leaves face up or back up, leaves edge or middle.

**Key words:** *Populus*, Leaf piece, Tissue culture, Regeneration system

杨树是世界各国普遍种植的本木植物, 属杨柳科 (*Salicaceae*) 杨属 (*Populus* L.), 具有适应性强、生长速度快、丰产等特性, 已被广泛作为短期轮作的造林树种, 在生态环境治理和解决木材短缺方面占有重要地位。

中林 2001 杨 (*Populus deltoides* cv. 'zhonglin-2001')、南林 95 杨 [*Populus deltoides* Bartr. cv. *Lux* × *P. euramericana* (Dode) Guineir cv. I-45 / 51]、南抗杨 (*Pop-*

*ulus deltoides* cl. *Nankang*) 为黑杨杂种, 是目前在江淮平原及长江中下游平原重点推广的树种, 但对于这 3 个品种的叶片再生体系的研究尚未见报道。

笔者在研究这 3 个品种叶片再生体系的同时, 对 3 个品种的差异性进行了对比, 并就接种叶片的放置方式、叶片上不同部位对诱导愈伤组织的影响等方面作了探索性研究, 为试图建立高效的再生体系及今后

**基金项目:**安徽省自然科学基金项目“滩地黑杨派杨树品质耐水淹分子标记的选择研究”(03041109); 安徽省教育厅“十五”学术带头人基金项目(2005 年度)资助。

**第一作者简介:**沈周高, 男, 1973 年出生, 安徽省宣州人, 在读硕士研究生, 主要从事园林植物及观赏园艺遗传育种和改良方面的研究。通信地址: 230036 安徽省合肥市长江西路 130 号安徽农业大学林学与园林学院。Tel: 0551-2823795 转 3522, E-mail: shenzhougao1973@yahoo.com.cn。

**通讯作者:**项艳, 女, 1965 年出生, 安徽桐城人, 博士, 教授, 主要从事林木遗传育种和现代生物技术等方面的研究。Tel: 0551-2823795 转 3522, E-mail: xiangyan@ahau.edu.cn。

**收稿日期:**2006-07-21, **修回日期:**2006-07-31。

的转基因研究打下基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 筛选消毒方法的材料 选用栽植于安徽农业大学校园内的 I-69 杨(*Populus deltoides* Bartr. CL. "LUX"), 外植体为中、下部健壮新生枝条上的成熟叶, 采集时间为春季晴天中午。

1.1.2 建立再生体系的材料 为栽植于安徽农业大学校园内的 3 年生中林 2001 杨、南林 95 杨、南抗杨等 3 个杨树品种, 外植体的选取参见 I-69 杨的选取方法。

### 1.2 方法

1.2.1 叶片消毒方法的筛选 取 I-69 杨的新生叶, 将叶片表面污物冲洗干净, 用 75% 的酒精浸泡 10s, 无菌水冲洗 2 次; 在 0.1%、0.2%、0.3% 3 种  $\text{HgCl}_2$  溶液下<sup>[1]</sup>, 分别消毒 2min、4min、6min、8min, 再用无菌水冲洗 7~8 次, 将叶片切成  $0.5\text{cm} \times 0.5\text{cm}$  的小块, 接种到预先设计好的培养基 (MS+6-BA 0.5mg/L+2,4-D 0.5mg/L+25g/L 蔗糖+8g/L 琼脂) 上, 观察结果。

1.2.2 3 个品种叶片上、下表皮气孔密度比的估算试验 分别取 3 个杨树品种叶片的叶尖、叶中脉附近、叶缘部分的正反两面制片, 在 400 倍显微镜下观测, 每个制片随机取 10 个视野, 直接计数叶片上、下表皮气孔数, 估算上、下表皮气孔密度比。

### 1.2.3 愈伤组织诱导效果的对比性试验

(1) 3 个品种的对比性试验。参照用 I-69 杨筛选出的消毒方法, 将消毒处理后的 3 个杨树品种的叶片切成  $0.5\text{cm} \times 0.5\text{cm}$  的小叶片, 平放于培养基表面。以 MS<sup>[2]</sup> 为基本培养基, 附加蔗糖 25g/L, 琼脂 8g/L, 植物激素 6-BA (0mg/L、0.1mg/L、0.2mg/L)、NAA (0.2mg/L、0.5mg/L、1.0mg/L、2.0mg/L、3.0mg/L), 共计 15 个处理, 每个处理设 3 次重复, 每个重复接种 20 块, 共 60 块小叶片。在  $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ 、光照 1500~2000lx、13h/d 下培养 4 周, 统计 3 个杨树品种外植体的出愈率, 进行品种间的

对比。

出愈率 = (形成愈伤的外植体数 / 接种外植体总数)  $\times 100\%$

(2) 叶片上的不同部分及放置方式的对比性试验。在上述的 15 个处理中, 将每个处理的 60 片小叶片分为四种不同类型: 30 片为叶缘带脉梢 (15 片叶正面朝上, 15 片叶背面朝上), 30 片为叶中部带侧脉 (15 片叶正面朝上, 15 片叶背面朝上)。记录小叶片的生长情况, 4 周后根据结果进行分析。

1.2.4 不同品种诱导分化的对比性研究 将上述试验中诱导的愈伤组织转接到以 MS 为基本培养基, 附加激素 6-BA (1.0 mg/L、2.0 mg/L、3.0 mg/L)、NAA (0.2mg/L、0.5mg/L、1.0mg/L)、KT (0.1mg/L、0.2mg/L、0.5mg/L)、蔗糖 (20g/L、30g/L、40g/L), 采用正交设计中的 4 因素 3 水平  $L_9(3^4)$  表设计, 共计 9 个处理, 每个处理设 3 次重复, 筛选 3 个品种诱导分化的最佳培养基, 并进行品种间的对比。

1.2.5 不同组合的生长素浓度对根生长的影响 在继代丛生芽中选取生长健壮, 叶片展开, 长度 2cm 左右的嫩茎, 切去茎段基部愈伤组织, 插入以 1/2 MS 为基本培养基, 附加生长素 NAA (0.01mg/L、0.02mg/L、0.05mg/L)、IBA (0.1mg/L、0.2mg/L、0.5mg/L) 的培养基中诱导生根, 生长素浓度不宜过高<sup>[3]</sup>, 7d、16d 后观测生根结果并进行分析。

### 1.3 统计方法

研究中的数据分析和制图采用 Excel 2003 (Microsoft Corporation) 和 SAS 9.0 [Copyright (c) 2002 by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.] 等软件进行。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同处理对外植体消毒效果的影响

将不同消毒处理的叶片经过 20d 的培养后, 其结果见表 1。

从表 1 可得:  $\text{HgCl}_2$  浓度与材料污染率、出愈率成

表 1 不同处理对外植体消毒效果的影响

| 灭菌方式                    | 消毒时间<br>(min) | 接种叶片数<br>(个) | 污染叶片数<br>(个) | 无菌叶片数<br>(个) | 出愈率<br>(%) | 污染率<br>(%) |
|-------------------------|---------------|--------------|--------------|--------------|------------|------------|
| 0.1%<br>$\text{HgCl}_2$ | 2             | 100          | 96           | 4            | 4          | 96         |
|                         | 4             | 100          | 20           | 80           | 76         | 20         |
|                         | 6             | 100          | 12           | 88           | 57         | 12         |
|                         | 8             | 100          | 8            | 92           | 22         | 8          |
| 0.2%<br>$\text{HgCl}_2$ | 2             | 100          | 80           | 20           | 19         | 80         |
|                         | 4             | 100          | 16           | 84           | 53         | 16         |
|                         | 6             | 100          | 8            | 92           | 36         | 8          |
|                         | 8             | 100          | 4            | 96           | 13         | 4          |
| 0.3%<br>$\text{HgCl}_2$ | 2             | 100          | 72           | 28           | 21         | 72         |
|                         | 4             | 100          | 8            | 92           | 35         | 8          |
|                         | 6             | 100          | 4            | 96           | 11         | 4          |
|                         | 8             | 100          | 4            | 96           | 4          | 4          |

反比;在一定浓度的  $\text{HgCl}_2$  溶液中,时间与污染率、出愈率成反比。这可能与  $\text{HgCl}_2$  溶液对叶片的毒害作用有关,时间越长,毒害作用越大,从而影响细胞活性,降低出愈率。研究中,0.1% $\text{HgCl}_2$  溶液、消毒 4min 为最佳处理,叶片的污染率为 20%,出愈率为 76%。

## 2.2 3 个品种愈伤组织诱导效果的对比性试验

表 2 不同培养基对 3 个品种叶片出愈率的影响

| 处理   | 激素水平           |               | 接种<br>外植体总数<br>(个) | 中林 2001    |      | 南林 95      |      | 南抗         |      |
|------|----------------|---------------|--------------------|------------|------|------------|------|------------|------|
|      | 6-BA<br>(mg/L) | NAA<br>(mg/L) |                    | 出愈率<br>(%) | 综合评分 | 出愈率<br>(%) | 综合评分 | 出愈率<br>(%) | 综合评分 |
| I-1  | 0.1            | 0.2           | 60                 | 46.7       | 0.67 | 22.3       | 0.00 | 25         | 0.67 |
| I-2  | 0.1            | 0.5           | 60                 | 63.3       | 1.33 | 31.7       | 0.67 | 23.3       | 1.33 |
| I-3  | 0.1            | 1.0           | 60                 | 41.7       | 1.33 | 90         | 2.67 | 58.3       | 2.33 |
| I-4  | 0.1            | 2.0           | 60                 | 40.0       | 1.67 | 96.7       | 2.33 | 58.3       | 2.00 |
| I-5  | 0.1            | 3.0           | 60                 | 71.7       | 2.67 | 93.3       | 2.67 | 48.3       | 1.67 |
| I-6  | 0.2            | 0.2           | 60                 | 73.3       | 2.00 | 96.7       | 2.67 | 21.7       | 0.67 |
| I-7  | 0.2            | 0.5           | 60                 | 100        | 3.00 | 91.7       | 3.33 | 66.7       | 2.67 |
| I-8  | 0.2            | 1.0           | 60                 | 93.3       | 3.67 | 96.7       | 4.67 | 68.3       | 3.67 |
| I-9  | 0.2            | 2.0           | 60                 | 46.7       | 1.33 | 95         | 4.67 | 75         | 2.67 |
| I-10 | 0.2            | 3.0           | 60                 | 100        | 2.00 | 43.3       | 2.00 | 48.3       | 2.00 |
| I-11 | 0.5            | 0.2           | 60                 | 43.3       | 1.33 | 83.3       | 3.00 | 43.3       | 2.00 |
| I-12 | 0.5            | 0.5           | 60                 | 53.3       | 2.00 | 66.7       | 2.67 | 51.7       | 2.33 |
| I-13 | 0.5            | 1.0           | 60                 | 81.7       | 3.33 | 76.7       | 2.67 | 78.3       | 3.00 |
| I-14 | 0.5            | 2.0           | 60                 | 100        | 4.33 | 95         | 4.33 | 98.3       | 4.67 |
| I-15 | 0.5            | 3.0           | 60                 | 100        | 4.00 | 100        | 3.00 | 95         | 3.33 |

注: (1) 出愈率、综合评分均为 3 次重复取样的平均值。(2) 每个重复接种叶片数为 20。综合评分项中 0 分表示极少出现瘤状愈伤组织或仅叶脉处微现; 1 分表示仅叶脉处稍现瘤状愈伤组织; 2 分表示叶脉处出现淡绿、白色、红色结构松散水渍化瘤状愈伤组织, 其他处少现; 3 分表示叶脉及切口处均现淡绿色结构较松散部分水渍化绿色愈伤组织; 4 分表示叶片周围密生绿色瘤状愈伤组织; 5 分表示叶片周围密生结构紧密的绿色瘤状愈伤且迅速膨大。

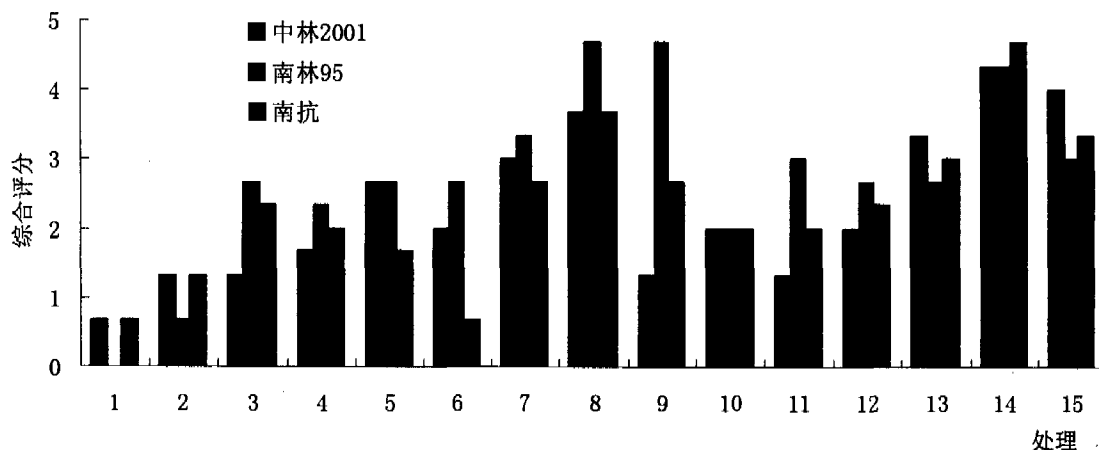


图 1 3 个品种的诱导愈伤效果比较示意图

从表 2 和图 1 可得: 3 个品种的诱导愈伤的效果存在一定差异, 通过方差分析可知品种间出愈率的 F 检验极显著 ( $F=5.30, P=0.0073$ ); 但 3 个品种诱导愈伤的整体趋势又具有一定的相似性, 其最佳诱导处理出现两个主要的波峰, 即 I-8、I-14 这 2 个处理上, 诱导愈伤组织的效果与 NAA/6-BA 比值也呈现一定的相关性, 其比值大体在 4:1~5:1 之间。另外, 在实验中观测的愈伤组织, 中林 2001 杨、南抗杨呈白色、淡绿或绿色, 而南林 95 杨则带有红色或紫红色, 这可能是由于

将 3 个品种的叶片分别接种到 1~15 号培养基上。4d 后, 叶片边缘普遍肿胀、皱曲, 部分叶片表面隆起, 7d 后叶片切口的侧脉及脉梢处可见白色、淡绿或红色愈伤组织产生。14d 后, 切口边缘密生绿色或淡红色愈伤组织。20d 后, 愈伤组织迅速增殖膨大呈瘤状。30d 后的试验结果见表 2、图 1、图版 I 中 A1、B1、C1。

品种间的差异所致。

由此可以推测——物种的相似性和品种基因型的差异性在杨树的组织培养中是同时存在的。

## 2.3 估算 3 个品种叶片上、下表皮气孔密度比

在 400 倍显微镜下, 观测制片, 参见图版 II 中 a11~c23, 3 个杨树品种的气孔数目及上、下表皮气孔密度比见表 3。

由表 3 可知, 3 个杨树品种叶片的下表皮的的气孔数均大于上表皮, 南林 95 杨的单位面积的气孔数较其

表3 3个品种叶片上、下表皮气孔数目及密度比

| 项 目       | 中林 2001 | 南林 95 | 南抗   |
|-----------|---------|-------|------|
| 上表皮气孔数    | 13.33   | 16.2  | 13.1 |
| 下表皮气孔数    | 16.53   | 22.7  | 16.6 |
| 上下表皮气孔密度比 | 0.81    | 0.71  | 0.79 |

注:上、下表皮气孔密度比=上表皮气孔数/下表皮气孔数。

它2个品种多;上、下表皮气孔密度比中林2001杨和南抗杨基本相同,而南林95杨相对较小,即上、下表皮气孔数相差较大。

## 2.4 叶片上的不同部分及放置方式对愈伤组织诱导效果的影响

表4 不同叶片部位对愈伤组织诱导的影响

| 部分  | 接种叶片数<br>(个) | 愈伤诱导率(%) |       |      |
|-----|--------------|----------|-------|------|
|     |              | 中林 2001  | 南林 95 | 南抗   |
| 叶 缘 | 450          | 68.2     | 84.7  | 56.4 |
| 叶中部 | 450          | 72.4     | 91.1  | 60.4 |

注:愈伤诱导率为3次重复取样的平均值。

将3个品种不同类型的叶片接种于1~15号培养基上,3周后,结果见表4、表5、表6、表7。

由表4、表5可得:不同品种及叶片上不同部位在愈伤组织诱导过程中差异显著,叶中部带侧脉高于叶缘带脉梢,南林95杨高于其他2个品种;另外,叶支脉

表5 不同叶片部位对愈伤组织诱导影响的方差分析表

| 变异来源 | 平方和     | 自由度 | 均方      | F 值      | Pr>F    |
|------|---------|-----|---------|----------|---------|
| 部 位  | 242.00  | 1   | 242.00  | 8.00 *   | 0.0134  |
| 品 种  | 5924.33 | 2   | 2962.17 | 97.88 ** | <0.0001 |
| 误 差  | 423.67  | 14  |         |          |         |
| 总变异  | 6590.00 | 17  |         |          |         |

注:\*,\*\*分别表示显著和极显著水平。

表6 不同叶片放置方式对愈伤组织诱导的影响

| 放置方式  | 接种叶片数<br>(个) | 愈伤诱导率(%) |       |      |
|-------|--------------|----------|-------|------|
|       |              | 中林 2001  | 南林 95 | 南抗   |
| 叶正面朝上 | 450          | 71.7     | 89.8  | 58.9 |
| 叶正面朝下 | 450          | 69.6     | 86.2  | 56.0 |

注:愈伤诱导率为3次重复取样的平均值。

处的愈伤组织出现较早。

由表6、表7可知:在叶片愈伤组织的诱导过程中,品种间差异极显著;叶片在培养基上的不同放置方

式差异较显著,正面朝上放置叶片的出愈率要高于正面朝下放置。

## 2.5 不同培养基对3个品种愈伤组织诱导分化的影响及其对比性研究

根据正交设计中的4因素3水平 $L_9(3^4)$ 设计,将实验中诱导的愈伤组织转接在9个处理的培养基上,20d转接1次,60d后结果见图版I中A2、B2、C2,结果分析见表8、表9。

表7 不同叶片放置方式对愈伤组织诱导影响的方差分析表

| 变异来源 | 平方和     | 自由度 | 均方      | F 值       | Pr>F    |
|------|---------|-----|---------|-----------|---------|
| 放置方式 | 76.06   | 1   | 76.06   | 3.89      | 0.0685  |
| 品 种  | 6397.00 | 2   | 3198.50 | 163.76 ** | <0.0001 |
| 误 差  | 2473.44 | 14  | 19.53   |           |         |
| 总变异  | 6746.50 | 17  |         |           |         |

注:\*,\*\*分别表示显著和极显著水平。

表8 不同培养基对3个品种愈伤组织诱导分化的试验方案和试验结果

| 处理   | 因素             |                 |                  |                | 分化数(个)  |       |       | 分化率(%)  |       |       |
|------|----------------|-----------------|------------------|----------------|---------|-------|-------|---------|-------|-------|
|      | A<br>(KT mg/L) | B<br>(NAA mg/L) | C<br>(6-BA mg/L) | D<br>(蔗糖 mg/L) | 中林 2001 | 南林 95 | 南抗    | 中林 2001 | 南林 95 | 南抗    |
| II-1 | 1(0.1)         | 1(0.2)          | 1(1.0)           | 1(20)          | 11.67   | 16.67 | 11.00 | 58.33   | 83.33 | 55.00 |
| II-2 | 1(0.1)         | 2(0.5)          | 2(2.0)           | 2(30)          | 17.00   | 14.00 | 13.67 | 85.00   | 70.00 | 68.33 |
| II-3 | 1(0.1)         | 3(1.0)          | 3(3.0)           | 3(40)          | 12.33   | 11.67 | 12.33 | 61.67   | 58.33 | 62.67 |
| II-4 | 2(0.2)         | 1(0.2)          | 2(2.0)           | 3(40)          | 13.33   | 10.67 | 16.33 | 66.67   | 53.33 | 81.67 |
| II-5 | 2(0.2)         | 2(0.5)          | 3(3.0)           | 1(20)          | 9.33    | 9.33  | 12.67 | 46.67   | 46.67 | 63.33 |
| II-6 | 2(0.2)         | 3(1.0)          | 1(1.0)           | 2(30)          | 11.00   | 10.67 | 10.67 | 55.00   | 53.33 | 53.33 |
| II-7 | 3(0.5)         | 1(0.2)          | 3(3.0)           | 2(30)          | 8.67    | 9.67  | 9.67  | 43.33   | 48.33 | 48.33 |
| II-8 | 3(0.5)         | 2(0.5)          | 1(1.0)           | 3(40)          | 10.33   | 12.33 | 9.67  | 51.67   | 61.67 | 48.33 |
| II-9 | 3(0.5)         | 3(1.0)          | 2(2.0)           | 1(20)          | 13.00   | 11.67 | 12.00 | 65.00   | 58.33 | 60.00 |

注:分化数为3次重复抽样平均值,每个重复接种愈伤组织数为20。

由表8、表9可得:3个品种的分化效果和最佳分化培养基有差异,品种间的F检验较显著( $F=2.84$ ,  $P=0.0881$ )。

在中林2001杨分化中,最佳配方为 $A_1B_2C_2D_2$ 或

$A_1B_2C_2D_3$ , 即  $MS+KT0.1mg/L+NAA0.5mg/L+6-BA 2.0mg/L+蔗糖 30g(或 40g)$ ,  $NAA/6-BA$  比值为1:4。

在南林95杨分化中,最佳配方为 $A_1B_1C_1D_1$ , 即  $MS+KT0.1mg/L+NAA0.2 mg/L+6-BA1.0mg/L + 蔗糖$

表 9 不同培养基对 3 个品种愈伤组织诱导分化的试验结果分析

| 品种      | 项目             | 因素                                                                                                                        |       |       |       |
|---------|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|
|         |                | A                                                                                                                         | B     | C     | D     |
| 中林 2001 | K <sub>1</sub> | 41.00                                                                                                                     | 33.00 | 33.00 | 34.00 |
|         | K <sub>2</sub> | 33.67                                                                                                                     | 36.67 | 43.33 | 35.33 |
|         | K <sub>3</sub> | 32.00                                                                                                                     | 36.33 | 30.33 | 35.33 |
|         | k <sub>1</sub> | 13.67                                                                                                                     | 11.00 | 11.00 | 11.33 |
|         | k <sub>2</sub> | 11.22                                                                                                                     | 12.22 | 14.44 | 11.78 |
|         | k <sub>3</sub> | 10.67                                                                                                                     | 12.11 | 10.11 | 11.78 |
|         | 极差 R           | 9.00                                                                                                                      | 3.67  | 13.00 | 2.00  |
|         | 因素主次           | C>A>B>D                                                                                                                   |       |       |       |
| 南林 95   | 优方案            | A <sub>1</sub> B <sub>2</sub> C <sub>2</sub> D <sub>2</sub> 或 A <sub>1</sub> B <sub>2</sub> C <sub>2</sub> D <sub>3</sub> |       |       |       |
|         | K <sub>1</sub> | 42.33                                                                                                                     | 37    | 39.67 | 37.67 |
|         | K <sub>2</sub> | 30.67                                                                                                                     | 35.67 | 36.33 | 34.33 |
|         | K <sub>3</sub> | 33.67                                                                                                                     | 33    | 30.67 | 34.67 |
|         | k <sub>1</sub> | 14.11                                                                                                                     | 12.33 | 13.22 | 12.56 |
|         | k <sub>2</sub> | 10.22                                                                                                                     | 11.89 | 12.11 | 11.44 |
|         | k <sub>3</sub> | 11.22                                                                                                                     | 11.00 | 10.22 | 11.56 |
|         | 极差 R           | 11.67                                                                                                                     | 3.00  | 9.00  | 3.33  |
| 南抗      | 因素主次           | A>C>D>B                                                                                                                   |       |       |       |
|         | 优方案            | A <sub>1</sub> B <sub>1</sub> C <sub>1</sub> D <sub>1</sub>                                                               |       |       |       |
|         | K <sub>1</sub> | 37                                                                                                                        | 37    | 31.33 | 35.67 |
|         | K <sub>2</sub> | 39.67                                                                                                                     | 35.33 | 42    | 34    |
|         | K <sub>3</sub> | 31.33                                                                                                                     | 35    | 34.67 | 38.33 |
|         | k <sub>1</sub> | 12.33                                                                                                                     | 12.33 | 10.44 | 11.89 |
|         | k <sub>2</sub> | 13.22                                                                                                                     | 11.78 | 14.00 | 11.33 |
|         | k <sub>3</sub> | 10.44                                                                                                                     | 11.67 | 11.56 | 12.78 |
| 南抗      | 极差 R           | 8.33                                                                                                                      | 2.00  | 10.67 | 4.33  |
|         | 因素主次           | C>A>D>B                                                                                                                   |       |       |       |
|         | 优方案            | A <sub>2</sub> B <sub>1</sub> C <sub>2</sub> D <sub>3</sub>                                                               |       |       |       |

注: (1) K<sub>i</sub>表示任一系列上水平号为 i 时所对应的试验结果之和。(2) k<sub>j</sub>=K<sub>i</sub>/s, 其中 s 为任一系列上各水平出现的次数。

20 g/L, NAA/6-BA 比值为 1:5。

在南抗杨分化中, 最佳配方为 A<sub>2</sub>B<sub>1</sub>C<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 即 MS+KT 0.2mg/L+NAA 0.2mg/L+6-BA 2.0mg/L + 蔗糖 40 g/L, NAA/6-BA 比值为 1:10。

表 10 不同浓度的 NAA 和 IBA 对 3 个品种试管苗生根的影响

| 处理    | 激素浓度          |               | 接种苗数<br>(个) | 中林 2001    |            |              | 南林 95      |            |              | 南抗         |            |              |
|-------|---------------|---------------|-------------|------------|------------|--------------|------------|------------|--------------|------------|------------|--------------|
|       | NAA<br>(mg/L) | IBA<br>(mg/L) |             | 生根率<br>(%) | 生根数<br>(个) | 平均根长<br>(cm) | 生根率<br>(%) | 生根数<br>(个) | 平均根长<br>(cm) | 生根率<br>(%) | 生根数<br>(个) | 平均根长<br>(cm) |
| III-1 | 0.00          | 0.00          | 20          | 95         | 1.65       | 2.67         | 100        | 2.35       | 3.15         | 90         | 1.50       | 2.96         |
| III-2 | 0.02          | 0.00          | 20          | 80         | 2.90       | 1.12         | 90         | 3.60       | 1.17         | 85         | 2.75       | 0.89         |
| III-3 | 0.05          | 0.00          | 20          | 100        | 3.75       | 0.83         | 100        | 6.00       | 0.93         | 100        | 3.05       | 0.72         |
| III-4 | 0.00          | 0.20          | 20          | 100        | 4.40       | 2.35         | 100        | 3.55       | 2.44         | 100        | 4.35       | 2.71         |
| III-5 | 0.00          | 0.50          | 20          | 100        | 5.10       | 1.80         | 100        | 4.70       | 1.95         | 100        | 5.80       | 2.19         |
| III-6 | 0.01          | 0.20          | 20          | 100        | 5.75       | 1.57         | 100        | 7.05       | 1.86         | 100        | 5.25       | 1.64         |
| III-7 | 0.02          | 0.10          | 20          | 95         | 4.00       | 0.99         | 100        | 4.35       | 1.58         | 100        | 3.65       | 1.04         |

诱导和愈伤组织分化中也得出类似结论, 即最佳诱导愈伤组织效果与 NAA/6-BA 比值有一定的相关性, 其比值大体在 4:1~5:1 之间, NAA 的浓度一般在 1.0~2.0mg/L 之间, 高于 3.0mg/L 或低于 0.5mg/L 则诱导效果会显著下降; 在愈伤组织分化中, 细胞生长素与细胞分裂素之间也存在一定比例。这也进一步证明了

## 2.6 不同浓度的 NAA 和 IBA 对 3 个品种试管苗生根的影响

在丛生芽中切取 2cm 左右的嫩茎, 插入生根培养基中诱导生根, 16d 后的结果见表 10、图版 I 中 A3、B3、C3、A4、B4、C4。

由表 10 可得: 两种生长素浓度与 3 个品种试管苗的生根率和平均生根数成正比, 但与生根的长度成反比; 从苗及根的生长状况来看, 处理 III-5、III-6, 即 1/2MS+IBA0.5mg/L 和 1/2MS+NAA0.01mg/L+IBA0.2 mg/L 较适合这 3 个品种试管苗的生根。

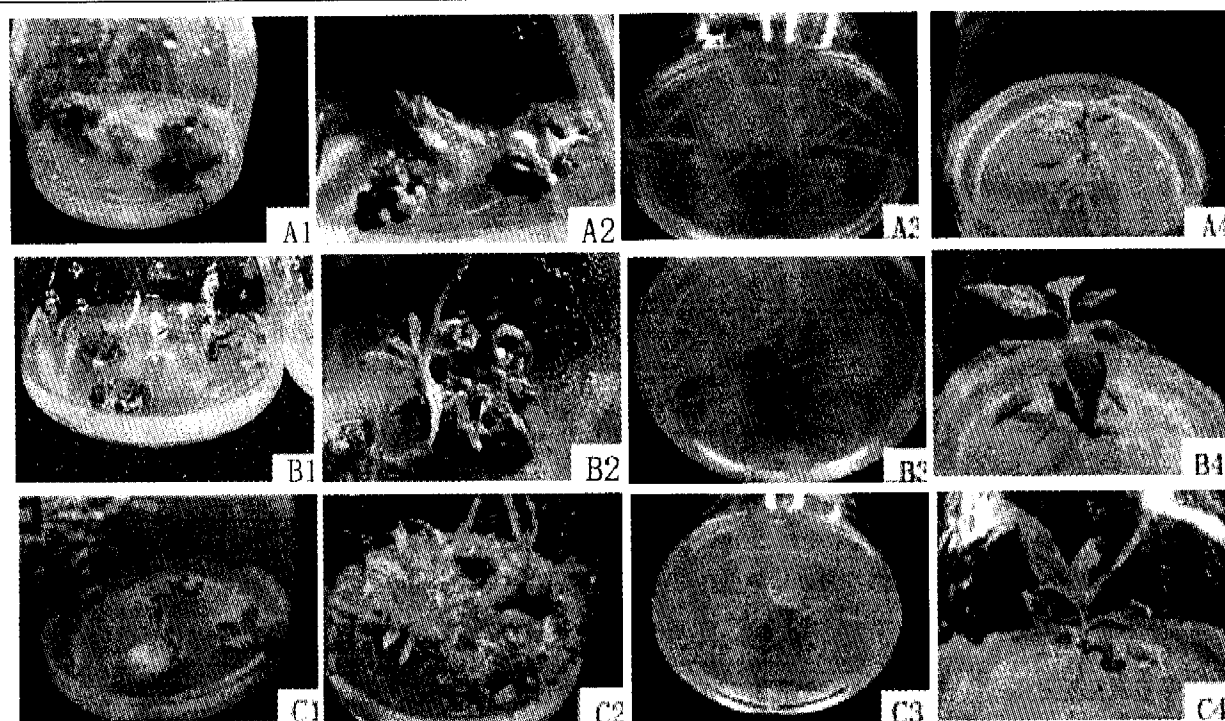
## 3 结论与讨论

大多数双子叶植物表皮上气孔的数目、位置和分布, 随植物的种类而异<sup>[9]</sup>。在植物组织培养中, 外植体处于高湿、弱光的离体培养条件下, 其海绵组织细胞间隙、气孔保卫细胞开度及气孔导度较大且无关闭功能<sup>[5-8]</sup>; 同时因叶片存在正反面结构的差异, 即使在离体的条件下, 仍会影响其对营养成分的吸收和利用。在对胡杨的研究中, 叶片上、下表皮面的不同放置方式在组培中的差异不大<sup>[9,10]</sup>, 但是研究中发现, 3 个品种的叶片的放置方向对愈伤组织的诱导效果影响较显著, 叶正面朝上高于叶正面朝下, 同时得出品种之间差异显著。经估算, 这 3 个杨树品种的叶片正反两面的气孔密度比中林 2001 杨为 0.81、南林 95 杨为 0.71、南抗杨为 0.79。由此推测, 叶片气孔数的不同可能是造成愈伤组织诱导效果差异的原因之一。

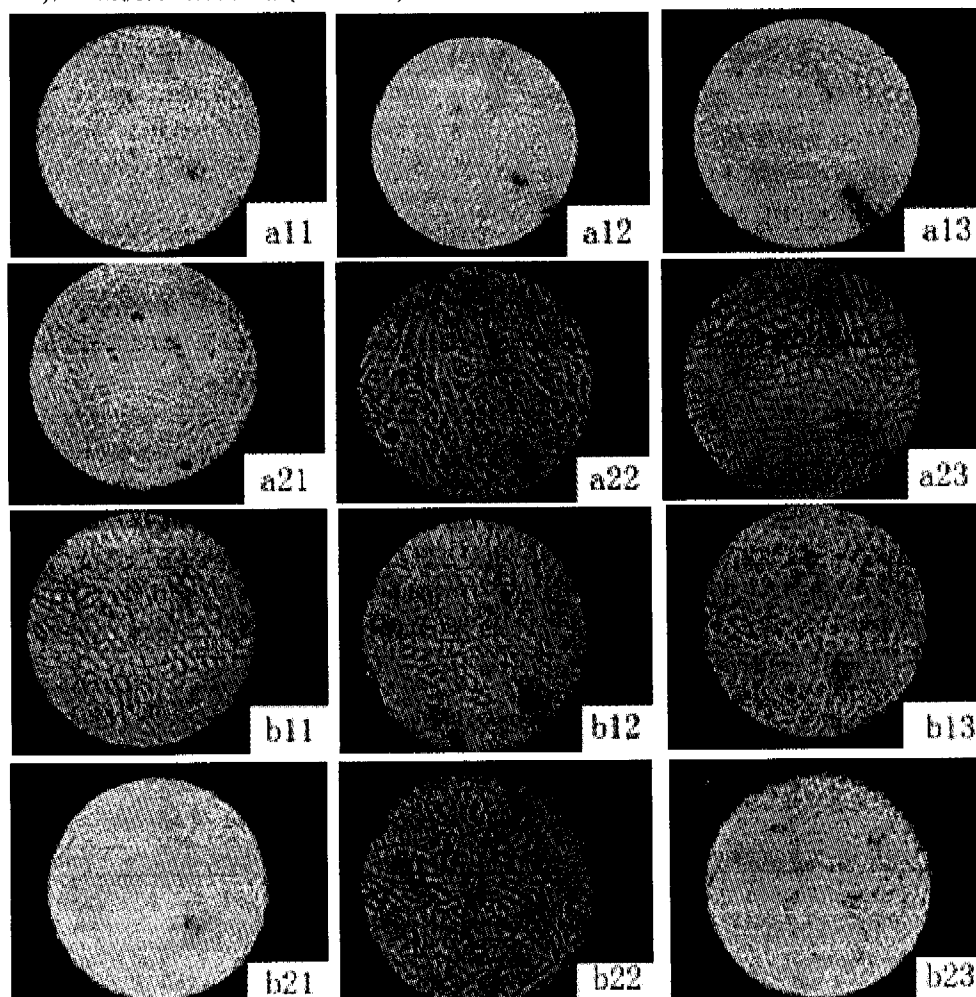
许多植物再生频率的高低因所用植物生长调节剂的种类、浓度及组合而异<sup>[10]</sup>。在杨树叶片不定芽诱导过程中, 诱导的效果与生长素和细胞分裂素的比值有一定的相关性<sup>[11,12]</sup>。研究在 3 个杨树品种叶片的愈伤组织

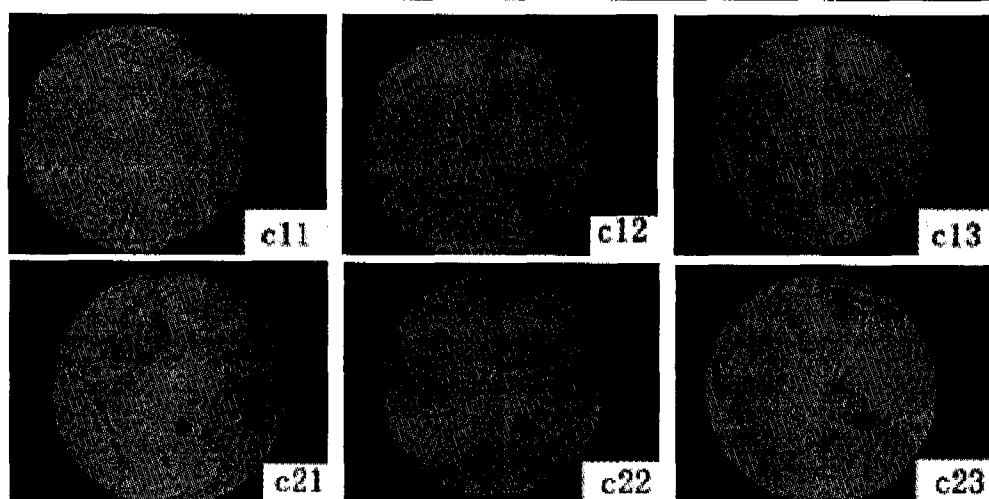
Skoog 和 Miler 提出的关于植物激素可调控器官发生的概念——通过改变培养基中生长素和细胞分裂素的相对浓度可以控制器官的分化。

尽管植物激素可调控器官发生的概念对于多数物种都可适用, 但由于在不同组织中这些激素的内在水平不同, 因而对于某一具体的形态发生过程来说, 它们



图版 I A1.中林 2001 杨叶片诱导的愈伤组织(处理 I ~14); A2.中林 2001 杨愈伤组织分化再生苗(处理 II ~2); A3.中林 2001 杨试管苗生根(处理 III~6); A4.中林 2001 杨再生苗; B1.南林 95 杨叶片诱导的愈伤组织(处理 I ~8); B2.南林 95 杨愈伤组织分化再生苗(处理 II ~1); B3.南林 95 杨试管苗生根(处理 III~6); B4.南林 95 杨再生苗; C1.南抗杨叶片诱导的愈伤组织(处理 I ~14); C2.南抗杨愈伤组织分化再生苗(处理 II ~4); C3.南抗杨试管苗生根(处理 III~5); C4.南抗杨再生苗。





图版 II a11.中林 2001 叶片正面尖端气孔图;a12.中林 2001 叶片正面边缘气孔图;a13.中林 2001 叶片正面中脉附近气孔图;a21.中林 2001 叶片背面尖端气孔图;a22.中林 2001 叶片背面边缘气孔图;a23.中林 2001 叶片背面中脉附近气孔图;b11.南林 95 叶片正面尖端气孔图;b12.南林 95 叶片正面边缘气孔图;b13.南林 95 叶片正面中脉附近气孔图;b21.南林 95 叶片背面尖端气孔图;b22.南林 95 叶片背面边缘气孔图;b23.南林 95 叶片背面中脉附近气孔图;c11.南抗叶片正面尖端气孔图;c12.南抗叶片正面边缘气孔图;c13.南抗叶片正面中脉附近气孔图;c21.南抗叶片背面尖端气孔图;c22.南抗叶片背面边缘气孔图;c23.南抗叶片背面中脉附近气孔图。

所要求的外源激素的水平也会有所不同<sup>[2]</sup>。在杨树组织培养中,组织的再生与植株的基因型、年龄、性别及组织的来源、状态等因素有关<sup>[13-17]</sup>。研究中的 3 个杨树品种,无论是愈伤诱导还是分化再生方面,都存在着显著的基因型差异。这可能是由于不同品种在启动愈伤组织形成及分化时,由于控制其形成和分化的基因以及基因组合不同,导致这种显著的差异。

总之,研究中虽然做出一些推测,但造成这些差异的根本原因还有待进一步研究证明。

### 参考文献

- [1] 蔡玲,王以红,吴幼媚,等.南方常绿杨再生体系建立.广西林业科学[J],2002,31(3):144~150
- [2] 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
- [3] 朱湘渝,王瑞玲.几种难生根杨树组织培养的研究.杨树遗传改良[C].北京:北京农业大学出版社,1991.331~336
- [4] 李扬汉.植物学[M].第二版.上海:上海科技出版社,1984.143~144
- [5] 刘小阳,柏新富,徐德聪,等.姜试管苗移栽过程中的蒸腾及光合性能变化[J].云南植物研究,2006,28(2):199~202
- [6] 王之,胡正海.槐树试管苗在移栽驯化过程中叶表面结构的扫描电镜观察[J].西北植物学报,1996,16(1):13~16
- [7] 李朝周,张利平,曹孜义.葡萄试管苗炼苗过程光合特性的变化[J].甘肃农业大学学报,1995,12(4):202~306
- [8] 袁惠君,宋占午,丁兰,等.人参果试管苗与移栽成活苗气孔行为的比较[J].西北师范大学学报(自然版),2001,37(4):89~92
- [9] 蒋进.极端气候条件下胡杨的水分状况及其与环境的关系[J].干旱区研究,1991,(2):35~38
- [10] 汪志军,李康,处格鲁克,艾尼,等.胡杨的组织培养[J].新疆林业科学,1997,(4):185~186
- [11] 丁霞,陈晓阳,李云,等.胡杨叶片不定芽再生体系的研究[J].北京林业大学学报:自然科学版,2003,25(2):28~31
- [12] 陈颖,韩一品,李铃,等.苏云杆菌杀虫晶体蛋白转化美洲黑杨的研究.见:王世绩主编.杨树研究进展[C].北京:中国林业出版社,1995.77~83
- [13] 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
- [14] 陈维伦,郭东红,杨善英,等.山新杨(*Populus davidiana* × *P. bolleana* Louche)叶外植体的器官分化以及生长调节物质对它的影响植物学报[J].1980,22(40):311~315
- [15] Coleman G D, Ernst S G. *In vitro* shoot regeneration of *Populus deltoids*: effect of cytokinin and genotype[J]. Plant Cell Rep, 1989,3: 459~462
- [16] Pierik R L M. *In vitro* culture of higher plants Dordrecht [M]. Martinus Nijhoff Publishers,1987.183~229
- [17] Ahuja M R. Micropagation of woody plants[M].Dordrecht:Kluwer Academic Publishers,1993.187~194

(责任编辑:陶冶之)