

窄冠白杨组培快繁与再生体系的建立

李际红, 邢世岩, 焦 振, 刘国兴, 张友朋

(山东农业大学林学院, 泰安 271018)

摘 要:以窄冠白杨为试材, 对其组培快繁与再生体系的建立进行了初步的研究。研究表明, 抗氧化剂聚乙烯吡咯烷酮(PVP)和抗坏血酸(Vc)能有效降低外植体的褐化; 该品种外植体增殖的最适培养基为1/2MS+BA0.3mg/L+NAA0.05mg/L, 平均分化率为87%, 增殖系数达7.5倍, 与其它处理组合均呈极显著差异。硝普钠(SNP)12mg/L极显著地促进叶片不定芽分化, 其再生频率与再生芽个数分别达到96.5%与8.2。窄冠白杨适宜的生根培养基为1/2MS+IBA0.3mg/L。

关键词:窄冠白杨; 组培快繁; 再生体系; 硝普钠

中图分类号:S722.37 **文献标识码:**A

Tissue Culture and Regeneration System from Leaves of *Populus Leucopyramidalis* in vitro

Li Jihong, Xing Shiyan, Jiao Zhen, Liu Guoxing, Zhang Youpeng

(College of Forest Shandong Agriculture University, Tai'an 271018)

Abstract: In this report, tissue culture and regeneration system from leaves in vitro have been extensively investigated utilizing *Populus Leucopyramidalis* as experiment materials. The results showed that the anti-oxidation materials polyvinylpyrrolidone (PVP) and ascorbic acid (Vc) decreased browning efficiently; the best medium for proliferation was 1/2 MS+ BA0.3mg/L + NAA 0.05mg/L with differentiation percentage of 87% and proliferation multiples of 7.5 respectively, and there was a great significant difference compared with other treatments. The differentiation and regeneration of adventitious shoot from leaves increased significantly in the medium MS containing BA0.3mg/L and NAA0.05mg/L supplemented with 12mg/L sodium nitroprusside (SNP) in which regeneration frequency and average number of shoots were 100% and 12 respectively. The best rooting medium was 1/2 MS+ IBA0.3mg/L.

Key words: *populus leucopyramidalis*, tissue culture, regeneration system, sodium nitroprusside

窄冠白杨1号、3号、6号(*populus leucopyramidalis* 1, 3, 6L₁、L₃、L₆)是山东农业大学庞金宣等人通过杂交选育出的, 适合农林间作的优良无性系。该无性系与农作物间作, 能不降低农作物产量而增加农民收入^[1-4], 受到广大农民群众的普遍欢迎, 在山东、河北、北京、天津、河南、山西、陕西、甘肃、青海、宁夏等地进行推广, 具有广阔的发展前景。但是, 目前窄冠白杨苗木的繁殖方法主要是“一条鞭芽接”和炮捻接, 该方法费工费时, 繁殖周期长, 繁殖数量受繁殖材料的限

制, 大大制约了其推广应用。采用植物组织培养实现苗木的快速繁殖, 是一条行之有效的办法。窄冠白杨组培快繁方面的研究未见其报道^[5,6]。完善窄冠白杨的性状, 对其进行遗传转化, 需要建立高效再生体系。

该文以窄冠白杨1号的茎段、叶片为材料, 采用正交试验的方法, 研究植物生长调节剂对茎段诱导、增殖及生根的影响; 探讨NO供体硝普钠(SNP)对叶片不定芽再生的影响, 为建立完善的窄冠白杨离体再生与遗传转化体系奠定基础。

基金项目:国家重点推广项目“窄冠黑杨与窄冠白杨推广项目”(2003EC000219)。

第一作者简介:李际红, 女, 1963年出生, 博士。主要研究方向: 生物技术。通信地址: 271018 山东农业大学林学院。E-mail: jhli@sdaa.edu.cn。

收稿日期:2008-04-28, 修回日期: 2008-05-27。

1 材料与方法

1.1 试验材料

窄冠白杨 1 号 (*populus leucopyramidalis* 1, L₁), 2007 年 1 月上旬取材于山东农业大学南校区实习基地一年生萌生条, 剪成 30 cm 长短的茎段, 置于光照培养箱中进行水培, 待芽长出嫩梢及叶片时作为外植体进行接种。

1.2 试验方法

1.2.1 防止外植体褐化的试验 前期无菌体系建立的试验中外植体的褐化严重, 制约窄冠白杨再生体系的建立, 故采用抗氧化剂进行外植体的预处理, 可以减轻酚类物质的毒害。

试验中, 选用聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、抗坏血酸(Vc)、活性炭(AC)3种抗氧化剂进行防止外植体褐化的试验, 设PVP为0.5、1.0、3.0g/L 3个水平, Vc为1.0、3.0、5.0mg/L 3个水平, AC为0.5、1.0、3.0g 3个水平, 采用L₉(3⁴)的正交试验, 共9个组合。培养20d后观察统计数据。探讨窄冠白杨抗褐化的最佳方法。

1.2.2 不同激素对比对窄冠白杨茎段不定芽增殖的影响 以1/2MS培养基为基本培养基, 设BA0.1、0.3、0.5mg/L 3个水平, NAA0.1、0.05、0.01mg/L 3个水平的双因素试验, 共9个组合。培养35d后观察统计分化率和增殖倍数。

1.2.3 NO供体硝普钠(SNP)对窄冠白杨叶片再生的影响 试验以窄冠白杨1号室内水培的叶片为外植体, 将

其接种到含有BA0.3mg/L、NAA0.05mg/L, 附以0.3、6、9、12、15、18 mg/L 7个不同浓度硝普钠的培养基上。接种60d后观察叶片的再生情况, 以0.5cm以上的芽为有效芽, 并记录数据。

1.2.4 IBA对窄冠白杨不定芽生根的影响 以1/2MS培养基为基本培养基, 设定IBA为0、0.1、0.3、0.5、0.7、1.0mg/L 6个组合的单因素试验。培养25d后统计其生根率及生根条数。

1.2.5 数据采集与统计 以上各试验接种10瓶, 每瓶接种3个外植体, 设3次重复。数据采用SAS软件进行统计分析。褐化率 = 褐化的外植体个数 / 接种的外植体个数; 分化率 = 外植体茎段分化的个数 / 外植体茎段分化的总数; 再生频率 = 再生叶片数 / 接种叶片总数; 增值倍数 = 再生不定芽总数 / 接种叶片总数。

1.2.6 培养条件 1/2MS为基本培养基, 蔗糖为30g/L, 琼脂为7g/L, pH为5.8~6.2, 培养室温度控制在25±3℃, 光照强度2000 lx左右, 光照时间为每天12h。

2 结果与分析

2.1 不同抗氧化剂对抑制窄冠白杨叶片褐化的影响

不同抗氧化剂对抑制窄冠白杨叶片褐化的影响明显不同(见表1)。PVP和Vc对抑制窄冠白杨的褐化均达到极显著水平, 而AC的作用不明显。当PVP为0.5g/L、Vc为3.0mg/L、AC为1.0g/L时即2号处理对窄冠白杨1号的褐化抑制最为明显, 褐化降低率达75.4%, 显著高于其它处理。因此, 使用PVP和Vc这两种抗氧化剂能有效抑制窄冠白杨叶片的褐化。

表1 不同抗氧化剂对抑制窄冠白杨叶片褐化的影响

处理序号	PVP / (g·L ⁻¹)	Vc / (mg·L ⁻¹)	活性炭 / (g·L ⁻¹)	褐化降低率 / %
1	0.5	1	0.5	43.8±3.23cD
2	0.5	3	1	75.4±4.16aA
3	0.5	5	3	60.6±2.37bB
4	1	1	1	28.9±2.20dE
5	1	3	3	47.2±2.48cC
6	1	5	0.5	35.6±2.17dDE
7	3	1	3	7.2±0.98fF
8	3	3	0.5	33.9±2.25dDE
9	3	5	1	15.2±1.39eF

注: 褐化降低率 = ck 褐化率 - 添加不同抗氧化剂的褐化率。* 表示差异显著 ($\alpha=0.05$); ** 表示差异极显著 ($\alpha=0.01$)。大小写字母表示 0.01 和 0.05 显著性差异。下同。

2.2 不同激素对比对窄冠白杨外植体茎段不定芽增殖的影响

为了达到较好的茎段分化及增殖目的, 设计BA与NAA对窄冠白杨外植体茎段不定芽增殖的双因素试验。由表2可以看出, 不同的激素对比对茎段分化及

增殖倍数是不同的。窄冠白杨1号在BA0.3mg/L和NAA0.05mg/L激素配比即5号处理组合条件下效果最佳, 其平均分化率为87%, 增殖倍数达7.5倍, 与其它处理呈极显著差异, 为窄冠白杨1号茎段分化及增殖的最适宜的激素配比。

表 2 不同激素配比对外植体茎段不定芽增殖的影响

处理组合	BA / (mg·L ⁻¹)	NAA / (mg·L ⁻¹)	平均分化率 / %	增殖倍数 / 个
1	0.1	0.1	11±0.81gF	1±0.17fE
2	0.1	0.05	43±3.40deCD	3.1±0.29dCD
3	0.1	0.01	22±2.14fEF	2.2±0.18deDE
4	0.3	0.1	53±3.42cC	4.3±0.30cC
5	0.3	0.05	87±3.18aA	7.5±0.58aA
6	0.3	0.01	70±2.94bB	5.6±0.23bB
7	0.5	0.1	26±0.69fE	1.8±0.20efDE
8	0.5	0.05	49±2.48cdCD	4.3±0.31cC
9	0.5	0.01	39±3.93eD	2.9±0.24dD

经方差分析显示,BA 和 NAA 对窄冠白杨 1 号平均分化率和增殖系数均达到极显著水平。新复极差多重比较表明,BA0.3mg/L 与 0.1、0.5 之间差异均达到极显著水平,NAA0.05mg/L 和 0.1、0.01 之间差异极显著。因此这个无性系茎段分化与增殖的最适培养基为 1/2MS+BA0.3mg/L+NAA0.05mg/L+ 琼脂 8g/L+ 蔗糖 25g/L(见图 1,2)。

2.3 SNP 对窄冠白杨叶片不定芽再生的影响

窄冠白杨 1 号叶片初代培养褐化严重,分化与再生能力极低,白杨派叶片再生尽管也有报道,但多均采

用瓶苗叶片,而且叶片再生能力较低^[6,7],若能直接利用预培养的材料诱导形成再生体系,即简化了培养程序,缩短了培养时间;同时又能为尽快进行基因转化提供了基础。近年来 NO 作为植物的信号转导物质,被人们广泛关注,对其研究涉及面较广^[8]。一氧化氮能够调节植物的生长发育^[9],能否诱导植物叶片形成再生体系,故该试验在 1/2MS +BA0.3mg/L +NAA0.05 mg/L 培养中再加入 NO 供体 SNP 以考察 NO 的效果,试验结果见表 3。

由表 3 可知,在无硝普钠的培养基中(即 CK1、



图 1 窄冠白杨 1 号外植体的分化



图 2 窄冠白杨 1 号外植体的增殖

表 3 SNP 对窄冠白杨叶片再生的影响

硝普钠浓度 / (mg·L ⁻¹)	接种叶片数	产生不定芽的叶片数	再生频率 / %	每片叶再生的芽个数
CK1	15	0	0±0gF	0±0fF
CK2	15	2.0	13.3±0.520eE	2±0.461eE
3	15	6.9	46.5±2.309dD	3.2±0.577dD
6	15	8.0	53.3±0.520cC	4.3±0.17cC
9	15	10.0	66.7±0.577bB	5.6±0.231bB
12	15	14.5	96.5±1.44aA	8.2±0.173aA
15	15	7.7	51.2±0.577cC	3.6±0.289cdCD
18	15	1.5	10.2±0.17fE	1.7±0.173eE
F 值	-	-	1013.3**	119.914**

注:CK1 不添加任何激素仅为 1/2MS 基本培养基;CK2 为不添加 SNP 的 1/2MS+BA0.3mg/L+NAA0.05mg/L 培养基。

CK2), 仅有两个叶片产生不定芽, 每个叶片也仅分化出两个芽, 而加入硝普钠后再生频率和每片叶再生的芽个数都明显增加。随着硝普钠浓度的逐渐提高, 窄冠白杨1号叶片再生频率与每片叶再生芽个数不断提高, 而当硝普钠浓度达到12 mg/L时再生频率达到最高为96.5%, 且每片叶再生芽个数均达到8.2个, 并且与其它处理均达到极显著差异。由表3可见, 硝普钠对窄冠白杨1号叶片的再生有明显的促进作用, 其中以浓度为12 mg/L时效果最好(见图3,4)。随着浓度的增加, 出现了明显的剂量效益, 分化与再生受到抑制。



图3 硝普钠诱导窄冠白杨1号叶片的再生(重复1)



图4 硝普钠诱导窄冠白杨1号叶片的再生(重复2)

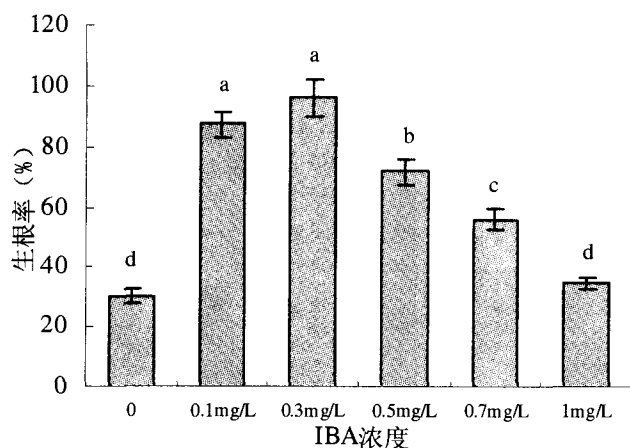


图5 IBA对窄冠白杨不定芽生根率的影响

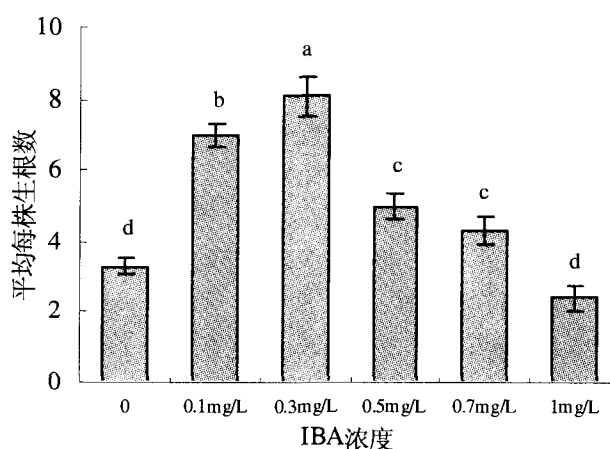


图6 IBA对窄冠白杨不定芽生根条数的影响

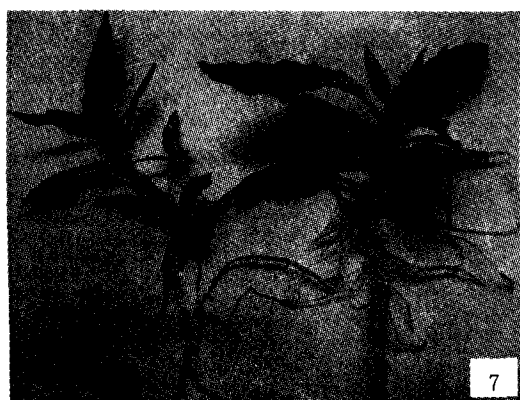


图7 IBA对窄冠白杨1号不定芽生根的影响(取出生根苗)

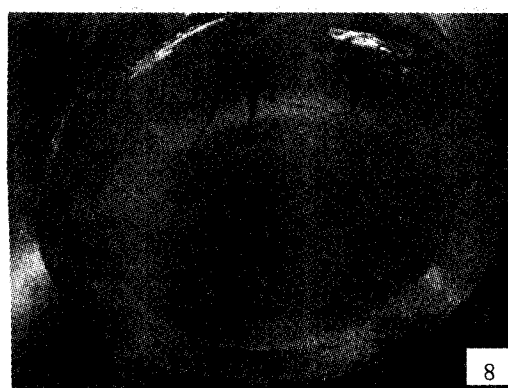


图8 IBA对窄冠白杨1号不定芽生根的影响(瓶内生根苗)

3 讨论

外植体在培养过程中体内的多酚氧化酶被激活,使细胞里的酚类物质氧化成棕褐色的醌类物质,醌类物质在酪氨酸酶的作用下,使外植体的蛋白质聚合,生长停顿,最终导致外植体的死亡^[7]。褐化不但向外扩散导致培养基逐渐变成褐色,而且还会抑制其他酶的活性,严重影响外植体的脱分化和器官分化,造成培养失败,这已成为组织培养中的一个棘手问题,同时也成为植物快繁体系建立的一大障碍,这种现象与菌类污染和过度含水化(玻璃化)并称为植物组织培养中的三大难题^[10],尤其是褐变。因此,能否有效地控制褐变是组培能否成功的关键。由于窄冠白杨 1 号材料本身的特殊性,褐化较为严重。试验探讨了三种抗氧化剂即聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、抗坏血酸(Vc)、活性炭(AC)在防止外植体褐化中的作用,其中使用 PVP 和 Vc 这两种抗氧化剂能有效的抑制窄冠白杨叶片的褐化。

NO 是植物的重要生物活性分子,它参与植物生长发育的许多过程^[9],如种子萌发、下胚轴伸长、叶扩展、根生长、侧根形成、细胞凋亡以及植物抗逆反应等。由于植物的大多数生长发育现象都受到植物激素的调节和控制,NO 与植物激素之间的关系也受到越来越多的关注,通过激素起作用可能是植物内源 NO 作用的机理之一^[8]。外源 IAA、ABA 和 CTK 处理均导致植物体内 NO 的升高,那么它们之间是怎样协同发挥功能的,将是植物学家和植物生理学家研究的一个热点方向。已有大量的实验证明 NO 参与了植物生长发育的各个方面,从这些研究中不难看出 NO 与植物激素有着千丝万缕的关系。事实上,由于植物生长发育及对环境反应等各个方面均受到激素的调节,NO 作用于植物系统就不可能不涉及植物激素。此试验则发现

SNP 可极显著地诱导窄冠白杨 1 号叶片不定芽分化。Tun^[11]等(2001)发现细胞分裂素能快速刺激 NO 的产生,在生长素存在的情况下 NO 又能促进叶片原生质体细胞分裂与体细胞胚的形成,并且 NO 与生长素相互作用共同调控植物细胞的脱分化与再分化过程^[12]。

参考文献

- [1] 李际红,张友朋,刘国兴,等.窄冠黑杨、窄冠黑白杨在农林复合经营中的应用.东北林业大学学报,2005,(8):83-85.
- [2] 张友朋,李际红,刘国兴,等.窄冠黑杨、窄冠白杨的选育及应用.林业科技开发,2004,18(4):19-20.
- [3] 王瑞霞,李秀江.农田林网首推良种——窄冠白杨.河北林业科技,2004(1):53.
- [4] 庞金宣,等.窄冠型杨树林粮间作技术与效益.实用林业技术,2002(10):32-36.
- [5] 左永忠,崔宝禄,李坤霞,等.芽变毛白杨组织培养初步研究.河北林果研究,2006,21(1):10-13.
- [6] 刘杰,李慧,陈晓阳.影响白杨再生体系建立的因素分析.中国农学通报,2007,23(3):156-159.
- [7] 付成华.黑杨派杨树再生体系建立的研究:[硕士学位论文].武汉:华中农业大学,2005.
- [8] 赵晓刚,徐张红,何奕昆,等. NO 在植物中的调控作用.植物学通报,2004,21(1):44-51.
- [9] Neill S J, Desikan R, Hancock J T. Nitric oxide signaling in plants. *New Phytologist*, 2003,1:11-22.
- [10] 谢丽霞,杜建伟,李海杰,等.植物组织培养中的褐变现象及解决途径.垦殖与稻作,2006,(1):70-72.
- [11] Tun N N, Holk A, Scherer F E. Rapid increase of NO release in plant cell cultures induced by cytokinin. *FEBS Lett.*, 2001,509: 174-176.
- [12] Ötvös K, Pasternak T P, Miskolczi P, et al. Nitric oxide is required for, and promotes auxin-mediated activation of, cell division and embryogenic cell formation but does not influence cell cycle progression in alfalfa cell cultures. *The Plant Journal*, 2005,43: 849-860.