

文章编号: 1000-5692(2006)05-0512-04

成熟龄杂交鹅掌楸再生体系的建立

李纪元¹, 田敏¹, 李辛雷¹, 范正琪¹, 倪穗²

(1. 中国林业科学研究院 亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400; 2. 宁波大学
生命科学与生物工程学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 以叶片及叶柄为外植体, 建立了杂交鹅掌楸 *Liriodendron chinense* × *L. tulipifera* 成年树的离体培养再生体系。结果表明, 外植体在多种植物生长调节物质组合的培养基上均能产生愈合组织。在 MS+0.5 mg·L⁻¹ NAA+2.0~4.0 mg·L⁻¹ 6-BA 的培养基上, 愈合组织能分化产生不定芽。在 MS+0.5 mg·L⁻¹ NAA+4.0 mg·L⁻¹ 6-BA 的培养基上, 外植体可不经愈合组织而直接分化产生不定芽。最适生根培养基为 1/2 MS+1.5 mg·L⁻¹ NAA。图 2 表 2 参 13

关键词: 林木育种学; 鹅掌楸属; 杂交种; 分化; 再生体系

中图分类号: S722.3 **文献标识码:** A

杂交鹅掌楸 *Liriodendron chinense* × *L. tulipifera* 是以鹅掌楸 *L. chinense* 为母本, 北美鹅掌楸 *L. tulipifera* 为父本的杂交第一代。其树干通直, 叶形奇特, 花朵亮丽, 观赏价值高, 是国内外著名的城市绿化、庭院观赏和四旁栽植树种, 也是长江中下游地区极有潜力的板材及纸浆林树种^[1,2]。鹅掌楸自身繁殖能力差, 自然结实率不足 1%^[3,4], 杂交鹅掌楸后代性状分离明显, 扦插繁殖生根率低^[5]。以种胚为材料的体胚发生途径获得再生植株的研究国内外已经开展^[6~9]。近年来在浙江省科技项目的支持下, 作者所在的研究组首先以 2 年生杂交鹅掌楸幼树为试材, 建立了器官发生途径的实验体系^[10]。在此基础上, 这项研究以 37 年生优良杂交鹅掌楸成年树叶片、叶柄为外植体开展其再生体系的研究, 旨在使其无性快繁成为可能, 有利于杂交鹅掌楸的种质保存和遗传改良等研究。

1 材料与方 法

杂交鹅掌楸种子 1964 年由南京林学院叶培忠教授提供, 1967 年育苗后栽植于中国林科院亚热带林业研究所内, 目前胸径达 90 cm, 树高 17 m, 是国内现存最大的一株杂交鹅掌楸。2004 年春季, 取该株杂交鹅掌楸枝条上幼芽刚萌发的第一片叶的叶片与叶柄为外植体。将外植体用自来水冲洗 2 h 后蒸馏水冲洗 3 次, 然后用体积分数为 75% 乙醇表面消毒 20 s, 然后用 1.0 g·kg⁻¹ HgCl₂ 浸泡消毒 10~15 min, 最后用无菌水洗 5~6 次。叶片切成 0.5 cm×0.5 cm 大小, 叶柄切成 0.5 cm 的小段, 接种到固体培养基上。

基本培养基有 MS 和 1/2MS, 添加 30 g·L⁻¹ 蔗糖, 8.0 g·L⁻¹ 琼脂, 10 mg·L⁻¹ 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 和 10 mg·L⁻¹ 抗坏血酸, 以及不同种类和质量浓度的植物生长调节物质, pH 5.6。培养温度为 (25±2) °C, 光强 1 600~2 000 lx, 光照 16 h·d⁻¹。

收稿日期: 2006-02-16; 修回日期: 2006-05-21

基金项目: 浙江省科学技术重点项目(2003C22011, 2006C22061)

作者简介: 李纪元, 研究员, 博士, 从事园林花卉及林木生物技术研究。E-mail: jiyuan_li@126.com

2 结果与分析

2.1 愈合组织的诱导和分化

在该实验设计的所有诱导培养基上, 叶片接种 5 d 后, 都出现明显膨大, 边缘卷曲等症状, 10 d 后部分变黑死去, 部分叶片切口处能形成绿色致密颗粒状愈合组织。叶柄一端或两端膨大, 或整个均匀变粗, 愈合组织出现在切口处或叶柄中段。叶片的愈合组织诱导率为 24.3%~44.3%, 叶柄为 32.8%~63.8%(表 1), 叶片的诱导率低于叶柄。

表 1 不同培养基上愈合组织的诱导情况

Table 1 Effects of plant growth regulators on the callus induction

培养基	植物生长调节物质质量浓度/(mg·L ⁻¹)		叶 片			叶 柄		
	6-BA	NAA	接种数	出愈数	诱导率/%	接种数	出愈数	诱导率/%
MS	0.5	0.1	70	17	24.3	70	29	41.4
MS	0.5	0.5	70	28	40.0	70	23	32.8
MS	1.0	0.1	70	26	37.1	70	36	51.4
MS	1.0	0.5	70	23	32.9	68	31	45.6
MS	2.0	0.1	70	31	44.3	80	51	63.8
MS	2.0	0.5	70	29	41.4	80	45	56.2

将生长状态良好的愈合组织转移到含有 0.5 mg·L⁻¹ 萘乙酸(NAA) 和不同质量浓度 6-苄氨基嘌呤(6-BA) 的分化培养基上。在含有 2.0~4.0 mg·L⁻¹ 6-BA 的分化培养基上, 3 周后愈合组织表面出现绿色芽点, 芽点逐渐长出小叶继而长大成幼苗(图 1, A)。培养基中添加 1.0 mg·L⁻¹ 6-BA (处理 1) 时,

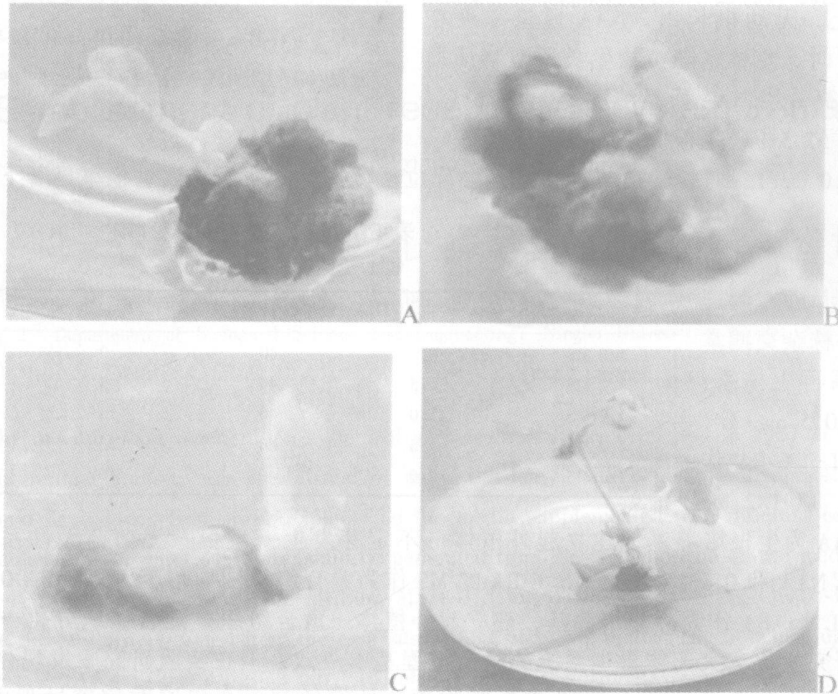


图 1 杂交鹅掌楸的组培繁殖

A. 愈合组织分化不定芽; B. 叶片分化不定芽; C. 叶柄一端分化出芽苞; D. 生根苗

Figure 1 Tissue culture of *Liriodendron chinense* × *L. tulipifera*

A. adventitious shoot differentiated from callus; B. shoot differentiated from leaf;

C. shoot differentiated from leaf petiole; D. rooting plant

愈组织的分化率为0, 6-BA为 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (处理2)时的分化率约为17.7%, 6-BA为 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (处理3)时愈组织的分化率最高, 可达到37.8%, 但6-BA质量浓度升高到 $4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (处理4)时, 分化率却有所下降, 约为26.6%。但研究中发现, 在含较高质量浓度6-BA($3.0 \sim 4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的分化培养基上培养约20 d, 愈组织极易褐化, 同时培养基开始呈现出褐色。两步分化策略(处理5), 即在 $4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA的培养基上先进行7 d分化培养, 再转移到 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA的培养基上培养)可以有效地解决褐变问题, 而且分化率可达到44.7%(图2)。

2.2 外植体不定芽的直接分化

在附加 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA和 $4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA的培养基上, 部分叶片接种后膨大变厚, 20 d左右在叶片中部分化产生芽突(图1, B)。叶柄一端膨大在膨大部位分化出绿色芽苞(图1, C), 几天后芽苞抽出2片小叶, 茎叶逐渐伸长长成幼苗; 有的叶柄整个膨大, 在一端分化出细须状的芽。也就是说, 在较高质量浓度6-BA的培养基上, 外植体可不经愈组织阶段而直接分化产生不定芽。

2.3 壮苗及生根培养

愈组织分化的不定芽和外植体直接分化的不定芽长到1 cm时, 将芽切下置于含有 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA和 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA的壮苗培养基上进行培养。等苗高2~3 cm时, 转移到含不同质量浓度NAA的1/2MS生根培养基上进行生根培养。20 d后, 在幼苗基部有嫩白的根发出, 30 d后幼根伸长5~6 cm, 变得粗壮(图1, D)。

不同质量浓度的NAA对生根有影响, 在不含NAA的培养基上, 无幼根长出, NAA质量浓度在 $0.5 \sim 1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 生根率随植物生长调节物质质量浓度升高而提高, 当NAA质量浓度为 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 生根率达到57.5%, 生根效果最好。而当NAA质量浓度高于 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 幼苗与培养基接触部位易愈伤化, 从而导致生根率显著下降(表2)。

3 结论与讨论

通过该研究, 建立起国内现存最大的一株杂交鹅掌楸的2个无性系再生体系: 第一, 以 $\text{MS} + 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA + $4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA作为分化培养基, 以1/2 MS

+ $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA为生根培养基, 建立起外植体→不定芽发生→生根→无菌苗无性系; 第二, 以含 $0.1 \sim 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA和 $0.1 \sim 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA的MS作为愈组织诱导培养, 以 $\text{MS} + 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA + $2.0 \sim 4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA作为分化培养基, 建立起外植体→愈组织→愈组织分化→无菌苗。与以幼树为试材的研究相比, 其离体再生系统的发生过程基本一致, 但在实验研究中发现存在以下问题:

虽然在培养基中加入了抗坏血酸和PVP等物质, 外植体和愈组织在培养过程中仍极易褐变, 特别是在高质量浓度6-BA的培养基上。这是因为木本植物含有高含量的酚类化合物, 而6-BA能促进酚类化合物的合成, 而且还能刺激多酚氧化酶的活性^[11], 而褐变的发生与组织中所含的酚类化合物多少和多酚氧化酶活性有直接关系。而另一方面, 一定质量浓度($2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的6-BA对启动鹅掌楸不定芽的发生是必需的(图2), 6-BA能够促进细胞分裂和由愈组织或器官上分化不定芽^[12]。实验中采用的两步分化策略能较好地解决这一问题, 但这样增加了培养步骤, 提高了生产成本, 不利于商业化生产。以后还需要进一步研究解决这一问题。

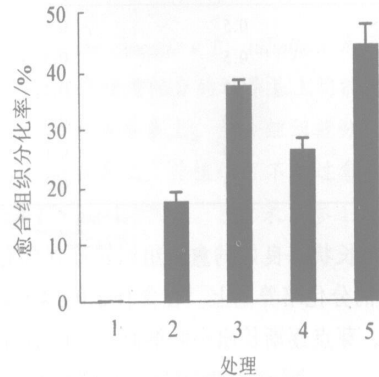


图2 6-BA对愈组织分化频率的影响

Figure 2 Effect of 6-BA on the callus differentiation rates

表2 NAA对生根的影响

Table 2 Effect of NAA on rooting

培养基 (Medium)	NAA/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	接种数 (Number of inoculations)	生根数 (Number of roots)	生根率/% (Rooting rate/%)
1/2MS	0	40	0	0
1/2MS	0.5	40	3	7.5
1/2MS	1.0	40	13	32.5
1/2MS	1.5	40	23	57.5
1/2MS	2.0	40	10	25.0

植物生长调节物质是杂交鹅掌楸生根所必需的, 但研究中发现, 在最适培养基上的生根率低于 60%。有的不定根直接从无菌苗基部的愈合组织中产生, 而不是直接从皮层产生, 这种根不与维管束相连, 不易吸收营养, 从而影响移栽成活率^[13]。同时, 杂交鹅掌楸的分化频率较低, 不足 50%, 远远不能满足工厂化育苗和遗传转化研究中对不定芽高频分化和植株高效生根的要求。因此, 在以后的研究中还要优先解决这一问题, 以促进杂交鹅掌楸优良种质的开发利用。

参考文献:

- [1] 季孔庶, 王章荣, 温小荣. 杂交鹅掌楸生长表现及其木材胶合板性能[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2005, 29(1): 7-74.
- [2] 李建民, 周志春, 陈炳星, 等. 马褂木人工林的生长和制浆造纸性能[J]. 中国造纸, 2002(2): 5-7.
- [3] 樊汝汉, 叶建国, 尹增芳, 等. 鹅掌楸种子和胚胎发育的研究[J]. 植物学报, 1992, 34(6): 437-442.
- [4] 黄坚钦. 鹅掌楸结籽率低的胚胎学原因探讨[J]. 浙江林学院学报, 1998, 15(3): 269-273.
- [5] 张晓平, 方炎明. 杂种鹅掌楸不同季节扦插特征比较[J]. 浙江林学院学报, 2003, 20(3): 249-253.
- [6] 王章荣. 鹅掌楸属 *Liriodendron* 杂交育种回顾与展望[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2003, 27(3): 76-78.
- [7] MERKLES A, HOEY M T, WATSON-PAILEY B A, *et al.* Propagation of *Liriodendron* hybrids via somatic embryogenesis [J]. *Plant Cell Tissue Org Cul.* 1993, 34: 191-198.
- [8] 陈金慧, 施季森, 诸葛强. 杂交鹅掌楸的不定芽诱导与植株再生[J]. 植物生理学通讯, 2002, 38(5): 459.
- [9] 陈金慧, 施季森, 诸葛强, 等. 杂交鹅掌楸体细胞胚胎发生的研究[J]. 林业科学, 2003, 39(4): 49-53.
- [10] 田敏, 李纪元, 范正琪. 杂交鹅掌楸离体培养中器官发生的研究[J]. 林业科学研究, 2003, 18(5): 546-550.
- [11] 高国训. 植物组织培养中的褐变问题[J]. 植物生理学通讯, 1999, 35(6): 501-506.
- [12] 李浚明. 植物组织培养教程[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2001.
- [13] 张存旭, 杨锋利, 袁秀平. 常春藤离体快繁技术[J]. 浙江林学院学报, 2005, 22(2): 241-245.

Establishment of plant regeneration system in matured *Liriodendron* hybrids

LI Ji-yuan¹, TIAN Min¹, LI Xin-lei¹, FAN Zheng-qi¹, NI Sui²

(1. Research Institute of Subtropical Forestry, The Chinese Academy of Forestry, Fuyang 311400, Zhejiang China; 2. Department of Biological Science and Engineering, Ningbo University, Ningbo 315211, Zhejiang China)

Abstract: The *in vitro* plant regeneration system of *Liriodendron* hybrids planted in 1967 at the yard of Research Institute of Subtropical Forestry was established by using the leaves and petioles as explants. The results showed that callus could be induced from these explants on the media supplemented with different concentrations of plant growth regulators. The adventitious buds could be generated from the calli induced on the media MS+0.5 mg·L⁻¹ NAA+2.0-4.0 mg·L⁻¹ 6-BA. On the medium MS+0.5 mg·L⁻¹ NAA+4.0 mg·L⁻¹ 6-BA, the adventitious buds could be directly differentiated from the explants without inducing calli. The best medium for rooting was 1/2 MS+1.5 mg·L⁻¹ NAA. [Ch, 2 fig. 2 tab. 13 ref.]

Key words: forest tree breeding; *Liriodendron*; hybrids; differentiation; plant regeneration