

胡杨雌花离体培养中的不定根诱导和植株再生体系的建立

周燕^{1,2}, 高自昞³, 高述民^{1,*}, 李凤兰¹

¹北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083; ²北京市园林科学研究所, 北京 100102; ³北京交通大学电气工程学院, 北京 100044

摘要: 正交实验的方差和极差分析表明, 胡杨雌花诱导的愈伤组织和芽的效果明显优于雄花; 雌花诱导愈伤组织的最适培养基是B₅添加1.0 mg·L⁻¹ 6-BA和1.0 mg·L⁻¹ NAA, 诱导芽的最适培养基为MS+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L⁻¹ NAA, 诱导根的最适培养基为1/2MS+0.5 mg·L⁻¹ IBA。

关键词: 胡杨; 雌花; 离体; 愈伤组织; 不定根

Plant Regeneration and Adventitious Root Induction *in vitro* from Female Flower of *Populus euphratica* Oliv.

ZHOU Yan^{1,2}, GAO Zi-Yang³, GAO Shu-Min^{1,*}, LI Feng-Lan¹

¹College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; ²Beijing Institute of Landscape Gardening, Beijing 100102, China; ³School of Electrical Engineering, Beijing Jiaotong University, Beijing 100044, China

Abstract: The orthogonal design exhibited the greatest impact factor for callus and buds induction of inflorescence types, and the results showed female inflorescence is better than male inflorescence. The optimum medium for callus induction of female inflorescence is B₅+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+1.0 mg·L⁻¹ NAA. The optimum medium of buds induced is MS+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L⁻¹ NAA, and 1/2MS+IBA 0.5 mg·L⁻¹ for root induction.

Key words: *Populus euphratica* Oliv.; female flower; *in vitro*; callus; adventitious root

胡杨具有耐盐碱、耐旱、抗寒和抗风沙等特性, 是维护与调控干旱荒漠地区脆弱的生态平衡和改善绿洲农业生态环境的树木之一。与其他杨属植物不同的是, 胡杨扦插生根困难, 而采用花器官快速繁殖可以有效解决胡杨的无性繁殖问题(周燕等 2006)。一般认为, 适宜浓度的吲哚丁酸(IBA)可以促进植物产生不定根。但新近的研究显示, IBA可通过过氧化物酶体的β氧化作用激活抑制根生长的生长素的形成(Wiszniewski 等 2009)。我们以前的研究也表明, 合适浓度的IBA可诱导胡杨组培苗生根或诱导其愈伤组织直接生根; 但却抑制实生苗的插穗生根(周燕等 2009)。因此, 探索胡杨不定根发生机制有一定的意义。本文在已建立的胡杨雄花再生培养体系的基础上, 进一步建立胡杨雌花的再生体系。

材料与方法

剥去胡杨(*Populus euphratica* Oliv.)花芽的苞片, 用4%次氯酸钠灭菌6~10 min, 再用无菌水冲洗4次。实验采取L₄(2³)三因素二水平正交实验设计研究由胡杨雌、雄花诱导愈伤组织和芽的效

应。以B₅为基本培养基, 每个处理接5瓶, 每瓶接6个材料。以胡杨雌花诱导绿色愈伤组织的有5种培养基, 重复5次。胡杨雌花诱导出的愈伤组织再诱导芽时用3种培养基, 每个处理6瓶, 每瓶3个材料。雌花诱导出的芽再诱导根时有2种培养基, 每个处理6瓶, 每瓶2~3个芽。于23~27 °C和17 h·d⁻¹光照(光照强度为40 μmol·m⁻²·s⁻¹)下培养。

结果与讨论

1 胡杨雌花和雄花诱导愈伤组织和芽的比较

正交实验方差分析结果(表1)表明, 雌花在1号培养基上的愈伤组织诱导率最高, 显著高于雄花(4号培养基)。雌花在1号培养基上的芽诱导率显著高于雄花在3号和4号培养基上的芽诱导率, 为最好的组合。

从极差分析可知, 诱导愈伤组织形成的最大影响因子是花的性别类型(极差为0.1333), 表明在诱

收稿 2009-08-07 修定 2009-10-09

资助 国家自然科学基金(30671709)和北京林业大学林木、花卉遗传育种教育部重点实验室开放基金(05-05)。

* 通讯作者(E-mail: gsm689@sohu.com; Tel: 010-62338717)。

表1 不同培养基对胡杨雌雄花愈伤组织和芽诱导的效应

Table 1 The effect of different media on callus and buds induction of male and female flowers in *P. euphratica*

培养基编号	花的性别	培养基 /mg·L ⁻¹	愈伤组织诱导率(2周)/%	芽诱导率(4周)/%
1	雌花	B ₅ +6-BA 1.0+NAA 0.5	96.7±1.0 ^a	50.0±1.7 ^a
2	雌花	B ₅ +6-BA 0.5+NAA 0.1	90.0±0.9 ^{ab}	40.0±1.7 ^a
3	雄花	B ₅ +6-BA 1.0+NAA 0.1	83.3±0.8 ^b	3.33±0.5 ^b
4	雄花	B ₅ +6-BA 0.5+NAA 0.5	76.7±0.7 ^b	0±0 ^b

数据为均值±SE (标准误差), 实验重复5次。LSD法多重比较, $P < 0.05$ 。

导愈伤组织中(2周内), 雌花优于雄花; 其次为6-BA (极差为 0.0667); NAA 影响最小(极差仅为 0.0001), 胡杨雌花诱导愈伤组织的最佳培养基均为 1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.5 mg·L⁻¹ NAA, 和以往采用雄花诱导愈伤组织的最佳培养基一致(周燕等 2006)。极差分析表明, 诱导芽最大的影响因子也是花的性别类型(极差为 0.4332), 说明在诱导芽中(4周内), 雌花优于雄花; 其次为 6-BA (极差为 0.0668); NAA 影响最小(极差为 0.0334)。无论雌花或是雄花, 均以 1.0 mg·L⁻¹ 6-BA, 0.5 mg·L⁻¹ NAA 为最佳组合。根据以上结果, 我们认为在现有的培养基设计范围内, 诱导愈伤组织和芽的最好培养基组合为: B₅+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.5 mg·L⁻¹ NAA。

2 胡杨雌花离体培养中植株再生体系的建立

(1)胡杨雌花在5种不同配方的培养基(5~9号, 6-BA 浓度均为 1.0 mg·L⁻¹)上都可以高效而快速的诱导出愈伤组织(表 2 和图 1)。接种 2 d 后就可以观察到愈伤组织的形成。其原因可能是由于花处于生长旺盛阶段, 其细胞分裂能力较强的缘故。当 NAA 浓度为 0.5 mg·L⁻¹ 时, B₅、LS 和 MS 三种培养基上的愈伤组织诱导率是 MS 略低些(8号), 其余 2 种培养基(5 和 9 号)上的诱导率均达到 100%。绿色愈伤组织诱导率则以 B₅(5号)为最高, 其次是 LS (9号), MS (8号)最低。当 B₅ 培养基中 NAA 浓度

为 1.0 mg·L⁻¹ 时(6号), 绿色愈伤组织的诱导率较高, NAA 的浓度增高(7号)或降低(5号)时, 绿色愈伤组织诱导率均下降, 说明 NAA 浓度对绿色愈伤组织的产生有影响。这种绿色愈伤组织对芽的分化发生是有利的。此外, 除 6 号培养基以外, 其余培养基上的愈伤组织都出现不同程度的褐化现象。我们还观察到, 胡杨愈伤组织放在 4 °C 冰箱中 3 个月时, 有些愈伤组织衰老褐化, 将其转入适宜的培养基(5号)上时, 愈伤组织很快又恢复生长, 长出黄白色的新愈伤组织。雌花诱导愈伤组织和绿色愈伤组织的较佳培养基为 6 号培养基(B₅+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+1.0 mg·L⁻¹ NAA)。

(2)雌花诱导 1 周后的黄绿色愈伤组织在附加不同生长调节物质和不同浓度的 MS 培养基中诱导芽(10~12 号)。表 3 结果显示, 6-BA/NAA 为 2.5 的效果(10 号)最好, 是诱导芽的最好组合; 其次是 6-BA/NAA 为 1.0 (11 号), 6-BA/NAA 为 2.0 (12 号)的芽诱导率最低。我们在实验中还观察到, 从 0.2~1.0 mg·L⁻¹ 6-BA 以及从 0.1~1.5 mg·L⁻¹ NAA 的培养基上的雌花和雄花均可诱导产生不定芽, 这与谷瑞升等(1999)的结果有相似之处。另外, 雌花诱导的芽在附加 0.5 mg·L⁻¹ IBA 的培养基(13 号)上生根率高于 1.0 mg·L⁻¹ IBA 培养基(14 号)的, 且直根多, 根也较健壮。

表2 不同培养基对胡杨雌花愈伤组织诱导的效应(3周)

Table 2 The effect of different media on callus induction of female flowers in *P. euphratica* (3 weeks)

培养基编号	基本培养基	6-BA 浓度 /mg·L ⁻¹	NAA 浓度 /mg·L ⁻¹	愈伤组织诱导率 /%	绿色愈伤诱导率 /%	愈伤组织褐化率 /%
5	B ₅	1.0	0.5	100	30.0	5.0
6	B ₅	1.0	1.0	100	45.8	0
7	B ₅	1.0	1.5	100	9.4	6.3
8	MS	1.0	0.5	90	16.7	13.9
9	LS	1.0	0.5	100	25.0	7.5

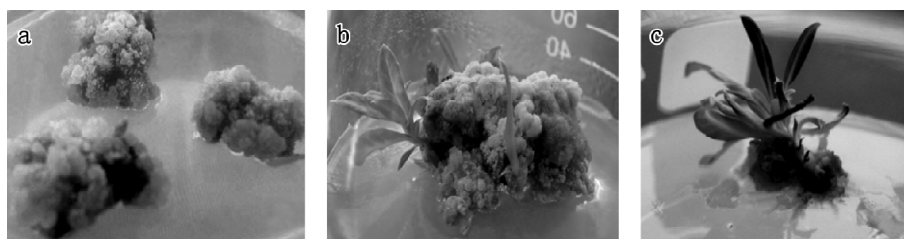


图1 胡杨雌花愈伤组织诱导芽和根的形成

Fig.1 The formation of buds and roots induction from callus of female flowers in *P. euphratica*

a 和 b: 10 号培养基中诱导出健壮的芽; c: 13 号培养基中诱导出根。

表3 不同浓度生长调节物质对胡杨雌花愈伤组织诱导芽和根的效应

Table 3 The effect of different growth regulating substances and different media on buds and roots induction from callus of female flowers in *P. euphratica*

培养基编号	基本培养基	生长调节物质 /mg·L ⁻¹	芽诱导率 /%	根诱导率 /%
10	MS	6-BA 0.5+NAA 0.2	22.2	
11	MS	6-BA 0.2+NAA 0.2	16.7	
12	MS	6-BA 0.2+NAA 0.1	5.6	
13	1/2MS	IBA 0.5		35.0
14	1/2MS	IBA 1.0		8.3

此外, 我们的实验结果还表明, 在诱导胡杨芽和愈伤组织生根的过程中, 需加外源的 IBA, 其最适浓度为 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; 若将愈伤组织放入不加 IBA 的培养基中则不长根。但是, 外源的 IBA 会抑制实生苗的插穗生根。这说明外源 IBA 可能是引起胡杨中吲哚乙酸 (IAA) 类的浓度变化而起作用的。

参考文献

谷瑞升, 蒋湘宁, 郭仲琛(1999). 胡杨离体器官发生及试管无性系的建立. 植物学报, 41 (1): 29~33

周燕, 高述民, 李凤兰(2009). 胡杨不定根原基发生的分生细胞结构特征及内源激素变化分析. 西北植物学报, 29 (7): 1342~1350

周燕, 朱小虎, 王晓炜, 江华, 梁蕊, 高述民, 李凤兰(2006). 胡杨雄花和花序轴离体培养的适宜培养基. 植物生理学通讯, 42 (4): 801~802

Wiszniewski AA, Zhou W, Smith SM, Bussell JD (2009). Identification of two *Arabidopsis* genes encoding a peroxisomal oxidoreductase-like protein and an acyl-CoA synthetase-like protein that are required for responses to pro-auxins. Plant Mol Biol, 69 (5): 503~515