

油桐叶柄高效直接再生体系的建立

林青, 吴玲利, 张琳*, 谭晓风, 龙洪旭, 李泽

中南林业科技大学, 经济林培育与保护省部共建教育部重点实验室, 长沙410004

摘要: 以油桐无菌苗叶柄为外植体, 研究植物生长调节剂对其离体培养及植株再生的影响。结果表明: 叶柄直接诱导不定芽的最佳培养基 $1/2MS+3.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} 6\text{-BA}+0.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{IAA}$, 诱导率达91.67%; 最佳继代增殖培养基 $1/2MS+3.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} 6\text{-BA}+0.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{IBA}+1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{GA}_3$, 增殖系数可达4.89; 最佳生根培养基为 $1/2MS+0.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{IBA}$, 生根率96.18%。炼苗移栽到泥炭土:珍珠岩:黄土=2:1:1的基质中, 成活率达93.55%以上。

关键词: 油桐; 叶柄; 直接再生; 植株再生

Establishment of Highly Efficient and Direct Regeneration System from Petioles of Tung Tree (*Vernicia fordii*)

LIN Qing, WU Ling-Li, ZHANG Lin*, TAN Xiao-Feng, LONG Hong-Xu, LI Ze

The Key Laboratory of Cultivation and Protection for Non-Wood Forest Trees, Ministry of Education, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China

Abstract: The effects of plant growth regulators on plant regeneration *in vitro* were studied using germ-free petioles of tung tree (*Vernicia fordii*) as explants. The results showed that the fittest medium for shoot differentiation of petioles was $1/2MS+3.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} 6\text{-BA}+0.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{IAA}$, with a 91.67% shoot induction rate; the best medium for shoot multiplication was $1/2MS+3.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} 6\text{-BA}+0.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{IBA}+1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{GA}_3$, with the multiplication coefficient reaching 4.89; the best rooting medium was $1/2MS+0.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{IBA}$, with a 96.18% rooting rate. After the culture-bottle seedlings were transplanted into the matrix composed of peat soil, perlite and loess (2:1:1), the survival rate was up to 93.55%.

Key words: *Vernicia fordii*; petiole; direct regeneration; plant regeneration

油桐为大戟科(Euphorbiaceae)油桐属(*Vernicia*)植物的统称, 是重要的工业油料树种, 与油茶、核桃和乌桕并称我国四大木本油料树种。从油桐种子榨取的油称为桐油, 是世界上最优质的植物干性油, 为油漆、印刷墨油的优良原料(何方和胡芳名2004; 胡芳名等2006)。桐油具有干燥快、附着力强、比重轻、富光泽、耐酸碱、耐高温、抗冻裂、防水等优良特性。此外, 桐油还是一种优良涂料, 是合成新型复合材料的基本原料, 具有广泛的用途(谭晓风等2011)。近年来, 随着全球人口增加和经济的飞速增长, 资源开发利用过度, 如何挖掘油桐这一宝贵资源在生物质能源等领域的重要作用, 推进油桐规模化发展是当前科研工作者的艰巨任务, 也是帮助山区农民脱贫致富的手段之一。

目前, 油桐的常规育苗方法主要为实生苗及嫁接苗, 嫁接苗虽然能够保持母本的优良性状, 但

成本较高, 不利于规模化生产。同时, 油桐枯萎病是我国油桐产区一种毁灭性病害, 严重影响了油桐产业的稳定发展(方嘉兴和何方1998)。通过组织培养可以快速繁殖油桐脱毒苗, 在此基础上通过遗传体系转化而获得抗病植株, 在木本油料植物遗传改良方面有广阔的前景。

油桐的离体培养研究很晚, 到目前为止仅有以油桐离体叶片通过间接器官发生途径获得再生植株的报道(谭晓风等2013), 还未能实现油桐的遗传体系转化。利用植物离体器官直接再生不定芽不需经过愈伤组织诱导, 培养周期短, 且在培养过程中外植体不易发生变异的优点在其他植物中已

收稿 2014-07-14 修定 2014-09-25

资助 国家“948”引进项目“木本植物高效遗传转化及外源基因清除技术引进”(2012-4-42)。

* 通讯作者(E-mail: triwoodtim918@126.com; Tel: 0731-85623416)。

有报道(Huang和Dai 2011; Nada等2011; 王娜等2010; 吴秀华等2013), 但油桐离体组织直接再生不定芽还未见报道。本试验以油桐无菌苗叶柄为外植体, 通过一步直接诱导不定芽、继代增殖、生根和炼苗移栽等过程, 旨在建立一个高效稳定的油桐叶柄离体快繁体系, 为油桐快速繁殖及遗传转化奠定基础。

材料与方 法

1 材料

实验材料油桐(*Vernicia fordii* Hemsley.)采自湖南湘西永顺县青坪镇国家油桐种质资源保存库(110°29'E, 28°32'N, 海拔530~600 m, 年均气温16.0 °C)。用四年生‘葡萄桐’成熟种胚接种在1/2MS基本培养基中获得油桐无菌苗(李泽等2012), 用无菌苗叶柄进行试验。

2 培养条件

以1/2MS为基本培养基, 含蔗糖30 g·L⁻¹(生根培养基含蔗糖20 g·L⁻¹), 琼脂7 g·L⁻¹, pH值为5.4~5.6, 在不同培养阶段添加相应的植物生长调节剂。光照强度20~30 μmol·m⁻²·s⁻¹, 光照时间14 h·d⁻¹, 培养温度(26±1) °C。

3 不定芽的诱导

叶柄诱导不定芽时, 取35 d左右苗龄的无菌苗健壮叶柄, 切割成长度为1 cm左右的叶柄, 接种在含6-BA、ZT和IAA的不定芽分化培养基(表1)中, 暗培养3 d后转入光照培养, 在光照条件下培养40 d后统计不定芽出芽数及叶柄出芽数。每个组合接种8个培养瓶, 每个培养瓶接种4~5个叶柄, 重复3次。

4 不定芽的继代增殖

将叶柄诱导的不定芽切割后转接到继代增殖培养基(表2)中, 其中6-BA的浓度为2.0、3.0和5.0 mg·L⁻¹, IBA的浓度为0、0.05和0.1 mg·L⁻¹, 培养35 d后统计增殖系数。每个处理接种10瓶, 每瓶接种1~2个不定芽, 重复3次。

5 不定芽生根及炼苗移栽

切取生长健壮、长约2 cm的单个不定芽接种在含不同浓度IBA或2,4-D的培养基(表3)中, 暗培养5 d后转到光照培养下20 d后统计生根率及生根数。每个处理接种15瓶, 每瓶接种1个不定芽, 重复3次。

将生根20 d左右的试管苗打开瓶盖放在湿度为60%~70%的人工气候箱中炼苗2~3 d, 用自来水洗净根部的培养基, 然后移栽到泥炭土:珍珠岩:黄土为2:1:1的混合基质中, 在盆子上面用塑料薄膜封住盆口放在温室中培养, 一周后揭取薄膜喷水保持小环境相对湿度在80%以上, 30 d后统计移栽成活率。

6 数据分析

出芽率=(出芽的外植体数/接种外植体总数)×100%; 叶柄平均出芽数=(产生不定芽总数/接种外植体总数)×100%; 生根率=(生根的不定芽数/接种不定芽总数)×100%。数据采用SPSS 17.0软件进行方差分析和多重比较分析(Duncan's法)。

实验结果

1 不同植物生长调节剂对油桐叶柄不定芽的诱导

将油桐无菌的叶柄接种在不同编号的培养基中(表1), 暗培养3 d后, 转到光照条件下培养(图1-A), 10 d左右叶柄明显膨大(图1-B), 20 d左右就有绿色的芽点长出, 30 d左右逐渐发育成小芽(图1-C), 继续培养15 d后不定芽的高度可达1 cm左右(图1-D、E)。由表1可知, 培养基中6-BA浓度的增减对叶柄不定芽的诱导影响显著, 当生长素浓度一定时, 随着6-BA浓度的升高, 叶柄出芽率及叶柄平均出芽数均先增后降; 当6-BA浓度一定时, 随着生长素IAA浓度的增加, 叶柄出芽率及叶柄平均出芽数均降低。玉米素ZT对油桐叶柄不定芽诱导效果较差, 其诱导率仅为5.62%。结果表明, 培养基A₂的叶柄出芽率及平均叶柄出芽数最高, 分别为91.67%及4.08, A₂与其他培养基有显著性差异。因此, 适合油桐叶柄诱导不定芽的最佳培养基为: 1/2MS+3.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.05 mg·L⁻¹ IAA。

2 不同植物生长调节剂对油桐叶柄不定芽的增殖

增殖系数是反映植物继代培养中培养物的增殖速度和效率, 也是植物组织培养快速繁殖的重要指标。将生长健壮的不定芽切割后转接到继代增殖培养基中(图1-F), 由表2可知, 培养基中单独加入6-BA即可使油桐叶柄不定芽增殖, 增殖系数最高可达2.94, 但增殖芽的长势不够健壮。在培养基中加入少量的IBA后, 增殖系数提高39.88%, 达到显著差异(图1-G、H)。可见, 细胞分裂素6-BA

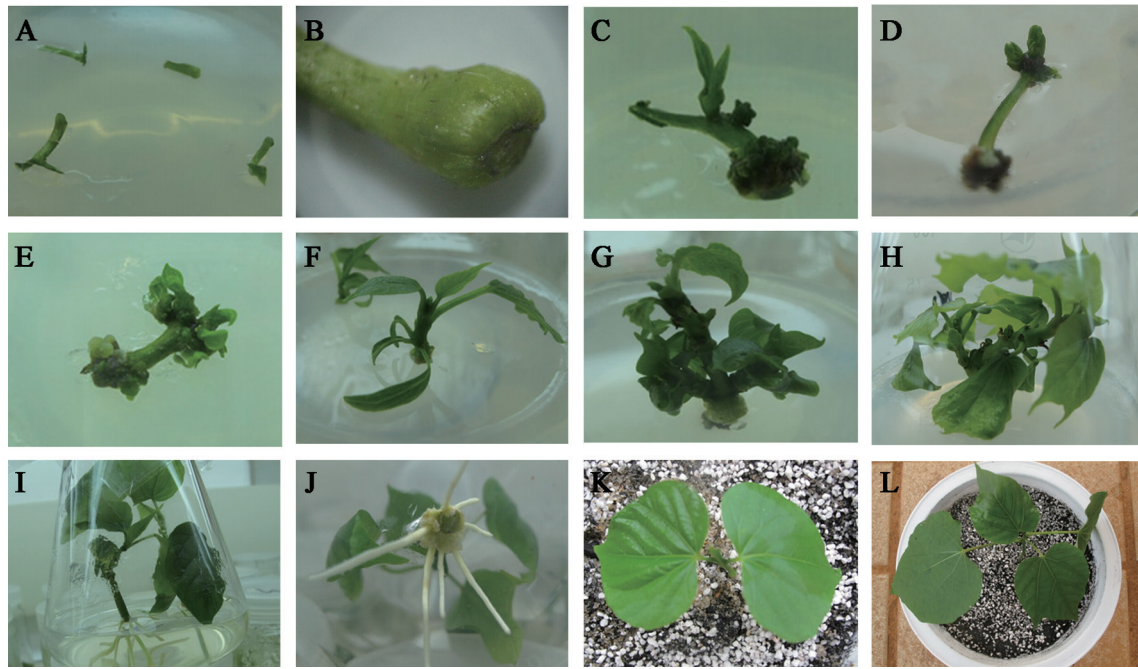


图1 油桐叶柄直接诱导不定芽与植株再生

Fig.1 Direct differentiation shoots from petioles and plant regeneration of tung tree

A: 叶柄不定芽诱导初期; B: 培养10 d后的叶柄; C: 叶柄培养30 d后的不定芽; D、E: 叶柄培养45 d后的不定芽; F: 不定芽继代培养初期; G: 不定芽增殖; H: 不定芽壮苗; I、J: 不定芽生根; K: 试管苗移栽; L: 移栽成活的试管苗。

表1 不同植物生长调节剂对油桐叶柄不定芽分化的影响

Table 1 Effects of different plant growth regulators on adventitious shoots induction from petiole of tung tree

编号	6-BA浓度/ mg·L ⁻¹	IAA浓度/ mg·L ⁻¹	ZT浓度/ mg·L ⁻¹	出芽率/%	叶柄平均 出芽数/个	生长情况
A ₁	1.0	0.05	0	53.46±3.16 ^{cd}	2.62±0.84 ^{bc}	不定芽长势弱, 不利于继代增殖
A ₂	3.0	0.05	0	91.67±2.37 ^a	4.08±0.79 ^a	不定芽长势健壮, 有利于继代增殖
A ₃	4.0	0.05	0	66.41±1.86 ^c	3.14±0.73 ^b	不定芽生长正常, 长势一般
A ₄	1.0	0.1	0	45.33±1.91 ^d	1.56±0.36 ^d	诱导率较低, 以单芽为主
A ₅	3.0	0.1	0	72.30±1.65 ^b	2.23±0.54 ^c	不定芽较健壮, 叶片较大
A ₆	4.0	0.1	0	58.34±2.78 ^c	2.11±0.51 ^c	不定芽生长不正常, 后期生长慢
A ₇	1.0	0.5	0	12.30±3.12 ^f	0.33±0.08 ^e	不定芽长势弱, 基部长少量愈伤
A ₈	3.0	0.5	0	22.91±2.04 ^e	0.49±0.12 ^e	芽体不健全, 生长后期死掉
A ₉	4.0	0.5	0	20.05±3.14 ^e	0.45±0.10 ^e	叶柄伤口处长不规则的叶片, 不定芽畸形, 后期不能继代增殖
A ₁₀	0	0.05	3.0	5.62±3.85 ^e	0.12±0.02 ^f	少数不定芽朝培养基中生长, 叶片卷曲, 不利于继代增殖
A ₁₁	0	0.1	3.0	0	0	叶柄变黄, 稍微带黑, 不能诱导出不定芽
A ₁₂	0	0.5	3.0	0	0	叶柄长黄白色的愈伤组织

表中数据为平均值, 同一列中不同字母表示数据差异显著($P<0.05$); 下表同此。

对油桐叶柄不定芽的增殖起主导作用, 而生长素 IBA 对不定芽的增殖起协同作用, 6-BA 和 IBA 浓度过高均不利于叶柄不定芽的增殖。因此, 适合油桐叶柄不定芽增殖的培养基为 1/2MS+3.0 mg·L⁻¹

6-BA+0.05 mg·L⁻¹ IBA+1.0 mg·L⁻¹ GA₃, 其增殖系数可达 4.89。在此过程中加入了 GA₃, 研究表明赤霉素对植物壮苗有重要作用, 在培养后期, 增殖的不定芽达 2 cm 高即可直接进行生根培养。

表2 不同植物生长调节剂对油桐叶柄不定芽增殖的影响
Table 2 Effects of different plant growth regulators on adventitious shoots proliferation from petiole of tung tree

编号	6-BA浓度/ mg·L ⁻¹	IBA浓度/ mg·L ⁻¹	GA ₃ 浓度/ mg·L ⁻¹	增殖系数
B ₁	2.0	0	1.0	1.75±0.41 ^e
B ₂	3.0	0	1.0	2.94±0.33 ^e
B ₃	5.0	0	1.0	2.19±0.31 ^d
B ₄	2.0	0.05	1.0	3.46±0.25 ^{bc}
B ₅	3.0	0.05	1.0	4.89±0.27 ^a
B ₆	5.0	0.05	1.0	4.03±0.36 ^b
B ₇	2.0	0.1	1.0	2.22±0.26 ^d
B ₈	3.0	0.1	1.0	3.67±0.39 ^b
B ₉	5.0	0.1	1.0	3.10±0.40 ^c

3 IBA及2,4-D对油桐生根的影响

将增殖培养基中2 cm左右的不定芽分单株接种到添加不同浓度生长素的培养基中(表3), 7 d后有白色的不定根产生(图1-I), 30 d后统计生根率、生根数、平均根长及根系生长情况(图1-J)。由表3可知, 在未加生长素的C₁组中, 油桐叶柄不定芽的生根率为0, 在添加了生长素IBA及2,4-D后, 不定芽均可生根, 但不同类别的生长素及浓度对不定芽的生根率及根系生长情况影响较大, IBA对油桐不定芽生根及根系生长情况要好于2,4-D, 2,4-D使得不定芽基部愈伤化严重, 且生根率低、生根数少, 不利于后期的炼苗移栽。当IBA的浓度在

表3 IBA和2,4-D对油桐诱导生根的影响
Table 3 Effects of IBA and 2,4-D on rooting of tung tree

编号	IBA浓度/mg·L ⁻¹	2,4-D浓度/mg·L ⁻¹	生根率/%	生根数/条	平均根长/cm	根系生长情况
C ₁	0	0	0	0	0	无根系产生
C ₂	0.05	0	96.18±1.21 ^a	9.53±0.85 ^a	3.32±1.36 ^b	根系颜色较白, 基部无愈伤产生
C ₃	0.1	0	90.83±1.36 ^a	9.26±0.89 ^a	3.26±1.24 ^b	根系颜色较白, 有少量愈伤产生
C ₄	0.5	0	78.09±2.32 ^b	5.64±1.21 ^b	2.67±1.06 ^c	根系偏绿, 基部长出大量的愈伤组织
C ₅	0	0.05	55.23±2.60 ^c	4.53±0.96 ^c	2.55±1.03 ^c	根系较细, 基部有少量的愈伤组织
C ₆	0	0.1	49.68±3.02 ^c	2.98±0.79 ^d	3.59±1.37 ^b	根系较绿, 基部产生愈伤组织
C ₇	0	0.5	38.21±3.95 ^d	1.06±0.64 ^e	4.66±1.45 ^a	根系较绿、较粗, 产生大量的愈伤组织

0.05~0.1 mg·L⁻¹时, 叶柄不定芽的生根率均可达90%以上, 试管苗生长快, 更有利于后期的炼苗移栽。

4 炼苗与移栽

将生根的油桐试管苗在湿度为60%~70%的人工气候箱中炼苗2~3 d后移栽在泥炭土:珍珠岩:黄土=2:1:1的基质中(图1-K), 总共移栽62株, 一个月后统计成活58株, 成活率达93.55%, 生长正常, 叶片较绿, 前期生长慢, 后期生长快, 有新叶长出(图1-L)。

讨 论

在植物离体培养过程中, 大部分植物都是先通过离体器官经过脱分化诱导愈伤组织, 再通过再分化形成不定芽(苗红梅等2012; 王梦亮等2014)。在植物离体再生过程中, 通过愈伤组织及体细胞胚胎发生途径获得的再生芽对外植体的依赖性强, 不利于后期的继代增殖(张常青等2005)。本试验在培养油桐叶柄的过程中没有通过愈伤组织诱导, 直接诱导出不定芽, 属于器官直接发生途

径。器官直接发生途径不仅具有培养周期短, 不经过愈伤组织诱导等优点, 而且可大大降低培养物在离体培养过程中发生遗传变异的可能性。

在不定芽诱导过程中, 本研究用6-BA、ZT及IAA三者组合试验, 6-BA对油桐叶柄直接诱导不定芽起主导作用, 生长素IAA起协同作用, 低浓度的6-BA及高浓度的生长素均不利于不定芽的直接再生。在不定芽诱导过程中, 加入玉米素ZT对不定芽的直接再生效果并不好, 只有低浓度的IAA与ZT才能诱导出不定芽, 浓度较高的IAA与细胞分裂素配合使用不能诱导出不定芽, 这与前人在其它植物中的研究有所差异(Huang和Dai 2011), 其原因可能是不同植物器官分化过程对植物生长调节剂的依赖性有所差异。6-BA是最常用的细胞分裂素, 价格较低, 可节约试管苗的成本, 适合油桐叶柄快速繁殖及遗传转化。在生根培养过程中使用IBA与2,4-D两种生长素, 由表3可知, IBA对油桐叶柄不定芽生根效果明显好于2,4-D的诱导效果, 2,4-D对愈伤组织诱导有重要作用, 虽然2,4-D也可

使油桐叶柄不定芽生根,但基部愈伤化严重,不利于后期的移栽炼苗,因此,适合油桐叶柄不定芽生根的生长素为IBA。

关于叶片与叶柄外植体再生不定芽的研究,廉玉姬等(2010)研究,叶柄分化不定芽的能力要高于叶片的,这主要是不同组织和器官的内源性植物生长调节剂和营养水平有所差异,从而影响了植物器官对外源性植物生长调节剂的响应。研究表明,油桐叶柄的分化能力较强,不定芽较叶片诱导的不定芽健壮,更有利于后期继代增殖培养及油桐的遗传体系转化的研究。Gahan和George(2008)研究表明,叶柄是茎中韧皮部和木质部的延伸,它是由一层或多层没有特定功能的薄壁细胞组成,这些细胞有较强的细胞分裂能力。这些薄壁细胞对植物生长调节剂和环境条件的变化非常敏感,因此,叶柄周围的薄壁细胞比其他细胞更容易分化成新的器官。

本研究通过直接器官发生途径成功建立了油桐叶柄高效可行的再生体系,不同种类植物生长调节剂的配比是诱导叶柄不定芽成功的关键,这使得通过生物技术的方法改良油桐的性状品质有了更进一步的进展。

参考文献

何方,胡芳名(2004).经济林栽培学.第2版.北京:中国林业出版社

- 胡芳名,谭晓风,刘惠民(2006).中国主要经济树种栽培与利用.北京:中国林业出版社
- 方嘉兴,何方(1998).中国油桐.北京:中国林业出版社
- 李泽,谭晓风,张琳,龙洪旭,袁军,范晓明,曾艳玲(2012).油桐种胚再生体系的建立.经济林研究,30(4):119~122
- 廉玉姬,赵小梅,林光哲(2010).朝鲜白头翁的组织培养与快繁技术.园艺学报,37(3):491~498
- 苗红梅,琚铭,魏利斌,马琴,张海洋(2012).芝麻愈伤组织诱导与植株再生体系的建立.植物学报,47(2):162~170
- 谭晓风,蒋桂雄,谭方友,周伟国,吕平会,罗克明,孙汉洲,王承南,马锦林,何桂林等(2011).我国油桐产业发展战略调查研究报告.经济林研究,29(3):1~5
- 谭晓风,李泽,张琳,龙洪旭,袁军,曾艳玲,林青(2013).油桐叶片愈伤组织诱导及植株再生.植物生理学报,49(11):1245~1249
- 王梦亮,张娜莎,郭婷婷,崔晋龙(2014).植物生长物质对大花红景天愈伤组织诱导及苗再生的影响.植物生理学报,50(2):192~196
- 王娜,刘孟军,秦子禹(2010).利用枣离体叶片直接再生完整植株.园艺学报,37(1):103~108
- 吴秀华,张艳玲,周月,罗克明,汤绍虎(2013).‘海沃德’猕猴桃叶片高频直接再生体系的建立.植物生理学报,49(8):759~763
- 张常青,洪波,王海琴,高俊平(2005).地被月季‘Royal Bassino’高频再生体系的建立.园艺学报,32(6):1065~1069
- Huang DQ, Dai WH (2011). Direct regeneration from *in vitro* leaf and petiole tissues of *Populus tremula* ‘Erecta’. Plant Cell Tiss Organ Cult, 107: 169~171
- Gahan PB, George EF (2008). Adventitious regeneration. In: George EF, Hall MA, De Klerk GJ (eds). Plant Propagation by Tissue Culture, 3rd edn. Dordrecht, the Netherlands: Springer, 335~402
- Nada S, Chennareddy S, Goldman S (2011). Direct shoot bud differentiation and plantlet regeneration from leaf and petiole explants of *Begonia tuberhybrida*. HortScience, 46(5): 759~764