

文章编号: 1001-1498(2005)05-0546-05

杂交鹅掌楸离体培养中器官发生的研究

田 敏, 李纪元, 范正琪

(中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400)

摘要:以杂交鹅掌楸的叶片、叶柄、无菌苗的茎段及其芽基部切段为外植体,进行愈伤组织途径的器官发生及不定芽途径的直接器官发生培养。结果表明,多种外植体在诱导培养基上均能脱分化产生愈伤组织,其中无菌苗芽基部具有最高的愈伤组织诱导率。愈伤组织在 $MS+6\text{-BA } 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $MS+6\text{-BA } 4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的分化培养基上能分化出不定芽。部分外植体在 $MS+6\text{-BA } 4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的分化培养基上直接分化产生不定芽。器官发生途径再生体系的建立为抗逆基因工程等工作奠定了基础。

关键词:杂交鹅掌楸;器官发生;愈伤组织

中图分类号: S722.3⁺7 **文献标识码:** A

Study on Organogenesis of *Liriodendron chinense* × *L. tulipifera*

TIAN Min, LI Ji-yuan, FAN Zheng-qi

(Research Institute of Subtropical Forestry, CAF, Fuyang 311400, Zhejiang, China)

Abstract: The organogenesis systems of *Liriodendron* hybrids were established by using the leaves, petioles, stem fragments and basal shoot fragments as explants. The results indicated that the callus could be induced from these explants on the inductive media, and the basal shoot fragment had the highest callus-inducing rate. The calli differentiated into shoot bud on the differentiation media $MS+6\text{-BA } 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and $MS+6\text{-BA } 4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, and some explants directly differentiated into shoot on the medium $MS+6\text{-BA } 4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. The organogenesis systems offered base for the molecular breeding.

Key words: *Liriodendron* hybrids; organogenesis; callus

鹅掌楸又称马褂木,属木兰科 (*Magnoliaceae*) 鹅掌楸属 (*Liriodendron* L.)。该属现仅存 2 个自然种: 鹅掌楸 (*Liriodendron chinense* (Hemsl.) Sarg) 和北美鹅掌楸 (*L. tulipifera* L.)。杂交鹅掌楸 (*L. chinense* × *L. tulipifera*) 是以鹅掌楸为母本, 北美鹅掌楸为父本的杂交第一代。它具有生长快, 抗性强, 杂交优势明显等特点, 已成为重要的城市绿化树种^[1]。由于鹅掌楸自身繁殖能力差, 自然结实率低^[2], 因此通过组织培养技术对其进行扩繁, 具有广阔的应用前景。以鹅掌楸种胚为材料, 通过体细胞胚胎发生途径获得再生植株方

法已较为成熟^[3~5], 而以其它组织或器官为材料的器官发生方面的研究还未见报道。本研究以杂交鹅掌楸的叶片、叶柄、无菌苗的茎段及其芽基部切段为外植体, 建立了直接器官发生和间接器官发生途径的实验体系, 不仅在大量无性繁殖植物上具有重要的应用价值, 而且为利用遗传转化技术对植物进行遗传改良奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

试验材料为 2 年生杂交鹅掌楸幼树, 在 3—7 月

收稿日期: 2004-09-21

基金项目: 浙江省科技厅重点项目 (2003C22011) 和中国林科院亚热带林业研究所青年科技发展基金项目 (2004) 的部分研究内容
作者简介: 田 敏 (1974—), 女, 河南延津人, 助理研究员。

份取当年春季抽出枝条上的腋芽、顶芽作为外植体培养无菌苗。取枝条上幼芽刚萌发的第一片叶的叶片与叶柄,及无菌苗的茎段与芽基部切段为外植体,进行愈伤组织诱导及不定芽的直接分化培养。

1.2 实验方法

将各种外植体用自来水冲洗 2 h 后蒸馏水冲洗 3 次,然后用 γ -75%乙醇浸泡 20 s, γ -10%的次氯酸钠表面灭菌 20 min,最后用无菌水冲洗 5~6 次。表面消毒后的腋芽及顶芽,用镊子剥除最外层的芽鳞片后接种于不同的生长培养基上诱导幼苗的萌发。表面消毒后的叶片或来自无菌苗的叶片切成 0.5 cm \times 0.5 cm 大小,叶柄、茎段切成 0.5 cm 的小段,茎段采用平放和插植两种方式,接种到 MS 附加各种激素组合的培养基上。

1.3 培养基

基本培养基有 MS 和 1/2MS₀ 添加 30 g \cdot L⁻¹蔗糖,8.0 g \cdot L⁻¹琼脂,10 mg \cdot L⁻¹PVP 和 10 mg \cdot L⁻¹抗坏血酸,1.0 g \cdot L⁻¹活性炭,以及不同的激素种类及浓度组合。

1.4 培养条件

芽外植体的生长、不定芽的分化培养于 25 \pm 16 h 光照 / 8 h 黑暗条件下;愈伤组织的诱导置于 16 h 光照或连续黑暗条件下。光照强度为 1 600~2 000 lx。

2 结果与分析

2.1 无菌苗的培养

芽生长培养基采用了 MS 和 1/2MS 2 种基本培养基,加入 3 种相同浓度的激素 (6-BA、KT、NAA),结果发现基本培养基对芽的生长状态没有明显影响,起决定作用的是植物生长调节剂。总的来说,无菌苗的生长状态基本上表现为 6 种情况 (表 1)。由表 1 可以看出,实验中用的生长素 (NAA) 对芽苗的生长无决定性影响,而细胞分裂素,特别是 6-BA 对芽苗生长的影响较为显著。在 6-BA 的质量浓度为 1.0~4.0 mg \cdot L⁻¹ 时,芽基部与培养基接触部位的愈伤化严重,20 d 后芽心黑死,芽苗不能正常生长,而且这种现象的发生频率与激素浓度成正相关。KT 对芽基部的愈伤化影响较小,但较高浓度仍不利于芽的生长。当细胞分裂素的质量浓度降到 0.5、0.2 mg \cdot L⁻¹ 时,芽苗茁壮生长,叶腋新芽萌发明显,整个芽苗长势好。而在无激素的培养基上,芽苗生长势较差,死亡率达到 50%。因此,一定浓度的植物生长调节剂对离体培养的芽生长是必需的,其中细胞分裂素的最适质量浓度为 0.1~0.5 mg \cdot L⁻¹, NAA 为 0.05~0.1 mg \cdot L⁻¹。

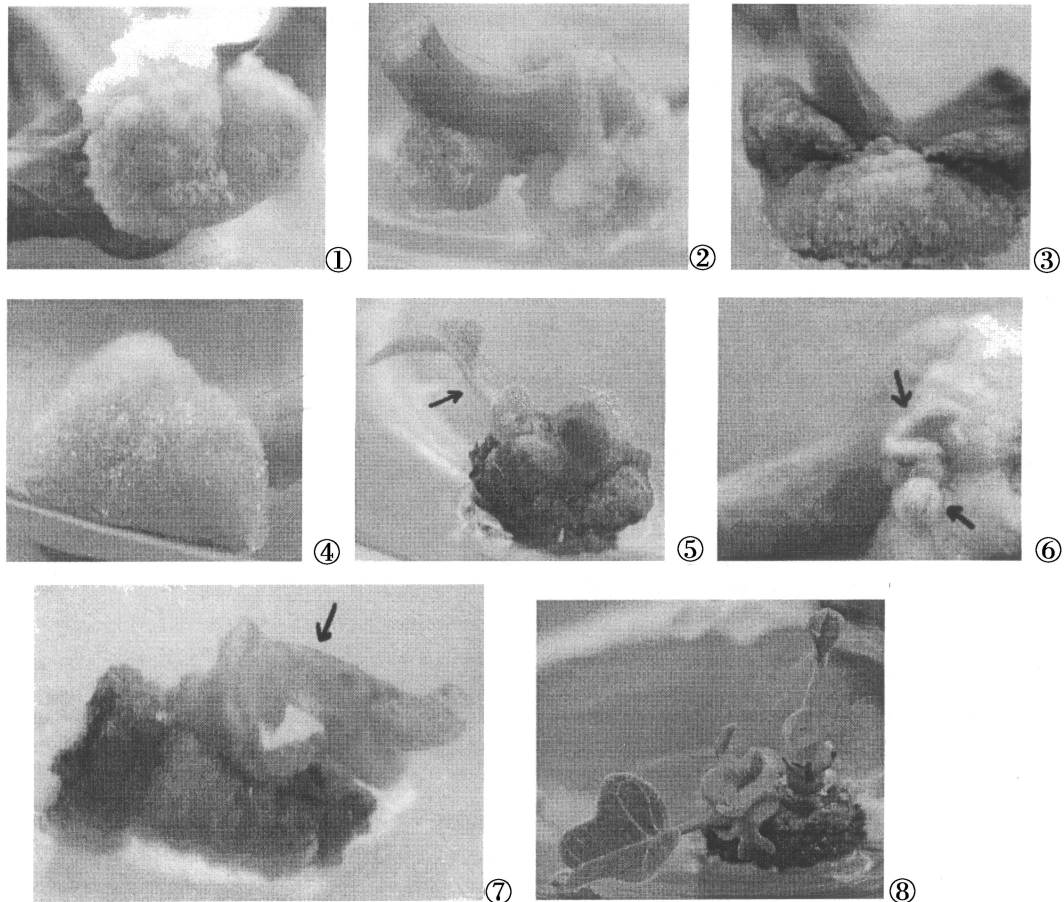
表 1 芽外植体在不同培养基上的生长情况

处理	激素 / (mg \cdot L ⁻¹)			生长状况
	6-BA	KT	NAA	
1	4.0		0.2	3 d 后外层芽鳞脱落,幼叶抽出向上生长,芽基部与培养基接触部位膨大,7 d 后边缘生出绿色愈伤组织,幼叶不再伸长生长,叶片卷曲。20 d 左右愈伤褐化,顶芽变黑死去。另外,芽基部膨大处萌出新芽、叶,形成芽簇,但多数愈伤化,小叶卷曲,脆化。(1)
2	4.0		0.5	
3	3.0		0.2	基本上同 (1),但约有 20% 的芽基部膨大程度较小,萌出的芽簇状态较好。顶芽不死,抽出的叶子向高外生长,20 d 后可继代芽苗。(2)
4	3.0		0.5	
5	2.0		0.2	芽基部与培养基接触处膨大,愈伤化。幼叶抽出,但伸长生长不明显。芽基部叶腋处有新芽萌发。20 d 后,约 60% 芽苗的顶芽黑死。(3)
6	2.0		0.5	
7	1.0		0.2	3 d 后幼叶抽出伸长,顶芽向上生长。20 d 后叶柄伸长可达 5~6 cm,叶片舒展、扩大,叶腋发出新芽。整株幼苗可达 4~5 cm。几乎无顶芽黑死现象。芽基部与培养基接触部分不膨大,无愈伤。(4)
8	1.0		0.5	
9	0.5		0.1	顶芽向上生长,幼叶抽出伸长,生长态势一般。与培养基接触部位膨大,有少量愈伤组织产生。(5)
10	0.3		0.1	
11	0.2		0.05	生长情况完全同 (4)。
12	0.1		0.05	
13		2.0	0.2	生长情况完全同 (4)。
14		2.0	0.5	
15		1.0	0.2	7 d 后外层芽鳞片裂开,幼叶向外伸出,向高处生长,但整个芽苗的生长势较差。20 d 后,45% 的芽苗出现叶黑、心死现象。基都不膨大,无愈伤。(6)
16		1.0	0.5	
17		0.5	0.1	7 d 后外层芽鳞片裂开,幼叶向外伸出,向高处生长,但整个芽苗的生长势较差。20 d 后,45% 的芽苗出现叶黑、心死现象。基都不膨大,无愈伤。(6)
18		0.3	0.1	
19		0.2	0.05	7 d 后外层芽鳞片裂开,幼叶向外伸出,向高处生长,但整个芽苗的生长势较差。20 d 后,45% 的芽苗出现叶黑、心死现象。基都不膨大,无愈伤。(6)
20		0.1	0.05	
21	0	0	0	7 d 后外层芽鳞片裂开,幼叶向外伸出,向高处生长,但整个芽苗的生长势较差。20 d 后,45% 的芽苗出现叶黑、心死现象。基都不膨大,无愈伤。(6)

2.2 愈伤组织途径的不定芽发生

2.2.1 愈伤组织的诱导 用来诱导愈伤组织的外植体有叶片、叶柄、茎段和芽基部,其中无菌苗芽基部具有最高的愈伤组织诱导率,叶柄次之,叶片最低(表 2)。叶片在表面消毒时,极易受到次氯酸钠的毒害而变黄,生活力下降,放在培养基上后多数变黑,较难脱分化,只有少部分叶片切口处能形成愈伤组织(图 1)。茎段平置于诱导培养基上,5~7 d后整个膨大变粗,与培养基接触处有愈伤组织出现(图

1)。芽基部 3~5 d后膨大,周围可见愈伤组织出现(图 1)。叶柄在含有 6-BA 和 NAA(或 2,4-D)的培养基上,一般表现为一端膨大或两端同时膨大,在切口外长出愈伤组织(图 1);少数表现为整个地均匀粗大,在叶柄段中间与培养基接触部位有小愈伤团出现。在含有 KT 和 NAA 激素组合的诱导培养基上,多数叶柄均匀地粗大,出愈率相对较低(表 3)。鉴于叶柄取材容易,且出愈率也较高,作者认为叶柄为愈伤组织诱导的最佳外植体。



叶片切口处产生绿色致密愈伤组织; 茎段与培养基接触部分产生淡绿色稍湿润愈伤组织; 芽基部产生绿色致密愈伤组织; 叶柄一端产生绿色致密愈伤组织; 愈伤组织分化出不定芽(箭头所示); 叶柄直接分化产生芽苞(箭头所示); 叶片直接产生不定芽(箭头所示); 无菌苗基部产生不定芽

图 1 杂交鹅掌楸愈伤组织的诱导及不定芽的分化

表 2 不同外植体愈伤组织的诱导情况

外植体	接种数/个	出愈数/个	愈伤诱导率/%
叶柄	90	55	61.1
叶片	90	13	14.4
茎段	90	47	52.2
无菌苗芽基部	90	76	84.4

注:诱导培养基均为 $MS + 6-BA 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + 2,4-D 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.2.2 愈伤组织诱导的影响因素 以叶柄为例,在多种诱导培养基上叶柄均能脱分化产生愈伤组织,且愈伤组织的诱导率与培养基中植物生长调节剂的含量有一定的相关性。在较低质量浓度的细胞分裂素($0.2, 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)和生长素($0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的培养基上,愈伤组织的诱导率相对较低(表 3)。说明叶柄的脱分化能力与外源激素的调控密切相关。

叶柄愈伤组织形态特征与培养基中细胞分裂素和生长素的相对含量有关。在含相对较高质量浓度 ($0.2 \sim 4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 细胞分裂素的培养基上,诱导产生的愈伤组织结构致密、紧实,而在生长素含量较高 ($2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的培养基上愈伤组织较松脆、湿润(表 3)。另外,光照对愈伤组织的诱导也有影响。

将置于 6-BA 和 2,4-D 激素组合培养基上的叶柄分为两组,一组在连续黑暗条件下培养,一组在 16 h 光照 / 8 h 黑暗下培养。结果发现,黑暗下诱导产生的愈伤组织为水湿状、乳白色,且随着 2,4-D 质量浓度的增加,愈伤组织的湿润程度增加,光下则较松脆,湿润度小。

表 3 激素对叶柄愈伤组织诱导的影响

激素组合 / ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)				外植体数 / 个	出愈数 / 个	愈伤诱导率 / %	愈伤组织形态
6-BA	KT	NAA	2,4-D				
4.0		0.5		78	47	60.3	致密、紧实、绿色
2.0		0.5		80	45	56.2	
1.0		0.5		68	31	45.6	
0.5		0.1		70	23	32.8	
0.2		0.1		70	21	30.0	
0.5		2.0		70	35	50.0	松脆、较湿润、浅绿色
1.0		2.0		70	39	55.7	色
	0.5	0.1		45	13	28.9	致密、紧实、绿色
	0.2	0.1		45	9	20.0	
0.5			1.0	50	22	44	湿润、松脆、浅白色
1.0			1.0	60	27	45.0	
0.5			2.0	90	55	61.1	
1.0			2.0	80	47	58.8	

注:以上培养条件均为 16 h 光照 / 8 h 黑暗,基本培养基为 MS。

2.2.3 愈伤组织的不定芽分化 将暗培养下的白色湿润愈伤团转移到分化培养基上,光下培养,一周后在白色愈伤团表面出现浅绿色颗粒状愈伤,这些浅绿色的愈伤颗粒逐渐长大,白色愈伤组织内部慢慢褐死。浅绿色的愈伤团接到含 6-BA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, NAA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MS 培养基上可进行增殖培养。

将生长状态良好的愈伤组织转移到分化培养基上,一周后观察,致密型的愈伤组织无明显变化,松脆、湿润的愈伤组织表面部分开始出现致密、深绿色的愈伤颗粒。3 周后,出现绿色芽点,芽点逐渐长大成幼苗,周围松脆湿润的愈伤变为浅褐色、水浸状并渐渐死去(图 1)。

2.2.4 激素对不定芽分化的影响 愈伤组织分化培养基所用的激素组合如表 4。由表可以看出,在较高 6-BA 含量的培养基上,愈伤组织的分化率较高,6-BA 质量浓度低于 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,不能刺激芽的分化。这说明较高浓度的细胞分裂素对分化是必需的。但同时发现,愈伤团在高浓度激素的培养基上容易褐化,而且分化产生的不定芽易玻璃化。研究发现,处理 5 能很好地解决这一问题,即在高浓度

6-BA 的培养基上培养 7 d,再将愈伤团转移到低浓度的培养基上继续分化培养,而且分化率也比处理 1 提高了 35.9%,比处理 2 提高了 103.4%。

表 4 激素对叶柄愈伤组织分化的影响

处理	激素组合 / ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	接种数 / 个	分化的愈伤组织数 / 个	分化率 / %
1	6-BA 4.0, NAA 0.5	42	11	26.2
2	6-BA 2.0, NAA 0.5	40	7	17.5
3	6-BA 1.0, NAA 0.2	39	0	0
4	6-BA 0.5, NAA 0.2	40	0	0
5	6-BA 4.0, NAA 0.5 (7d) + 6-BA 0.5, NAA 0.2	45	16	35.6

注:基本培养基为 MS。

2.3 外植体的直接不定芽发生

将叶柄、叶片、茎段、芽基部等外植体接种到 MS + 6-BA $4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基上后,约 20 d 后多数脱分化产生愈伤组织,但部分外植体则能直接分化产生不定芽,其中,无菌苗芽基部的不定芽发生率相对来说最高,可达到 20.8%,茎段次之,叶片分化率最低,只有 2.5%(表 5)。叶柄在膨大的一段分化出绿色的芽苞(图 1),芽苞逐渐长成幼苗;叶片膨大、脆化,表面分化产生子叶状

芽苗(图 1); 无菌苗芽基部首先膨大, 然后在膨大的基面上生出绿色的芽苗(图 1)。而茎段接种后的命运与其放置状态有关, 平放状态下多进行脱分化产生愈伤组织, 竖放状态下多进行不定芽的直接器官发生。

表 5 不同外植体不定芽的直接分化情况

外植体	接种数 / 个	芽发生外植体数 / 个	分化率 / %
叶柄	120	8	6.7
叶片	120	3	2.5
茎段	120	13	10.8
无菌苗芽基部	120	25	20.8

3 小结

离体器官发生是植物再生完整植株的最主要的方式之一^[6]。本研究建立了杂交鹅掌楸以叶柄等为外植体的器官发生系统, 较以种胚为材料的体细胞胚胎发生而言, 具有外植体来源广泛、取材方便、不受时间限制等优点, 拓宽了杂交鹅掌楸离体培养再生植株的获得途径。通过本研究, 可以得出以下结论: (1) 虽为遗传背景较为复杂的杂种树, 但在适当的培养基上, 杂交鹅掌楸的幼嫩外植体较易脱分化形成愈伤组织。本研究中 4 种外植体(叶柄、叶片、茎段及无菌苗芽基部)的愈伤诱导率分别为 61.1%、14.4%、52.2%和 84.4%(表 2), 由此可见, 外植体脱分化形成愈伤组织的能力次序为: 无菌苗芽基部 > 叶柄 > 茎段 > 叶片。(2) 本研究中得到的愈伤组织有 4 种类型: 绿色、致密、紧实; 浅绿色、松脆、较湿润; 浅白色、松脆、湿润(表 3); 乳白色、水湿状。这些不同类型愈伤组织的形成同培养的光照条件和激素种类及浓度有关, 与外植体的来源无太大关系, 即在相同的培养条件下不同的外植体产生相同类型的愈伤组织。(3) 细胞分裂素(6-BA)是诱导外植体脱分化和直接器官发生的关键因子, 高质量浓度的 6-BA(2.0~4.0 mg·L⁻¹)能促进愈伤组织的形成与不定芽的分化。

高频率器官发生途径的建立为转基因工作提供了良好的受体系统, 特别是直接器官发生途径, 不需要经过脱分化和再分化过程, 不仅能缩短培养周期, 提高转化频率和简化转化程序, 而且能避免体细胞变异, 可以保证杂交鹅掌楸的优良品质。本研究中的 4 种外植体均能直接分化产生不定芽, 其分化率分别为叶柄 6.7%, 叶片 2.5%, 茎段 10.8%, 无菌苗芽基部 20.8%(表 5), 这种杂交鹅掌楸离体培养中不定芽直接发生的再生方式属首次报道, 但分化频率较低, 需进一步改进。另外, 无菌苗芽基部切段在含激素的培养基上能够高频率地诱导愈伤组织和芽的形成, 其愈伤组织诱导率为 84.4%(表 2), 而且其愈伤组织和无菌苗在多个培养基上均能增殖, 其中愈伤组织的增殖培养基含有低质量浓度的 6-BA(0.2~0.5 mg·L⁻¹)和 NAA(0.1~0.2 mg·L⁻¹)或 6-BA(0.2~0.5 mg·L⁻¹)和 2,4-D(0.1~0.2 mg·L⁻¹), 无菌苗的增殖培养基含有低质量浓度的 6-BA(0.2~0.5 mg·L⁻¹)和 NAA(0.05~0.1 mg·L⁻¹)。这样就建立起有效的循环培养再生体系, 为快繁和抗逆基因工程等工作奠定了基础。

参考文献:

- [1] 濮香香. 杂种马褂木的繁殖方法的比较[J]. 江苏林业科技, 1999, 26(3): 46~47
- [2] 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
- [3] Merkle SA, Sommer H E. Somatic embryogenesis in tissue cultures of *Liriodendron tulipifera* L [J]. Canada Journal of Forest Research, 1986, 16: 420~422
- [4] Merkle SA, Hoey M T, Watson-Pauley B A, et al. Propagation of *Liriodendron* hybrids via somatic embryogenesis [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1993, 34: 191~198
- [5] 陈金慧, 施季森, 诸葛强, 等. 杂交鹅掌楸体细胞胚胎发生研究[J]. 林业科学, 2003, 39(4): 49~53
- [6] 谷瑞升, 蒋湘宁, 郭仲琛. 植物离体培养中器官发生调控机制的研究进展[J]. 植物学通报, 1999, 16(3): 238~244