

## 光叶楮叶片和叶柄再生体系的建立

郁萌萌<sup>1,2</sup>, 施国新<sup>1</sup>, 吕群丹<sup>2</sup>, 杨磊<sup>2</sup>, 唐仁杰<sup>2</sup>, 张洪霞<sup>2</sup>

(1 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210097; 2 中国科学院上海植物生理生态研究所, 上海 200032)

关键词: 光叶楮; 组织培养; 快繁;

中图分类号: S722.3 文献标识码: A

### *In vitro* Culture and Shoot Regeneration from Leaves and Petioles of *Broussonetia papyrifera*

YU Mengmeng<sup>1,2</sup>, SHI Guoxin<sup>1</sup>, LV Qundan<sup>2</sup>, YANG Lei<sup>2</sup>, TANG Renjie<sup>2</sup>, ZHANG Hongxia<sup>2</sup>

(1. College of Life Sciences Nanjing Normal University, Nanjing 210097, Jiangsu, China

2. Shanghai Institute of Plant Physiology and Ecology Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)

**Abstract** In this study, an efficient regeneration system of *Broussonetia papyrifera* was established. Using leaf disks and petiole fragments as explants, MS media supplemented with different concentrations of BA and NAA were investigated for shoot induction. Then regenerated shoots were transferred to MS medium containing 0~0.6 mg·L<sup>-1</sup> NAA to induce roots. A BA/NAA combination of 2.5/0.1 (mg·L<sup>-1</sup>) produced the highest percentage of regeneration with petiole explants and of 1.5/0.05 (mg·L<sup>-1</sup>) with leaf explants. The optimal medium for rooting was MS medium supplemented with 0.05 mg·L<sup>-1</sup> NAA.

**Key words** paper mulberry; tissue culture; plant regeneration

光叶楮 (*Broussonetia papyrifera* (L.) Vent.), 速生阔叶树种, 落叶乔木, 属桑科 (Moraceae), 构树属 (*Broussonetia*)。该树种适应性极强, 耐盐碱、干旱, 生长周期短, 且伐后可以萌生, 是近年来从日本引进的制浆造纸专用树种。光叶楮的树皮可生产特种纸; 树干可制纸和纤维板; 树叶可作饲料, 当年的生物产量可达到 22.5 t·hm<sup>-2</sup>。它不仅具有极高的经济价值, 而且还是一种可用于环境绿化和保持水土的优良树种。

目前光叶楮苗木的大量需求主要靠常规的无性扦插繁殖得以满足, 但由于其材料来源不足, 扦插成活率不高, 且费时费工, 难以满足当前大面积栽培及推广光叶楮优良品种的需要。李际红等<sup>[1]</sup>采用母株基部的茎段作外植体, 对其进行了组培快繁的研究, 孙天洲等<sup>[2]</sup>通过对光叶楮顶芽离体培养, 探索了其

快繁及生根的最佳培养条件。但是这些研究多集中在光叶楮组织快繁方面。如何以叶片和叶柄为外植体建立光叶楮高效再生体系, 目前国内外均未见报道。Bhatnagar<sup>[5]</sup>与 Kapur<sup>[6]</sup>等曾对桑树 (*Morus alba* L.) 叶片与叶柄的分化作了系统的研究。本文从光叶楮的叶片与叶柄外植体着手, 经过大量试验, 筛选出各阶段的最佳培养条件, 解决了光叶楮分化率低, 增殖缓慢, 生根困难等问题, 不仅为实现其快速无性繁殖、扩大种源生产、保存优良品种提供了一种行之有效的方法, 更重要的是, 为光叶楮的遗传转化及转基因品种改良打下了坚实的实验基础。

### 1 材料与amp;方法

#### 1.1 材料

供试材料为光叶楮组培苗, 叶片和叶柄取自

MS<sup>[4]</sup>培养基上生长 30 d 的组培苗。

## 1.2 培养方法

以 MS 为基本培养基, 琼脂粉  $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 蔗糖  $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 添加不同组合的植物激素, 调节 pH 值至 5.8。将叶片切割成 5 mm 见方的小块 (图 3A), 叶柄切成 5 mm 的小段 (图 3C), 接种于附加不同激素组合的分化培养基中, 每天光照 16 h 光照强度为  $2000 \sim 2500 \text{ lx}$ , 温度  $25 \sim 28 \text{ }^\circ\text{C}$ , 每两周更换一次培养基。当芽苗长至 1~2 cm 时, 置 MS 培养基上延长生长至 3 cm 左右, 转移到生根培养基中, 2~3 周从茎基部分化出根, 长成完整植株。开瓶炼苗 1 周, 洗净根部培养基, 移栽到经灭菌的营养土盆中, 30 d 后长成大苗。每次实验选取 40 个左右的外植体, 重复 3 次。

## 2 结果与分析

### 2.1 BA、NAA 的不同组合对叶片、叶柄分化的影响

预试验中, 我们曾选用 Z<sub>1</sub> TDZ、BA 比较促进分化的效果, 结果表明 BA 对光叶楮叶片、叶柄外植体的再生有较好的效果。这与前人的 BA 可以有效促进木本植物茎段外植体的分化<sup>[7]</sup>的观点一致。因此本实验在 MS 培养基中添加不同浓度的 BA、NAA 组合, 进一步探索分化配方。

将叶片、叶柄外植体接种到各分化培养基中, 培养 30 d 后, 对萌发不定芽数进行统计, 结果见表 1。运用 SAS 软件的 PROC FREQ 程序分析数据, 结果表明 BA 和 NAA 的不同浓度组合与叶片、叶柄分化率之间存在显著的相关性。( $p < 0.0001$ )

表 1 各种分化培养基对叶片叶柄不定芽再生的影响 (30 d)

激素 / ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )		叶片外植体		叶柄外植体	
BA	NAA	接种个数	再生率 / %	接种个数	再生率 / %
1.0	0.02	39	2.3	42	7.1
1.0	0.05	42	16.1	29	34.5
1.5	0.02	48	1.7	37	8.5
1.5	0.05	44	36.4	33	87.9
1.5	0.1	45	7.2	21	4.8
2.0	0.02	43	8.2	37	14.9
2.0	0.05	43	13.5	35	62.9
2.0	0.1	50	10.4	41	41.5
2.0	0.2	36	23.3	40	70
2.5	0.02	40	2.5	41	0
2.5	0.05	46	13.5	30	66.7
2.5	0.1	46	12	43	93
2.5	0.2	35	30.2	40	70
3.0	0.02	40	3.4	43	0
3.0	0.05	41	18.6	30	56.7
3.0	0.1	48	22.2	41	63.4

叶片最佳分化培养基为 MS+ BA  $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  + NAA  $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 此时的最高分化率达 36.4%。叶片外植体接种于分化培养基上 20 d 左右, 组块边缘伤口处可见少而小的绿色愈伤组织, 约 30 d 后, 有绿色芽点生成, 逐渐分化出芽。每个叶片外植体一般只能分化出一个芽 (图 3B)。叶柄外植体的再生能力明显强于叶片: 当 BA  $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , NAA  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 叶柄的分化率高达 93%。叶柄接种两周左右, 两端切口处可见绿色愈伤组织, 3 周左右愈伤组织中分化出小芽, 4 周时芽的分化达到高峰 (图 3D)。一般叶柄两端均可分化出芽, 每个再生叶柄分化芽数为 1~4 个不等。

### 2.2 硝酸银对外植体褐化的影响

外植体褐化是木本植物组织培养过程中容易出现的问题。外植体的褐化, 除了会导致自身死亡外, 还向培养基中分泌褐色物质, 影响其它外植体的分化。防止外植体的褐化是木本植物组织培养成功的关键之一。本试验参照钟名其等<sup>[3]</sup>的研究结果, 采用硝酸银为抗酚类氧化剂, 添加至培养基中, 培养 20 d 后观察外植体的褐化率。结果如下 (见图 1):

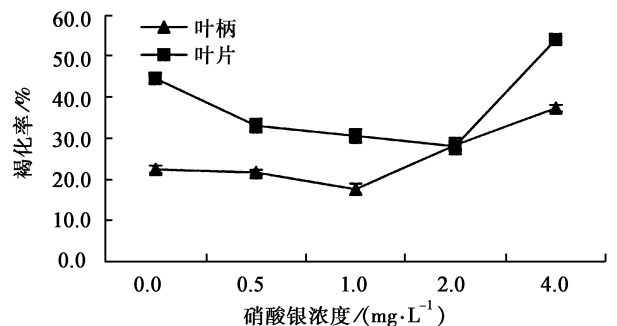


图 1 硝酸银对外植体褐化的影响

从图 1 看出: 在培养基中加入适量的硝酸银可以显著地减少光叶楮叶片、叶柄外植体的褐化。然而, 不同的外植体对硝酸银的敏感程度不同: 叶片的最佳浓度在  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 叶柄最佳浓度在  $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。这可能是由于叶片本身褐化程度较叶柄严重, 因此需加入的硝酸银浓度也较叶柄的高些。但在硝酸银浓度过高时, 无论叶片、叶柄, 均表现出严重褐化死亡、再生率大大降低的现象。这可能是因为高浓度的银离子对外植体产生了重金属胁迫, 从而影响了外植体的分化与发育。

### 2.3 MS 1/2MS 中添加不同浓度的 NAA 对植株生根的影响

将长势较为一致的高约 3 cm 左右的试管苗切

下, 接种到分别以 MS、1/2MS 为基本培养基, 添加不同浓度 NAA 的生根培养基中。实验结果见图 2。

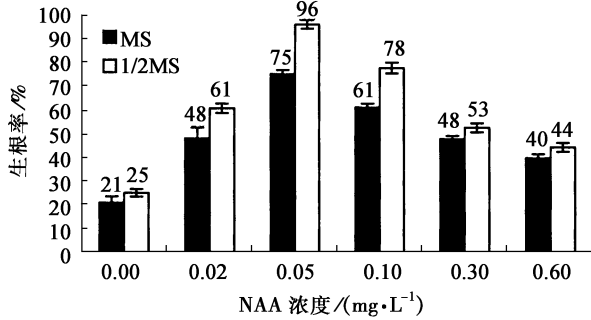


图 2 MS、1/2MS 中添加不同浓度 NAA 对植株生根的影响

较低水平的 NAA 能有效促进根的发育。0.05~0.1 mg·L<sup>-1</sup> 的 NAA 约一周时间就能诱

导根突萌发 (图 3E), 且所生的根分布均匀, 侧根发达。而高浓度的 NAA 非但不能有效促进根的发育, 反而对其有抑制作用。若 NAA 浓度很低, 如 0~0.02 mg·L<sup>-1</sup>, 虽然所生的根愈伤很少, 但根的始萌发时间偏长, 分布不均, 且根细长。另一方面, 较低浓度的无机盐水平也有利于根的形成。在各种 NAA 的浓度下, 1/2MS 培养基的生根效果均明显优于 MS 培养基。1/2MS 培养基上不仅光叶楮幼苗生根率较高, 而且生根时间平均短于 MS 培养基 4~6 d, 根长而粗壮, 这可能与高浓度的无机盐对根发生的抑制作用有关。综合两方面的因素, 在 1/2MS 培养基中添加 0.05 mg·L<sup>-1</sup> NAA, 生根效果最佳。

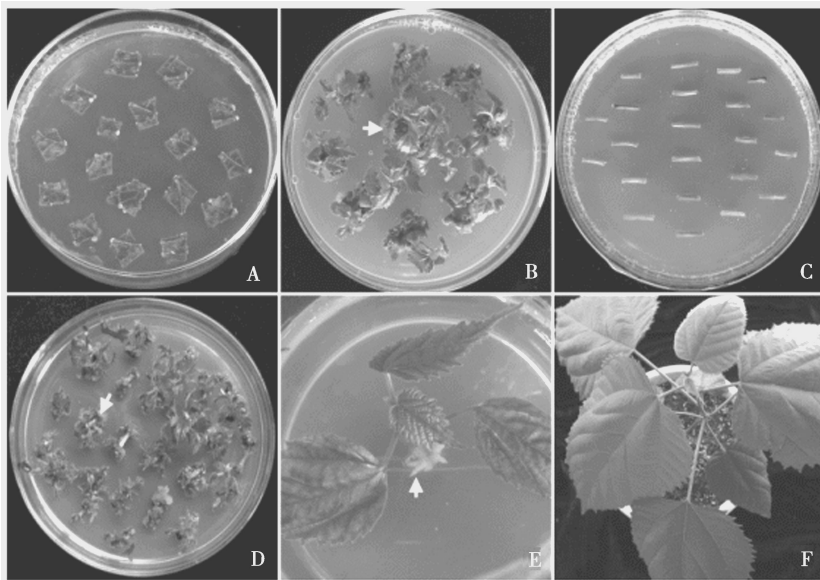


图 3 A. 叶片外植体置于分化培养基上; B. 30 d 后从叶柄边缘分化出不定芽; C. 叶柄外植体置于分化培养基上; D. 30 d 后从叶柄两端分化出不定芽; E. 无根小苗在生根培养基中 15 d 后开始生根; F. 移栽至花盆中 30 d 后

## 2.4 试管苗炼苗移栽

当试管苗长至 5 cm 左右, 并有数条根时, 即可进行炼苗。打开瓶盖炼苗一周左右, 将生根试管苗小心地从培养瓶中取出, 用水洗净根部残留的培养基, 栽入经灭菌的营养土盆中 (图 3F)。

试管生根苗在移栽前需要一个开瓶炼苗的过程, 锻炼后植株成活率高, 长势较好。光叶楮试管苗在过渡移栽中需要注意缓和蒸腾过速与增强光照与温度的矛盾。不同光照和温度条件下的锻炼对试管苗的形态有明显的影响。强光高温 (3 500 lx, 28 ℃) 下试管苗根系发达, 幼茎组织充实, 叶片大而绿,

植株挺拔有活力; 而弱光低温 (2 000 lx, 15 ℃) 下的试管苗根系生长较慢, 茎较幼嫩, 叶片不发达, 植株生活力较差。试管苗根系大小, 叶片的光合能力以及维管组织的发育与充实程度与其对外界环境适应能力密切相关, 适当的强光高温锻炼后的试管苗自身抗性增强, 保护组织完善, 成活率高达 91.6%, 而未经锻炼的试管苗从培养室的培养条件下直接过渡移栽, 成活率仅为 48.4%。

## 3 讨论

以叶片、叶柄为外植体进行组织培养, 经短时间

的愈伤化直接分化出芽,这是一条便捷的再生途径。

实验中发现,相同的激素配比,对叶片和叶柄不定芽的诱导存在很大的差异。无论从不定芽萌发所需时间,还是再生率看,叶柄的再生能力明显比叶片强,这可能与叶片和叶柄的易褐化程度不同及二者的内源激素含量、利用能力存在差异有关。在 BA  $1.5 \sim 3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , NAA  $0.05 \sim 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的浓度范围内,均能诱导叶柄产生不定芽。尤其在 BA  $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , NAA  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时再生率达 93%,所生的芽均为丛生芽。

叶片外植体一般只能分化一个芽,但所生的芽非常健壮,生命力旺盛,这可能与叶片外植体与培养基之间接触面积较大、营养吸收更充分有关。此外,虽然叶片外植体的再生率较低,最高仅为 36%,但因其叶片较大,取材方便,亦不失为一种良好的组培材料。

本研究建立了光叶楮叶柄、叶片的高效再生系统。并探索了硝酸银在减轻光叶楮外植体褐化方面的作用。该技术体系的建立不仅有助于我们实现光叶楮大规模种植的产业化,同时也为将外源基因导

入该树种,进行分子育种方面的研究,实现其种质资源的改良打下了坚实的基础。

#### 参考文献:

- [1] 李际红,孟凡志,邵小杰,等. 光叶楮组织快繁技术的研究[J]. 山东林业科技, 2002(4): 13~ 15
- [2] 孙天洲,王清海. 日本光叶楮组织培养技术[J]. 农业科技开发, 2004, 18(5): 59~ 60
- [3] 钟名其,楼程富,谈建中,等. 硝酸银对桑树遗传转化的作用[J]. 热带亚热带植物学报, 2002, 10(1): 74~ 76
- [4] Skoog E, Miller C O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues culture *in vitro* [J]. Symp Soc Exp Biol 1957 (11): 118~ 131
- [5] Bhatnager S, Kapur A, Khurana P. TDZ mediated differentiation in commercially valuable Indian mulberry, *Morus indica* cultivars K2 and DD [J]. Plant Biotechnol 2000, 18: 6~ 65
- [6] Kapur A, Bhatnagar S, Khurana P. Efficient regeneration from mature leaf explants of Indian mulberry via organogenesis [J]. Sericologia 2001, 41: 207~ 214
- [7] Aiken-Christie J, Connett M B. Micropropagation of Forest Trees for Genetic Improvement [A]. In Kurata K, Kozai T. Transplant Production Systems [M]. Kluwer Press 1992 163~ 194