

同源四倍体台湾泡桐体外植株再生系统的建立

张变莉¹,王 杨²,刘荣宁¹,范国强^{2*}

(1. 河南农业职业学院,河南 中牟 451450; 2. 河南农业大学 泡桐研究所,河南 郑州 450002)

摘要:以同源四倍体台湾泡桐叶片和叶柄为外植体,将其分别置于含有不同植物生长调节剂及其不同质量浓度(0.1~1.1 mg/L NAA 和 6~20 mg/L 6-BA)的组合培养基上诱导再生植株,筛选最佳外植体和最适培养基,建立体外植株再生系统。结果表明,同源四倍体台湾泡桐体外植株再生的最佳外植体是叶片;其愈伤组织诱导的最适培养基为 MS+0.1 mg/L NAA+14 mg/L 6-BA;芽分化的最适培养基为 MS+0.3 mg/L NAA+16 mg/L 6-BA;幼芽生根的最适培养基为 1/2MS+0.1 mg/L NAA。

关键词:台湾泡桐;同源四倍体;体外植株再生
中图分类号: S792.43 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2015)07-0119-05

Establishment of Plantlet Regeneration System of
Autotetraploid *Paulownia kawakamii* in Vitro

ZHANG Bianli¹, WANG Yang², LIU Rongning¹, FAN Guoqiang^{2*}

(1. Henan Vocational College of Agriculture, Zhongmu 451450, China; 2. Institute of Paulownia, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: The leaves and petiole of autotetraploid *Paulownia kawakamii* were placed on media with different hormones and concentrations (0.1—1.1 mg/L NAA, 6—20 mg/L 6-BA), so as to screen the optimal explants and media, and establish the plantlet regeneration system *in vitro*. The results indicated that the leaves were the optimal explants for plantlet regeneration of autotetraploid *Paulownia kawakamii* *in vitro*. Moreover, the optimal media for callus induction from *Paulownia kawakamii* was MS+0.1 mg/L NAA+14 mg/L 6-BA, the optimal media for shoot differentiation was MS+0.3 mg/L NAA+16 mg/L 6-BA, and the optimal rooting media was 1/2MS+0.1 mg/L NAA.

Key words: *Paulownia kawakamii*; autotetraploid; plantlet regeneration *in vitro*

泡桐 (*Paulownia* spp.) 是中国重要的速生用材、农田防护林和庭院绿化树种,因具有材质优良和用途广泛等优点,而深受广大林农的欢迎。大量种植泡桐对改善生态环境、缓解目前中国木材短缺局面和提高农民生活水平具有重要意义。但由于泡桐种质资源贫乏而造成现有品种存在的丛枝病发生严重和低于大冠等问题给林业生产造成了巨大损失。具有 2 套以上完整染色体组的植物称为多倍体植物。由于其染色体的增加使植株生物量增大,各部

分均呈现“巨大性”,株体健壮、长势强、叶厚、果大、次生代谢产物增加,营养物质含量增加;并且多倍体能更好地抵抗不良环境的影响,具有较好的环境适应性和抗逆能力^[1-2]。因此,开展泡桐多倍体研究对解决泡桐目前存在的问题具有重要的理论和经济意义。平吉功^[3]曾用毛泡桐种子进行四倍体诱导研究,但因诱导率低而没有保存诱导出的植株。近年来,成功诱导了同源四倍体兰考泡桐、白花泡桐、南方泡桐、豫杂一号泡桐、毛泡桐等植株,并建立了

收稿日期:2015-03-20
基金项目:河南省杰出人才创新基金项目(321001700);河南省高校杰出科研人才工程基金项目(2002KYC-003)
作者简介:张变莉(1982-),女,河南通许人,讲师,硕士,主要从事园林绿化及林木生物技术的教学和科研。
E-mail:kfzbl@163.com
* 通讯作者:范国强(1964-),男,河南禹州人,教授,博士,主要从事泡桐生物技术的研究。E-mail:gqfan@henau.edu.cn

其体外植株再生系统^[4-10]。但目前国内外有关四倍体台湾泡桐体外植株再生的研究未见报道。为了快速繁育四倍体泡桐幼苗、扩大泡桐种质资源和培育泡桐新品种,以同源四倍体台湾泡桐组培苗叶片和叶柄为试验材料,研究不同植物生长调节剂及其质量浓度对其愈伤组织诱导和芽分化的影响,筛选最佳外植体和最适培养基,建立体外植株再生系统,以期为同源四倍体台湾泡桐的推广应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

材料为河南农业大学泡桐研究所培育出生长 30 d 的同源四倍体台湾泡桐 (*Paulownia kawakamii*) 组培苗的叶片和叶柄。

1.2 试验方法

1.2.1 最佳外植体的筛选 将培养 30 d 的同源四倍体台湾泡桐组培苗的叶片切成约 1.0 cm × 1.0 cm 的小块,叶柄剪成 1 cm 小段(外植体),放入装有 40 mL 附加 0.1 ~ 1.1 mg/L NAA 和 6、12、20 mg/L 的 6-BA(表 1)的 MS 培养基(蔗糖 25 g/L、琼脂粉 3.0 g/L、聚乙烯吡咯烷酮 1 g/L)的 100 mL 三角瓶中,在温度(25 ± 2)℃、光照强度 130 μmol/(m² · s)、光照时间 16 h/d 的培养室内进行其愈伤组织的诱导。每个组合接种 20 瓶,每瓶放入 3 个外植体。20 d 后,统计不同外植体的愈伤组织诱导率。并根据愈伤组织诱导率和愈伤组织生长的情况,确定最佳外植体。愈伤组织诱导率 = (诱导出愈伤组织的外植体数/接种外植体总数) × 100%。

表 1 植物生长调节剂质量浓度组合 mg/L

组合编号	NAA	6-BA
1	0.1	6
2	0.1	12
3	0.1	20
4	0.3	6
5	0.3	12
6	0.3	20
7	0.5	6
8	0.5	12
9	0.5	20
10	0.7	6
11	0.7	12
12	0.7	20
13	0.9	6
14	0.9	12
15	0.9	20
16	1.1	6
17	1.1	12
18	1.1	20

1.2.2 同源四倍体台湾泡桐叶片愈伤组织诱导培养基的筛选 将筛选出的最佳外植体按照 1.2.1 的方法接入附加有植物生长调节剂(0.1 ~ 1.1 mg/L NAA 和 6 ~ 20 mg/L 6-BA)的 MS 培养基中,在上述温度和光照条件下进行愈伤组织的诱导。每个组合 20 瓶,每瓶 3 个外植体,20 d 时,根据愈伤组织诱导率、愈伤组织的颜色状态等,确定愈伤组织诱导的最适培养基。

1.2.3 同源四倍体台湾泡桐芽分化培养基的筛选

将筛选出的最佳外植体在其最适培养基上诱导出的愈伤组织切成约 1.0 cm³ 的小块,放在附加有不同质量浓度植物生长调节剂(0.1 ~ 1.1 mg/L NAA 和 6 ~ 20 mg/L 6-BA)的 MS 培养基上,在上述温度和光照条件下诱导愈伤组织进行芽分化。每个组合接种 20 瓶,每瓶 3 块愈伤组织,继续培养 20 d,观察芽分化情况,并统计其芽分化率,以确定芽分化的最适培养基。芽分化率 = 分化出芽外植体数/接种愈伤组织块数 × 100%。

1.2.4 同源四倍体台湾泡桐根诱导培养基的筛选

将在芽分化最适培养基上诱导出的长约 4 cm 的幼芽从茎基部剪下转移到盛有 30 mL 含 0 ~ 0.5 mg/L NAA 的 1/2MS 培养基(蔗糖和琼脂质量浓度分别为 25、3.0 g/L)的 100 mL 三角瓶中,在上述光照条件下进行根的诱导。20 d 观察其生根情况,计算根诱导率,筛选出最适生根培养基。根诱导率 = 生根的幼芽个数/接种幼芽总数 × 100%。

1.2.5 同源四倍体台湾泡桐幼苗移栽 3 月下旬至 4 月下旬,挑选出生长健壮、长势齐整、根系生长良好并且长度在 3 cm 以上的组培苗进行移栽。移栽前去掉三角瓶塞,先在室内强光下锻炼 7 d,然后移至室外生长 10 d,最后小心取出组培苗,用清水洗去沾在根系上的培养基,在 1% 多菌灵溶液中浸泡 1 min。再将幼苗移栽到经 1% KMnO₄ 消毒处理后的泥炭土和珍珠岩混合(3:1)的基质中生长。20 d 后移至盛有肥沃土壤的大花盆中,放在室外观察其生长状况。为避免太阳光直接照射,应选择少风的阴雨天移栽,注意保温、保湿。

1.3 试验数据处理

愈伤组织诱导率、芽分化率和根诱导率经反正弦转换后,采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析并用 LSR 进行多重比较。

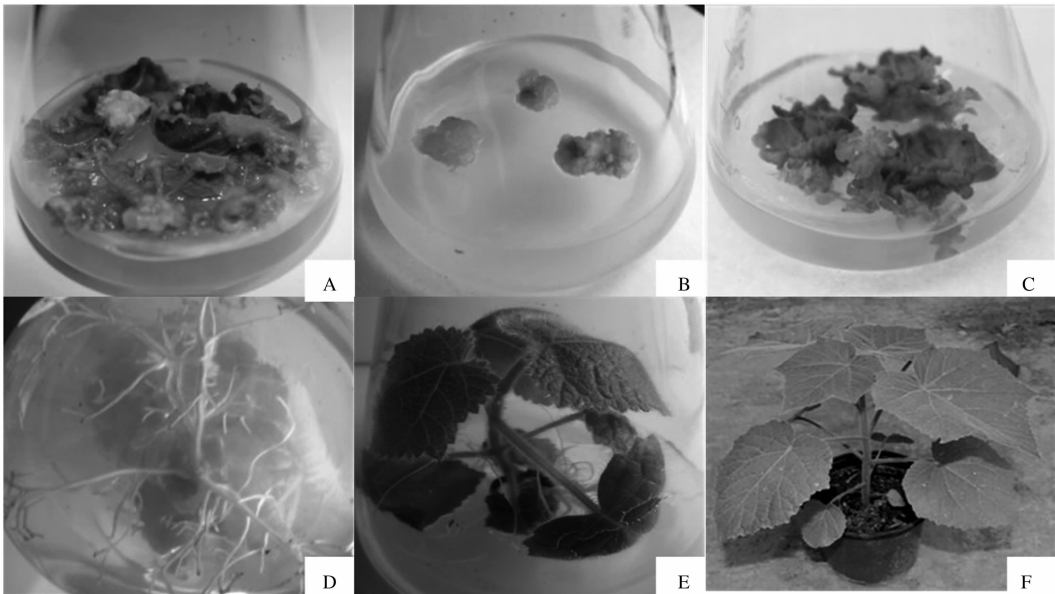
2 结果与分析

2.1 同源四倍体台湾泡桐最佳外植体的筛选

从图 1 和表 2 可以看出,在不同质量浓度植物

生长调节剂下,同源四倍体台湾泡桐叶片愈伤组织的诱导率均高于叶柄,且叶片愈伤组织的最高诱导率为 90.00% (组合 2、组合 11),而叶柄的仅为 60.00% (组合 5)。叶片愈伤组织大部分在培养 6 d 出现绿色米粒状愈伤组织,结构紧实致密(图 1 - A),

而叶柄的愈伤组织在 10 d 后出现(图 1 - B),较叶片愈伤组织出现的晚,且组合 12、13、15、16 产生的愈伤组织呈现白色松散的现象,在后续的培养中极易褐化死亡。综上所述,选用叶片作为同源四倍体台湾泡桐的最佳外植体。



A. 叶片愈伤组织; B. 叶柄愈伤组织; C. 叶片愈伤组织芽的分化; D. 幼芽生根; E. 幼苗; F. 移栽后的幼苗

图 1 台湾泡桐同源四倍体体外植株的再生

表 2 不同植物生长调节剂组合对 2 种外植体愈伤组织诱导率的影响			%
组合编号	叶片	叶柄	
1	60.00	10.00	
2	90.00	40.00	
3	76.67	23.33	
4	70.00	10.00	
5	86.67	60.00	
6	86.67	23.33	
7	63.33	20.00	
8	80.00	56.67	
9	73.33	40.00	
10	43.33	16.67	
11	90.00	33.33	
12	50.00	10.00	
13	53.33	10.00	
14	76.67	36.67	
15	63.33	6.67	
16	36.67	10.00	
17	70.00	56.67	
18	50.00	16.67	

2.2 不同植物生长调节剂组合对同源四倍体台湾泡桐叶片愈伤组织诱导率的影响

由表 3 可以看出,叶片在不同植物生长调节剂组合的培养基上的愈伤组织诱导率存在一定差异,

当 NAA 质量浓度一定时,随 6 - BA 质量浓度的增加,叶片愈伤组织诱导率总体呈现出先上升后下降的趋势。当 NAA 质量浓度为 0.1、0.3、0.5 mg/L 时,叶片愈伤组织诱导率最大值分别出现在组合 5 (MS + 0.1 mg/L NAA + 14 mg/L 6 - BA (简称 MS + 0.1 NAA + 14 6 - BA,下同))、组合 14 (MS + 0.3 NAA + 16 6 - BA)和组合 23 (MS + 0.5 NAA + 18 6 - BA),分别为 100.00%、100.00% 和 90.00%。当 NAA 质量浓度为 0.7、0.9、1.1 mg/L 时,叶片愈伤组织诱导率最大值分别出现在组合 28 (MS + 0.7 NAA + 12 6 - BA)、组合 39 (MS + 0.9 NAA + 18 6 - BA)和组合 46 (MS + 1.1 NAA + 16 6 - BA),分别为 90.00%、100.00% 和 93.33%。当 NAA 为 1.1 mg/L、6 - BA 为 6 mg/L 时,愈伤组织诱导率在 48 个组合中最低,为36.67%。6 - BA 质量浓度越低,叶片愈伤组织的褐化率越高,诱导率较低;而 6 - BA 质量浓度较高时,愈伤组织呈现白色松散状态,不利于以后芽的分化。当 NAA 质量浓度较低时,叶片愈伤组织生长较慢,质量浓度高时又会抑制它的生长。由表 4 可以看出,NAA、6 - BA 均对叶片愈伤组织诱导率造成了极显著的影响,NAA 与 6 - BA 的交互作用也极显著。

表 3 不同植物生长调节剂组合对同源四倍体台湾泡桐叶片愈伤组织诱导率和芽分化率的影响

组合编号	NAA/ (mg/L)	6-BA/ (mg/L)	愈伤组织 诱导率/%	芽分化率/%
1	0.1	6	60.00ghijk	26.67hijkl
2	0.1	8	70.00defghij	36.67ghijk
3	0.1	10	66.67efghij	33.33ghijkl
4	0.1	12	90.00abcd	50.00defg
5	0.1	14	100.00a	83.33ab
6	0.1	16	96.67ab	70.00abcd
7	0.1	18	93.33abc	60.00cdef
8	0.1	20	76.67bcdefgh	40.00efghi
9	0.3	6	70.00defghij	36.67ghijk
10	0.3	8	70.00defghij	40.00efghi
11	0.3	10	76.67bcdefgh	36.67ghijk
12	0.3	12	86.67abcde	50.00defg
13	0.3	14	90.00abcd	50.00defg
14	0.3	16	100.00a	90.00a
15	0.3	18	90.00abcd	76.67abc
16	0.3	20	86.67abcde	50.00defg
17	0.5	6	63.33fghijk	16.67kl
18	0.5	8	60.00ghijk	33.33ghijkl
19	0.5	10	76.67bcdefgh	26.67hijkl
20	0.5	12	80.00abcdefg	33.33ghijkl
21	0.5	14	63.33fghijk	40.00efghi
22	0.5	16	60.00ghijk	46.67efgh
23	0.5	18	90.00abcd	63.33bcde
24	0.5	20	73.33cdefghi	46.67efgh
25	0.7	6	43.33kl	20.00jkl
26	0.7	8	53.33ijkl	30.00ghijkl
27	0.7	10	73.33cdefghi	43.33efghi
28	0.7	12	90.00abcd	63.33bcde
29	0.7	14	83.33abcdef	43.33efghi
30	0.7	16	70.00defghij	46.67efgh
31	0.7	18	56.67hijkl	33.33ghijkl
32	0.7	20	50.00jkl	26.67hijkl
33	0.9	6	53.33ijkl	33.33ghijkl
34	0.9	8	73.33cdefghi	50.00defg
35	0.9	10	63.33fghijk	30.00ghijkl
36	0.9	12	76.67bcdefgh	60.00cdef
37	0.9	14	93.33abc	70.00abcd
38	0.9	16	96.67ab	80.00abc
39	0.9	18	100.00a	70.00abcd
40	0.9	20	63.33fghijk	50.00defg
41	1.1	6	36.67l	13.33l
42	1.1	8	43.33kl	16.67kl
43	1.1	10	63.33fghijk	30.00ghijkl
44	1.1	12	70.00defghij	43.33efghi
45	1.1	14	80.00abcdefg	46.67efgh
46	1.1	16	93.33abc	73.33abc
47	1.1	18	70.00defghij	46.67efgh
48	1.1	20	50.00jkl	23.33ijkl

注:同列后不同字母表示在 0.05 水平上差异显著。

表 4 同源四倍体台湾泡桐叶片愈伤组织诱导的方差分析

方差来源	愈伤组织诱导率/%		芽分化率/%	
	MS	F	MS	F
NAA	1 184.907	13.835 **	1 175.556	14.936 **
6-BA	1 758.664	20.534 **	2 627.249	33.382 **
NAA×6-BA	213.267	2.491 **	222.963	2.833 **

注: * 表示 0.01 ≤ P < 0.05; ** 表示 0.001 ≤ P < 0.01。

综上所述,组合 5、组合 14、组合 39 的叶片愈伤组织诱导率均为 100.00%,但考虑到上述愈伤组织形态、质地及分化芽的能力等因素,选择组合 5(MS + 0.1 mg/L NAA + 14 mg/L 6-BA)为同源四倍体台湾泡桐叶片愈伤组织诱导最适培养基。

2.3 不同植物生长调节剂组合对同源四倍体台湾泡桐愈伤组织芽分化率的影响

同源四倍体台湾泡桐幼苗愈伤组织芽的分化结果(表 3)表明,在不同植物生长调节剂组合的培养基上,芽分化率存在一定差异。当 NAA 质量浓度分别为 0.1(组合 1—8)、0.3(组合 9—16)、0.5(组合 17—24)、0.7(组合 25—32)、0.9(组合 33—40)、1.1(组合 41—48)mg/L 时,芽分化率最高分别达到 83.33%(组合 5)、90.00%(组合 14)、63.33%(组合 23)、63.33%(组合 28)、80.00%(组合 38)、73.33%(组合 46)。由方差分析结果(表 4)可以看出,NAA、6-BA 对 2 种泡桐芽分化率有极显著的影响,并且 NAA 与 6-BA 的交互作用也极显著。综上所述,考虑同源四倍体台湾泡桐愈伤组织分化出芽的数量和生长状态、植物生长调节剂使用量等因素,选择组合 14(MS + 0.3 mg/L NAA + 16 mg/L 6-BA)为同源四倍体台湾泡桐叶片愈伤组织芽分化的最适培养基(图 1-C)。

2.4 不同植物生长调节剂组合对同源四倍体台湾泡桐幼芽根诱导率的影响

从表 5 可以看出,同源四倍体台湾泡桐在有、无生长素的生根培养基上均诱导出根,且生根率均达 100%,但不同质量浓度 NAA 对根的条数、粗细和长短的影响不同。随着 NAA 质量浓度的增大,同源四倍体台湾泡桐根数增多,但是长度变短、变粗,生长变慢、长势差。当 NAA 质量浓度达到 0.3 mg/L 时,出现大量的气生根,严重抑制幼芽的生长。这可能与随着 NAA 质量浓度的增加,幼芽切口处形成较多愈伤组织从而抑制幼芽根形成和生长有一定关系。综合考虑台湾泡桐四倍体幼芽诱导出根的质量、数量、长度和幼苗生长情况(图 1-E)及 NAA 用量,选择 1/2MS + 0.1 mg/L NAA 作为同源四倍体台湾泡桐幼芽生根的最适培养基(图 1-D)。生根幼苗移栽 10 d 后,台湾泡桐四倍体幼苗的成活率达到

95%。后期幼苗生长状况良好(图 1 - F)。

表 5 同源四倍体台湾泡桐幼芽根的诱导

NAA 质量浓度/(mg/L)	根诱导率/%	平均根数/条	平均根长/cm	根质量
0	100	4.0	2.6	长势一般,根细弱
0.1	100	4.3	2.3	生长快,长势好,根粗壮
0.2	100	5.7	1.7	生长慢,主根弱,出现大量须根
0.3	100	6.0	1.2	长势差,部分无主根,出现气生根

3 结论与讨论

植物体外植株再生的难易与植物种类、植物基因型和培养基成分及培养条件均有密切关系^[11-13]。当植物基因型、培养基成分和培养条件确定时,植物倍性大小必然会影响到其体外植株的再生频率^[6,13]。本试验结果表明,同源四倍体台湾泡桐幼苗叶片愈伤组织诱导和芽分化的最适培养基分别为 MS + 0.1 mg/L NAA + 14 mg/L 6 - BA 和 MS + 0.3 mg/L NAA + 16 mg/L 6 - BA。这与二倍体台湾泡桐幼苗叶片愈伤组织诱导和芽分化的最适培养基有一定差异^[14]。该结果一方面与二倍体和四倍体台湾泡桐幼苗体外植株再生时的外植体生理状态有关;另一方面,这意味着同源四倍体相关基因的表达量似乎不是二倍体的简单叠加,或许是通过改变这些基因的表达模式而永久传递给子代的遗传结果^[15-17]。

参考文献:

[1] Stebbins G L. Chromosomal evolution in higher plants [M]. London:Edward Aronld,1974.

[2] 王秀芳,李悦. 植物多倍体育种研究进展[J]. 林业科技,2003,28(5):1-5.

[3] 平吉功. 森林植物における人为倍数の研究Ⅱ: キソ倍数体におけるの观察[J]. Seiken Ziho, 1950, 4: 17-21.

[4] 范国强,杨志清,曹艳春,等. 秋水仙素诱导兰考泡桐同源四倍体[J]. 核农学报,2006,20(6):473-476.

[5] 范国强,曹艳春,赵振利,等. 白花泡桐同源四倍体的诱导[J]. 林业科学,2007,43(4):31-35.

[6] 杨志清,范国强,曹艳春,等. 同源四倍体泡桐体外植株再生系统建立[J]. 河南农业大学学报,2007,41(2):149-153.

[7] 范国强,魏真真,杨志清. 南方泡桐同源四倍体的诱导及其体外植株再生[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2009,37(10):83-90.

[8] 范国强,杨志清,曹艳春,等. 毛泡桐同源四倍体的诱导[J]. 植物生理学通讯,2007,43(1):109-111.

[9] 范国强,翟晓巧,魏真真,等. 豫杂一号泡桐体细胞同源四倍体诱导及其体外植株再生[J]. 东北林业大学学报,2010,38(12):22-26.

[10] 赵振利,何佳,赵晓改,等. 泡桐 9501 体外植株再生体系的建立及体细胞同源四倍体诱导[J]. 河南农业大学学报,2011,45(1):59-65.

[11] Fan G Q,Zhai X Q,Zhai C J. Callus induction from different *Paulownia* plant leaves and their plantlet regenerations[J]. Journal of Forestry Research,2001,12(4): 209-214.

[12] Bergman B A,Moon H K. *In vitro* adventitious shoot production in *Paulownia* [J]. Plant Cell Reports, 1997, 16(5):315-319.

[13] Rao C D,Goh C J,Kumar P P. High frequency adventitious shoot regeneration from excised leaves of *Paulownia* spp. cultured *in vitro* [J]. Plant Cell Reports, 1996, 16(3/4):204-209.

[14] 韩同丽. 四种泡桐体外植株再生体系建立[D]. 郑州:河南农业大学,2013.

[15] 黄慧君,黄道强,刘丽娴等. 水稻体细胞同源四倍体的人工诱导及遗传特性研究[J]. 广东农业科学,1995(1):9-12.

[16] 王卓伟,余茂德,鲁成. 桑树二倍体及人工诱导的同源四倍体遗传差异的 AFLP 分析[J]. 植物学通报,2002,19(2):194-200.

[17] Gu X F,Yang A F,Meng H,et al. *In vitro* induction of tetraploid plants from diploid *Zizyphus jujuba* Mill. cv. Zhanhua[J]. Plant Cell Reports,2005,24(11):671-676.