

## 杜仲杂交子代的组织培养及无性系化

李煜, 周素华, 李周岐\*, 王大玮

(西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨陵 712100)

**摘要:**以杜仲人工杂交获得的种子为材料,进行了组织培养及无性系化研究。结果表明:无茵苗培育的方法可以提高杜仲种子的发芽率;子叶节不定芽诱导的最适宜培养基为 MS+6-BA2mg·L<sup>-1</sup>,诱导率为 85%;单节茎段快速增值的最适宜培养基为 MS+6-BA2mg·L<sup>-1</sup>,增值系数为 3.80;而最适宜单节茎段生长的培养基为 MS+6-BA1 mg·L<sup>-1</sup>+NAA0.1 mg·L<sup>-1</sup>,生长系数为 3.71;无根苗的最佳生根培养基为 1/2MS+IBA1.5 mg·L<sup>-1</sup>,生根率达 90%。

**关键词:**杜仲;杂交种子;组培培养;无性系化

**中图分类号:**S722.37

**文献标识码:**A

**文章编号:**1001-7461(2009)04-0073-03

### Tissue Culture and Cloning of Hybride Seeds of *Eucommia ulmoides*

LI Yu, ZHOU Su-hua, LI Zhou-qi\*, WANG Da-wei

(College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** The hybrid seeds of *Eucommia ulmoides* were used as explants for cloning. The results showed that seed germination rate was improved greatly under tissue culture conditions. The best medium for buds' initiation of cotyledonary nodes was MS+6-BA 2 mg·L<sup>-1</sup>. The inducing ratio could be up to 85%. The best medium for the propagation of stem with one node was MS+6-BA 2 mg·L<sup>-1</sup>. The multiplication coefficient was 3.80. The best medium for the growth of stem with one node was MS+6-BA 1 mg·L<sup>-1</sup>+NAA0.1 mg·L<sup>-1</sup>. The growth ratio was 3.71. The best medium for rooting was 1/2MS+IBA 1.5 mg·L<sup>-1</sup>, which rooting ratio reached 90%.

**Key words:** *Eucommia ulmoides*; hybrid seeds; tissue culture; cloning

杜仲(*Eucommia ulmoides*)属杜仲科植物,该科仅有 1 属 1 种,是我国特有的贵重药用树种,也是极有开发利用价值的胶源植物<sup>[1]</sup>。传统的杜仲育种采取杂交育种和无性系选育的方法,已取得丰硕的成绩<sup>[2-3]</sup>。但是,由于林木个体大、生长周期长、生长环境较难控制,从而制约着杜仲良种选育工作的进程。遗传连锁图谱的构建使林木早期选择成为可能,从而大大缩短选育时间、提高选择精度并降低选育成本<sup>[4]</sup>。而建立具有一定规模的作图群体是成功和高效率作图的基础。

传统的播种育苗易受环境的影响,杜仲杂交后代的出苗率并不高,从而制约着作图群体的数量。作图群体越小,图谱精度越低,图谱的分辨率越

差<sup>[5]</sup>。再者,目前的作图群体都是以单株为重复,如果能使作图群体的每个植株都无性系化,就能大大提高作图的精度和速度。组织培养的方法不仅可以在短时间内大量繁育植株,提高育种进程,而且可以得到每个植株的大量克隆。因此,本试验对杜仲的杂交子代进行了组织培养及其无性系化研究,旨在获得足够大的杜仲永久性遗传作图群体,从而为杜仲遗传连锁图谱构建和重要性状的分子标记研究奠定基础,也为杜仲杂交育种提供依据。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 材 料

选取西北农林科技大学杜仲优树资源圃杜仲优

收稿日期:2008-10-19 修回日期:2008-12-04

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30771751);西安市科技计划项目(NC08009)

作者简介:李煜,男,硕士研究生,主要从事林木遗传育种研究。

\*通讯作者:李周岐,博士,教授,博士生导师,主要从事林木遗传育种教学与研究。E-mail: lzhouqi@yahoo.com.cn

良品雌雄株各 4 株(表 1 中 A, B 分别表示雌雄株), 2007 年 4 月初进行人工授粉, 于 10 月中旬采集种子, 及时放在阴凉通风处阴干, 除去杂质, 放在布袋里储存于室内阴凉处备用。

## 1.2 方法

1.2.1 无菌苗的培育 选用饱满种子, 剥去种皮, 用清水反复冲洗,  $\text{GA}_3$  浸泡 48 h, 70% 酒精消毒 30 s 后,  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{HgCl}_2$  消毒 10 min, 无菌水冲洗 3~4 次, 切去少许胚芽和胚根端胚乳后接入无激素的 MS 培养基中, 每个杂交组合后代接种 40 瓶, 每瓶 2 颗种子。待子叶萌发或成苗后备用, 同时统计各个杂交组合的发芽率。

1.2.2 不定芽的诱导 将子叶节接种于附加不同浓度配比 6-BA 和 NAA 的 MS 培养基, 每种处理接种 40 瓶, 每瓶 2 个外植体。观察其生长情况, 30 d 后统计不定芽的数目, 并计算诱导率。

1.2.3 离体扦插 将无菌苗截成 1.5 cm 的单节茎段, 接入附加不同浓度配比 6-BA 和 NAA 的 MS 培养基, 每种处理接种 40 瓶, 每瓶 2 个外植体。观察其生长情况, 30 d 后统计每个无根苗的高度和所能切取的带节茎段和不定芽的数目。并计算增值系数和生长系数。

增值系数 = 所能切取的带节茎段和不定芽的数目 / 接种时的单节茎段

生长系数 = 生长 30 d 后的平均苗高 / 接种时的平均苗高

1.2.4 生根培养 对以上所得到的杜仲无根苗接种于含有不同浓度 IBA 的 1/2MS、1/4MS 培养基中诱导生根, 形成完整植株。每种处理接种 40 瓶, 每瓶接种 1 个无根苗。30 d 后统计生根率。

1.2.5 炼苗和移栽 当根长 2 cm 时, 将瓶口打开炼苗, 3 d 后, 移栽到温室内花盆中, 基质为沙子: 珍珠岩: 腐殖质 = 1: 1: 1 及 1: 2: 1, 覆盖地膜保湿, 3 d 后逐渐延长透气时间, 最终去掉地膜。每种基质移栽 30 盆, 每盆 2 株。

1.2.6 培养条件 本试验采用的 MS 培养基含蔗糖  $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、琼脂  $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、pH 调整为 5.8~6.2, 分装后在  $121^\circ\text{C}$ ,  $1.1 \text{ kg} \cdot \text{cm}^{-2}$  的压力下灭菌 30 min。培养室温度为  $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ , 每日光照 14 h, 光照强度 1 500~2 000 lx。

## 2 结果与分析

### 2.1 无菌苗的培育

与传统的播种育苗相比, 组织培养培育无菌苗的方法可以显著地提高杜仲种子的发芽率。杜仲

种子通过沙藏, 发芽率最高为 50%<sup>[1]</sup>。在组培条件下, 杜仲的发芽率最高可以达到 90% 以上(表 1), 而且无菌苗生长良好(图 1-A)。这样, 就可以得到大量的子叶节和单节茎段, 以便于使每个植株得到快速的增殖。

表 1 组培条件下各杂交组合种子发芽率(%)

Table 1 The hybrid seeds' germination ratio in tissue culture %

亲本	A1	A2	A3	A4
B1	75.7	84.4	95.0	69.2
B2	96.5	90.0	97.5	70.0
B3	81.7	76.4	99.6	68.6
B4	83.8	78.5	68.6	55.0

### 2.2 子叶节不定芽的诱导

试验表明(表 2), 在 6-BA 浓度小于  $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的范围内, 随着 6-BA 浓度的增加, 子叶节不定芽的诱导率增加, 每个子叶节着生的不定芽也增多。当 6-BA 浓度小于  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 虽然对不定芽的诱导不利, 但子叶节可以发育成完整植株; 6-BA 浓度为  $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 不定芽诱导率高, 但顶芽发育不正常。6-BA 浓度为  $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 不定芽诱导率开始下降; 当 6-BA 浓度达到  $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  以上时, 子叶弯曲, 生长不良, 甚至致死。当 6-BA 浓度小于  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 每个子叶节平均着生芽数较少。6-BA 浓度为  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  或  $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 每个子叶节平均着生芽数较多, 有的甚至不易数清(图 1-B)。综合看来,  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 6-BA 是子叶节不定芽诱导的最佳浓度。

表 2 子叶节不定芽的诱导

Table 2 Buds' initiation from cotyledonary nodes

激素及浓度配比 ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	不定芽诱导率/%	每个子叶节平均着生芽数
6-BA 0.1	5.0	1.0
6-BA 0.5	42.5	1.5
6-BA 1.0	77.5	3.2
6-BA 2.0	85.0	5.0
6-BA 3.0	62.5	5.6
6-BA 4.0	0	0
6-BA 2.0 + NAA 0.1	55.0	1.4
6-BA 2.0 + NAA 0.3	52.5	1.0
6-BA 2.0 + NAA 0.5	50.0	0.7

### 2.3 单节茎段离体扦插

从表 3 可看出, 无菌苗单节茎段的增值需要较高浓度的 6-BA, 甚至不需要附加 NAA, 以  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 6-BA 为最适宜浓度。而对于生长来说, 则需要较低质量浓度的 6-BA 和 NAA, 以  $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 6-BA 和  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 NAA 为最适宜浓度配比(图 1-C)。6-BA 浓度达到  $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  后, 虽然也能

使单节茎段得到增值,但是带节茎段和不定芽生长不良,影响进一步的增值和生根培养。为达到快速繁殖的目的,首先要提高增值系数,得到大量的带节茎段和不定芽,其次再使繁殖材料生长到一定高度。

2.4 生根培养

结果表明(表 4),含 IBA 1.5 mg · L<sup>-1</sup> 的 1/2MS 培养基为最佳生根培养基,培养 15d 时生根率达到 90%,一般可产生不定根 3~6 条(图 1-D)。当 IBA 的浓度为 0.5 mg · L<sup>-1</sup> 时,也能诱导出根,但诱导率不高,且不定根数量明显减少(一般为 1~3 条)。1/4MS 培养基没有 1/2MS 培养基诱导率高。

2.5 炼苗和移栽

当根长 2 cm 时,将瓶口打开炼苗,幼苗叶色逐渐加深,以沙子、珍珠岩、腐殖质按 1 : 2 : 1 为基质移栽成活率较高(约 80%)。珍珠岩的比例增高可能有利于提高基质的透气性。

表 3 单节茎段的离体扦插

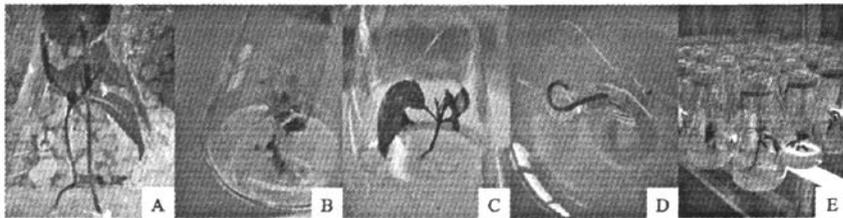
Table 3 In vitro cutting of stem with one node

激素及浓度配比/(mg · L <sup>-1</sup> )	增值系数	生长系数
6-BA 1.0	2.50	3.25
6-BA 1.0 + NAA 0.1	1.90	3.71
6-BA 1.0 + NAA 0.3	1.65	3.14
6-BA 2.0	3.80	2.79
6-BA 2.0 + NAA 0.1	2.90	2.58
6-BA 2.0 + NAA 0.3	2.15	2.73
6-BA 4.0	2.90	1.14
6-BA 4.0 + NAA 0.1	2.60	1.72
6-BA 4.0 + NAA 0.3	1.75	1.64

表 4 生根诱导率

Table 4 The rooting rate

培养基配方/(mg · L <sup>-1</sup> )	生根率/%
1/2MS + IBA 0.5	71.6
1/2MS + IBA 1.5	90.0
1/4MS + IBA 0.5	58.2
1/4MS + IBA 1.5	60.5



(A. 无菌苗的培育; B. 不定芽的诱导; C. 离体扦插; D. 生根培养; E. 无性系化)

图 1 杜仲组织培养及无性系化过程

Fig. 1 Cloning process of *E. ulmoides* from tissue culture

3 结论与讨论

本试验在进行杜仲无菌苗的培育中,杜仲的发芽率可达到 90% 以上(其余没有发芽的原因可能是杂交不亲和等原因导致的种胚发育不良),无菌苗生长良好,可利用此方法直接进行杂交后代的繁育。如需进一步扩繁,则利用子叶节不定芽诱导和单节茎段离体扦插的方法使繁殖材料得到增值,子叶节不定芽诱导的最适宜培养基为 MS 培养基附加 2 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA; 该配方也能使单节茎段快速增值; 而最适宜单节茎段生长的培养基为 MS 培养基附加 1 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA 和 0.1 mg · L<sup>-1</sup> NAA。含 IBA 1.5 mg · L<sup>-1</sup> 的 1/2MS 培养基则是最佳的生根培养基。

通过不定芽诱导的途径虽然可以得到快速繁殖,但一般认为产生的植株易产生变异。通过单节茎段离体扦插虽然没有不定芽诱导的途径繁殖快,但是可以保持遗传性状的一致性<sup>[6]</sup>。如果只是为了扩繁,不定芽诱导的途径则是最快的; 如果是为了构建遗传作图群体,则需要选择单节茎段离体扦插的途径。胡建军等<sup>[7]</sup>在构建美洲黑杨遗传图谱时,为

获得足够大的回交群体,对获得的种子进行了组织培养。本试验通过无菌苗培育及单节茎段离体扦插的方法,不仅可以使杜仲杂交子代快速繁殖,而且可以使群体的每个植株均无性系化(图 1-E),并且保持性状的一致性。因此,如果进一步开展大田移栽研究,必定可以快速得到足够大的杜仲永久性遗传作图群体。

参考文献:

[1] 张康健. 杜仲[M]. 北京, 中国林业出版社, 1990.  
 [2] 张博勇, 张康健, 张檀, 等. 秦种 1-4 号优良品种选育研究[J]. 西北林学院学报, 2004, 19(3): 18-20.  
 [3] 杜红岩, 张再元, 刘本端, 等. 华种 1 号等 5 个杜仲优良无性系的选育[J]. 西北林学院学报, 1994, 9(4): 27-31.  
 [4] 黄少伟. 松树分子标记辅助育种研究进展[J]. 林业科学研究, 2006, 19(6): 799-806.  
 [5] 王明麻. 林木遗传育种学[M]. 北京, 中国林业出版社, 2001.  
 [6] 李浚明, 株登云. 植物组织培养教程(第 3 版)[M]. 北京, 中国农业大学出版社, 2005.  
 [7] 严伟伦, 胡建军. 杨树遗传图谱构建与数量性状基因定位[M]. 北京, 中国环境科学出版社, 2005.