

白榆的组织培养与叶片再生研究

王静华¹, 侯建生², 刘桂林^{3*}, 王艳³, 刘海波³

(1. 河北农业大学 林学院, 河北 保定 071001; 2. 河北政法职业学院 园林系, 河北 石家庄 050061;
3. 河北农业大学 园林与旅游学院, 河北 保定 071001)

摘要:采用河北沧州市的白榆茎段作为外殖体进行组织培养,在附加不同浓度激素的培养基上对其进行培养,建立其组织培养及叶片再生体系。结果表明,白榆最适增殖培养基是MS培养基+6-BA 0.10 mg·L⁻¹+IBA0.005 mg·L⁻¹,叶片再生的最适培养基均为MS+TDZ0.005 mg·L⁻¹+IAA0.005 mg·L⁻¹,最适生根培养基是MS培养基+IBA0.01 mg·L⁻¹。

关键词:白榆;组织培养;叶片再生

中图分类号:S792.19 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-7461(2009)05-0074-04

Tissue Culture and Plant Regeneration from Leaf of Siberian Elm

WANG Jing-hua¹, HOU Jian-sheng², LIU Gui-lin^{3*}, WANG Yan³, LIU Hai-bo³

(1. College of Forestry, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071001, China; 2. Landscape Department, Hebei Professional College of Political Science and Law, Shijiazhuang, Hebei 050061, China;
3. College of Landscape Architecture and Tourism, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071001, China)

Abstract: Stems of siberian elm were used as explants, a tissue culture and plant regeneration system was established. The results showed that the optimal differentiation medium for stem was MS+6-BA 0.10 mg·L⁻¹+IBA0.005 mg·L⁻¹; the optimal rooting medium was MS+IBA0.01 mg·L⁻¹; MS medium supplemented with 0.005 mg·L⁻¹ TDZ and 0.005 mg·L⁻¹ IAA was the optimal medium condition for leaf regeneration.

Key words: siberian elm; tissue culture; leaf regeneration

白榆(*Ulmus pumila*)为榆科(Ulmaceae)榆属(*Ulmus*),又称榆、家榆。白榆是河北省常见的速生阔叶用材树种,同时也是城市绿化、防护林、盐碱地改造的主要树种^[1-2]。近年来,国内针对白榆的研究主要集中在种质资源的研究与保存、杂交育种及实生苗选育、种源变异、分子遗传学和非常规育种等方面^[3-10]。国外一些研究已经逐渐转向白榆的遗传学基础研究,并逐渐将细胞和组织培养、分子标记技术等引入白榆改良研究中^[11-17]。Kapaun等人从白榆的叶组织中得到了再生植株,但是再生芽率很低,产生的芽伸长困难,产生的小苗生根困难等一系列问题尚未解决^[13]。建立一个再生体系是进行遗传转化的先决条件。本研究以白榆茎段为材料进行组织

培养,讨论附加不同浓度激素的培养基对其增殖、生根的影响,为白榆的生物技术改良和优良品系的快速繁殖提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验所用的外殖体为白榆(*Ulmus pumila*)当年生茎段,2006年5月采自河北沧州市。

1.2 方法

1.2.1 白榆无菌苗的获得 取白榆当年生健壮带芽茎段,用洗衣粉清洗其表面,再用自来水冲洗30 min。将清洗后的外殖体在无菌操作台上,用70%酒精浸泡30 s,20% 8-4消毒液浸泡14 min,无菌水

收稿日期:2008-11-04 修回日期:2008-12-24

基金项目:河北省交通厅重点攻关项目(Y-050116)。

作者简介:王静华,女,在读硕士,主要从事园林植物资源利用及评价方面研究。

*通讯作者:刘桂林,男,高级工程师,主要从事园林工程及苗木生产方面的研究。

冲洗4~5次,接种于不附加任何激素的MS培养基上进行培养。

1.2.2 培养条件 试验所采用的基本培养基是MS培养基和1/2MS培养基,附加不同的浓度及不同种类的激素(表1~表3)。培养基加蔗糖 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,琼脂 $6.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,pH5.8~6.0。培养条件为温度 25°C ,光照度 $2\ 000\sim 3\ 000\text{ lx}$,光照时间10 h。

1.2.3 分化培养基的筛选 取无菌苗带芽茎段(1.5~2.0 cm)接于附加不同浓度6-BA、NAA、IBA的MS培养基上进行培养。每个处理10瓶,每瓶3个茎段。30 d后调查分化情况,统计增殖率、平均苗高、平均叶片数、平均愈伤块直径、是否玻璃化。

增殖率=(增殖后外殖体数/接种外殖体数) $\times 100\%$

1.2.4 叶片分化培养基的筛选 取无菌苗叶片,叶片横切2~3刀,剪过中脉,叶面朝上平铺于附加不同浓度TDZ、ZT、IAA的MS培养基上进行培养。每个处理5瓶,每瓶5个叶片。在培养基上培养45 d后,统计出愈率、不定芽再生率及死亡率。

出愈率=(形成愈伤组织的外殖体数/接种外殖体数) $\times 100\%$

不定芽形成率=(产生不定芽的愈伤组织块数/接种外殖体数) $\times 100\%$

死亡率=(死亡外殖体个数/接种外殖体数) $\times 100\%$

1.2.5 生根培养基的筛选 取无菌苗茎段(1.5~2.0 cm)接于附加不同浓度的NAA和IBA的MS和1/2MS培养基上进行培养。每个处理5瓶,每瓶5个茎段。30 d后调查白榆在附加不同浓度激素的培养基上的生根情况,统计生根率及平均苗高。

生根率=(有生根现象的茎段数/接种茎段数) $\times 100\%$

生根系数=生根条数/有生根现象的茎段数

2 结果与分析

2.1 白榆无菌苗的获得

采用20%8-4消毒液消毒14 min,接种于不附加任何激素的MS培养基中即可获得白榆无菌苗,且长势良好。

2.2 不同激素类型与浓度对白榆带芽茎段分化的影响

在MS培养基中添加不同浓度的6-BA、NAA、IBA对白榆的带芽茎段进行培养,培养30 d后进行调查(表1、图1)。由表1可知,在不添加任何激素的MS培养基上白榆都可生长,但平均茎高和增殖率较低。在附加6-BA和NAA的MS培养基上白榆的分化状况很差。当6-BA浓度大于 $0.25\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,NAA浓度大于 $0.025\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时白榆发生了玻璃化现象,增殖产生的新芽虽多,但茎叶纤细发黄,或呈水渍状,非常不利于继续生长,且激素浓度

表1 不同激素对白榆带芽茎段分化的影响

Table 1 Effect of hormones at different concentrations on differentiation of stem with buds

6-BA/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	NAA/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	IBA/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	平均茎高/cm	平均叶片数	增殖率/%	愈伤平均/cm	是否玻璃化
0.00	0.000	0.000	2.92	6.90	154	0.06	否
0.10	0.005	0.000	2.67	6.00	125	0.48	否
0.10	0.010	0.000	2.47	5.83	133	0.38	否
0.10	0.025	0.000	2.33	4.58	109	0.25	否
0.25	0.025	0.000	3.89	10.79	200	1.00	是
0.50	0.025	0.000	3.78	14.00	411	1.22	是
1.00	0.025	0.000	2.14	10.86	314	1.37	是
0.25	0.050	0.000	3.57	11.43	214	1.05	是
0.50	0.050	0.000	4.27	16.91	373	1.18	是
1.00	0.050	0.000	2.20	9.20	280	1.40	是
1.50	0.050	0.000	1.28	8.00	267	1.32	是
0.25	0.100	0.000	6.43	18.43	321	1.09	是
0.50	0.100	0.000	3.29	14.00	257	1.14	是
1.00	0.100	0.000	1.23	7.00	238	1.25	是
0.05	0.000	0.005	2.40	4.27	125	0.03	否
0.10	0.000	0.005	2.65	6.00	243	0.39	否
0.25	0.000	0.005	2.10	5.97	258	0.87	是
0.05	0.000	0.010	2.30	4.80	100	0.06	否
0.10	0.000	0.010	2.57	6.00	192	0.24	否
0.25	0.000	0.010	1.71	5.50	246	0.97	是
0.05	0.000	0.025	2.33	5.08	109	0.03	否
0.10	0.000	0.025	1.95	6.53	131	0.38	否
0.25	0.000	0.025	1.82	5.59	314	1.04	是



图1 白榆的增殖情况

Fig. 1 Proliferation of siberian elm

越高玻璃化现象越严重。当 6-BA 浓度降至 $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, NAA 浓度降为 $0.005, 0.010, 0.025 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时玻璃化现象得到控制, 但是平均茎高和增殖率都下降了很多。在附加 6-BA 和 IBA 的 MS 培养基上, 当 6-BA 浓度为 $0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时白榆都发生玻璃化现象, 降低 6-BA 浓度后玻璃化现象得到控制, 平均茎高和增殖率都有所提高。其中在附加 6-BA $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 IBA $0.005 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MS 培养基上白榆分化最好, 平均茎高为 2.65 cm , 增殖率达到了 243% 。

2.3 不同激素对白榆叶片不定芽诱导的影响

在 MS 培养基中添加不同浓度的 TDZ、ZT、IAA 对白榆的幼嫩叶片进行培养, 培养 45 d 后进行调查(表 2、图 2)。由表 2 可知, 白榆的叶片具有一定的再生能力, 但再生率很低。在附加 ZT 和 IAA 的 MS 培养基上白榆出愈率很低, 基本上不产生不定芽。在附加 TDZ $0.005 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 IAA $0.005 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MS 培养基上白榆的表现最好, 出愈率均为 96% , 不定芽再生率为 56% 。将白榆叶片愈伤组织产生的不定芽接种于附加 6-BA $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、IBA $0.005 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的增殖培养基上, 不定芽可长成健壮的小苗。

2.4 不同生根培养基对白榆生根的影响

在 MS 和 1/2MS 培养基中添加不同浓度的 NAA 和 IBA, 对白榆的带芽茎段进行培养, 接种数天后逐渐从基部和茎节处产生数条不定根, 培养 30 d 后调查其生根状况(表 3、图 3)。由表 3 可知, 在不添加任何激素的 MS 培养基上白榆即可生根, 但生根率很低, 生根率为 36% 。在附加不同浓度 NAA 的 MS 培养基上, 白榆生根率较高, 可达到

87% , 但生根系数很低, 新生芽细弱。附加相同浓度 IBA 的 MS 培养基比 1/2MS 培养基更适合白榆生根。白榆在 5 种附加不同浓度 IBA 的 1/2MS 培养基上的平均茎高、平均根长、生根率和生根系数均不及 MS 培养基。因此最适宜白榆生根的是附加 IBA $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MS 培养基, 其生根率达 100% , 生根系数 8.94 。

表 2 不同激素对白榆叶片不定芽诱导的影响

Table 2 Effect of different hormones on induction of adventitious buds from the leaves of siberian elm

TDZ /($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	ZT	IAA	接种叶 片数	出愈率 /%	不定芽 形成率/%	死亡率 /%
0.010	0.0	0.010	25	84	20	16
0.010	0.0	0.100	25	80	36	20
0.005	0.0	0.005	25	96	56	4
0.005	0.0	0.050	24	67	29	33
0.000	1.0	0.100	20	5	0	95
0.000	1.0	0.050	25	20	0	80
0.000	0.5	0.025	25	40	4	60
0.000	0.5	0.050	24	33	4	67

注: 接种叶片数因长势一致的叶片不足接种叶片数略有差异。

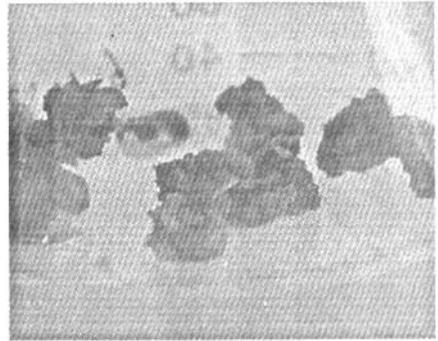


图2 白榆叶片产生的不定芽

Fig. 2 Adventitious buds induced from the leaves of siberian elm

表 3 不同生根培养基对白榆生根的影响

Table 3 Effect of different rooting media on rooting of siberian elm

培养基	NAA /($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	IBA /($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	平均 茎高 /cm	平均 根长 /cm	生根率 /%	生根 系数
1/2MS	0.00	0.30	2.41	0.79	80	4.67
1/2MS	0.00	0.10	2.04	0.70	74	5.31
1/2MS	0.00	0.05	1.96	0.56	60	6.25
1/2MS	0.00	0.03	1.87	0.60	64	5.98
1/2MS	0.00	0.01	2.35	0.59	35	7.01
MS	0.00	0.30	2.79	0.83	89	8.29
MS	0.00	0.10	2.48	0.77	76	8.69
MS	0.00	0.05	2.73	0.88	91	7.29
MS	0.00	0.03	2.98	0.88	86	6.22
MS	0.00	0.01	2.97	0.85	100	8.94
MS	0.50	0.00	2.36	0.56	78	4.57
MS	0.30	0.00	3.45	0.64	82	2.11
MS	0.10	0.00	3.57	0.73	76	2.13
MS	0.05	0.00	3.06	0.88	74	5.67
MS	0.00	0.00	2.92	1.48	36	3.50

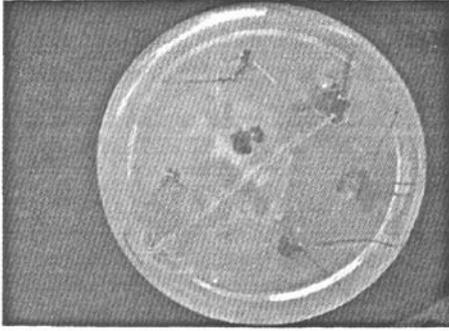


图3 白榆的生根情况
Fig.3 Rooting of siberian elm

3 结论

白榆适合的增殖培养基是 MS 培养基 + 6-BA 0.10 mg · L⁻¹ + IBA 0.005 mg · L⁻¹。在添加 NAA 的培养基中白榆极易产生玻璃苗。

白榆最适生根培养基是 MS 培养基 + IBA 0.01 mg · L⁻¹，最高生根率可达 100%。

白榆无论是生根培养还是增殖培养中，凡是添加 NAA 的培养基表现都不好，增殖培养中极易玻璃化，生根培养中生根率较低。是否白榆对 NAA 敏感有待进一步研究。

生根培养中白榆在 MS 培养基上的表现比 1/2MS 培养基上的表现好，不同于其他多数植物适宜在 1/2MS 培养基中生根的特点，这可能与白榆极高的抗盐碱能力有关。

白榆具有叶片再生能力，但再生率较低有待进一步研究。

参考文献：

- [1] 傅立国. 中国榆属的研究[J]. 东北林学院学报, 1980(3): 1-40.
- [2] 张敦论, 林新福, 工铁章, 等. 白榆[M]. 北京: 中国林业出版社, 1984.
- [3] 张纪卯. 4种榆科保护树种种子及幼苗形态特征研究[J]. 林业实用技术, 2006(8): 9-11.
- [4] 朱延林, 董铁民, 茹桃勤. 白榆速生、高抗榆蓝叶甲优良无性系 65212 选育研究[J]. 林业科学, 1997, 33(专刊): 39-46.
- [5] 续九如. 榆树树种遗传改良研究现状及思考[J]. 北京林业大学学报, 2000, 22(6): 95-99.
- [6] 张建国. 白榆优良基因资源的收集保存和利用的研究[J]. 林业科技通讯, 1992, (12): 12-14.
- [7] 白榆种源研究协作组. 白榆种源的地理变异和基因型稳定性[J]. 林业科学研究, 1989, 2(4): 334-343.
- [8] 蔡玉成, 马国弊, 工政琦. 不同地理种源白榆的某些生理特性[J]. 宁夏农林科技, 1990(2): 20-23.
- [9] 冯思速, 马国彬, 宋玉霞. 白榆不同地理种源过氧化物酶同工酶的比较研究[J]. 宁夏农林科技, 1990(1): 24-26.
- [10] 顾万春, 刘德安, 田玉林. 白榆种源与家系的选种研究[J]. 林业科学, 1987, 23(4): 415-424.
- [11] KAMALAV J C, CAREY D W. Application of RAPD-PCR markers for identification and genetic analysis of American Elm (*Ulmus americana*) selections[J]. Journal of Environmental Horticulture, 1995, 13(4): 155-159.
- [12] BENET H, CURIERS R P, BOURY S, et al. Identification of RAPD markers linked to a black leaf spot resistance gene in Chinese elm[J]. Theor App Gen, 1995, 90(7-8): 1068-1073.
- [13] KAPAUN J A, CBENG Z M. Plant regeneration from leaf tissues of siberian elm[J]. HortScience, 1997, 32(2): 301-303.
- [14] LINEBERGER H D, STICKLERS M B, FIJUT F M, et al. Use of protoplast, cell, and shoot tip culture in ald elm germplasm improvement program[J]. Acta Horticulture, 1990, 280: 247-253.
- [15] SANTAMOUR F S. Interspecific hybridization within fall- and spring flowering[J]. For Sci, 1972, 18: 283-289.
- [16] SANTAMOUR F S. Flowering and fertility of hybrids between spring and fall-flowering elms[J]. HortScience, 1989, 24: 139-140.
- [17] MACHOS N, LEFRANC M, BILGER I, et al. Isoenzymes as an aid to clarify the taxonomy of French elms [J]. Hereditv, 1995, 74(1): 39-47.