

杨树叶试管不定根高频率同步发生体系的研究

马庆国^{1,2}, 董宁光², 魏丽², 段承俐¹, 裴东^{2*}

(1. 云南农业大学, 云南昆明 650201; 2. 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091)

摘要 [目的] 建立高频率和高同步性不定根发生体系。[方法] 以长期继代培养的 741 杨无根苗或有根试管苗 [*Populus alba* × (*P. davidiana* + *P. simonni*)*P. tomentosa*] 的叶、嫩茎、叶盘和叶柄等外植体为试材, 在试管内分别诱导不定根发生。[结果] 从不定根发根时间、生根率和生根同步性等方面看, 所有生根试管苗上的叶明显优于嫩茎、继代苗上的叶、叶盘和叶柄, 而试管生根初期苗上的叶又好于生根后期苗上的叶。进一步优化试管生根初期苗上的叶的不定根诱导条件, 在 1/2 MS+0.5 mg/L IBA 生根培养基上, 培养 6 d 可见根原基突起, 6-8 d 为不定根高发期, 8 d 后生根率可达 100%, 单叶平均生根数为 3.7 条。不定根发生进程的形态学观察发现, 不定根发生部位为叶柄基部及向上至 3 mm 处, 不定根起始分化时间集中为诱导后 2 d, 不定根发生起源于维管形成层, 特别是维管射线正对的形成层。[结论] 杨树是木本植物的模式植物, 建立高频率和高同步性不定根发生体系, 可为深入研究木本植物不定根发生调控机制提供良好的试验体系和技术平台。

关键词 杨树; 不定根; IBA; 叶

中图分类号 S722.3:7 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)14-05782-04

Study on High Efficiency Induction and High Synchronism System of Adventitious Root of Poplar Leaves in vitro

MA Qing-guo et al (Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650201)

Abstract [Objective] The research aimed to establish high efficiency induction and high synchronism system of adventitious root in Poplar. [Method] Taking leaves, stems, leaf discs and petioles of rooted plantlets and subculture in vitro of poplar 741 [*Populus alba* × (*P. davidiana* + *P. simonni*)*P. tomentosa*] as experiment materials, the induction situation of adventitious root was studied. [Result] Leaves from rooted plantlets were obviously better than that of other explants like stem cuttings, leaf discs and petioles in aspects like time of rooting, rooting rate and synchronism. When 0.5 mg/L IBA was applied in leaves from early days' rooting plantlets, the adventitious root started at the 6th day, and the rooting rate was up to 100% at the 8th day, and the average number of root was 3.7. Adventitious roots differentiated after the induction time was 2 days and the rooting site was 0.3 mm to the bottom of the petioles. Adventitious root came from fascicular cambium especially which was opposite to the vascular ray. [Conclusion] The establish of this high efficiency induction and high synchronism system of adventitious root in poplar provided a good technical flat roof and experimental system for the further researches on regulating mechanisms of adventitious root and the studies on molecular level in woody plants.

Key words Poplar; Adventitious root; IBA; Leaf

不定根发生既是植物发育和形态建成等方面的重要理论问题, 又是植物无性繁殖或离体器官再生的重要实践问题。长期以来, 围绕植物不定根发生机制, 人们从形态学、组织学、生理生化等不同层次开展了大量研究^[1-6], 特别是对模式植物如拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*), 一些研究已经深入到分子水平, 从基因及基因调控等方面探讨不定根发生的机制^[7-11]。

良好的诱导不定根发生体系, 应当具备诱导发生频率高、同步性好、方法简单、可控性好、诱导周期短和良好的重复性等优点。然而, 由于木本植物为多年生, 并具有次生结构, 在根发生机制上具有特殊性, 因此, 现有的生根体系并不适用^[12]。但在木本植物的生产实践中, 诱导不定根发生可以实现林木和果树的扦插无性繁殖, 保持并大量生产优良母株, 从而在生产上获得更大的遗传增益^[13]。另外, 不定根发生也是木本植物试管再生的关键环节, 是生物工程技术在木本植物上应用的重要前提, 因此, 不定根发生问题在木本植物上具有重要的实践意义。

杨树是木本植物基础生物学规律研究的模式树种, 其分布范围广、生长快, 基因组相对较小 (500 Mbp), 易于种间杂交和无性繁殖, 也便于进行遗传转化。目前, 尚未见到针对其不定根发生同步和高频率研究的报道。为此, 笔者以杨树为对象, 研究其叶的不定根高频率同步发生体系, 旨在为

深入研究木本植物不定根发生调控机制, 建立高频率和高同步性的不定根发生体系提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料 嫩茎、叶盘、叶和叶柄分别取自继代培养 28 代以上的 741 杨无根苗或有根试管苗。

1.2 方法

1.2.1 培养基及培养条件设置。 试管嫩茎继代培养基为 MS+0.3 mg/L 6-BA+0.1 mg/L IBA, 生根培养基为 1/2 MS 附加 0.5 mg/L IBA, 插穗置入深度为 0.5 cm。培养容器为 250 ml 圆柱状培养瓶, 培养温度 (25±3) °C, 光照强度为 1 800 lx, 16 h/d 光照, 8 h/d 黑暗。所有试验处理数不少于 25 个, 重复 3 次。

1.2.2 材料的选取方法。

1.2.2.1 嫩茎。 选取继代培养生长健壮, 高为 2~4 cm, 基径 > 1 mm 的试材。

1.2.2.2 叶、叶盘、叶柄。 分别选择生根初期苗或后期苗上茎中部完全展开的叶。生根初期苗上的叶: 嫩茎不定根诱导后 15 d 左右, 生长于茎中部且夹角 < 45° 的叶; 生根后期苗上的叶: 嫩茎不定根诱导后 20~30 d, 生长于茎中部且夹角 > 45° 的叶。

1.2.3 生根诱导。

1.2.3.1 叶诱导生根方法。 选取生根初期苗的叶扦插于生根培养基中, 叶柄置入深度为 0.5 cm。每个培养瓶中扦插的叶数为 10~15 个。诱导过程中隔 1 d 观察叶柄基部变化, 并统计生根率和每生根叶不定根条数。

1.2.3.2 嫩茎诱导生根方法。 选取高为 2~4 cm, 基径 > 1 mm 的健壮嫩茎扦插于生根培养基中, 插入深度为 0.5 cm。每瓶

基金项目 国家自然科学基金项目资助 (30671436)。

作者简介 马庆国 (1983-), 男, 山东沂南人, 硕士研究生, 研究方向: 分子生物学。* 通讯作者。

收稿日期 2008-03-10

中置入 5~6 个嫩茎。诱导过程中每 3 d 观察嫩茎基部变化,并统计生根率及每生根嫩茎不定根条数。

1.2.3.3 叶盘诱导生根方法。选取生根初期苗的叶,去掉叶柄和远柄端约 1/3,剩余部分横向切割 2 或 3 刀,切口至叶片的 2/3 处,然后将叶盘近轴面向上平置于生根培养基上。每瓶均匀置入 5~6 片。诱导过程中每 3 d 观察叶盘变化,并统计生根的叶盘数及每生根叶盘不定根条数。

1.2.3.4 叶柄诱导生根方法。选取生根初期苗的叶,去掉叶片,将叶柄扦插培养于生根培养基上。每个培养瓶均匀置入 10~15 个叶柄。诱导过程中每 3 d 观察叶柄基部变化,并统计生根率和每生根叶柄不定根条数。

1.2.4 叶不定根发生的形态学观测。将生根初期苗叶在生根培养基上诱导生根,分别取诱导 1、2、3、4、5、6、7 d 的基部叶柄 3 mm 进行 FAA 固定。石蜡切片制作按照张晓平等^[4]的方法,番红-固绿染色、加拿大树胶封片后在光学显微镜下观察并拍照。

1.3 数据处理与分析 数据分析和制图采用 EXCEL 2003 和 SPSS13.0 等软件进行。生根率采用百分数差异显著性比较,其他均采用 LSD 方法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 不同外植体试管诱导生根情况比较 741 杨试管嫩茎、生根初期苗的叶、叶盘和叶柄的诱导生根结果见图 1~4。从发根时间、生根率和生根同步性看,初期生根苗的叶最好(图 1),其产生根的时间为诱导后 6 d,6~8 d 不定根大量发生,生根率由 42.8% 上升到 100.0%,持续时间为 2 d,不定根发生部位为叶柄基部纵向 3 mm 处;叶的不定根发生在诱导后 6 d,持续时间为 2 d,生根叶的平均发根量诱导后 6 d 为 2.2 条,8 d 后为 3.7 条,而 10 d 后为 4.6 条;嫩茎发根时间在诱导培养后 6 d,不定根大量发生是在诱导后 6~18 d,持续约 12 d,生根率从 8.3% 上升到 82.8%,18 d 后不定根发生呈现缓慢增长趋势,诱导 30 d 后生根率可达 97.5%(图 2);叶盘不定根发生在诱导后 6 d,6~15 d 为不定根大量发生期,持续时间为 9 d,生根率由 3.5% 上升到 70.4%,诱导 15 d 后不定根发生增长缓慢,由 70.4% 上升到 30 d 后的 75.1%(图 3);叶柄不定根发生在诱导后 9 d,其后生根率增长缓慢,至第 30 天达到 54.4%(图 4)。与嫩茎、叶盘和叶柄相比,叶的不定根发生时间相对集中,有较好的同步性,生根率明显较高($P < 0.01$)。

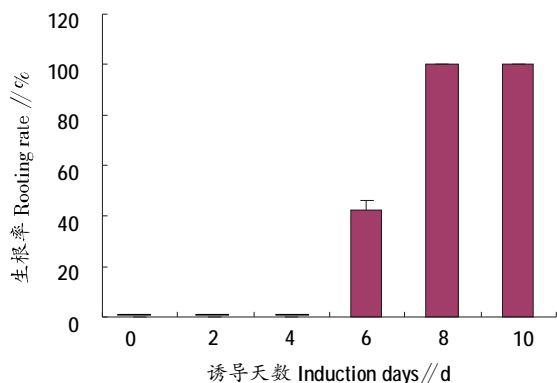


图 1 1/2 MS+0.5 mg/L IBA 时 741 杨生根初期苗叶诱导生根及其同步性

Fig. 1 Rooting and its synchronization of seedling leaves at early rooting stage of Poplar 741 under 1/2 MS+0.5 mg/L IBA

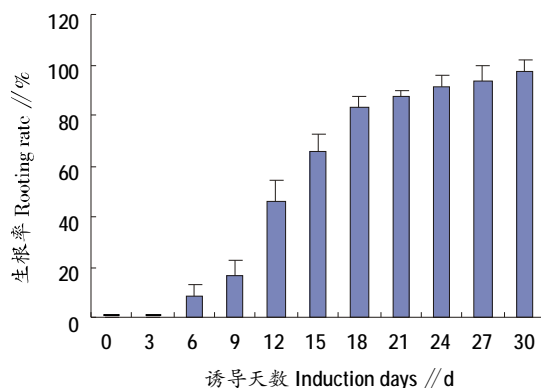


图 2 1/2 MS+0.5 mg/L IBA 时 741 杨生根初期苗嫩枝生根及其同步性

Fig. 2 Rooting and its synchronization of young branch at early rooting stage of Poplar 741 under 1/2 MS+0.5 mg/L IBA

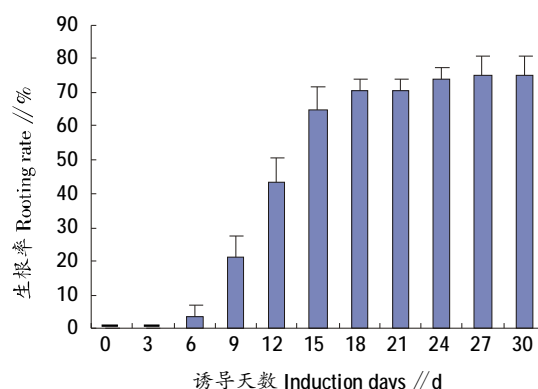


图 3 1/2 MS+0.5 mg/L IBA 时 741 杨生根初期苗叶盘诱导生根及其同步性

Fig. 3 Rooting and its synchronization of leaf disc induction at early rooting stage of Poplar 741 under 1/2 MS+0.5 mg/L IBA

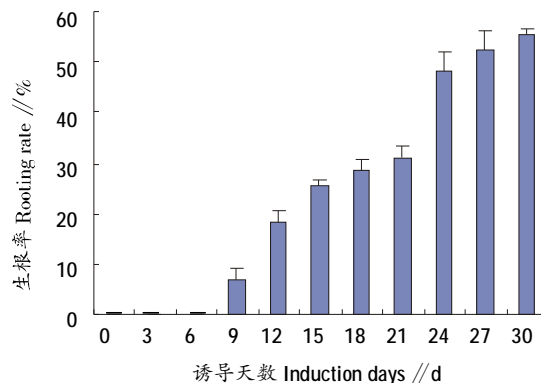


图 4 1/2 MS+0.5 mg/L IBA 时 741 杨生根初期苗叶柄诱导生根及其同步性

Fig. 4 Rooting and its synchronization of petiole induction at early rooting stage of Poplar 741 under 1/2 MS+0.5 mg/L IBA

2.2 叶生根条件优化 培养基中 IBA 水平对生根苗叶的不定根发生的影响见图 5。由图 5 可知,IBA 浓度为 0 时,生根率为 7.4%,而当 IBA 浓度为 0.25~1.50 mg/L 时,生根率达到了 100.0%,但 IBA 浓度大于 1.00 mg/L 后易产生愈伤组织,对不定根的发育有不良影响。叶不定根发生结果见图 6A。

分别选取继代苗、生根初期苗和生根后期苗的叶诱导生根,结果见图 1、5。由图 1、5 可知,生根初期苗叶的生根率和生根同步性明显好于继代苗和生根后期苗 ($P < 0.01$)。生根初期苗叶不定根发生在诱导后 6 d,6~8 d 不定根大量发生,生根率由 42.8% 上升到 100.0%,持续时间为 2 d,生根

叶柄的平均发根量诱导后 6 d 为 2.2 条, 8 d 后为 3.7 条, 而 10 d 后为 4.6 条(图 1, 7)。继代苗的叶不定根发生在诱导后 7 d, 7~11 d 不定根大量发生, 持续时间为 4 d, 生根率由 6.7% 上升到 68.9%, 至第 13 天达 77.8%(图 5)。生根后期苗叶生根与生根初期苗叶相似, 但生根率要低, 6~8 d 为 36.4%~91.9%(图 5)。

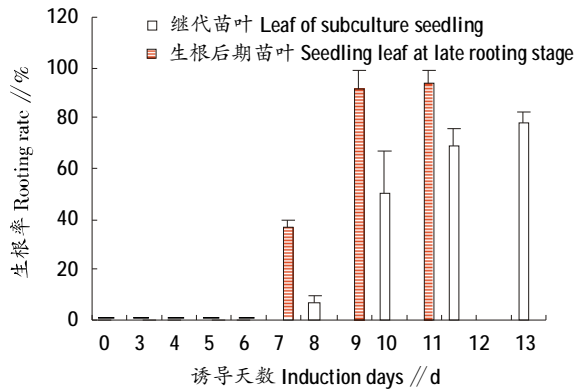
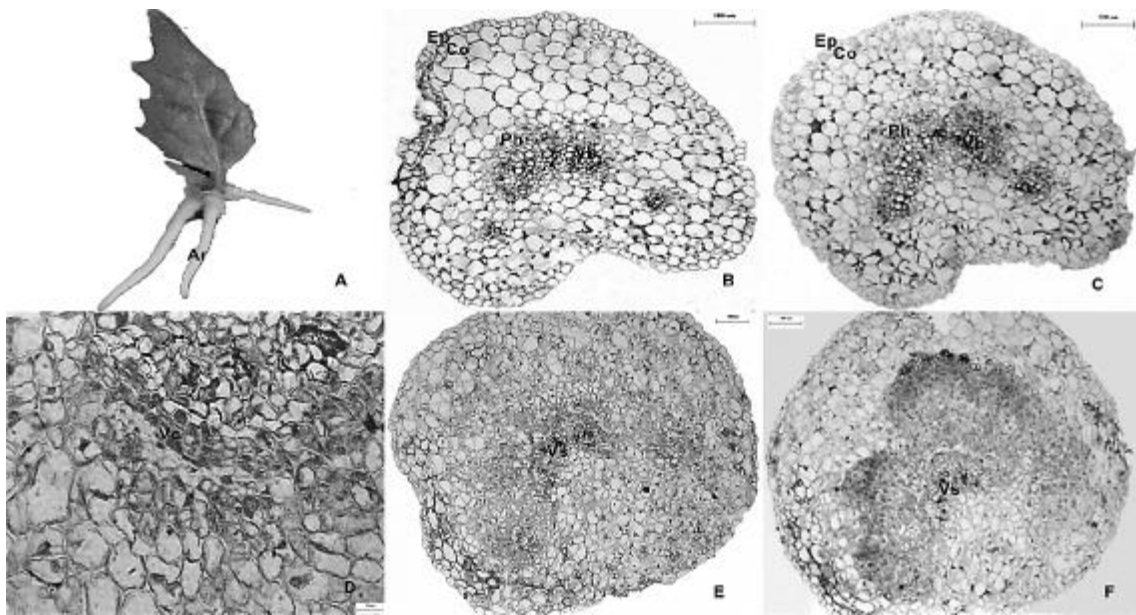


图 5 1/2 MS+0.5 mg/L IBA 时 741 杨继代苗及生根后期苗叶诱导生根及其同步性

Fig. 5 Rooting and its synchronization of seedling leaf induction at late rooting stage of subculture Poplar 741 under 1/2 MS+0.5 mg/L IBA



注: Ar 为不定根; Co 为皮层; Ep 为表皮; Ph 为韧皮部; Rb 为根原基; Vs 为维管系统; Vb 为维管束; Vc 为维管形成层。A 为生根苗叶, 叶柄长约 0.5~1.0 cm, 生根部位为叶柄基部及纵向 3 mm 周缘处; B 为诱导 0 d, 741 杨叶柄横切, 内部未发现潜伏根原基存在(10 \times); C 为生根诱导 2 d, 形成层细胞分裂, 细胞层数增多(10 \times); D 为生根诱导 2 d, 形成层细胞分裂, 细胞层数增多(40 \times); E 为根原基形成(10 \times); F 为不定根伸长(10 \times)。

Note: Ar. Adventitious root; Co. Cortex; Ep. Epidermis; Ph. Phloem; Rb. Root primordia; Vs. Vascular system; Vb. Vascular bundle; Vc. Vascular cambium. A. Full leaves from rooted plantlets; B. 0 d induction, transverse cut of the Poplar 741 petioles, incubate root primordium not found inside (10 \times); C. 2 d induction, cambium cell division and the cell layers manifold (10 \times); D. 2 d induction, cambium cell division and the cell layers manifold(40 \times); E. Root primordia formation (10 \times); F. Adventitious root primordium extension (10 \times).

图 6 741 杨叶柄不定根发生及其形态学观察

Fig. 6 Adventitious root formation and its morphological observation of petioles of Poplar 741

诱导培养基, 对 741 杨嫩茎、叶盘、叶和叶柄等不同外植体的生根进行了比较研究。从生根率和生根的同步性等方面看, 生根初期苗上的叶要明显优于嫩茎、叶盘和叶柄, 生根发生于诱导后 6 d, 6~8 d 不定根大量发生; 而嫩茎发根时间在诱导培养后 6 d, 不定根大量发生是在诱导后 6~18 d; 叶盘不定根发生在诱导后 6 d, 6~15 d 为不定根大量发生期; 叶柄不定根发生在诱导后 9 d, 其后生根率缓慢增长; 继代苗

2.3 叶不定根发生的形态学观察 741 杨叶不定根发生的形态学观察表明, 不定根发生部位主要位于叶柄基部约 3 mm 范围内(图 6A), 根原基发生类型属诱生型(图 6B、C), 单位点发生(图 6F)。

从生根诱导过程观察, 诱导 1 d 后叶柄基部即可见局部或全部膨大, 镜检发现皮层薄壁细胞的细胞质变浓、核仁增大, 有细胞分裂迹象; 诱导 2 d 的镜检结果显示, 维管形成层特别是维管射线正对的形成层细胞分裂旺盛, 形成层由原来的 1~2 层细胞加厚至 4~6 层, 此时细胞核染色较深, 镜检可以观察到正处于分裂后期及末期的形成层细胞(图 6B、D); 诱导 3 d, 维管射线正对的维管形成层细胞分别进行平周和垂周分裂, 形成球形细胞团, 并向皮层外围突起形成根原基(图 6E、F); 诱导 4~5 d, 由根原基细胞分化形成根的分生组织即将突破表皮, 5 d 后在叶柄外围有根突起。

3 结论与讨论

预试验结果表明, 741 杨试管外植体生根需要生长素类调节剂诱导, 但对 IBA 浓度要求不严。IBA 浓度为 0.3~1.0 mg/L 时, 嫩茎、叶盘和叶的生根率未有显著差异, 因此, 在生根培养基中选取 1/2 MS 并附加 0.5 mg/L IBA 作为生根

叶不定根发生在诱导后 7 d, 7~11 d 不定根大量发生; 生根后期苗叶生根与生根初期苗叶相似, 但生根率要低。嫩茎和叶盘生根率结果与陈正华^[12]报道的结果相近。

不定根发生的具体机制目前还不清楚。生根初期苗叶的不定根诱导明显好于其他外植体, 可能有一些原因: 第一, 与叶的来源和发育状态有关。从起源上来说, 叶是由叶原基发育而来的, 叶原基起源于茎尖分生区的顶端分生

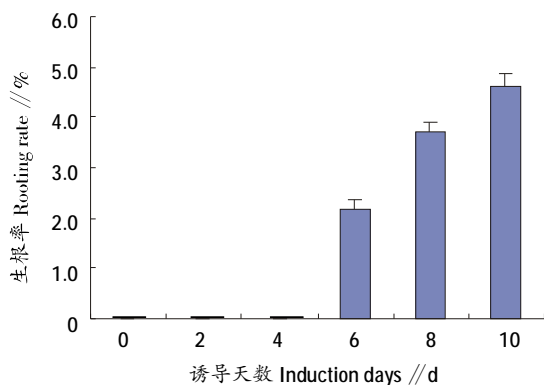


图7 1/2 MS+0.5 mg/L IBA 时 741 杨生根初期苗叶生根数变化
Fig. 7 Changes of seedling leaf rooting number at late rooting stage of Poplar 741 under 1/2 MS+0.5 mg/L IBA

组织^[15]。一般来说,叶发生于当年生枝条,而且大多只能生活 1 个生长季,因此含有较多的分化程度低的细胞。不定根的起源为内生源,一般认为其起源于中柱鞘、维管组织及其附近的薄壁细胞,这些细胞脱分化恢复分裂机能,进而形成根原基发育成不定根,因此,诱导条件下,分化程度越低的细胞越易脱分化形成不定根。据此可以推断叶的不定根诱导一般比较容易。第二,与 IAA 的分布有关。相关研究表明外源 IBA 可诱导内源 IAA 水平的增高,在启动根原基分化中发挥着重要的作用,进而促使不定根发生^[16],不定根原基的诱导与局部 IAA 水平的升高同时发生^[17],一旦根原基形成,IAA 含量将随之降低^[17]。组培苗诱导至刚刚生根时体内 IAA 含量较高,有利于不定根发生。因此,生根初期苗叶的不定根诱导要比继代苗叶和生根后期苗叶容易。另外,幼嫩叶片中合成的生长素可以通过极性运输向下输送至诱导部位,纯叶柄诱导生根率比叶低正说明了这一点。第三,与叶柄的结构有关。与茎等相比较,叶柄结构简单,且受其他组织干扰较小。

形态学观察表明,741 杨叶柄根原基发生过程与其生根曲线是一致的。同时发现,不定根原基主要发生于叶柄相对于叶片的远轴面即背面。这可能是因为含有筛管和伴胞的韧皮部位于远轴面,而分化程度较高的木质部位于近轴面即腹面,中间是形成层^[18],叶肉细胞中合成的生长素可通过筛管向下运输至诱导部位,促使不定根产生,故生长素大部分在叶柄远轴面富集,导致该部位不定根原基大量发生。

参考文献

- [1] 魏丽,蒋湘宁,裴东.不定根发生分子调控机制的研究进展[J].生命科学,2006,18(3):266-272.
- [2] KRISANTINI S,JOHNSTON M,WILLIAMS R R,et al. Adventitious root formation in *Grevillea* (Proteaceae),an Australian native species[J]. *Scientia Horticulturae*.2006,107(2):171-175.
- [3] FATMA KOYUNCU,FIKRI BALTA. Adventitious root formation in leaf-bud cuttings of tea (*Camellia sinensis* L.)[J]. *Pakistan Journal of Botany*,2004,36(4):763-768.
- [4] LU S F,ZHAO H Y,WEI H,et al. Establishment of in vitro regeneration system of triploid Chinese white Poplar [J]. *Acta Botanica Sinica*,2001,43(4):435-437.
- [5] ERMEL F F,VIZOSO S,CHARPENTIER J P,et al. Mechanisms of primordium formation during adventitious root development from walnut cotyledon explants[J]. *Planta*.2000,211(4):63-74.
- [6] FALASCA G,ZAGHI D,POSSENTI M,et al. Adventitious root formation in *Arabidopsis thaliana* thin cell layers [J].*Plant Cell Reports*.2004,23(1/2):17-25.
- [7] GUO H S,XIE Q,FEI J F,et al. MicroRNA directs mRNA cleavage of the transcription factor NaCl to downregulate auxin signals for *Arabidopsis* lateral root development [J]. *Plant Cell*, 2005,17(5):1376-1386.
- [8] SEDIRA M,BUTLER E,GALLAGHER T,et al.Verification of auxin-induced gene expression during adventitious rooting in rolB-transformed and untransformed apple Jork 9 [J]. *Plant Science*, 2005,168(5):1193-1198.
- [9] BRINKER M,VAN ZYL L,LIU W B. Microarray analyses of gene expression during adventitious root development in *Pinus contorta* [J]. *Plant physiology*.2004,135(3):1526-1539.
- [10] 肖洁凝,黄学林,张以顺,等.与芒果子叶切段不定根形成相关基因的 cDNA 片段的克隆[J].*植物生理与分子生物学学报*,2004,30(2):136-140.
- [11] THAKUR A K,SARITA SHARMA,SRIVASTAVA D K.Plant regeneration and genetic transformation studies in petiole tissue of Himalayan poplar (*Populus ciliata* Wall.)[J]. *Current Science*, 2005,89(4):664-668.
- [12] 陈正华.木本植物组织培养及其应用[M].北京:高等教育出版社,1986:141-196.
- [13] BONGA J M,DORM D J.林木组织培养[M].朗国宁,郭初达,等,译.北京:中国林业出版社,1988:129-288.
- [14] 张晓平,方炎明.杂种鹅掌楸插穗不定根发生与发育的解剖学观察[J].*植物资源与环境学报*,2003,12(1):11-16.
- [15] 杨世杰.植物生物学[M].北京:科学出版社,2002:104-234.
- [16] 裴东,袁丽钗,谷瑞升,等.核桃子叶不定根发生调控的研究[J].*林业科学*,2003,39(6):33-39.
- [17] LI X F,HE Y K,TANG Z C. Effect of IAA and stimulated microgravity on formation of adventitious roots of Chinese cabbage [J]. *Acta Bio Experi Sinia*,2000,33(2):179-185.