

南方泡桐同源四倍体的诱导及其体外植株再生

范国强,魏真真,杨志清

(河南农业大学 泡桐研究所, 河南 郑州 450002)

【摘 要】 【目的】用秋水仙素诱导出南方泡桐同源四倍体,建立其体外植株高效再生系统,为泡桐新品种的培育奠定基础。【方法】以二倍体南方泡桐幼苗叶片为外植体,预培养泡桐不同时间(0,8,16 d)后,置于含不同质量浓度(5,10,20 mg/L)秋水仙素的固液双层培养基上处理泡桐不同时间(24,48,72 h),以诱导其同源四倍体植株,并通过根尖细胞染色体计数和叶片单细胞 DNA 相对含量的测定,进行变异植株的倍性分析;同时,以其四倍体叶片、茎段和叶柄为外植体,利用不同植物激素不同质量浓度的组合培养基,筛选建立体外植株再生系统的最适培养基。【结果】秋水仙素质量浓度和处理时间对南方泡桐同源四倍体诱导率影响显著,外植体预培养时间影响不显著;在含 10 mg/L 秋水仙素的 MS 培养基上处理 72 h,未经预培养叶片的四倍体诱导率高达 18.8%;同源四倍体幼苗叶片较二倍体大而且厚,叶片单气孔器变大,孔密度变小,叶绿素含量和 SOD 活性升高,MDA 含量和 POD 活性降低。MS+0.1 mg/L NAA+8 mg/L BA、MS+0.3 mg/L NAA+12 mg/L BA 和 1/2 MS 分别是其愈伤组织诱导、芽诱导和根诱导的适宜培养基。【结论】诱导获得了南方泡桐同源四倍体,建立了同源四倍体南方泡桐的体外植株再生系统;叶片是同源四倍体南方泡桐体外植株再生的最佳外植体。

【关键词】 南方泡桐;秋水仙素;同源四倍体;体外植株再生

【中图分类号】 S792.43;S722.3⁺5

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2009)10-0083-08

Induction of autotetraploid of *Paulownia australis* and its *in vitro* plantlet regeneration

FAN Guo-qiang, WEI Zhen-zhen, YANG Zhi-qing

(Institute of Paulownia, He'nan Agricultural University, Zhengzhou, He'nan 450002, China)

Abstract: 【Objective】 Induction of *Paulownia australis* autotetraploid with colchicines was investigated and the system of *in vitro* plantlet regeneration with different explants was established in order to lay foundation for the breeding of new variant of *Paulownia* plants. 【Method】 The diploidy leaves on the liquid-solid double layer MS media with different colchicines concentrations were used to induce the autotetraploid and the ploidy levels were analysed through chromosome numbering of the plant root tip cells and DNA relative content of the leaf single cell. 【Result】 The concentrations of colchicine and the treatment periods were significantly different, and pre-culture time was not significantly different to the autotetraploidy induction. The highest induction rate might reach 18.8% from non pre-cultured leaves treated with 10 mg/L colchicine for 72 h on the MS medium. Leaves of the autotetraploids were larger and thicker, and the stomatal size and density on the leaf larger and thinner than those of the diploid, and the chlorophyll content and SOD activities of the autotetraploids became higher and MDA content and POD activity lower than those of the diploids. MS+0.1 mg/L NAA+8 mg/L BA, MS+0.3 mg/L NAA+12 mg/L BA and 1/2 MS were the optimal media for shoot and root induction respectively. 【Conclusion】 The autotetraploid of *Paulownia australis* was induced and the system of its *in vitro* plantlet regeneration was established. Moreo-

* 【收稿日期】 2009-02-20

【基金项目】 河南省高校创新人才基金项目(2002012)

【作者简介】 范国强(1964—),男,河南禹州人,教授,博士生导师,主要从事泡桐生物技术研究。E-mail: gqfan@henau.edu.cn

ver, leaves were the suitable explants for the *in vitro* plantlet regeneration.

Key words: *Paulownia australis*; colchicine; autotetraploid; *in vitro* plantlet regeneration

多倍体植物具有生物量大和抗逆性强等特点,自 20 世纪 30 年代德国首次育成了四倍体黑麦以来,国内外科技工作者对其进行了大量研究,并培育出了多种多倍体植物^[1-16],有的多倍体植物已在农林业生产上产生了显著的经济和社会效益^[17-18]。泡桐是中国重要的速生用材和庭院绿化树种之一,但由于种质资源匮乏、遗传背景窄等缘故,生产中发生严重的丛枝病和低于大冠等问题一直未得到解决,从而限制了泡桐的大面积种植。平吉 功^[13]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,范国强等^[1-3]成功诱导了同源四倍体毛泡桐、兰考泡桐和白花泡桐植株,并建立了其体外植株再生系统^[19]。然而,国内外至今未见南方泡桐四倍体诱导及其体外植株再生方面的报道。本研究以组培苗叶片为试验材料,对南方泡桐进行了同源四倍体诱导,并在此基础上建立了其四倍体的体外植株再生系统,以期完善泡桐同源四倍体诱导体系,为扩大其种质资源和培育新品种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料及处理

将 2006-10-21 采集于河南农业大学郑州林业试验站的南方泡桐(*Paulownia australis* Gong Tong)($2n=2x=40$)种子先在体积分数 75% 的酒精中消毒 30 s,再用质量分数 0.1% 的 HgCl_2 消毒 5 min,然后用无菌水清洗 3~4 次,并用无菌滤纸吸干种子表面水分后,放入盛有 40 mL 不含植物激素的 MS 培养基(含蔗糖 20 g/L,琼脂粉 3.0 g/L)的三角瓶中,在温度为 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ 、光照强度为 $130 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、光照时间为 16 h/d 的人工气候箱内进行培养。40 d 后,待幼苗长至约 2 cm 高时,取同一株幼苗叶片作为外植体,置于其体外植株再生最适培养基上^[20],在上述温度和光照条件下进行幼苗培养。80 d 时即可获得长有 6~8 对叶片同一无性系的南方泡桐组培苗,取其叶片用于同源四倍体诱导。

1.2 试验方法

1.2.1 同源四倍体南方泡桐植株的诱导 取上述方法培养的南方泡桐幼苗,自形态学上端向下数的第 2~3 对叶片,去叶缘后剪成约 $1.0 \text{ cm} \times 1.0 \text{ cm}$ 小块(外植体),分别接种于盛有“40 mL MS+0.3

mg/L NAA+2 mg/L BA”培养基^[20]的 100 mL 三角瓶中,在上述温度和光照条件下预培养 0,8 和 16 d 后,置于秋水仙素质量浓度分别为 5,10 和 20 mg/L 的固液双层培养基^[3]上,在温度为 20°C 的黑暗条件下诱导处理 24,48 和 72 h。处理结束后,先用无菌水清洗外植体 3 次,再用无菌滤纸吸干外植体表面液体后转到不含秋水仙素的芽诱导最适培养基上,于温度为 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ 、光照强度为 $130 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、光照时间为 16 h/d 的培养室内进行培养。每处理共 60 个外植体。40 d 时,统计外植体存活数及出芽数,并计算其存活率(存活率/%=(存活外植体个数/接种外植体总数) $\times 100\%$)和芽诱导率(芽诱导率/%=(诱导出芽外植体数/接种外植体总数) $\times 100\%$)。

当诱导出的幼芽长到约 2 cm 时,从基部剪断放入上述 1/2 MS 培养基上诱导生根,每 20 d 继代 1 次,共继代 5 次。第 5 次继代苗培养 20 d 时,先将制成的根尖临时压片^[21],在尼康 TS-100 荧光倒置显微镜($\times 2000$)下进行染色体计数,同时用流式细胞仪测定染色体变化的南方泡桐幼苗叶片单细胞 DNA 的相对含量^[14],以确定诱变植株的倍性,并计算同源四倍体诱导率(诱导率/%=(流式细胞仪确认四倍体幼芽数/外植体诱导出的总芽数) $\times 100\%$)。

同源四倍体与二倍体幼苗形态学、叶片表皮细胞气孔器的比较参照范国强等^[3]的方法进行,叶绿素和丙二醛(MDA)含量及过氧化物酶(POD)和超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定参照李合生等^[22]的方法进行。试验重复 2 次。

1.2.2 同源四倍体南方泡桐体外植株再生系统的建立 将上述在 1/2 MS 培养基上生长 30 d 的同源四倍体南方泡桐幼苗叶片,切成约 $1.0 \text{ cm} \times 1.0 \text{ cm}$ 的小块,将茎段和叶柄剪成 1 cm 小段(外植体),放入装有 40 mL 附加不同质量浓度植物激素 MS 培养基(蔗糖 25 g/L,琼脂粉 3.0 g/L)的 100 mL 三角瓶中。每一种植物激素不同质量浓度组合培养基接种 20 瓶,每瓶 4 个外植体。

将放有外植体的三角瓶置于温度为 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ 、光照强度为 $130 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、光照时间为 16 h/d 的培养室内进行愈伤组织诱导。20 d 时,统计不同外植体的愈伤组织诱导率(愈伤组织诱导率/%=(诱导愈伤组织的外植体数/接种外植体

总数) $\times 100\%$),并根据其大小确定同源四倍体南方泡桐不同外植体愈伤组织诱导的最适培养基。

然后,将外植体在最适培养基上诱导出的愈伤组织切成约 1.0 cm³ 的小块,放在附加有激素(质量浓度为 0.1~1.1 mg/L NAA 和 4~20 mg/L BA)的 MS 培养基上,在上述温度和光照条件下进行芽诱导。每一种植物激素不同质量浓度组合培养基接种 20 瓶,每瓶 3 块愈伤组织。于第 20 天时,观察芽诱导情况,并计算芽诱导率(芽诱导率/ $\%$ =(诱导出芽外植体数/接种愈伤组织块数) $\times 100\%$),以确定芽诱导的最适培养基。

在芽诱导最适培养基上诱导长出约 4 cm 的幼芽,从其基部剪断转移至盛有 40 mL 含 0~0.7 mg/L NAA 的 1/2 MS 培养基(蔗糖和琼脂质量浓度分别为 25 和 3.0 g/L)的 100 mL 三角瓶中,在上述条件下进行根诱导,至第 20 天时,观察其生根情况,计算根诱导率。

1.2.3 数据处理 外植体存活率、芽诱导率、四倍体诱导率和根诱导率经反正弦转换后,采用 SPSS12.0 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 南方泡桐同源四倍体植株的诱导

2.1.1 不同处理对南方泡桐同源四倍体诱导率的影响 由表 1 和表 2 可知,不同秋水仙素质量浓度、诱导时间和外植体预培养时间的组合处理,对南方泡桐外植体存活率、芽诱导率和四倍体诱导率均有一定影响,但影响程度并不相同。当预培养时间和秋水仙素质量浓度一定时,随着秋水仙素处理时间的延长,泡桐外植体存活率逐渐变小;当秋水仙素质量浓度和处理时间一定时,随着预培养时间的增加,外植体存活率整体呈现出先降低后升高的变化趋势。

表 1 秋水仙素对南方泡桐叶片诱导四倍体植株的影响

Table 1 Effects of colchicine treatment duration on tetraploid induction of *Paulownia* plants

预培养时间/h Precultured time of explants	秋水仙素质量浓度/ (mg·L ⁻¹) Colchicine concentration	处理时间/h Treatment period	外植体存活率/% Survival rate of explants	芽诱导率/% Rate of shoot induction	四倍体诱导率/% Induction rate of the tetraploid
0	5	24	50.0 b	25.0 ab	0.0 r
0	5	48	40.0 d	18.4 cde	3.2 q
0	5	72	33.3 f	13.3 ef	11.3 g
0	10	24	40.0 d	18.4 cede	5.8 p
0	10	48	35.0 ef	13.3 ef	9.9 h
0	10	72	30.0 g	10.0 fg	18.8 a
0	20	24	36.7 e	13.3 ef	7.7 k
0	20	48	30.0 g	10.0 fg	15.5 d
0	20	72	23.3 i	1.7 j	0.0 r
8	5	24	45.0 c	23.3 abc	0.0 r
8	5	48	36.7 e	16.7 de	0.0 r
8	5	72	30.0 g	13.3 ef	8.4 i
8	10	24	36.7 e	16.7 de	3.3 q
8	10	48	30.0 g	13.3 ef	8.0 j
8	10	72	26.7 h	6.7 gh	17.4 b
8	20	24	33.3 f	13.3 f	7.4 l
8	20	48	26.7 h	10.0 fg	14.9 e
8	20	72	20.0 j	0.0 k	0.0 r
16	5	24	53.3 a	28.4 a	0.0 r
16	5	48	43.3 c	20.0 bcd	0.0 r
16	5	72	40.0 d	16.7 de	6.8 m
16	10	24	43.3 c	21.7 bcd	0.0 r
16	10	48	36.7 e	16.7 de	6.5 n
16	10	72	33.3 f	11.7 f	16.3 c
16	20	24	40.0 d	18.4 cde	6.2 o
16	20	48	35.0 ef	13.3 ef	12.9 f
16	20	72	26.7 h	3.3 i	0.0 r

注:同列数据后标不同小写字母表示在 $P=0.05$ 水平上差异显著。下表同。
Note: Data followed by different letters differ significantly within columns at $P=0.05$ level. The same are as follows.

由表 1 可见,在秋水仙素质量浓度、处理时间和预培养时间分别为 5 mg/L、24 h 和 16 d 时,外植体存活率达到最高,为 53.3%,芽诱导率也达到最高,为 28.4%,但四倍体诱导率的变化趋势与外植体存活率和芽诱导率的变化趋势存在一定差异。也就是说,在一定范围内,秋水仙素质量浓度和处理时间与四倍体诱导率呈正相关关系,但当其大于一定范围时,秋水仙素质量浓度和处理时间与四倍体诱导率呈负相关关系,这可能与秋水仙素质量浓度和处理时间分别为最大值时,秋水仙素对预培养叶片诱导出来的幼芽产生了较大的毒害作用,最终导致幼芽

死亡有一定关系。此外,随着预培养时间的延长,叶片四倍体诱导率整体上呈逐渐下降趋势,其原因可能与叶片细胞接触秋水仙素的面积和处于同一分裂周期细胞的大小和数量多少有关。由表 1 可见,不经预培养的叶片,在质量浓度为 10 mg/L 秋水仙素培养基中处理 72 h,四倍体诱导率最大,达 18.8%。方差分析结果(表 2)表明,秋水仙素的质量浓度和处理时间对南方泡桐外植体成活率、芽诱导率和四倍体诱导率皆产生了显著影响,而外植体预培养时间对南方泡桐的成活率和芽诱导率作用显著,但对其四倍体诱导率的作用不显著。

表 2 秋水仙素诱导南方泡桐四倍体植株的方差分析

方差来源 Source	外植体存活率 Survival rate of explants		芽诱导率 Induction rate of shoots		四倍体诱导率 Induction rate of tetraploids	
	MS	F	MS	F	MS	F
预培养时间 Precultured time	90.66	131.01**	79.42	9.35**	80.54	1.17
秋水仙素浓度 Colchicine concentration	205.20	296.54**	475.35	55.97**	417.84	6.07**
处理时间 Treatments period	270.62	391.09**	576.41	67.87**	228.59	3.32*

注(Notes): $P=0.05, f(2,11)=3.98$; $P=0.01, f(2,11)=7.2$ 。
2.1.2 南方泡桐同源四倍体植株的鉴定 在显微镜下观察临时压片发现,二倍体根尖细胞染色体数均为 $2n=2x=40$,而变异植株染色体数均为 $2n=4x=80$ (图 1),变异植株幼苗细胞染色体数为二倍体幼苗细胞染色体数的 2 倍,此外未发现非整倍体和嵌合体的存在。利用流式细胞仪对继代 5 次的变异植株和二倍体植株叶片单细胞 DNA 相对含量的

检测结果(图 2)表明,南方泡桐二倍体在相对荧光强度为 50 处出现了 1 个单峰,而变异植株在相对荧光强度为 100 处出现了 1 个单峰,未发现相对荧光强度为 50 和 100 位置以外有明显的峰出现,即变异植株单细胞 DNA 相对荧光强度为二倍体的 2 倍。以上结果表明,诱导获得的南方泡桐变异植株完全为同源四倍体植株。

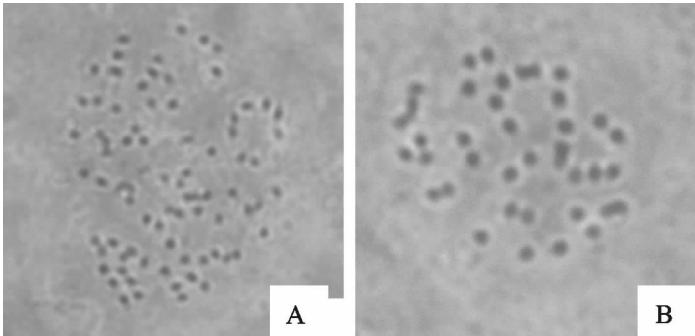


图 1 不同倍性南方泡桐根尖细胞的染色体观察
A. 四倍体($2n=4x=80$);B. 二倍体($2n=2x=40$)

Fig.1 Chromosome numbers of root tip cell of the diploty and tetraploidy
A. Tetraploid($2n=4x=80$);B. Diploid($2n=2x=40$)

2.1.3 南方泡桐四倍体与二倍体幼苗的比较 比较二倍体和四倍体南方泡桐幼苗的形态(表 3 和图 3),可以发现,与二倍体植株相比,四倍体植株叶片显著增大、增厚,叶色加深,叶片长宽比减小。四倍体南方泡桐叶片气孔明显大于二倍体,其叶片气孔长度、宽度分别为二倍体的 116%和 122%。四倍体

南方泡桐叶片的气孔器密度变小,其叶片气孔密度为二倍体的 59.6%。对四倍体和二倍体南方泡桐幼苗叶片生化指标的测定结果(表 4)表明,四倍体植株叶片叶绿素含量高于二倍体,MDA 含量低于二倍体,叶片 POD 活性低于二倍体,而 SOD 活性高于二倍体。

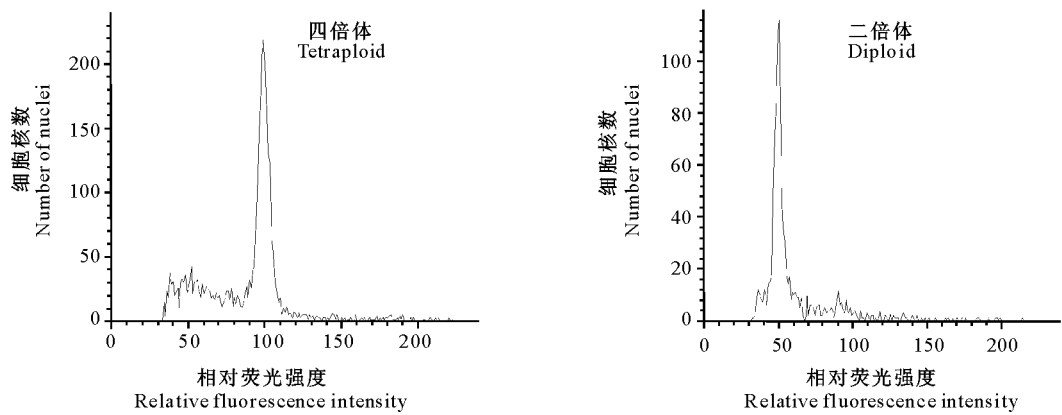


图 2 南方泡桐四倍体和二倍体叶片细胞 DNA 含量的分布

Fig. 2 DNA distribution histogram of the leaf cells of the tetraploidy and diploidy plants

表 3 南方泡桐四倍体和二倍体叶片形态及气孔的变化

倍性 Ploidy	叶长/ μm Leaf length	叶宽/ μm Leaf width	叶长/叶宽 Leaf length /Width	气孔器长/ μm Stomatal length	气孔器宽/ μm Stomatal width	气孔器长宽比 Stomata length/Width	气孔器密度/ mm^2 Stomatal density	气孔器密度比 Ratio of stomata
4x	$4.01\pm0.29\text{ a}$	$3.65\pm0.24\text{ a}$	1.10 b	$23.45\pm0.28\text{ a}$	$20.12\pm0.25\text{ a}$	1.16 a	$253.38\pm10.78\text{ b}$	0.596
2x	$3.60\pm0.18\text{ b}$	$3.10\pm0.11\text{ b}$	1.16 a	$20.18\pm0.23\text{ b}$	$16.52\pm0.14\text{ b}$	1.22 a	$424.82\pm16.32\text{ a}$	

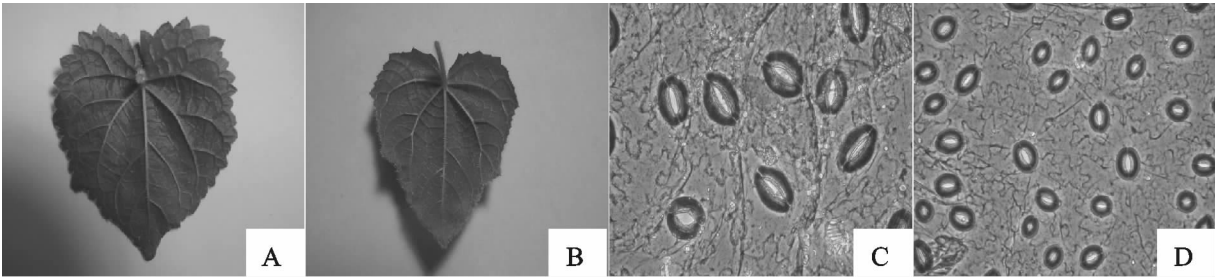


图 3 南方泡桐四倍体和二倍体叶片及其气孔的观察

A. 四倍体叶片;B. 二倍体叶片;C. 四倍体叶片气孔($\times 2\ 400$);D. 二倍体叶片气孔($\times 2\ 400$)

Fig. 3 Leaves and their stomata of the diploid and tetraploid

A. Tetraploidy leaf;B. Diploidy leaf;C. Stomata of tetraploidy leaf($\times 2\ 400$);D. Stomata of diploidy leaf($\times 2\ 400$)

表 4 南方泡桐四倍体和二倍体叶片生化指标的差异

项 目 Item	叶绿素含量 Chlorophyll content	MDA 含量 MDA content	POD 活性 POD activity	SOD 活性 SOD activity
4x/2x	1.14 ± 0.04	0.50 ± 0.06	0.42 ± 0.03	1.10 ± 0.05

2.2 南方泡桐同源四倍体体外植株再生系统的建立

2.2.1 不同外植体愈伤组织的诱导 分别以同源四倍体南方泡桐幼苗的叶片、茎段和叶柄为外植体,在不同植物激素质量浓度组合的培养基上进行培养,其愈伤组织的诱导结果(表 5,图 4-A)表明,不同外植体在不同培养基上的愈伤组织诱导率存在一定差异。当 NAA 质量浓度为 0.1 mg/L 时,或 NAA 质量浓度为 0.3~1.1 mg/L,BA 质量浓度为 4~16 mg/L 时,叶片愈伤组织的诱导率均为 100.0%;当

NAA 质量浓度为 0.3~1.1 mg/L,BA 质量浓度为 4~8 mg/L 时,茎段和叶柄愈伤组织的诱导率均为 100.0%;当 BA 质量浓度为 12~20 mg/L 时,随着 BA 质量浓度的增大,3 种外植体的愈伤组织诱导率均逐渐降低。茎段和叶柄愈伤组织诱导率最低的植物激素质量浓度组合皆为 0.1 mg/L NAA+20 mg/L BA,与其他试验组合的愈伤诱导率差异显著。这些结果虽然表明,同源四倍体泡桐幼苗不同外植体的愈伤组织诱导率不同,但观察发现,叶片、茎段和叶柄诱导出的愈伤组织在形态和质地等方面

存在一定差异。因此,在综合考虑以上因素及成本的基础上,选择 MS+0.1 mg/L NAA+8 mg/L BA 培养基作为四倍体南方泡桐叶片、茎段和叶柄愈伤组织诱导的最适培养基。

表 5 不同外植体和植物激素组合对南方泡桐同源四倍体愈伤组织诱导的影响

植物激素/(mg·L ⁻¹) Phytohormones		愈伤组织诱导率/% Rate of callus induction			愈伤组织芽诱导率/% Callus induction rate of leaves		
NAA	BA	叶片 Leaves	茎段 Stem segments	叶柄 Petiole	叶片 Leaves	茎段 Stem segments	叶柄 Petioles
0.1	4	100.0 a	100.0 a	100.0 a	26.6 q	0.0 d	10.0 ab
0.1	8	100.0 a	100.0 a	100.0 a	46.7 l	6.7 a	11.7 a
0.1	12	100.0 a	73.3 d	71.7 e	51.7 k	8.4 a	13.3 a
0.1	16	100.0 a	33.4 i	30.0 i	76.7 e	0.0 d	0.0 e
0.1	20	100.0 a	15.0 j	15.0 j	33.3 p	0.0 d	0.0 e
0.3	4	100.0 a	100.0 a	100.0 a	33.3 p	3.3 b	0.0 e
0.3	8	100.0 a	100.0 a	100.0 a	75.0 ef	0.0 d	1.7 d
0.3	12	100.0 a	96.7 b	100.0 a	91.7 a	1.7 c	10.0 ab
0.3	16	100.0 a	50.0 fg	90.0 c	70.0 g	6.7 a	6.7 bc
0.3	20	96.7 c	40.0 h	80.0 d	68.4 gh	0.0 d	0.0 e
0.5	4	100.0 a	100.0 a	100.0 a	40.0 n	0.0 d	10.0 ab
0.5	8	100.0 a	100.0 a	100.0 a	80.0 d	0.0 d	6.7 bc
0.5	12	100.0 a	100.0 a	100.0 a	88.4 b	6.7 a	0.0 e
0.5	16	100.0 a	60.0 f	95.0 b	83.3 c	1.7 c	0.0 e
0.5	20	95.0 c	40.0 h	90.0 c	70.0 g	0.0 d	0.0 e
0.7	4	100.0 a	100.0 a	100.0 a	36.7 o	0.0 d	0.0 e
0.7	8	100.0 a	100.0 a	100.0 a	66.7 h	0.0 d	10.0 ab
0.7	12	100.0 a	66.7 e	90.0 c	83.3 c	0.0 d	0.0 e
0.7	16	100.0 a	48.4 g	66.7 f	88.4 b	0.0 d	0.0 e
0.7	20	98.4 b	40.0 h	48.4 h	66.7 h	0.0 d	0.0 e
0.9	4	100.0 a	100.0 a	100.0 a	43.3 m	0.0 d	0.0 e
0.9	8	100.0 a	100.0 a	100.0 a	60.0 j	0.0 d	0.0 e
0.9	12	100.0 a	100.0 a	100.0 a	73.3 f	0.0 d	5.0 c
0.9	16	100.0 a	80.0 c	100.0 a	76.7 e	0.0 d	6.7 bc
0.9	20	96.7 c	50.0 g	60.0 g	63.3 i	0.0 d	0.0 e
1.1	4	100.0 a	100.0 a	100.0 a	13.3 r	0.0 d	0.0 e
1.1	8	100.0 a	100.0 a	100.0 a	43.3 m	0.0 d	6.7 bc
1.1	12	100.0 a	100.0 a	100.0 a	76.7 e	0.0 d	0.0 e
1.1	16	100.0 a	81.7 c	91.7 c	83.3 c	0.0 d	0.0 e
1.1	20	96.7 c	46.7 g	50.0 h	66.7 h	0.0 d	0.0 e

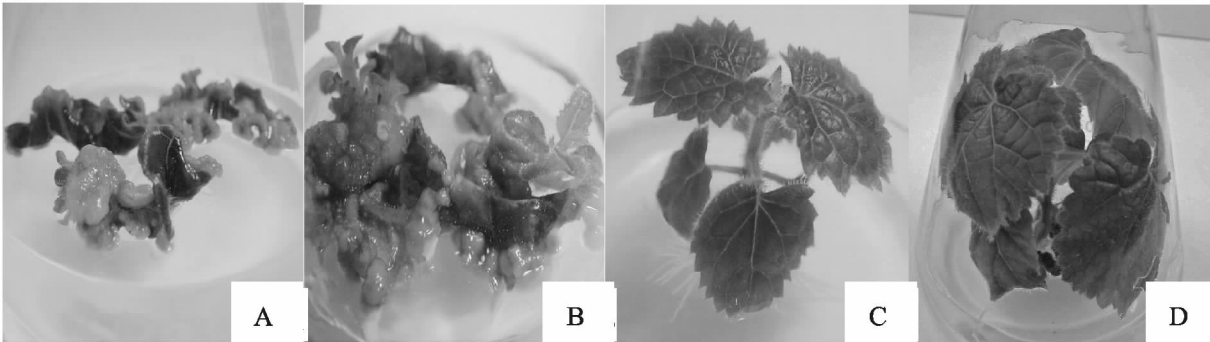


图 4 南方泡桐同源四倍体体外植株的再生

A. 愈伤组织诱导;B. 幼芽诱导;C. 幼芽根诱导;D. 幼苗

Fig. 4 *In vitro* plantlet regeneration of autotetraploid of *P. australis*

A. Callu;B. Induction of shoots;C. Induction of roots;D. Seedling

2.2.2 同源四倍体南方泡桐幼苗愈伤组织芽的诱导 同源四倍体南方泡桐幼苗愈伤组织芽的诱导结果(表 5,图 4-B)表明,在不同植物激素质量浓度组合的培养基上,不同愈伤组织的芽诱导率存在一定

差异。当 NAA 质量浓度一定时,随 BA 质量浓度的增加,叶片愈伤组织诱导率呈现出先上升后下降的趋势;当 NAA 质量浓度分别为 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9, 1.1 mg/L 时,叶片愈伤组织最高的芽诱导率分别达到 76.7%, 91.7%, 88.4%, 88.4%, 76.7%和 83.3%。但是,茎段和叶柄在 NAA 和 BA 所有植物激素组合中,最高的芽诱导率分别仅为 8.4%和 13.3%。因此认为,叶片愈伤组织是同源四倍体南方泡桐芽诱导的最适愈伤组织,MS+0.3 mg/L NAA+12 mg/L BA 培养基为愈伤组织芽诱导的最适培养基。

2.2.3 同源四倍体南方泡桐幼芽根的诱导 由同源四倍体南方泡桐幼芽在不同质量浓度 NAA 的 1/2 MS 培养基上的根诱导结果(表 6,图 4-C)可以

看出,不同质量浓度的 NAA 对幼芽根诱导作用不同。虽然同源四倍体南方泡桐幼芽在供试培养基上均能诱导生根,且最高的根诱导率可达 100%,但不同质量浓度 NAA 对诱导出第 1 条根的时间、根的数量和每株幼苗平均根长的影响不同。随着 NAA 质量浓度的增大,诱导出第 1 条根所需的时间越来越长,幼芽生根数量逐渐减少,平均根长越来越短。造成该结果的主要原因,可能是由于 NAA 质量浓度的逐渐增大,导致幼芽切口处产生的愈伤组织较多所致。综合同源四倍体南方泡桐幼芽生根时间、根数量和平均根长及幼苗的生长情况(图 4-D)等因素,选择 1/2 MS 培养基为四倍体南方泡桐幼芽生根的最适培养基。

表 6 南方泡桐同源四倍体幼芽根的诱导
Table 6 Root induction of autotetraploid of the shoots

NAA 质量浓度/(mg · L ⁻¹) Concentration	根诱导率/% Rooting rate	诱导出第 1 条根所需时间/d Time of the first rooting	根数 Root number	平均根长/cm Mean length of roots
0.0	100 a	12 d	5 a	3.8 a
0.1	100 a	12 d	5 a	3.5 b
0.3	100 a	15 c	4 b	3.1 c
0.5	100 a	16 b	3 c	2.9 c
0.7	100 a	18 a	3 c	2.0 d

3 讨 论

植物细胞染色体加倍与染色体诱变剂种类及其处理时间等因素有关。众所周知,秋水仙素是至今人们发现的最有效、使用最广泛的生物细胞染色体加倍诱导剂,在林木多倍体诱导中具有极其重要的作用。有研究发现,在一定质量浓度范围内,秋水仙素对染色体结构无破坏作用,在遗传上很少造成其他不利变异,当诱变剂去除后,经一定时间处理的细胞可恢复正常分裂,形成染色体加倍的多倍体细胞^[7]。不同植物细胞对秋水仙素的敏感性存在差异,因此,不同植物多倍体诱导所需的最适秋水仙素质量浓度和处理时间组合也不尽相同^[1-3,5-13]。对泡桐来说,获得白花泡桐同源四倍体最高诱导率的最适处理组合为预培养 12 d 的叶片在秋水仙素质量浓度为 5 mg/L 的培养基上处理 72 h,毛泡桐为预培养 6 d 叶片在 20 mg/L 秋水仙素培养基上处理 72 h,而兰考泡桐则为预培养 12 d 的叶片在 10 mg/L 秋水仙素培养基上处理 24 h^[1-3]。本试验中,获得南方泡桐叶片最高四倍体诱导率的条件是:不经预培养的叶片在质量浓度为 10 mg/L 的秋水仙素中处理 72 h。也就是说,南方泡桐同源四倍体诱导率最高的处理组合,不是经一定时间预培养后的

叶片在最高质量浓度秋水仙素中处理最长时间的组合,造成该结果的原因,一方面可能与该树种的起源有关^[20,23],另一方面还可能与其在北方地区长期生长后产生的变异有关。

植物体外植株的再生与植物种类、植物基因型和培养基成分及培养条件均有密切关系^[20,23-25]。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^[19,25]。本试验中,四倍体南方泡桐幼苗叶片、茎段和叶柄最高芽诱导率分别为 91.7%, 8.4%和 13.3%,其与二倍体幼苗相同外植体最高芽诱导率存在明显差异^[21,23]。造成该结果的原因,可能与二倍体和四倍体南方泡桐幼苗体外植株再生时,外植体的生理状态以及二者细胞基因表达产物的种类或数量存在一定差异有关^[24-25],至于其具体原因将在以后的论文中予以报道。

[参考文献]

[1] 范国强,杨志清,曹艳春,等. 秋水仙素诱导兰考泡桐源四倍体[J]. 核农学报,2006,20(6):473-476.
Fan G Q, Yang Z Q, Cao Y C, et al. Autotetraploid induction of *Paulownia elongata* with colchicine [J]. Journal of Nuclear Agricultural Science, 2006, 20(6): 473-476. (in Chinese)
[2] 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.
- Fan G Q, Yang Z Q, Cao Y C, et al. Induction of autotetraploid of *Paulownia tomentosa* (Thunb.) Steud [J]. Plant Physiology Communication, 2007, 43(1): 109-111. (in Chinese)
- [3] 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.
- Fan G Q, Cao Y C, Zhao Z L, et al. Induction of autotetraploid of *Paulownia tomentosa* [J]. Scientia Silvae Sinicae, 2007, 43(4): 31-35. (in Chinese)
- [4] 李 云, 朱之悌, 田硯亭, 等. 秋水仙碱处理白杨雌花芽培育三倍体植株的研究 [J]. 林业科学, 2001, 37(5): 68-74.
- Li Y, Zhu Z T, Tian Y T, et al. Studies on abstaining triploids by colchicines treating female flower buds of White poplar [J]. Scientia Silvae Sinicae, 2001, 37(5): 68-74. (in Chinese)
- [5] Chakpaborti S P, Vijayan K. *In vitio* induction of tetraploidy in mulberry (*Morus alba* L.) [J]. Plant Cell Reports, 1998, 17: 799-803.
- [6] 孙日彦, 梁明芝, 宋慧贞, 等. 秋水仙碱处理成龄桑诱导四倍体研究 [J]. 蚕业科学, 1997, 23(1): 55-56.
- Sun R Y, Liang M Z, Song H Z, et al. Studies on induction of tetraploidy by colchicine treating muture mulberry, *morus* spp. [J]. Acta Sericologica Sinica, 1997, 23(1): 55-56. (in Chinese)
- [7] 谭德冠, 庄南生, 黄华孙. 刚果 12 号桉离体组织的多倍体诱导 [J]. 热带作物学报, 2005, 26(2): 50-54.
- Tang D G, Zhuang N S, Huang H S. Polypoid induction of *in vitro* tissue eucalyptus 12ABL [J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2005, 26(2): 50-54. (in Chinese)
- [8] 杨今后. 桑树四倍体的诱导及其应用 [J]. 桑业科学, 2004, 30(1): 6-10.
- Yang J H. Induction of tetraploidy and its application in mulberry, *morus* spp. [J]. Acta Sericologica Sinica, 2004, 30(1): 6-10. (in Chinese)
- [9] 韩礼星, 赵改荣, 李玉红, 等. 猕猴桃多倍体诱导研究 [J]. 果树科学, 1998, 15(2): 273-276.
- Han L X, Zhao G R, Li Y H, et al. Studies on induction of polyploid on actinidia chinensis [J]. Journal of Fruit Science, 1998, 15(2): 273-276. (in Chinese)
- [10] 蒋洪恩, 刘孟军. 秋水仙碱诱导枣多倍体的研究 [J]. 园艺学报, 2004, 31(5): 647-650.
- Jiang H E, Liu M J. Studies on polyploid induction of Chinese jujube with colchicine [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2004, 31(5): 647-650. (in Chinese)
- [11] 刘庆忠, 赵红军, 刘 鹏, 等. 秋水仙素处理离体叶片获得皇家嘎拉苹果四倍体植株 [J]. 果树学报, 2001, 18(1): 7-10.
- Liu Q Z, Zhao H J, Jiu P, et al. Regeneration of tetraploid plants of royal gala apple variety from *in vitro* leave treated with colchicine [J]. Journal of Fruit Science, 2001, 18(1): 7-10. (in Chinese)
- [12] 罗耀武, 乔子靖, 朱子英, 等. 人工诱变获得四倍体玫瑰香葡萄的研究 [J]. 园艺学报, 1997, 24(2): 125-128.
- Luo Y W, Qiao Z J, Zhu Z Y, et al. Study on autotetraploid grape muscat hamburg with good quality [J]. Acta Horticulture Sinica, 1997, 24(2): 125-128. (in Chinese)
- [13] 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]. Seikenziho, 1950, 4: 17-21.
- [14] Hlicini K, Walker D J, Bouzid S, et al. Determination ploidy level and nuclear DNA content in Tunisian populations of *At-riplex halimus* L. [J]. Gen Res Crop Evol, 2006, 253: 1-5.
- [15] Jane F, Carvalho R P, Carvalho S, et al. *In vitro* induction of polyploidy in annatto (*Bixa orellana*) [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2005, 80(1): 69-75.
- [16] Tambong J T, Saprav T, Garton S. *In vitro* induction of tetraploids in colchicine-treated cocoyam plantlets [J]. Euphytica, 1998, 104(3): 191-197.
- [17] 孔凡功, 陈嘉川, 詹怀宇, 等. 三倍体毛白杨常规 APMP 与 P-RC APMP 的制浆研究 [J]. 中国造纸学报, 2004, 19(2): 21-24.
- Kong F G, Chen J C, Zhan H Y, et al. Comparison of conventional APMP and P-RC APMP of a hybird poplar [J]. Transactions of China Pulp and Paper, 2004, 19(2): 21-24. (in Chinese)
- [18] Kalaycioglu H, Deniz I, Hizirglu S. Some of the properties of partickeboard made from *Paulownia* [J]. Journal of Wood Science, 2005, 51: 410-414.
- [19] 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.
- Yang Z Q, Fan G Q, Cao Y C, et al. Establishment of the system of *in vitro* plantlet regeneration of different autotetraploid paulownia plants [J]. Journal of Henan Agricultural University, 2007, 41(2): 149-153. (in Chinese)
- [20] 范国强, 翟晓巧, 蒋建平, 等. 不同种泡桐叶片愈伤组织诱导及其植株再生 [J]. 林业科学, 2002, 38(1): 29-35.
- Fan G Q, Zhai X Q, Jiang J P, et al. Callus induction from Paulownia plant leaves and their plantlet regenerations [J]. Scientia Silvae Sinicae, 2002, 38(1): 29-35. (in Chinese)
- [21] 舒寿兰. 四种泡桐染色体数目的初步研究 [J]. 河南农业大学学报, 1985, 19(1): 48-50.
- Shu S L. Study on chromosome number of four kinds of *Paulownia* [J]. Journal of Henan Agricultural University, 1985, 19(1): 48-50. (in Chinese)
- [22] 李合生, 孙 群, 赵世杰, 等. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- Li H S, Sun Q, Zhao S J, et al. Experimental principle and technique of plant physiology and biochemistry [M]. Beijing: Higher Education Press, 2000. (in Chinese)
- [23] 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, 2002, 12(4): 209-214.
- [24] Bergman B A, Moon H K. *In vitro* adventitious shoot production in *Paulownia* [J]. Plant Cell Reports, 1997, 16: 315-319.
- [25] 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: 204-209.