

## 杉木再生系统的比较研究

朱木兰 王 骥 卫志明\*

(中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所, 上海 200032)

**摘要** 通过对杉木(*Cunninghamia lanceolata* Hook)再生系统的比较研究,建立了子叶、下胚轴、茎段和针叶等四个再生体系。子叶在附含1 mg/L BA和0.1 mg/L NAA的DCR培养基中再生频率为93.7%±0.45%,平均芽数为3.76±0.25;下胚轴在附含2 mg/L BA和0.2 mg/L NAA的DCR培养基中再生频率为96.2%±0.35%,平均芽数为17.4±0.18;茎段在附含1 mg/L BA和0.1 mg/L NAA的DCR培养基中再生频率达100%,平均芽数为3.28±0.11;针叶在附含1.5 mg/L BA和0.1 mg/L NAA的DCR培养基中再生频率达84.5%±0.45%,平均芽数仅为1.42±0.08。不定芽在附含0.2 mg/L BA和0.02 mg/L NAA的DCR培养基中有效伸长。芽苗经预处理后在附含0.3 mg/L IBA的1/2 DCR培养基中生根效果最佳。

**关键词:** 杉木 组织培养 器官发生 再生系统 遗传转化 离体快繁

在全球森林资源中,针叶树占世界总林分面积的60%<sup>[1]</sup>,因此,无论是从环境还是从用材的角度来看,针叶树都与人类的生存密切相关。在我国森林资源中,针叶树占全国林分总蓄积面积的56.2%<sup>[2]</sup>,大多分属松科、杉科、柏科等。杉木(*Cunninghamia lanceolata* Hook)分属杉科,为我国南方特有的常绿速生针叶树种,分布于我国17个省市,提供25%以上的商品用材量<sup>[3]</sup>,广泛用于建筑、家具和造纸等行业,是我国重要的针叶树种之一。

随着杉木市场需求的日益增长,传统的育苗方法面临挑战,常规的育种手段陷入“瓶颈”。为提供大量的优质种苗,杉木的离体快繁和遗传改良已成为该物种当前的研究热点。近年来,国内一些学者就此展开了较为广泛的研究,并取得了一定成果。席梦利<sup>[2]</sup>以杉木的胚、子叶和下胚轴等为外植体,经直接器官发生途径获得了再生植株,但就再生频率而言,这几个再生系统均不足以作为遗传转化和规模化繁殖的基础平台。阙国宁<sup>[4]</sup>和林荣华等<sup>[5]</sup>以茎段为外植体对杉木进行了离体再生研究并获得了再生植株,再生频率也达到了转基因操作技术的基本要求。因此,席梦利<sup>[2]</sup>和林荣华等<sup>[5]</sup>便以茎段为受体系统对杉木进行了遗传转化研究,但均未获得转基因植株。主要原因是:褐化降低再生频率;定芽(腋芽)导致假阳性。可见,杉木的再生系统研究有待进一步深入和系统化。

目前,国内外尚未见有关杉木再生系统比较研究的报道。为加速杉木基因工程育种的进程,我们就杉木的不同再生系统开展比较研究,以期对杉木的转基因研究提供更为完善而高效的受体系统。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试品种

湖南会同杉,杉木种子采集于会同国家杉木种子园,由湖南省溆浦县林业局提供。

### 1.2 外植体种类及来源

成熟胚取自成熟种子,子叶、下胚轴、茎段和针叶等取自温室萌发的无菌苗。

### 1.3 材料处理

选取饱满的成熟种子,用流水冲洗2h,去外种壳后用70%酒精消毒30s,10%次氯酸钠浸泡15min,无菌水冲洗5次。然后在无菌条件下剥出种胚并接种于各种供试培养基。选取温室萌发7d且生长健壮的幼苗,用自来水清洗干净,去根后用70%酒精消毒30s,0.1%升汞浸泡4min,无菌水冲洗5次,再将无菌苗转入无激素的MS<sup>[6]</sup>,培养7d后取子叶和下胚轴切段受试,培养21d后取茎段和幼嫩针叶受试。

本文2007年3月7日收到。2007年5月20日接受。

\*通讯作者, E-mail: zmwei@sippe.ac.cn

## 1.4 不定芽诱导

将成熟胚、子叶(4mm,表面具切口)下胚轴(2mm)、茎段(4mm)和针叶( $\leq 10\text{mm}$  整片幼叶,表面具切口)分别接种于富含 0–3 mg/L BA 和 0.1–0.2 mg/L NAA 的 MS、1/2 MS、DCR<sup>[7]</sup>和 GD<sup>[8]</sup>等培养基进行不定芽诱导。MS 和 1/2 MS 附加蔗糖 3%, DCR 和 GD 附加蔗糖 2%, 所有培养基用 0.7% 琼脂粉固化, pH5.8, 暗培养( $25\pm 1^\circ\text{C}$ )5d 后转入光培养, 光照( $80\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )16h/d, 培养温度  $25\pm 2^\circ\text{C}$ 。4 周继代一次, 培养基不变。

## 1.5 不定芽伸长

将诱导的不定芽转入富含 0.2 mg/L BA 和 0.02 mg/L NAA 的 DCR 培养基进行伸长培养 4–6 周。暗培养 ( $25\pm 1^\circ\text{C}$ )3d 后转入光培养, 光照( $80\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )16h/d, 培养温度  $25\pm 2^\circ\text{C}$ 。

## 1.6 不定根诱导

将 3–4 cm 高的小苗用 50 mg/L IBA 预处理 24h, 剥去小苗形态学下端 1 cm 区段的针叶, 切除形态学下端 1 mm 茎段后, 转入富含 0.1–0.6 mg/L IBA 的 1/2 MS、1/2 DCR 和 1/2 GD 培养基中诱导不定根。生根培养基附加蔗糖 2%, 且用 0.25% gelrite 固化。暗培养( $25\pm 1^\circ\text{C}$ )3d 后转入光培养, 光照( $60\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )16h/d, 培养温度  $25\pm 2^\circ\text{C}$ 。

# 2 结 果

## 2.1 培养基和外植体对不定芽诱导的影响

将成熟胚、子叶(4mm)下胚轴(2mm)、茎段(4mm)和针叶分别接种于富含 1 mg/L BA 和 0.1 mg/L NAA 的 MS、1/2 MS、DCR 和 GD 等培养基上,

15d 后发现不同处理间开始出现显著变化。成熟胚几乎全部坏死, 仅极个别外植体在 DCR 培养基上表现出不定芽发生迹象, 但未能进一步发育成为有效芽。子叶、下胚轴、茎段和针叶在 DCR 培养基中均获得了最高的不定芽诱导频率(表 1)。下胚轴在富含 1 mg/L BA 和 0.1 mg/L NAA 的 MS 和 1/2 MS 培养基上, 只能诱导出愈伤组织, 愈伤组织在继代中坏死。尽管茎段在上述四种培养基中均有较高的不定芽诱导率, 但在 DCR 中的不定芽诱导频率比 GD、1/2 MS 和 MS 中分别高 7.7%、11% 和 17.8%(表 1)。因此, DCR 培养基为杉木组织培养的最佳培养基。

## 2.2 外植体种类和激素配比对器官发生的影响

为了筛选出不同种类外植体器官发生的最佳激素配比, 将不同浓度的 BA(0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mg/L)和 NAA(0.1、0.2 mg/L)按正交实验设计进行组合, 以 DCR 培养基为基本培养基, 分别对成熟胚、子叶、下胚轴、茎段和针叶等五种外植体进行不定芽诱导。结果发现不同外植体除了在激素配比上存在差异外, 还在器官发生方式、芽形成时间和平均芽数等方面有所不同(表 2)。在富含 1 mg/L BA 和 0.1 mg/L NAA 的 DCR 培养基上培养 6 周后, 茎段以直接器官发生方式成芽, 而且再生频率达 100%, 这在针叶树乃至整个木本植物的离体再生中实不多见。然而, 其平均芽数仅为  $3.28\pm 0.11$ , 而且从芽的性质来讲, 这些再生芽多为定芽(腋芽)(图版 I, 图 C)。下胚轴在富含 2 mg/L BA 和 0.2 mg/L NAA 的 DCR 培养基上获得 100% 的愈伤诱导率。经多次继代培养(16 周)后, 大量不定芽(图版 I, 图 D)从这些愈伤组织上分化出来, 分化频率为  $96.2\%\pm 0.35\%$ , 平均芽数为  $17.4\pm 0.18$ (远

表 1 培养基和外植体对不定芽诱导频率的影响

Table 1 Effect of media and explants on frequency of adventitious buds induction

| 培养基<br>Media | 不定芽诱导频率(%)<br>Frequency of adventitious buds induction (%) |                  |                  |                  |                  |
|--------------|------------------------------------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
|              | 成熟胚<br>Mature embryo                                       | 子叶<br>Cotyledon  | 下胚轴<br>Hypocoty  | 茎段<br>Stem       | 针叶<br>Needle     |
|              |                                                            |                  |                  |                  |                  |
| MS           | 0                                                          | $12.6\pm 1.47^d$ | 0                | $80.4\pm 0.36^d$ | $37.8\pm 0.38^d$ |
| 1/2 MS       | 0                                                          | $25.4\pm 1.15^c$ | 0                | $87.2\pm 0.18^c$ | $45.6\pm 0.62^c$ |
| DCR          | 0.12                                                       | $95.6\pm 1.29^a$ | $92.8\pm 0.48^a$ | $98.2\pm 0.21^a$ | $77.3\pm 0.43^a$ |
| GD           | 0                                                          | $66.4\pm 1.32^b$ | $72.3\pm 0.34^b$ | $90.5\pm 0.24^b$ | $61.8\pm 0.35^b$ |

所有培养基附加 1 mg/L BA 和 0.1 mg/L NAA。数据为 3 次重复平均值 $\pm$ 标准误差(100 个外植体), 上标(字母 a–d)表示差异显著性( $P<0.05$ )(表 2、表 3 同)。

All media were supplemented with 1 mg/L BA and 0.1 mg/L NAA. Data represent mean $\pm$ S.E of three replicates (100 explants) and superscripted letters (with the same meaning in table 2 and 3) are significant differences ( $P<0.05$ ).

表 2 不同外植体的最佳器官发生汇总表

Table 2 Summary of different types of explants on best organogenesis

| 外植体种类<br>Types of<br>explants | 最佳激素组合<br>Optimal of PGRs<br>combination (mg/L) | 器官发生方式<br>Organogenesis<br>manner | 芽形成周数(周)<br>Weeks of buds<br>forming (week) | 芽诱导频率<br>Frequency of buds<br>induction (%) | 平均芽数<br>Mean number<br>of buds |
|-------------------------------|-------------------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|--------------------------------|
| 成熟胚<br>Mature embryo          | 0.5 BA+0.2 NAA                                  | directly                          | No buds forming                             | 0                                           | 0                              |
| 子叶<br>Cotyledon               | 1 BA+0.1 NAA                                    | directly                          | 8                                           | 93.7±0.45                                   | 3.76±0.25                      |
| 下胚轴<br>Hypocotyl              | 2 BA+0.2 NAA                                    | indirectly                        | 16                                          | 96.2±0.35                                   | 17.4±0.18                      |
| 茎段<br>Stem                    | 1 BA+0.1 NAA                                    | directly                          | 6                                           | 100±0.00                                    | 3.28±0.11                      |
| 针叶<br>Needle                  | 1.5 BA+0.1 NAA                                  | directly                          | 10                                          | 84.5±0.45                                   | 1.42±0.08                      |

基本培养基为 DCR。平均芽数指平均每个外植体产生的芽数。

Basal medium was DCR. Mean number of buds means that per explant produces buds.

表 3 不同培养基对生根的影响

Table 3 Effect of media on rooting

| 培养基<br>Medium | 生根频率 (%)<br>Rooting frequency (%) | 生根天数 (天)<br>Rooting time (d) | 移栽存活率 (%)<br>Survival frequency (%) |
|---------------|-----------------------------------|------------------------------|-------------------------------------|
| 1/2 MS        | 98.2±0.35 <sup>a</sup>            | 65                           | 55.6±0.69 <sup>c</sup>              |
| 1/2 GD        | 78.2±0.44 <sup>c</sup>            | 48                           | 62.4±0.47 <sup>b</sup>              |
| 1/2D CR       | 93.5±0.52 <sup>b</sup>            | 25                           | 76.4±0.75 <sup>a</sup>              |

芽苗用 50 mg/L IBA 处理后转入附含 0.3 mg/L IBA 的生根培养基。

After pre-treated with 50 mg/L IBA, shoots were transferred to rooting media supplemented with 0.3 mg/L IBA.

远高出其它几种外植体)。在附含 1 mg/L BA 和 0.1 mg/L NAA 的 DCR 培养基上培养 8 周后,子叶像茎段一样以直接器官发生方式形成不定芽(图版 I, 图 B),再生频率达 93.7%±0.45%, 平均芽数仅为 3.76±0.25, 略高于茎段的平均芽数。在附含 1.5 mg/L BA 和 0.1 mg/L NAA 的 DCR 培养基上培养 10 周后, 针叶也以直接器官发生方式成芽。在上述四种再生系统中, 针叶再生系统不仅再生频率和平均芽数最低(表 2), 而且也不能排除定芽(腋芽)的存在(图版 I, 图 A)。成熟胚活力很弱, 大多数被污染或坏死, 极少数在附含 0.5 mg/L BA 和 0.2 mg/L NAA 的 DCR 培养基上呈现出一点点直接器官发生的迹象, 但最终还是未能成芽。由此可见, 外植体种类对杉木器官发生影响很大, 不同外植体对应不同的最佳激素组合。

### 2.3 不定芽的伸长

虽然不同来源的芽性质有异,但在附含 0.2 mg/L BA 和 0.02 mg/L NAA 的 DCR 培养基中均能得到有效伸长。

### 2.4 不定根的诱导

在针叶树离体再生过程中,生根是难度最大的一个环节<sup>[9-11]</sup>。因此,将芽苗先用 50 mg/L IBA 预处理 24h, 再转入附含 0.1-0.6 mg/L IBA 的 1/2 MS、1/2 DCR 和 1/2 GD 培养基中诱导不定根。结果在 0.3 mg/L IBA 的处理中得到了最佳效果(表 3)。就生根频率而言,1/2 MS 略高于 1/2 DCR, 1/2 GD 次之(表 3)。但是,1/2 MS 耗费的生根时间最长(65d),而 1/2 DCR 的生根时间则最短(25d)。表 3 的数据还表明生根时间与移栽存活率还呈反相关关系。来源于 1/2 DCR 培养基的小苗不仅根系最发达(图版 I, 图 E)、生根时间最短、移栽存活率最高(表 3),而且株型良好、生长健壮(图版 I, 图 F)。综合看来,1/2 DCR 是杉木生根的最佳培养基。

此外,由不同外植体经不同器官发生途径而来的不定芽,在 1/2 DCR 培养基中未见显著差异。

## 3 讨 论

在植物离体培养中,基本培养基的成分愈贴近

其自然生长状态下土壤成分, 瓶苗愈是生长良好。针叶树多生长在贫瘠的土壤环境中, 对氮肥要求不高, 所以针叶树的组织培养应在含氮量偏低的基本培养基中进行。在本研究的受试培养基中, DCR 的含氮量最低, 仅为 MS 的 1/4, 因此, 杉木的组培在 DCR 培养基中获得了理想效果。DCR 基本培养基不仅是杉木的离体再生的最佳培养基, 也广泛适用于其它针叶树种的离体培养<sup>[12-14]</sup>。

许多针叶树的离体再生和遗传转化研究都以成熟胚为起始外植体<sup>[10-13]</sup>来进行, 表 1 和表 2 的数据却表明杉木成熟胚难以作为起始外植体。主要原因是: 杉木种子的活力很弱<sup>[15]</sup> (自然萌发率低于 30%), 经消毒处理后活力更弱。因此, 绝大多数成熟胚在实验中被污染或坏死。

就本研究所形成的四种再生系统而言, 除了针叶再生系统外, 其它三个都能在杉木的生产或研究领域发挥各自的作用。下胚轴再生系统再生频率高, 产芽量大, 适于农杆菌介导的遗传转化与应用研究; 子叶再生系统形成的不定芽虽然数量不多但遗传稳定性好, 加之子叶具有较大的微粒接收面积, 因而适于基因枪介导的遗传转化与应用研究; 茎段再生系统再生频率最高, 定芽产出量大, 遗传稳定性好, 移栽存活率高, 所以适于优良母株的离体快繁。

### 参 考 文 献

- [1] Narender, S.N., R.B. Michael & A.H. Maud, 2005, Forest biotechnology: innovative methods, emerging opportunities. *In Vitro Cell Dev. Biol.-plant*, **41**: 707-717.
- [2] 席梦利, 2004, 杉木转基因受体系统的建立及遗传转化研究. 博士学位论文.
- [3] Li, M.H. & G.A. Ritchie, 1999, Traditional afforestation with Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*). *New Forests*, **18**: 131-142.
- [4] 阙国宁, 1980, 杉木组织培养的初步研究. 林业科学, 增刊: 137-140.
- [5] 林荣化、叶冰莹、庄泳宏、林泳许、魏 琳、陈由强、朱锦懋, 2002, 杉木高效再生与基因转化的初步研究. 生命科学研究, **6**(4): 351-355.
- [6] Murashige, T & F. Skoog, 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, **15**: 437-497.
- [7] Gupta, P.k. & D.J. Durzan, 1985, Shoot multiplication from mature trees of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*) *Plant Cell Rep.*, **4**: 177-179.
- [8] Gresshoff, P.M. & C.H. Doy, 1972, Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (tomato). *Planta*, **107**: 161-170.
- [9] Chee, P.P., 1995, Stimulation of adventitious rooting of *Taxus* species by thiamine. *Plant Cell Rep.*, **14**: 753-757.
- [10] Datta, M.M., A. Majumder & S. Jha, 2006, Organogenesis and plant regeneration in *Taxus wallichiana* (Zucc.) *Plant Cell Rep.*, **25**: 11-18.
- [11] Tang, W., & R.J. Newton, 2005, Plant regeneration from callus cultures derived from mature zygotic embryos in white pine (*Pinus Strobus* L.) *Plant Cell Rep.*, **24**: 1-9.
- [12] 张 宇、卫志明、席梦利、施季森, 2006, 马尾松高效再生体系的建立. 分子细胞生物学报, **39**(3): 271-274.
- [13] Mathur, G. & R. Nadgauda, 1999, In vitro plantlet regeneration from mature zygotic embryos of *Pinus wallichiana* A.B. Jacks. *Plant Cell Rep.*, **19**: 74-80.
- [14] Lin, X.F., W.B. Zhang, K. Takechi, S. Takio, K. Ono & H. Takano, 2005, Stable genetic transformation of *Larix gmelinii* L. by particle bombardment of zygotic embryos. *Plant Cell Rep.*, **24**: 418-425.
- [15] 林业部造林经营司主编, 1982, 杉木丰产技术. 北京: 中国林业出版社, 8-49.

### 图 版 说 明

#### 图 版 I

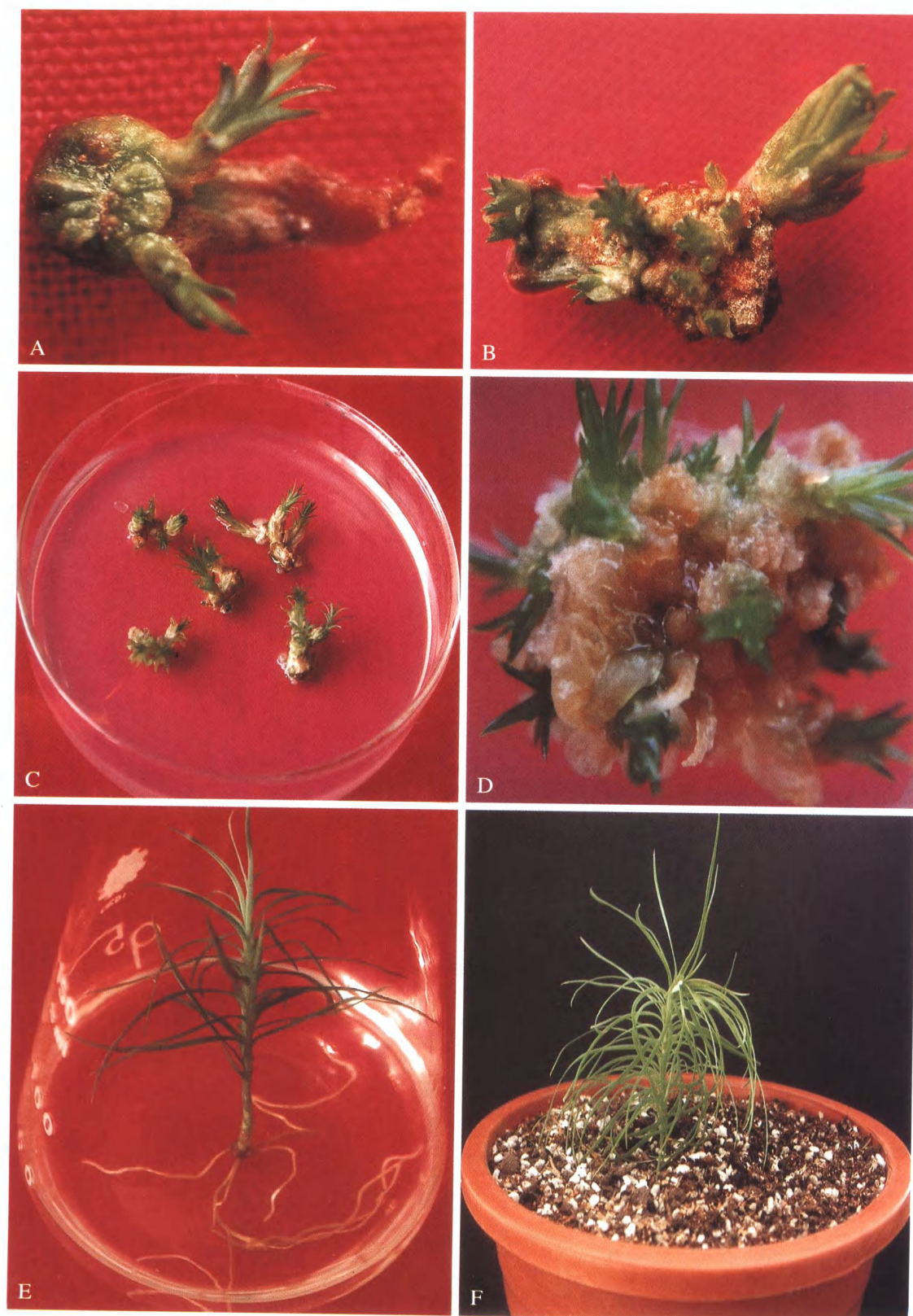
- |                        |                              |
|------------------------|------------------------------|
| 图 A 以针叶为外植体诱导出的不定芽;    | 图 B 以子叶为外植体诱导出的不定芽;          |
| 图 C 以茎段为外植体诱导出的腋芽和不定芽; | 图 D 以下胚轴为外植体经间接器官发生途径形成的不定芽; |
| 图 E 从生根培养基上诱导出的不定根;    | 图 F 移栽存活的再生植株。               |

### EXPLANATION OF FIGURES

#### PLATE I

- |                                                               |                                                                  |
|---------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| Fig. A Induction of adventitious buds from needle;            | Fig. B Induction of adventitious buds from cotyledon;            |
| Fig. C Induction of axillary and adventitious buds from stem; | Fig. D Induction of adventitious buds via callus from hypocotyl; |
| Fig. E Shoot with adventitious roots on rooting medium;       | Fig. F Survival regeneration plantlet.                           |

图 版 I



## COMPARATIVE STUDY ON REGENERATION SYSTEMS OF *CUNNINGHAMIA LANCEOLATA* HOOK

ZHU Mu Lan WANG Ji WEI Zhi Ming

(Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Science, Chinese Academy of Science,  
Shanghai 200032)

**ABSTRACT** Four regeneration systems derived from cotyledon, hypocotyls, stem and needle explants have been established in the comparative researches of regeneration systems in *Cunninghamia lanceolata* Hook. A high frequency ( $93.7\% \pm 0.45\%$ ) of adventitious buds were induced from cotyledons on DCR medium supplemented with 1 mg/L BA and 0.1mg/L NAA, with a maximum mean number buds of  $3.76 \pm 0.25$ . A higher frequency ( $96.2\% \pm 0.35\%$ ) of adventitious buds were induced from hypocotyls on DCR medium supplemented with 2 mg/L BA and 0.2 mg/L NAA, with a maximum mean number buds of  $17.4 \pm 0.18$ . A highest frequency (100%) of adventitious buds were induced from stem segments on DCR medium supplemented with 1 mg/L BA and 0.1mg/L NAA, with a maximum mean number buds of  $3.28 \pm 0.11$ . A low frequency ( $84.5\% \pm 0.45\%$ ) of adventitious buds were induced from needles on DCR medium supplemented with 1.5 mg/L BA and 0.1mg/L NAA, with a maximum mean number buds of  $1.42 \pm 0.08$ . Buds were elongated on DCR medium supplemented with 0.2 mg/L BA and 0.02 mg/L NAA. After pre-treating shoots, best rooting result was produced on 1/2 DCR medium supplemented with 0.3 mg/L IBA.

**Key words:** *Cunninghamia lanceolata*. Tissue culture. Organogenesis. Regeneration system. Genetic transformation. *In vitro* propagation