

研究报告

Research Report

欧美杨“山地1号”组织培养再生系统的建立

杨传平* 郑琼 马旭俊 姜静 刘桂丰 董京祥

教育部林木遗传育种与生物技术重点实验室, 东北林业大学林木遗传育种省级重点实验室, 哈尔滨, 150040

* 通讯作者, yangcp@nefu.edu.cn

摘要 欧美杨“山地1号”是美洲黑杨与欧洲黑杨(*P. deltoides* × *P. nigra* cv., ‘shandis 1’)杂交培育成功的杨树优良品种。本研究以叶片作为外植体进行组织培养, 建立了欧美杨“山地1号”组织培养再生系统。分别用植物生长调节剂 α -萘乙酸(NAA)和细胞分裂素6-苄氨基嘌呤(6-BA)诱导芽的分化, 促进侧芽生长; 用3-吲哚丁酸(IBA)诱发根生长, 使根多而长, 本研究筛选出诱导率最优的培养基和激素浓度: 分化培养阶段——以1/2MH培养基(6-BA 0.5mg/L与NAA 0.05mg/L)诱导分化获得再生芽; 继代培养阶段——以MH培养基(6-BA 0.5mg/L与NAA 0.05mg/L)进行继代培养获得丛生芽; 抽茎培养阶段——以MH培养基(6-BA 0.1mg/L与NAA 0.05mg/L)进行抽茎培养获得丛壮无根苗; 生根培养阶段——以1/2MH培养基(IBA 0.3mg/L)诱导生根。然后, 选择根系发达、主茎高达2~3cm且木质化程度高的幼苗移栽到塑料大棚中, 约14d后长出新根即可成活, 移栽成活率达90%。本欧美杨组织培养再生系统可用于基因的遗传转化。

关键词 欧美杨, 培养基, 组织培养, 再生系统

Tissue Culture and Regeneration of Poplar (*Populus deltoides* × *P. nigra*)

Yang Chuanping* Zheng Qiong Ma Xujun Jiang Jing Liu Guifeng Dong Jingxiang

Laboratory of Forestry Genetics and Breeding and Biotechnology, Key Laboratory of Ministry of Education, The Provincial Key Lab of Forestry Genetics and Breeding, Harbin, 150040

* Corresponding author, yangcp@nefu.edu.cn

Abstract Poplar ‘shandis 1’ (*P. deltoides* × *P. nigra* cv.) is a hybrid with good traits. Tissue culture and regeneration system of poplar (*P. deltoides* × *P. nigra*, ‘shandis 1’) was established in our experiment. Poplar leaves were used as explants for tissue culture. Plant growth regulator alpha-naphthylacetic acid (NAA) and cell division element 6-aminopurine (6-BA) were used, in our experiment, to induce buds and clump shoots. Indole butyric acid (IBA) was used for root generation and growth. The following was the media and hormones used in the poplar tissue culture: 1/2MS culture medium (6-BA 0.5mg/L and NAA 0.05mg/L) was used to induce and obtain the regenerated buds; MS culture medium (6-BA 0.5 mg/L and NAA 0.05mg/L) was used to generate clump buds; MS culture medium (6-BA 0.1 mg/L and NAA 0.05mg/L) was used to obtain strong shoots; 1/2MS culture medium (IBA 0.3 mg/L) was used to induce and generate roots. Those regenerated plants, 2~3cm high with strong roots and high lignification, were transferred to greenhouse. And the plants grew well after 14 days when their new roots grew out. The survival rate of transplants could reach 90%. The system of tissue culture and regeneration is available for poplar transformation.

Keywords Poplar, Medium, Tissue culture, Regeneration system

欧美杨“山地1号”是美洲黑杨与欧洲黑杨(*P. deltoides* × *P. nigra* cv., ‘shandis 1’)杂交培育成功的适宜高寒山地、低山丘陵及平原区栽培的杨树优良品种(赵云等, 2002)。其生长速度快, 木材加工性能

好, 可用于造纸、制作各种板材及建筑用材, 具有广泛的应用前景。它也是目前北方抗寒能力较强的杨树优良品种之一, 基本没有病、虫害。本研究建立了欧美杨高效组织培养再生系统, 为该杨树品种的快

速无性繁殖和基因的遗传转化奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

选取 1~2 年生欧美杨扞穗, 以腋芽萌动长出的幼叶作为实验材料。

1.2 外植体的表面消毒与不定芽诱导

用自来水将穗条上的灰尘冲洗干净, 用清水浸泡 3d, 然后在河沙中扦插培养。10d 左右腋芽萌动幼叶展出, 待叶片长到宽 2cm 左右时, 采集叶片。先用自来水洗 2~3 次, 再用蒸馏水洗 2~3 次, 在超净工作台上用 70% 的酒精消毒 30s, 无菌水漂洗 3 次, 再用 3% 的次氯酸钠水溶液浸泡漂洗 3min, 然后用无菌水漂洗 4~6 次, 最后用无菌滤纸吸干叶片表面的水分, 获得无菌叶片外植体。无菌叶片切成 1cm×1cm 大小, 接种于含不同浓度 6-BA 和 NAA 的不定芽诱导培养基 (1/2MS) 上, 置于温度 25℃, 光照强度为 1 000~1 500 Lux (16h/d) 条件下进行培养, 诱导不定芽。

1.3 继代培养

继代、抽茎和生根培养均采用 MH 基本培养基。将上述经诱导得到的不定芽转入含 6-BA 和 NAA 的继代培养基上, 培养条件同上。3 周后观察和统计不同激素浓度对丛生芽形成的影响, 统计出每个单株丛生芽诱导数。

1.4 抽茎培养

将丛生芽分离出单株转入含 6-BA 和 NAA 的抽茎培养基上, 培养条件同上。经过诱导使其抽茎形成无根的幼苗, 2 周后统计抽茎形成无根幼苗的株数和抽茎率。

1.5 生根培养

将长至 2~3cm 高的幼苗自基部切下, 转到含 IBA 的生根培养基中, 14d 后统计生根数和生根率。

1.6 组培苗移栽

选择根系发达、主茎高达 2~3cm 且木质化程度高的幼苗进行移栽。揭去培养瓶上的封口膜, 在塑料大棚中炼苗 2~3d, 小心洗去附着在根部的培养基, 然后移栽到经过除菌剂代森锌处理 2d 的草碳土与沙子 (2:1 混合) 的基质中, 移栽苗木应放在塑料大棚中遮荫培养, 10d 内保湿淋水, 相对湿度 90% 左右。

2 结果

2.1 不定芽的诱导

无菌叶片在含不同浓度 6-BA 和 NAA 的 1/2MH 培养基上诱导侧芽萌发, 7~10d 出现愈伤组织, 约 2 周可长出不定芽 (图 1 A)。采用不同浓度比的 6-BA 和 NAA, 不定芽诱导率不同。实验结果表明, 在 NAA 浓度相同的情况下, 高浓度的 6-BA (1.0mg/L) 不利于侧芽的诱导, 当 6-BA 为 1.0mg/L 时, 第 10 天个别出现愈伤组织, 15d 仍未出芽 (表 1); 6-BA 为 0.5mg/L 和 NAA 为 0.05mg/L 最适于侧芽的诱导, 在此培养基上第 7 天出现愈伤组织, 15d 不定芽诱导率高达 91.7% (表 1)。

2.2 继代培养

此阶段的目的是诱导丛生芽, 进而形成大量适合抽茎和生根的无菌苗。将初代培养的健壮分化芽和较好的愈伤组织移入继代培养基中。3 周后, 不同浓度比例的 NAA 与 6-BA 均能诱导不定芽逐渐形成芽丛 (图 1 B), 但不同浓度比例的 NAA 与 6-BA 诱导的出芽率存在差异。在 6-BA 浓度相同的情况下, NAA 浓度高 (0.05mg/L) 有利于丛生芽形成 (表 2); 6-BA 浓度为 0.5 mg/L, NAA 浓度为 0.05mg/L 最适于丛

表 1 不同浓度的激素对叶片出芽率的影响

Table 1 Effect of hormones on bud generation from leaf explants

培养基 Medium	NAA (mg/L)	BA (mg/L)	叶片数 No. of leaves	分化芽数 No. of generated bud	分化率 (%) Ratio of bud generation	得到分化芽的天数(d) Culture time of cullus/ bud generation
1	0.05	0.1	24	11	45.8	10
2	0.05	0.3	24	18	78.2	8
3	0.05	0.5	24	22	91.7	7
4	0.05	0.7	24	5	23.8	10
5	0.05	1.0	24	0	0	10

生芽的形成(表2)。

表2 不同激素浓度对继代增殖的影响

培养基 Medium	NAA (mg/L)	BA (mg/L)	继代丛生芽数 No. of induced clump buds
1	0.05	0.3	8~15
2	0.05	0.5	22~28
3	0.05	0.8	16~25
4	0.01	0.3	4~12
5	0.01	0.5	14~23
6	0.01	0.8	17~23

2.3 再生苗的抽茎培养

当丛生芽长至0.5~1cm左右时,切下转入抽茎培养基上,2周后可诱导抽茎,形成2~3cm高的无根幼苗。不同浓度比的6-BA和NAA均能诱导丛生芽抽茎(图1C),但抽茎诱导率不同(表3)。6-BA浓度为0.1mg/L, NAA浓度为0.05mg/L最适宜抽茎,抽茎率最高(表3),在此培养基上10d左右个别已经抽茎,2周后大多数抽茎长成无根苗,且茎高,叶长。

表3 不同浓度的激素对抽茎的影响

培养基 Medium	NAA (mg/L)	BA (mg/L)	植株总数 Total no. of buds	抽茎数 No. of shoots	抽茎率(%) Ratio of shoot generation
1	0.05	0.1	60	50	83.3
2	0.05	0.2	60	38	63.3
3	0.05	0.3	63	29	46.0
4	0.10	0.1	69	41	59.4
5	0.10	0.2	66	33	50.0
6	0.10	0.3	65	19	29.2

2.4 生根培养

将无根苗转移到生根培养基中,7~11d左右从无根苗基部长出白色小根,14d后无根苗长出许多1~2cm左右的较粗壮的根,同时苗也进一步长壮(图1D)。在含不同浓度IBA的培养基上,无根苗均能生根,但IBA浓度为0.3mg/L时,生根率最高(表4),根较长,根数在7根以上。

2.5 再生苗移栽

选择根系发达、主茎高达2~3cm且木质化程度高的幼苗移栽到塑料大棚中,10d内保湿淋水,约14d后长出新根即可成活,移栽成活率达90%。

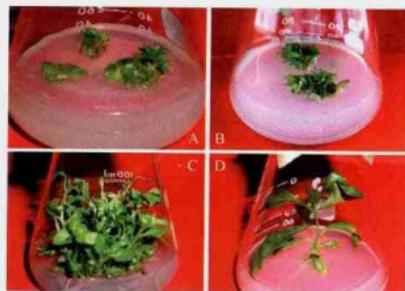


图1 欧美杨叶片组织培养与再生过程

注: A: 不定芽诱导; B: 继代培养; C: 抽茎; D: 生根

Figure 1 Tissue culture and regeneration of poplar (*P. deltoides* × *P. nigra*, 'shandisi') from leaf explants

Note: A: Adventitious bud generation; B: Clump bud generation; C: Clump shoot generation; D: Rooting culture

表4 不同浓度的激素对根再生的影响

培养基 Medium	IBA (mg/L)	植株总数 Total no. of shoots	生根数 No. of roots	生根率(%) Ratio of roots generation
1	0.1	120	58	48.3
2	0.2	120	71	59.2
3	0.3	120	98	81.7
4	0.4	120	85	70.8

3 讨论

通常幼嫩植株的芽比成熟植株的芽再生能力强,这可能是幼嫩植株分生能力旺盛的结果(朱至清, 2003, 植物细胞工程, 化学工业出版社, 中国, 北京, pp.2-5)。但林木不同于草本植物, 林木生长周期长, 幼苗成年后的性状不易预测, 有时不得不从成年后的优良大树上直接选取幼嫩部分或先复幼再取外植体。再生能力与器官(Ahuja, 1993)及植株幼嫩程度有关。通常幼嫩的外植体再生能力强。本研究选用初春枝条上萌发的腋芽, 通过沙培法使腋芽萌动, 幼叶长出, 然后选择叶宽2cm左右的嫩叶进行组织培养, 在适当浓度的6-BA和NAA的作用下, 幼芽诱导率可达90%以上(表1)。

植物组织培养中常观察到一些半透明状的畸形试管植株, 这类植物体被称为“玻璃苗”, 这种现象称为“玻璃化现象”, 又称为过度水化现象(蔡祖国等, 2005)。目前, 对玻璃化的发生机制缺乏真正了解。温

度对杨树植株的生长也有一定的影响。温度过高会导致分化芽出现玻璃化苗,低则苗生长缓慢(赵华燕等, 2001)。提高光照强度(蔡能等, 2003)、减低培养器皿内的相对湿度、改善培养瓶盖的透气性和调节激素组合水平,是抑制玻璃化的有效途径。

目前,未见欧美杨“山地1号”组织培养方面的报道。我们通过实验研究建立了其组织培养和再生系统,通过此系统可在短期内获得大量扩繁植株。当6-BA用量过高,达到0.8mg/L时会导致嫩茎增殖过大,茎条纤细,并伴有玻璃化现象,茎条不适合生根。当6-BA与NAA配合使用时,不同含量的NAA均能使嫩茎增殖下降,但是可使茎条增高。本研究得出不同阶段最佳培养基与激素含量为:(1)再生芽诱导培养基:1/2MH+6-BA 0.5mg/L+NAA 0.05mg/L;(2)继代培养基:MH+6-BA 0.5mg/L+NAA 0.05mg/L;(3)抽茎培养基:MH+6-BA 0.1mg/L+NAA 0.05mg/L;(4)生根培养基:MH+IBA 0.3mg/L。

致谢

本研究由国家转基因植物研究与产业化专项基金(J2002-B-004)资助。

参考文献

- Ahuja M.R., ed., 1993, *Micropropagation of Woody Plants*, Kluwer Academic Publishers, Boston, pp.187-194
- Cai N., Yi Z.L., and Li X., 2003, Advances in improvement of tissue culture conditions of plants on large scale, *Zhiwuxue Tongbao (Chinese Bulletin of Botany)*, 20(6):745-751 (蔡能, 易自力, 李祥, 2003, 改善植物大规模组织培养条件的研究进展, *植物学通报*, 20(6): 745-751)
- Cai Z.G., Xu X.B., and Zhou H.P., 2005, The vitrification and its prevention in plant tissue culture, *Shengwu Jishu Tongxun (Letters in Biotechnology)*, 16 (3): 353-355 (蔡祖国, 徐小彪, 周会萍, 2005, 植物组织培养中的玻璃化现象及其预防, *生物技术通讯*, 16(3): 353-35)
- Zhao H.Y., Lu S.F., and Chao R.T., 2001, Studies on tissue culture and gene engineering of poplar, *Zhiwuxue Tongbao (Chinese Bulletin of Botany)*, 18(2): 169-176 (赵华燕, 卢善发, 晁瑞堂, 2001, 杨树的组织培养及其基因工程研究, *植物学通报*, 18(2): 169-176)
- Zhao Y., Zheng T.J., Xu G.L., Sun J.H., Yuan S.R., Zhu L.H., Qi F.R., Lin T.X., Xu B.F., Yang B.Q., Zhang G.H., Duan F.L., and Hou Y., 2002, Study on selective breeding for poplar *Jilinsis, Jilin Linye Keji (Jilin Forestry Science and Technology)*, 31 (4): 1-7 (赵云, 郑太晶, 徐桂莲, 孙景花, 原所仁, 朱荔华, 祁凤荣, 林天喜, 徐炳芳, 杨秉清, 张国华, 段福玲, 候义, 2002, 吉林杨(山地1号)选育的研究, *吉林林业科技*, 31(4): 1-7)

(上接第488页)

Marc Giband, Cotton molecular geneticist
Mark J. van Haaren, Manager Business Development
Massahiro Yano, Applied Genomics Laboratory
Noel Ellis, Associate Head of Department of Genetics
Prakshi R. Arreli, Supervisory Research Geneticist
Ray Wu, Professor of Molecular Biology
Roberto Tuberosa, Prof. of Biotechnology
Sukhpal Singh, Plant Breeding Scientist
Susan McCouch, Associate Professor, Plant Genomics
Wanggen, Zhang, Senior Scientist
Xingwang Deng, Principal Investigator,
Yulin Jia, Research Plant Pathologist
中国组委会成员
李平博士, 李杨瑞博士, 刘耀光博士, 柳参奎博士,
罗达博士, 马正强博士, 钱前博士, 施季森教授, 万建民博士, 吴为人博士, 薛红卫博士, 张爱民博士, 张桂权博士, 朱玉贤博士, 朱祯教授
组委会执行委员
方宣钧博士, 黎志康博士

7 大会语言为英语

8 会议时间、地点

2007年3月23日 报到
2007年3月24-26日 会议
2007年3月27日 离会

9 会议论文及其摘要

会议论文全文和摘要提交方法及会议论文集收录具体方法请登陆本届会议网站: www.icpmb.org

10 联系方式

会务组联系方式(北京):
联系地址: 北京市海淀区知春路49号希格玛公寓B1601
邮编: 100080
电话: 010-62556198, 传真: 010-88099388
E-mail: mpbhn@vip.sina.com, 联系人: 李迪女士

会务组联系方式(海南):
联系地址: 海南省海口市海秀中路107号北岸青年公寓507室, 邮编: 570206
电话: 0898-68966415, 传真: 0898-68958180
E-mail: icpmb2007@hitar.org, 联系人: 吴海兰女士