

派间杂种 110 杨再生系统的建立

陈彩霞, 沈 昕, 王祎宁, 陈少良*

(北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083)

关键词: 派间杂种 110 杨; 组培; 植株再生

中图分类号: S722.3

文献标识码: A

Establishment of Tissue-Culture Regeneration System in the Hybrid Poplar 110

CHEN Cai-xia, SHEN Xin, WANG Yi-ning, CHEN Shao-liang

(School of Biological Science and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: The new emerging stems and buds of poplar 110 (*Populus deltoids* × *P. maximowiczii* cv 'Eridano') were used as explants and incubated on MS media supplemented with various hormone combinations. Once the successive and rooting plants were obtained through selection of cultural medium formula, leaves and internodals were excised from tubed-culture planlets and induced to form regenerated plants. The result showed MS + 6-BA 0.5 mg · L⁻¹ + NAA 0.1 mg · L⁻¹ + TDZ 0.02 mg · L⁻¹ was beneficial for leaves to inducing adventitious buds; The proper medium for using internodals as explants was MS + 6-BA 0.3 mg · L⁻¹ + NAA 0.05 mg · L⁻¹ + TDZ 0.02 mg · L⁻¹; while the medium of MS + 6-BA 0.3 mg · L⁻¹ + NAA 0.1 mg · L⁻¹ was proper to culturing the stronger tubed-planlets. The optimum medium for producing roots was 1/2MS + IBA 0.5 mg · L⁻¹. The effect of different incising mode and growth state of leaves and internodals on inducing adventitious was discussed. *In vitro* vegetative propagation and plant rooting were optimized to establish the high-efficient tissue culture reproduction system of poplar 110, which make it possible for tree breeding and genetic transformation of this species.

Key words: hybrid poplar 110 (*Populus deltoids* × *P. maximowiczii* cv 'Eridano'); tissue culture; regeneration system

杨树(*Populus* spp.)是我国北方地区重要的造林绿化树种之一,因其速生丰产、防风固沙能力强、无性繁殖容易,且基因组较少,而成为林木遗传改良的理想模式植物^[1]。随着分子生物学的发展和杨树组织培养技术的日趋成熟,人们纷纷把目光转向基因工程,希望在短期内达到改良杨树品种的目的^[2]。

派间杂种 110 杨(*P. deltoides* Bartr. × *P. maximowiczii* A. Henry cv 'Eridano')是由黑杨派美洲黑杨(*Populus deltoides* Bartr.)和青杨派辽杨(*P. maximowiczii* A. Henry)杂交而成的雄株,是中国林科院“九五”科技攻关成果。因其速生、干形好、雄株不飞絮等优良特性,已被国家林业局列为我国西北及华北

收稿日期: 2005-11-10

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(30430430)、全国高校优秀博士学位论文作者专项基金(200152)和教育部高等学校优秀青年教师教学科研奖励计划(2002-323)联合资助

作者简介: 陈彩霞(1972—),女,河北深泽人,博士研究生,主要研究方向: 树木抗性生理. 电话 010-62338841; E-mail: yongtaochen@126.com; 地址: 100083 北京林业大学 736 信箱.

* 通讯作者: 陈少良,教授,博导,主要研究方向: 树木抗性生理. 电话 010-62338129; E-mail: Lschen@bjfu.edu.cn, 地址: 100083 北京林业大学生物科学与技术学院 162 信箱.

地区重点推广的树种之一^[3]。前人关于不同品种杨树再生系统建立的研究已很多^[4~6],但 110 杨再生系统建立的研究还未见报道。本文通过以 110 杨叶片、茎节间等材料为外植体诱导不定芽,建立再生体系进行了系列研究,获得大量无菌苗,以期为提高该品系杨树耐盐性的基因转化提供材料和理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

派间杂种 110 杨最初由中国林科院张绮纹研究员于 1984 年引种到我国。该试验所用材料为 2002 年春季再次从意大利杨树研究所直接引进的插穗,在北京市大东流苗圃进行扦插繁殖。2004 年春季从生长健壮的优良单株上取当年生新梢做为试验材料。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的表面灭菌 以 1~1.5 cm 长带芽茎段做为外植体,在超净工作台上,以 700 mL·L⁻¹ 酒精消毒 30 s,再在 1.0 g·L⁻¹ HgCl₂ 溶液中浸泡 5~10 min,无菌水冲洗 5~6 遍,接种到诱导培养基中。

1.2.2 培养程序 整个培养程序为:外植体(带芽茎段)→丛状芽→无菌苗→茎节间、叶→再生植株→生根苗

1.2.3 无菌体系的建立 将无菌带芽茎段接种到添加不同浓度 BA 和 NAA 的 MS 培养基上,培养 20~25 d 观察不同激素对侧芽萌发生长的影响效果。

1.2.4 不定芽诱导 取无菌苗的叶片在超净工作台上剪出 2~3 条过叶脉的伤口,或用手术刀切割成 1 cm² 大小的碎片;节间剪成 1 cm 左右长,横切过中轴的伤口 1~2 个,平放于不同激素配比的培养基中,注意观察切口处不定芽萌发的时间和数量。

1.2.5 再生植株生根的诱导 将长度为 2 cm 左右的再生苗接种到生根诱导培养基中。注意观察各处理培养基上组培苗不定根产生的时间、数量、根长及植物材料底端愈伤组织大小等生根情况。

1.2.6 试验培养基及培养条件 各阶段基本培养基采用 1/2MS 或 MS。蔗糖 15~30 g·L⁻¹,pH 值 6.0,琼脂 5~7 g·L⁻¹。培养环境中温度为 25±2℃,光照强度 2 000~3 000 lx,光照时间 14 h·d⁻¹。

2 结果与分析

2.1 无菌体系的建立

以 110 杨带芽茎段为外植体,接种到初始诱导培养基中,一般 10 d 左右侧芽萌发,但不同植物激素影响侧芽的萌发和生长。试验结果见表 1。

表 1 不同激素和浓度配对外植体的诱导效果

培养基编号	6-BA/(mg·L ⁻¹)	NAA/(mg·L ⁻¹)	2,4-D/(mg·L ⁻¹)	外植体数/个	芽诱导率/%	备注
1	0.1	0.00	0	20	0	外植体没明显生长迹象
2	0.1	0.03	0.02	20	0	茎基部有少量愈伤组织
3	0.1	0.05	0.05	20	0	茎基部产生较多愈伤组织
4	0.3	0.00	0.02	20	20	侧芽萌发,长势慢,茎基部有愈伤组织
5	0.3	0.03	0.05	20	45	侧芽生长慢,茎基部愈伤组织多
6	0.3	0.05	0	20	80	侧芽长势好,茎基部未见愈伤组织
7	0.5	0.00	0.05	20	10	产生丛状芽,茎基部愈伤组织多
8	0.5	0.03	0	20	65	产生丛状芽,高生长慢
9	0.5	0.05	0.02	20	60	丛状芽,茎基部愈伤组织多

由表 1 看出,6-BA 浓度是影响 110 杨侧芽生长和不定芽形成的关键,较适宜的浓度范围在 0.3~0.5 mg·L⁻¹ 之间。而与 NAA 配合使用,可促进芽的生长,这与马宗新等^[7]在其它基因型杨树的研究中的实验结果基本一致。2,4-D 对杨树愈伤组织的诱导有效,对器官的分化不利^[8],且随其浓度的增加,愈伤组织愈大,愈不利于芽的分化和生长。可见,建立 110 杨的无菌体系,较适合的培养基为 MS+6-BA 0.3 mg·L⁻¹+NAA 0.05 mg·L⁻¹。进一步试验的结果表明,无菌体系建立起来后,培养基中保

持 6-BA 浓度不变,适当提高 NAA 的浓度到 0.1 mg·L⁻¹,可作为以芽生芽方式扩繁试管苗的壮苗培养基。

2.2 无菌苗叶片或茎段诱导不定芽

在林木基因工程中,遗传转化的受体材料多以叶片或茎节间为多^[9~11],所以有必要对 110 杨叶片和茎节间的诱导规律进行摸索。陈维伦等^[12]对山新杨(*P. davidiana* Dode × *P. bolleana* Louche)叶外植体分化的研究表明,带有叶柄的下段,极易在叶柄的切口上产生不定芽,分化成芽的频率高达 70% 左

右,而中上段(芽从叶脉上产生)的分化频率极低。110 杨叶片接种到诱导培养基上后,不定芽分化情况与山新杨类似。一般 4~5 d 叶片边缘开始膨大,15 d 后切口处陆续有丛状芽产生,但多数不定芽从叶柄或中脉切口处产生,其它切口表面很难产

生不定芽或很少。以茎的节间为材料,一般 2~3 d 伤口处即开始膨大,10 d 后有丛状不定芽形成。

2.2.1 不同激素对叶片或节间诱导不定芽的影响效果 培养材料接种到不同培养基后,30 d 时的调查结果见表 2。

表 2 不同激素组合对 110 杨叶片及节间产生不定芽的影响

试验 编号	6-BA/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	NAA/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	TDZ/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	每处理材料数/个		不定芽出现时间/d		每材料平均芽数/个		不定芽分化率/%	
				叶片	节间	叶片	节间	叶片	节间	叶片	节间
1	0.3	0.03	0	32	30	17	12	5.23	8.23	59.38	60.00
2	0.3	0.05	0	29	31	15	12	8.34	12.25	66.67	80.65
3	0.3	0.05	0.02	30	25	15	10	8.88	12.96	72.41	88.00
4	0.5	0.05	0	32	30	15	11	9.15	6.52	62.96	60.61
5	0.5	0.1	0	32	27	14	10	10.63	7.33	78.13	67.74
6	0.5	0.1	0.02	30	30	14	10	10.88	7.56	83.33	73.33

注:表中不定芽分化率为产生不定芽的外植体数/接种总外植体数。

由表 2 知,叶片比茎段分化不定芽所需的时间更长,一般需 14 d 以上,而茎节间则在 10~12 d 左右即可产生不定芽。对叶片来说,MS + 6-BA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + TDZ $0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 配比的培养基上诱导不定芽效果较好,分化率达到 80% 以上,产生不定芽的数量也较多;以节间为材料诱导不定芽的分化培养基中,MS + 6-BA $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + TDZ $0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的分化效果较好。类细胞分裂素 TDZ 也正被广泛应用于杨树的组织培养,它促进腋芽增值和不定芽分化^[13]。特别是与 6-BA 混合使用时,用极低浓度的 TDZ 就可诱导杨树叶外植体产生大量的不定芽^[14]。诸葛强等^[15]在新疆杨(*P. bolleana* Lauche)再生体系的研究中也发现,不同种类的细胞分裂素影响叶盘不定芽分化频率,其中较低浓度的 TDZ 可显著提高叶盘不定芽分化率。在 110 杨不定芽诱导培养基中加入 TDZ 后,可明显促进叶片和茎节间上不定芽的分化,分化率都达到了 80% 以上。前人研究结果表明,在植物基因工程中,受体材料需达到 70%~90% 的再生率进行遗传转化才有保证。可见,该再生体系对以 110 杨作为受体材料进行的遗传转化是可行的。

2.2.2 不同切割方式对外植体再生的影响 以叶片为外植体诱导不定芽的研究中,前人多以剪成面积为 1 cm^2 大小的叶盘作为培养材料^[16,17]。本试验过程中发现,不同的切割处理方法也会影响 110 杨叶片愈伤组织和不定芽的分化。110 杨试管苗叶片特点是狭长,一般 1 个叶片只能剪出 1 个 1 cm^2 大小的碎片,且只在叶片中脉两端切口处产生丛状不定

芽,不定芽分化率只有 50% 左右。而直接在叶片上剪出 1~2 条过脉伤口,则产生不定芽的部位较多,如叶柄及中脉伤口处,均可产生不定芽,不定芽分化率可达到 80% 以上,所以对 110 杨来说,叶片还是以直接剪出伤口的切割方式比较适宜。这与 Lee-Stadelmann^[18]的研究结论是基本一致的,即中脉比叶其它切口表面更易诱导出愈伤或不定芽。此外,Caiping Ma 等^[19]的研究结果表明,*Populus trichocarpa* Torr. et Groy 茎节间剪成 4~5 mm 长,两端切口产生不定芽数量可能是 10 mm 长外植体的 25 倍。本试验中采用节间长约 1 cm 左右,中间剪出 1~2 条过中轴切口,不定芽的分化率也较高。

2.2.3 不同生长状态对叶外植体产生不定芽的影响 郑均宝等^[20]用生根和未生根试管苗植株的叶片进行不定芽的诱导,发现生长条件一致时,生根试管苗植株的叶片分化情况较好,产生不定芽的数量多且粗壮。本试验过程中发现在生根培养基中生长的幼苗生长迅速,特别是叶片生长较为健壮,叶片大,且颜色深绿,较适于作为外植体诱导不定芽的发生,这与于志水等^[8]的研究结果也是一致的。但是组培苗一直在生根培养基中生长,会出现老化的现象,所以在培养过程中,应采取增殖分化与生根培养交替进行的方式来保持组培苗的繁殖与生长。也有研究结果表明,当试管苗的苗龄为 40~50 d 时,其叶片容易诱导出不定芽^[19]。M. Confalonieri 等^[21]对 white poplar 进行基因转化的研究中,认为植物材料培养 6~8 周时取材分化率高,适宜进行基因转化。故不同植物材料不同的生理状态被诱导出愈伤组织或不定芽的能力是有很大差异的。

2.3 诱导生根

再生植株接种到生根培养基中,10 d 左右就有不定根发生,结果见表 3

表 3 不同激素及浓度对 110 杨试管苗生根的影响

培养基 编号	激素浓度/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)		每株平均生 根数/条	生根率/%
	NAA	IBA		
1	0.1		1.5	66.67
2	0.3		2.5	80.00
3	0.5		1.8	83.33
4		0.3	3.0	90.00
5		0.5	4.8	100.00
6		1.0	4.4	93.33

根据观察,不同处理培养基上,110 杨树生根时间均在 10 ~ 12 d 左右。其中 IBA 培养基上生长的试管苗无论从生根率还是生根苗平均生根数量上都明显高于添加 NAA 培养基上生长的试管苗。其中 IBA 培养基上生长的试管苗生根率都在 90% 以上,其浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,生根率可达 100%,生根苗平均生根数量为 4.8 条。浓度为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时反而抑制了生根。而添加 NAA 培养基上生根的试管苗,茎基部首先会产生一定的愈伤组织,然后再产生数量较少的主根 1 ~ 2 条。且随着 NAA 浓度增加,愈伤组织会增加,这样的试管苗其根系易断,移栽时不利于成活。而 IBA 培养基上生长的试管苗,其根系基本从茎基部直接产生,呈辐射状,移栽成活率高,是较为理想的生根方式。

3 小结与讨论

通过对 110 杨叶片、茎段诱导分化并再生形成完整植株的能力进行了系列试验研究,基本可得出以下结论:以生根苗叶片为外植体,采用 $\text{MS} + 6\text{-BA } 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{TDZ } 0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 有利于不定芽的诱导;以茎的节间为外植体,在 $\text{MS} + 6\text{-BA } 0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{TDZ } 0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基中诱导不定芽的效果较好,两者不定芽分化率均可达 80% 以上。而 $\text{MS} + 6\text{-BA } 0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基可做为继代苗增值培养后的壮苗培养基使用,最后于 $1/2\text{MS} + \text{IBA } 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 中诱导再生植株生根,即可培育成完整植株,形成了 110 杨完整的再生体系。

在 110 杨再生体系建立的试验过程中发现,不定芽的诱导相对根的诱导要困难些,多次试验的结果才使不定芽的分化率达到 80% 以上,还必须是生长状态良好的叶或茎段,而根的诱导相对容易得多。

就目前杨树离体培养的研究中,关于试管苗再生过程中其生理过程及生化途径的遗传基础研究得很少。Kyung-Hwan Han 等^[22] 利用定量遗传分析方法研究了杂种杨 (*Populus trichocarpa* × *P. deltoides*) 三代家系植株试管苗诱导不定芽和根再生的规律,结果表明杨树不定芽和根的发生受主要基因的调控,其植物材料对诱导培养的反应能力是高度遗传的。进一步试验结果表明,杨树不定芽和根的再生分别受不同的遗传机理调控。这在其它杨树材料的研究中也得到证实。这可能有利于理解 110 杨不定芽和根的诱导出现明显差异的原因。

在 110 杨试管苗的继代过程中,连续几次继代,会出现试管苗茎顶端坏死的现象。但如果继代过程中将培养基中 MS 大量元素减半,症状会得到缓解。而如果无菌体系建立的初期,就采用 MS 大量元素减半,则不能诱导不定芽的形成,具体原因还有待进一步的研究。有的研究认为,试管苗生长的环境温度是造成茎尖坏死的原因之一,较高温度会引起钙缺乏导致茎尖坏死症状出现。一旦环境温度低于 $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$,则会使茎尖坏死的频率明显降低^[23]。Marc De Block^[24] 对杂种杨 *Populus alba* L. × *P. tremula* L. 和 *Populus trichocarpa* × *P. deltoides* 组培过程中出现的茎尖坏死现象进行了研究,结果表明培养基中 $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ 的比例以及 NH_4^+ 同化作用引起的培养基中 pH 值的变化可能是引起组培苗茎尖坏死的原因。可通过在培养基中添加 Mes (2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid) 和葡萄糖酸钙或环境温度保持在 $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下得到改善。因此关于 110 杨组培过程中茎尖坏死的现象以及解决方法还有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] 林善枝,肖基潜,张志毅. 杨树分子标记研究进展[J]. 北京林业大学学报, 2000, 22(6): 79 ~ 83
- [2] 赵华燕,卢善发,晁瑞堂. 杨树的组织培养及其基因工程研究[J]. 植物学通报, 2001, 18(2): 169 ~ 176
- [3] 张绮纹,李金花. 杨树工业用材林新品种[M]. 北京:中国林业出版社, 2003
- [4] 李世承,李晶,佟凤琴,等. 山杨、大青杨、毛白杨组织培养的研究[J]. 辽宁大学学报(自然科学版), 1995, 22(2): 59 ~ 61
- [5] 杜宁霞,李云,于海武,等. 毛白杨叶片再生系统的建立(英文)[J]. Forestry Studies in China, 2002, 2(4): 48 ~ 51
- [6] 孙宇飞,高秀华,赵彦修,等. 欧美 107 杨组织培养再生系统的建立[J]. 山东师范大学学报(自然科学版), 2004, 19(2): 85 ~ 87
- [7] 马宗新,高玉祥,赵红,等. 三倍体速生杨树的组织培养及应用

- [J]. 安徽农业科学, 2004, 32(4): 715 ~ 716
- [8] 于志水, 金红, 苟胜军, 等. 黑杨派杨树组培再生系统的研究[J]. 辽宁林业科技, 2002(6): 11 ~ 13
- [9] 张绮纹, 苏晓华. 杨树定向遗传改良及高新技术育种[M]. 北京: 中国林业出版社, 1999
- [10] Massimo Delledome, Gianni Allegro, Beatrice Belenghi, *et al.* Transformation of white poplar (*populus alba* L.) with a novel arabinidopsis thaliana cysteine proteinase inhibitor and analysis of insect pest resistance[J]. Molecular Breeding, 2001, 7: 35 ~ 42
- [11] In-Suk Ahn, Young-Goo Park, Dong-III Shin, *et al.* Genetic transformation of *Populus nigra* × *maximowiczii* using agrobacterium tumefaciens harboring Antisense OMT gene[J]. Plant Biotechnology, 2001, 3(3): 135 ~ 140
- [12] 陈维伦, 郭东红, 杨善英, 等. 山新杨叶外植体的器官分化以及生长调节物质对它的影响[J]. 植物学报, 1980, 22(4): 311 ~ 315
- [13] Noel N, Leple J C, Pilate G. Optimization of *in vitro* micropropagation and regeneration for *Populus* × *interamericana* and *Populus* × *euramericana* hybrida (*P. deltoides*, *P. trichocarpa*, and *P. nigra*) [J]. Plant Cell Rep, 2002, 20: 1 150 ~ 1 155
- [14] Huetteman C A, Preece J E. Thidazuron: a poen cytokinin for woody plant tissue culture[J]. Plant Cell Tissue Org Cult, 1993, 33: 105 ~ 119
- [15] 诸葛强, 王婕琛, 黄敏仁, 等. 新疆杨植株再生体系的建立[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2003, 27(6): 1 ~ 4
- [16] Dai W H, Cheng Z M, Sargent W. Plant regeneration and agrobacterium-mediated transformation of two elite aspen hybrid clones from *in vitro* leaf tissues[J]. *In vitro* Cell Dev Biol Plant, 2003, 39: 6 ~ 11
- [17] In-Suk Ahn, Young-Goo Park, Dong-III Shin, *et al.* Identification of excision of Ac transposable element in *P. nigra* × *maximowiczii* using agrobacterium-mediated transformation [J]. Plant Biotechnology, 2003, 5(1): 19 ~ 23
- [18] Lee-Stadelmann O Y, Lee Sw, Hackett W P, *et al.* The formation of adventitious buds *in vitro* on micro-cross sections of hybrid *Populus* leaf midveins[J]. Plant Sci, 1989, 61: 263 ~ 272
- [19] Caping M A, Steven H S, Richard Meilan. Agrobacterium-mediated transformation of the genome-sequenced poplar clone, Nisqualy-1 [J]. Plant Molecular Biology, 2004, 22: 1 ~ 9
- [20] 郑均宝, 张玉满, 杨文芝, 等. 741 杨离体叶片的再生及抗虫基因转化[J]. 河北农业大学学报, 1995, 118(3): 20 ~ 25
- [21] Confalonieri M, Belenghi B, Balestrazzi A, *et al.* Transformation of elite white poplar (*Populus alba* L.) cv. 'Villafranca' and evaluation of herbicide resistance[J]. Plant Cell Reports, 2000, 19: 978 ~ 982
- [22] Kyung-Hwan Han, Harvey D B, Jr. Milton P G. Adventitious root and shoot regeneration *in vitro* is under major gene control in a F2 family of hybrid poplar (*Populus trichocarpa* × *P. deltoides*) [J]. Forest Genetics, 1994, 1(3): 139 ~ 146
- [23] Sha L, McCown B H, Peterson L A. Occurrence and cause of shoot-tip necrosis in shoot culture[J]. J Am Soc Hort Sci, 1985, 110: 631 ~ 634
- [24] Marc De Block. Factors influencing the tissue culture and the agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of hybrid aspen and poplar clones[J]. Plant Physiol, 1990, 93: 1 110 ~ 1 116