

文章编号: 1001-1498(2009)05-0740-04

TDZ对巨尾桉(GL9)胚性愈伤组织诱导和再生的影响

裘珍飞, 曾炳山, 李湘阳, 刘英

(中国林业科学研究院热带林业研究所, 广东 广州 510520)

关键词: TDZ; 巨尾桉 GL9; 愈伤诱导率; 再生率

中图分类号: S792.39 文献标识码: A

Embryogenic Callus Induction and Plant Regeneration of Clones GL9 of *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla*

QIU Zhen-fei, ZENG Bing-shan, LI Xiang-yang, LIU Ying

(Research Institute of Tropical Forestry, CAF, Guangzhou 510520, Guangdong, China)

Abstract: The embryogenic callus induction and shoot regeneration were studied systematically in elite clone GL9 of *Eucalyptus* cultivated widely in south China. We investigated TDZ 0.02 - 0.05 mg · L⁻¹ was the proper concentration. The callus induction rate was 92.9%—100%. When TDZ concentration was higher than 0.1 mg · L⁻¹, the axillary bud germination was completely inhibited. TDZ 0.02 mg · L⁻¹ with combinations of CoCl₂ 0.125 mg · L⁻¹ could induce the embryogenic callus. The direct regeneration rate was 13.39% ± 1.03%, and with combinations of NAA 0.1 mg · L⁻¹ could not differentiate directly from callus, but higher regeneration rate (20.2% ± 1.3%) could be obtained by transferring callus onto regeneration medium. The size of callus can increase to 1.4 fold of its original size in the first subculture in modified MS + TDZ 0.02 mg · L⁻¹ + NAA 0.1 mg · L⁻¹ medium and the average number of deep pink-coloured masses of embryogenic cells on each callus was 8.4. In the second and third subculture, callus stopped growing further and the number of masses of embryogenic cells decreased gradually. Regeneration system could lay a good foundation for further transformation research.

Key words: TDZ; *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla* GL9; callus initiation rate; regeneration rate

TDZ(苯基噻二唑脲)是近20~30年被逐渐应用到组织培养中的一种新型植物生长调节剂,具有很强的细胞分裂素活性,它的活性是6-BA的50倍、Zip的1000倍^[1],许多难以再生的植物应用TDZ可获得体细胞胚和再生植株^[2]。Tibok^[3]认为:在尾叶桉(*Eucalyptus urophylla* S. T. Blake)胚轴再生芽中,6-BA诱导只通过器官发生再生,而TDZ诱导不仅通过器官发生途径再生,而且还获得心型结构的体胚再生。在国外桉树愈伤组织诱导和植株再生的研究

报道中,应用TDZ诱导尾叶桉、巨尾桉(*E. grandis* W. Hill ex Maiden × *E. urophylla* S. T. Blake)和蓝桉(*E. globules* Labill.)胚轴和子叶愈伤,其适合浓度为0.01~0.5 mg · L⁻¹^[3-5],取得较好效果。在国内桉树的再生研究中,卜朝阳^[6]应用TDZ在0.5 mg · L⁻¹水平上获得愈伤再生。作者在开展桉树组培苗茎段愈伤组织诱导和植株再生的研究中,应用TDZ获得了稳定的胚性愈伤和再生植株,为进一步开展优良无性系的转基因研究奠定基础。

收稿日期: 2008-10-20

基金项目: 国家林业局948项目“桉树转基因技术及抗病育种基因质粒引进”(2006-4-70); 科研院所基本科研费项目“桉树转基因技术及转基因育种研究”(2007-23)

作者简介: 裘珍飞(1966—),女,浙江嵊州人,高级实验师,从事热带林木组织培养和生物技术研究。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料为本实验室大规模生产的巨尾桉 (GL9) 组培生根苗, 生根培养 25~30 d, 苗高 2~3 cm。组培生根苗具有较长的茎间节段, 便于获得茎段愈伤。

TDZ为 Signa公司生产的 0.25 mg装产品, 用 1 mL二甲亚砷溶解后, 用 1 mol氢氧化钾稀碱液定容, 配成 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 母液备用; 2, 4-D、6-BA 和 NAA 为上海伯奥产品。

基本培养基采用欧阳权等^[7]在桉树组培育苗中研制的改良 H, 改良 H在刚果 12桉愈伤诱导和再生中获得较好效果^[8]; 再生培养基为改良 H+6-BA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 所有培养基中蔗糖 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 琼脂 $7.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

培养室温度 (25 ± 2) , 光照强度 2 500 lx, 光照时间 $10 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

1.2 试验设计

1.2.1 TDZ最适浓度试验 配制改良 H+TDZ ($0.001, 0.005, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.1, 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 9个浓度梯度培养基, 以改良 H+6-BA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基为对照。切除生根苗顶芽, 取中上部单芽茎段 (长 1.0~1.5 cm, 带 1个腋芽), 直立插入培养基中, 培养 30 d, 观察切口愈伤形成和腋芽萌发情况, 统计愈伤诱导率、愈伤大小和腋芽萌发率。

1.2.2 TDZ和不同物质组合使用效果试验 改良 H+TDZ $0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组合 2, 4-D ($0.01, 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、NAA ($0.01, 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、6-BA ($0.01, 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 CoCl_2 (氯化钴, $0.025, 0.125 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 共 8个处理培养基。切除生根苗顶芽, 取中上部单芽茎段 (长 1.0~1.5 cm, 带 1个腋芽), 直立插入培养基中, 培养 30 d, 调查愈伤大小和再生率。切取茎段基部切口长出的愈伤组织 (不含腋芽茎段), 接入再生培养基, 培养 30 d, 调查再生率。

1.2.3 TDZ多代培养对愈伤再生的影响 取生根苗中上部单芽茎段接种在改良 H+TDZ $0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ +NAA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的愈伤诱导培养基中, 培养 20 d, 切取茎段基部切口长出的愈伤组织 (不含腋芽茎段) 接入相同的培养基, 继代 3次, 转接周期 20 d, 观察愈伤组织生长和愈伤表面发生的变化。

1.3 试验重复

所有试验的每个处理重复 6瓶, 每瓶接种 6个材料。由于实际操作中存在一定的污染, 因此每个

处理比试验设计多 2瓶, 以保证每个试验数据的完整性, 如果没有污染, 则多余的瓶数不作统计。

1.4 试验观察和调查

茎段愈伤以茎段基部切口能观察到球状突起, 即生长出直径大于 2 mm的愈伤计数, 诱导率为生长愈伤茎段和接种茎段数的百分比。愈伤再生以愈伤表面生长出大于 2 mm的芽计数, 再生率为再生愈伤与接种愈伤数的百分比。

1.5 统计与分析

数据利用 SAS分析软件进行处理, 文中百分率数据分析时经过正弦平方根转换。

2 结果与分析

2.1 不同浓度 TDZ对愈伤组织诱导和腋芽生长的影响

表 1表明: TDZ各浓度在愈伤诱导率、愈伤大小和腋芽萌发率上都存在极显著的差异。当 TDZ浓度为 $0.02 \sim 0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 获得直径大于 4.89 mm的愈伤, 且诱导率大于 92.9%; 当 TDZ浓度过低 ($<0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 或过高 ($>0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 时, 愈伤直径和诱导率都存在下降的趋势: 当 TDZ $<0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 切口难以产生愈伤, 而当 TDZ $>0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 表现为全茎段膨大。腋芽萌发率随着 TDZ浓度的增加而下降, 当 TDZ浓度大于 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 腋芽生长完全受到抑制。在对照的再生培养基中, 愈伤不生长, 而腋芽萌发率为 100%, 与最低浓度的 TDZ ($0.001 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 存在极显著差异。从腋芽萌发的状态看, TDZ培养基腋芽萌发较 6-BA培养基慢, 且萌出的腋芽细弱, 这表明 TDZ不利于桉树腋芽的萌发和生长, 在再生和增殖上最好还是选用 6-BA等其它激素较好, 这与巴西 Luis等^[5]的研究结果一致。

表 1 TDZ浓度对愈伤诱导和腋芽萌发的影响

试验号	TDZ浓度 / ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	愈伤诱导 率 / %	愈伤直径 / mm	腋芽萌发 率 / %
对照	0.000	0.0 d	—	100.0 a
1	0.001	46.4 c	2.61 c	66.7 b
2	0.005	44.7 c	2.33 c	63.0 b
3	0.010	68.3 bc	3.09 c	53.2 bc
4	0.020	96.4 a	5.14 a	33.9 cd
5	0.030	100.0 a	4.89 a	17.9 de
6	0.040	100.0 a	5.30 a	8.8 ef
7	0.050	92.9 ab	5.10 a	3.6 fg
8	0.100	65.6 bc	4.45 ab	0.0 g
9	0.500	67.4 bc	3.39 bc	0.0 g

注: 表中数据为平均值 ±标准误 (下同); 同列中不同字母表示差异极显著 ($P=0.01$)。

2.2 TDZ和不同物质组合使用对愈伤诱导和再生的影响

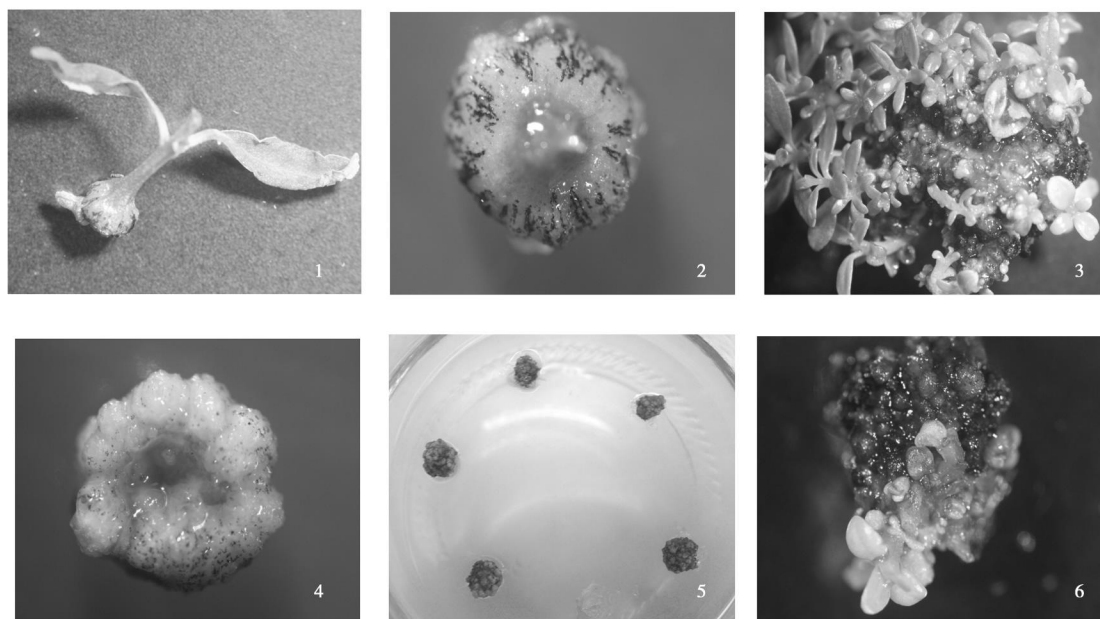
TDZ具有细胞分裂素的作用,又具有生长素的作用。Tibok^[31]认为,在尾叶桉中 TDZ只有与 NAA 配合使用才能发挥作用,在苜蓿中使用 TDZ促进乙烯的形成,使愈伤组织变绿变硬,丧失体胚发生能力,而加入 CoCl_2 可恢复愈伤组织的体胚发生^[9]。表 2 表明:TDZ与不同的物质及浓度组合使用,愈伤大小、再生方式和再生率存在很大差异,其中,3、5、6、8号培养基可获得 2 条途径的再生,即在诱导培养基上直接获得愈伤再生芽(直接再生)和把获得的愈伤材料(图版 2)转接到再生培养基后分化出芽(间接再生)。直接再生多为单芽或双芽(图版 1),间接再生表现为愈伤多点出芽,最多可达 30 个·块⁻¹愈伤(图版 3)。

TDZ与高浓度 CoCl_2 ($0.125 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)组合使用效果最好,直接再生率达 13.39%,间接再生率达 16.5%,说明 CoCl_2 在桉树愈伤再生中也具有解除 TDZ的再生抑止和恢复胚性的意义,但 TDZ与低浓度的 CoCl_2 ($0.025 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)组合使用再生效果不明显。TDZ与 6-BA 组合使用,能产生少量再生,且以低浓度 6-BA 为好。表 2 中,1、2、4、7 号培养基,不能获得直接再生;但 TDZ与高浓度的 NAA ($0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)组合使用,间接再生率最高,平均达 20.2%,且愈伤生长最大,达 5.32 mm。TDZ和低浓度的 2,4-D ($0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)组合使用时,有少量间接再生,但 TDZ和高浓度的 2,4-D ($0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)组合使用时,不能再生。由此可见,最佳胚性愈伤诱导培养基为:改良 H + TDZ $0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

表 2 TDZ $0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和不同物质配合使用对桉树愈伤组织诱导和再生影响

培养基编号	组物质及浓度 / ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	愈伤直径 / mm	直接再生率 / %	间接再生率 / %
1	TDZ $0.02 + 2,4 - \text{D} 0.01$	$4.62 \pm 0.67 \text{ bc}$	$0.00 \pm 0.00 \text{ b}$	$13.0 \pm 11.8 \text{ bc}$
2	TDZ $0.02 + 2,4 - \text{D} 0.10$	$4.26 \pm 0.65 \text{ bc}$	$0.00 \pm 0.00 \text{ b}$	$0.0 \pm 0.00 \text{ d}$
3	TDZ $0.02 + \text{NAA} 0.01$	$4.45 \pm 0.62 \text{ bc}$	$5.08 \pm 7.05 \text{ ab}$	$6.3 \pm 12.5 \text{ cd}$
4	TDZ $0.02 + \text{NAA} 0.10$	$5.32 \pm 1.32 \text{ a}$	$0.00 \pm 0.00 \text{ b}$	$20.2 \pm 13.3 \text{ a}$
5	TDZ $0.02 + 6 - \text{BA} 0.01$	$4.06 \pm 0.37 \text{ bc}$	$10.27 \pm 6.90 \text{ ab}$	$7.1 \pm 8.2 \text{ cd}$
6	TDZ $0.02 + 6 - \text{BA} 0.10$	$3.83 \pm 0.79 \text{ c}$	$4.72 \pm 6.48 \text{ ab}$	$4.7 \pm 6.5 \text{ cd}$
7	TDZ $0.02 + \text{CoCl}_2 0.025$	$3.88 \pm 0.50 \text{ c}$	$0.00 \pm 0.00 \text{ b}$	$3.1 \pm 6.3 \text{ cd}$
8	TDZ $0.02 + \text{CoCl}_2 0.125$	$4.90 \pm 0.94 \text{ ab}$	$13.39 \pm 1.03 \text{ a}$	$16.5 \pm 5.7 \text{ ab}$

注:表中数据为平均值 ± 标准误;同列中不同字母表示数据间差异显著 ($P=0.05$)



图版: 1 愈伤直接再生出单芽; 2 再生培养的愈伤材料; 3 愈伤间接再生出多个芽; 4 初代培养获得的愈伤; 5 继代培养后的愈伤; 6 红色的胚性细胞团再生出芽

2.3 TDZ多代培养对愈伤生长和胚性的影响

单芽茎段接种在胚性愈伤诱导培养基(改良 H + TDZ $0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)上, 7~10 d在切口形成愈伤组织, 10~15 d为愈伤迅速增长期, 15~20 d为缓慢增长期, 20 d后几乎停止生长。作者以 20 d为继代周期, 切取所得愈伤在相同的培养基上进行连续 3代培养, 结果见图 1。由图 1可见: 诱导获得的初代愈伤, 直径为 2.67 mm , 表面呈黄绿色(图版 4), 在第 1代培养基上, 10 d后表面生长出红色颗粒状的胚性细胞团(图版 5), 20 d后愈伤直径增长了 40.4% , 每块愈伤中红色颗粒状胚性细胞团的数量平均达 8.4 个。具有红色颗粒的愈伤组织在再生培养时容易产生再生芽(图版 6), 这与欧阳权等^[7]描述的胚性愈伤再生相似。经 2、3代培养, 愈伤直径没有明显生长, 愈伤表面的红色胚性细胞团的数量逐渐减少。这是因为在 2、3代培养时, 愈伤停止了生长, 新的胚性细胞发生少, 第 1代的胚性细胞会慢慢老化, 变成褐色而死亡。

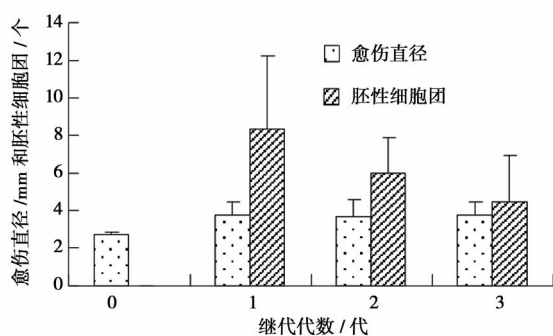


图 1 愈伤在相同培养基上继代生长

3 结论与讨论

(1) TDZ单独使用可诱导 GL9组培苗茎段获得愈伤, 最适浓度为 $0.02 \sim 0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 愈伤诱导率在 92.9% 以上, 愈伤直径最大达 5.30 mm 。徐华松^[1]文中引用很多事例说明了 TDZ的高效性, 本文发现了 TDZ的精确性, TDZ $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 TDZ $0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的愈伤诱导率和愈伤直径都达到了极显著水平, 因此使用 TDZ时尽可能选择低浓度, 浓度梯度的设计尽可能精确开展实验。

(2) TDZ的再生抑制性。TDZ对腋芽萌发具有抑制作用, TDZ浓度大于 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 腋芽生长完全受到抑制, 同时 TDZ也抑制愈伤再生。CoCl₂

$0.125 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 具有解除 TDZ的再生抑止和恢复胚性的作用。本试验获得的最佳胚性愈伤诱导培养基为: 改良 H + TDZ $0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 其间接再生率达 $20.2\% \pm 13.3\%$ 。TDZ与 CoCl₂、NAA组合能否进一步提高再生率需要继续试验。

(3) 胚性愈伤的诱导是植株再生的关键。本文通过 TDZ的合理使用获得了胚性愈伤并实现胚性愈伤的再生, 获得最高达 30 个芽·块⁻¹愈伤的再生植株。欧阳权等^[10]通过切片获得胚性愈伤的特征为细胞小、质浓、核明显, 外观特征为表面光滑、湿润、呈深红色或淡红色、颗粒状、凹凸不平, 这与本试验再生的胚性愈伤高度一致; 但本试验只有部分胚性细胞团实现再生, 这可能与使用材料是组培苗, 诱导的胚性愈伤发育和发展不完全, 胚性细胞的活力不强等原因有关。提高胚性愈伤的再生率是进一步值得研究的问题。

参考文献:

- [1] 徐华松, 徐九龙, 黄学林. TDZ在植物组织培养中的作用[J]. 广西植物, 1996, 16(19): 77 - 80
- [2] 陈云凤, 张春荣, 黄霞, 等. TDZ对植物体细胞胚胎发生的作用[J]. 植物生理学通讯, 2006, 42(1): 127 - 132
- [3] Tibok A, Blackhall N W, Power J B, et al. Optimized plant regeneration from callus derived from seedling hypocotyls of *Eucalyptus urophylla* [J]. Plant Science, 1995 (1101): 139 - 145
- [4] Greg N, Stephen F C, Phil W, et al. Adventitious Bud Induction in *Eucalyptus globulus* Labill [J]. Society for In Vitro Biology, 2001 (37): 388 - 391
- [5] Luis P B C, Adriane C M G, Silvia B R C, et al. Plant regeneration from seedling explants of *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla* [J]. Plant cell, Tissue and organ culture, 1999(56): 17 - 23
- [6] 卜朝阳. 桉树再生系统的研究[J]. 西南农业学报, 2004, 17(4): 500 - 503
- [7] 欧阳权, 曾炼武, 李洁汉. 桉树组培育苗新技术[J]. 广西科学, 1994, 1(3): 49 - 59
- [8] 谭德冠, 庄南生, 黄华孙. 刚果 12号桉愈伤组织的诱导与再生植株快繁体系的构建[J]. 热带作物学报, 2005, 26(3): 24 - 29
- [9] 黄学林, 李筱菊, 傅家瑞, 等. Thidiazuron对苜蓿愈伤组织的乙烯生成及其体细胞胚胎发生的影响[J]. 植物生理学报, 1994, 20(4): 367 - 372
- [10] 欧阳权, 彭海忠, 李启泉. 桉树愈伤组织发生胚状体研究[J]. 林业科学, 1981, 17(1): 1 - 9