

青海青杨高效再生体系的建立

杜晓艳^{1,2}, 韩素英³, 梁国鲁¹, 齐力旺^{2*}

(1. 西南大学园艺园林学院, 重庆 400716; 2. 中国林业科学研究院林业研究所细胞生物学实验室, 北京 100091;
3. 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所, 北京 100091)

摘要:以青海青杨茎段为外植体进行组织培养,研究了不同浓度激素对其再生的影响,建立了其高效的组培再生体系。结果表明:青海青杨在不定芽分化、试管苗伸长和增值以及试管苗生根的各阶段对培养基中激素的浓度反应较敏感,激素浓度低或高都会给试管苗生长带来很大影响。通过研究筛选,得到了青海青杨生长各阶段最佳的培养基:诱导茎段分化最佳的培养基为 $1/2MS + 6-BA 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + NAA 0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,其分化率 82.0%;伸长及壮苗效果最好的培养基为 $MS + NAA 0.005 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;增殖效果最好的培养基为 $MS + 6-BA 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + NAA 0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;生根效果最好的培养基为 $1/2MS + IBA 0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

关键词:青海青杨;组织培养;不定芽;再生体系

中图分类号:S722.3

文献标识码:A

Establishment of an Efficient Regeneration System of *Populus cathayana* Rehd. var. *Qinghai*

DU Xiao-yan^{1,2}, HAN Su-ying³, LIANG Guo-lu¹, QI Li-wang²

(1 College of Horticulture and Landscape, Southwest University, Chongqing 400716, China; 2 Laboratory of Cell Biology, Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China; 3 Research Institute of Forest and Ecology, Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

Abstract: The shoots of *Populus cathayana* Rehd. var. *Qinghai* were used as explants for tissue culture to study the effects of different hormone concentrations on the plant's regeneration system and a high-efficient tissue culture regeneration system of *P. cathayana* Rehd. var. *Qinghai* was established. It was found that *P. cathayana* Rehd. var. *Qinghai* was very sensitive to hormone concentration. The concentration of hormone had great impact on their growth in various stages. The best culture medium for induction and differentiation of *P. cathayana* Rehd. var. *Qinghai* was $1/2MS + 6-BA 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + NAA 0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, on which the differentiation rate was 82.0%; The best culture medium for bud growth was $MS + NAA 0.005 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; The best culture medium for proliferation was $MS + 6-BA 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + NAA 0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; The best culture medium for rooting was $1/2MS + IBA 0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

Key words: *Populus cathayana* Rehd. var. *Qinghai*; tissue culture; adventitious bud; regeneration system

青杨(*Populus cathayana* Rehd.)属杨柳科(Salicaceae)杨属(*Populus* L.),是青杨派中的一个大的种群,主要分布在我国青藏高原,集中分布在青

海,垂直分布于海拔1 800~3 900 m,地跨草原带、森林草原带和荒漠带,为我国北方特有的乡土树种^[1]。青杨具有抗性强、易成活、适应范围广等优良

收稿日期:2010-03-16

基金项目:国家“863”项目(2006AA100109,2007AA10Z182与2008AA10Z126);国家自然科学基金重点项目(30830086)和国家“973”项目(2009CB119100)及国家林业局“948”创新项目(2006-4-C01-02)资助

作者简介:杜晓艳(1985—),女,山西河曲人,硕士研究生,从事林木遗传育种研究。

* 通讯作者:研究员,博导,研究方向:树木遗传学;E-mail:lwqi@caf.ac.cn

特性,是我国重要的高原荒山造林、山地绿化树种。目前,关于青杨的研究多集中于形态特征、种群调查、锈病预防、种间核型比较等方面^[2],在组织培养方面还没有系统的研究。

杨树因其速生丰产、无性繁殖能力强、基因组较小等特点成为林木遗传育种研究理想的模式植物,国内外许多实验室利用杨树开展了大量遗传转化研究;但是,从现有的研究来看,杨树遗传转化成功的实例多集中于白杨派无性系,大多数利用杨树开展遗传转化的再生植株的研究,都优先选择白杨派树种及其杂种无性系,例如银白杨(*Populus alba* Linn.)、大齿杨(*P. grandidentata* Michx.)、欧洲山杨(*P. tremula* Linn.)、美洲山杨(*P. tremuloides* Michx.)、毛白杨(*P. tomentosa* Carr.)、欧洲山杨×银白杨(*P. tremula* × *P. alba*)等^[3-7],因为利用这些无性系的不同器官可以非常容易地诱导出再生植株^[6]。由于杨树的再生基因型起着决定作用^[8],所以不同杨树无性系再生能力存在很大的差异,对应其组培再生体系和建立技术难易程度也各不相同。众所周知,青杨派无性系再生困难,对植株再生和遗传转化存在一定的抑制性^[9],目前缺少可靠有效的再生系统,这已成为青杨派无性系基因工程改良的最大障碍和“瓶颈”,对其进行再生体系建立的研究具有重大的科学意义和应用价值。本研究以青海青杨为试验材料,通过筛选最佳的不定芽诱导分化、伸长、增殖和生根的培养基,建立其高效组培再生及遗传转化体系,为进一步开展青海青杨分子聚合育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

青海青杨采自青海高原海拔1 900 m处,定植于中国林业科学研究院玉泉山苗圃,于2008年10月晴朗的下午采集生长健壮、腋芽饱满、长度为30~40 cm的半木质化枝条为外植体。

1.2 研究方法

1.2.1 无菌材料的获得 将所采枝条用自来水反复冲洗,洗净表面污物、油脂,剪成2 cm左右的单芽茎段,置于超净工作台中,用75%的乙醇处理30 s,0.1%的氯化汞消毒6~8 min,用量以浸没材料为宜,其间不断晃动灭菌瓶,最后用无菌水冲洗5~6次,将材料放在灭菌的滤纸上将水分吸干、备用。

1.2.2 再生体系的建立

1.2.2.1 最佳不定芽诱导分化培养基的筛选 将无菌茎段两端切取少许,垂直接种于以1/2MS为基本培养基,附加浓度6-BA(0.5、1.0、1.5 mg·L⁻¹)、TDZ(0.01 mg·L⁻¹)与NAA(0.05、0.10 mg·L⁻¹)构成的9个不同处理的培养基上,每个处理分别接种50个无菌茎段,30 d后对分化情况进行记录分析。

1.2.2.2 最佳不定芽伸长及壮苗培养基的筛选 待不定芽长至1.5 cm左右转入以MS为基本培养基,附加6-BA(0.1、0.2、0.4 mg·L⁻¹)与NAA(0.005、0.01、0.02、0.05 mg·L⁻¹)构成的10个不同处理的培养基上,30 d后调查统计试管苗的高度。

1.2.2.3 最佳继代增殖培养基的筛选 将健壮的试管苗剪成1 cm左右带有2~4个节的茎段接种到以MS为基本培养基,附加6-BA(0.1、0.2、0.5、1.0、1.5 mg·L⁻¹)与NAA(0.05、0.10、0.20、0.30、0.40 mg·L⁻¹)构成的11个不同处理的培养基上,每处理接种30个茎段,30 d后统计增殖倍数。

1.2.2.4 最佳生根培养基的筛选 将长至2~3 cm的试管苗自基部切下,分别接种到以1/2MS为基本培养基,附加NAA(0.2、0.3 mg·L⁻¹)、IBA(0.2、0.3、0.4 mg·L⁻¹)5个不同处理的培养基上,20 d后对生根情况进行统计。

1.2.3 培养基及培养条件 各阶段培养基均添加蔗糖25 g·L⁻¹、琼脂7 g·L⁻¹。所有培养基pH均调至5.8~6.0,分装后在121℃下高压灭菌。

培养材料接种后放于组培室培养,培养温度(25±1)℃,光强1 500~2 000 lx,光周期12~14 h·d⁻¹。

1.2.4 分析指标

分化率 = 分化的外植体数/接种的外植体数 × 100%

平均株高 = 试管苗高度/接种不定芽数

增殖系数 = 不定芽的数/接种茎段数

生根率 = 生根的试管苗数/接种试管苗数 × 100%

2 结果与分析

2.1 不同浓度激素对青海青杨不定芽诱导分化培养的影响

将无菌茎段接种到以1/2MS为基本培养基,附加不同浓度的6-BA、TDZ与NAA处理组合的培养基上诱导茎段不定芽分化,从表1的结果可以看出:

各种培养基上诱导不定芽的生长、分化情况差别比较大。当6-BA浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (培养基2)时,分化生长情况最好,腋芽萌动较快,分化的丛生芽4~9个不等,且生长健壮,分化率也较高(图1);当6-BA浓度为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,分化率最高,达到88.0%,但此浓度下不定芽生长状况不好,有矮小泛黄现象产生;在附加TDZ的培养基7~9中,腋芽也可较快萌动,但诱导效果不理想,诱导率较6-BA降低,分化的不定芽不同程度出现了畸形、矮化、玻璃化等现象。

综合分析,筛选到合适的不定芽诱导分化培养基

为: $1/2\text{MS} + 6\text{-BA } 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。



图1 青海青杨茎段在分化培养基(2)上不定芽分化情况

表1 不同浓度激素对诱导青海青杨不定芽分化的影响

培养基	6-BA/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	NAA/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	TDZ/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	接种数/个	分化率/%	生长情况
1	0.1	0.05	-	50	42	一般
2	0.5	0.05	-	50	82	健壮
3	1.0	0.05	-	50	88	植株矮小
4	1.5	0.05	-	50	86	矮小泛黄
5	0.5	0.10	-	50	72	一般
6	1.0	0.10	-	50	76	矮小泛黄
7	-	0.05	0.01	50	52	叶色泛黄
8	0.5	0.05	0.01	50	42	畸形
9	0.5	-	0.01	50	60	玻璃化

2.2 不同浓度激素对青海青杨不定芽伸长及壮苗的影响

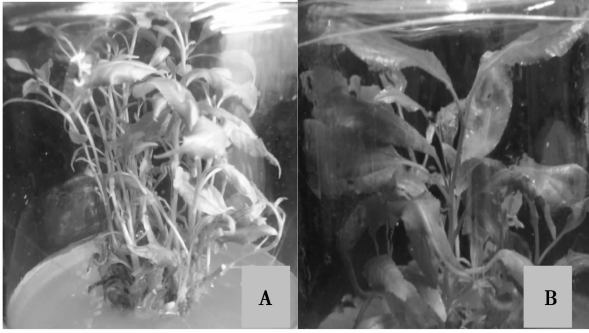
实验观察发现,把不定芽继续放在分化培养基上,随着培养时间的加长,在基部有大量不定芽继续生成,而长度长至2 cm左右的不定芽出现发黄、叶片脱落、生长缓慢等现象,说明培养基不足以提供大量不定芽生长所需的养分,所以有必要进行培养基激素的调整来解决上述营养不均衡产生的问题,期望得到健壮的不定芽为后续进行的增殖和生根试验打下良好的基础。

从表2看出:在附加不同浓度6-BA的培养基1~5,不定芽继续分化,已分化的不定芽不同程度

的出现了徒长现象,表现为茎细弱,淡黄色,茎节距离较大,叶片狭长发黄等现象,且6-BA浓度越高,徒长现象越严重(图2A);在只附加NAA的培养基6~10上,没有不定芽分化,NAA $\geq 0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,不定芽伸长较快,但是不定芽的质量不理想,还存在部分不定芽茎较细,叶片泛黄现象;当NAA为 $0.005 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,不定芽生长状态良好,30 d可平均伸长2 cm左右,在不定芽伸长的部分明显茎变粗变绿,新生叶片颜色墨绿色,壮苗效果明显(图2B);在没附加任何激素的MS培养基上,不定芽质量较好,但是不定芽的伸长速度较附加 $0.005 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA的培养基的较慢。

表2 不同浓度激素对青海青杨不定芽伸长及壮苗的影响

培养基	6-BA/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	NAA/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	接种数/个	平均株高/cm	生长情况
1	0.40	0.050	30	5.9	徒长现象严重,茎细弱,叶泛黄狭长,茎节距离较大
2	0.20	0.050	30	5.5	大部分不定芽有徒长现象,茎细弱,叶泛黄
3	0.10	0.050	30	4.9	部分不定芽有徒长现象,茎细弱,叶泛黄
4	0.05	0.020	30	4.3	部分不定芽有徒长现象,茎细弱,叶泛黄
5	0.03	0.020	30	4.1	少部分不定芽有徒长现象
6	0.00	0.050	30	4.5	伸长较快,部分不定芽较纤细,不健壮
7	0.00	0.020	30	3.9	伸长较快,部分不定芽较纤细,不健壮
8	0.00	0.010	30	3.7	伸长较快,少部分不定芽较纤细,不健壮
9	0.00	0.005	30	3.5	伸长较快,不定芽健壮
10	0.00	0.000	30	2.9	伸长相对较慢,不定芽健壮



A 不定芽在培养基(2)上出现了徒长现象
B 不定芽在培养基(9)上生长健壮

图2 青海青杨不定芽在不同伸长及壮苗培养基上的生长情况

综合分析,青杨不定芽适合的伸长及壮苗培养基为:MS + NAA0.005 mg·L⁻¹。

2.3 不同浓度激素对青海青杨试管苗继代增殖的影响

从表3看出:培养基1~4,6-BA ≤ 0.5 mg·L⁻¹,6-BA/NAA 越小,腋芽萌发较快,15~20 d,萌发的不定芽纤细,生长缓慢;30~40 d 会从茎段基

部分化2~4个不定芽,不定芽长势缓慢,随着培养时间的增长,没有不定芽的分化,已分化的不定芽生长基本停止,开始发黄死亡,继代增殖的健壮茎段叶柄也脱落,发黄丧失了分化能力,逐渐死亡(图3A)。培养基5~8,6-BA ≥ 1.0 mg·L⁻¹,生长现象均表现为:腋芽不萌发或稍有一点萌发的迹象,没有不定芽的增殖分化,用于增殖继代的健壮的茎段发黄死亡。培养基9~11,NAA/6-BA 越大腋芽萌发越快,不定芽分化越快,增殖越多,当 NAA = 0.3 mg·L⁻¹时,7 d左右腋芽萌动,15 d左右从茎段基部和腋芽周围有大量不定芽冒出,增殖倍数达到5.1,20~25 d不定芽可长至2~3 cm,不定芽健壮(图3B);当 NAA = 0.4 mg·L⁻¹时,增殖系数达到5.6,但是不定芽大部分出现了玻璃化现象,叶片和茎呈半透明状(图3C)。

综合分析,筛选得到青海青杨适合的继代增殖培养基为:MS + 6-BA0.1 mg·L⁻¹ + NAA 0.3 mg·L⁻¹。

表3 不同浓度激素对青海青杨试管苗增殖的影响

培养基	6-BA/(mg·L ⁻¹)	NAA/(mg·L ⁻¹)	接种数/个	增殖系数	生长情况
1	0.2	0.05	30	0.10	1~4培养基:腋芽萌发较慢,不定芽增殖少,约
2	0.2	0.10	30	0.13	2~4个,且不定芽发黄、长势缓慢
3	0.5	0.05	30	0.10	
4	0.5	0.10	30	0.06	
5	1.0	0.05	30	0.00	5~8培养基:腋芽未萌发,没有不定芽的增殖
6	1.0	0.10	30	0.00	分化
7	1.5	0.05	30	0.00	
8	1.5	0.10	30	0.00	
9	0.1	0.20	30	4.30	不定芽分化较慢、不定芽正常
10	0.1	0.30	30	5.10	不定芽增殖较多,不定芽健壮
11	0.1	0.40	30	5.60	玻璃化现象严重



A 在培养基(1)上腋芽萌发,但没有不定芽增殖
B 在培养基(10)上不定芽增殖较多,生长健壮
C 在培养基(11)上不定芽增殖较多,但玻璃化

图3 青海青杨试管苗茎段在不同增殖培养基上的生长情况

2.4 生长素 NAA、IBA 对试管苗生根的影响

当青海青杨试管苗生长至 3 cm 左右时,将生长健壮的小苗切成单苗接种于以下生根培养基中,7~10 d 从基部长出白色小根,生根率达到 90% 以上,但根系生长情况各异。从表 4 可以看出:培养基中加入 NAA 和 IBA 都能使青杨生根,但生根效果差异较大,当培养基中加入 NAA 时,生根一般表现为细长弱根;当培养基中加入 IBA 时,生根的质量较 NAA 培养基上理想,不同浓度的 IBA 诱导的结果不同,其中当 IBA 的浓度为 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,生根条数最多,质量最好(图 4),当其浓度达到 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时所生根的条数有所下降,基部也有轻微的愈伤化。

表 4 不同浓度激素对青海青杨试管苗生根的影响

培养基	NAA/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	IBA/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	接种数/个	生根率/%	生长情况
1	0.2	0.0	30	93	2~3 条,根细长
2	0.3	0.0	30	97	3~4 条,根细长
3	0.0	0.2	30	100	3~4 条,根较粗
4	0.0	0.3	30	100	6~7 条,根粗壮
5	0.0	0.4	30	100	4~5 条,根短粗

故青杨较为理想的生根培养基为: $1/2\text{MS} + \text{IBA} 0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

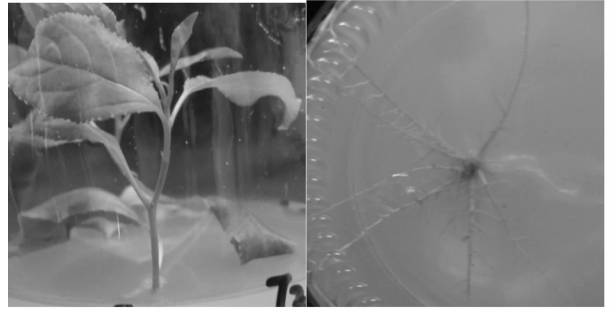


图 4 青海青杨试管苗及其根系在生根培养基(4)的生长情况

3 小结与讨论

对青海青杨茎段不定芽诱导分化并再生形成完整植株的较好的培养基为:(1)不定芽诱导分化培养基: $1/2\text{MS} + 6\text{-BA} 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA} 0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;(2)伸长及壮苗培养基: $\text{MS} + \text{NAA} 0.005 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;(3)增殖培养基: $\text{MS} + 6\text{-BA} 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA} 0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;(4)生根培养基: $1/2\text{MS} + \text{IBA} 0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。青海青杨组织培养再生系统的研究可用于基因的遗传转化,为进一步进行其分子育种奠定基础。

组织培养是一个复杂的过程,影响外植体分化和组培苗生长的因子也较复杂,其中,培养基的种类和含量是影响不定芽分化和组培苗生长的关键因素。在杨树组织培养中,常见的基本培养基为 MS 和 WPM,但二者都含有较高浓度的铵离子,据报道,铵离子浓度高不利于杂交杨(*P. alba* × *P. tremula*)和(*P. trichocarpa* × *P. deltoides*)愈伤组织的诱导^[9];而大量元素减半的 $1/2\text{MS}$ 培养基有利于杨树不定芽的诱导。在本实验中,诱导茎段不定芽分化的基本培养基为 $1/2\text{MS}$,与上述研究结果有相似之处,可能是由于 $1/2\text{MS}$ 中低浓度的铵离子和全量的 MS 有机成分及微量元素有利于青海青杨不定芽诱导。

在基本培养基上添加适当浓度的植物生长调节剂往往有利于器官的发生,调节其水平和配比,能提高组织分化频率^[10]。在杨树的组织培养中,通常都用最常见的 6-BA 诱导不定芽的产生^[11],但也有报道证实,在杨树和其他树种中,在诱导不定芽分化的细胞分裂素类化合物中,TDZ 的作用是最强的,目前正广泛的应用于杨树的组织培养中,它可促进腋芽增殖和不定芽的分化^[12]。在本实验中,TDZ 诱导青海青杨外植体不定芽分化的效果不好,极易引起玻璃化现象,6-BA 诱导效果好,但需注意使用的浓度。实验发现,分化的不定芽持续在含有 6-BA 的培养基上生长,不定芽长势会变弱并易发生徒长现象,表现为茎细弱,淡黄色,茎节距离较大,叶片狭长发黄。引起徒长现象的原因较多,可能是品种本身的原因或是生长条件、激素比例的不协调等等,青海青杨徒长现象的原因可能是 6-BA 所致,但需进一步确定。在本试验中发现及时去掉 6-BA,仅使用低浓度的 NAA 有利于不定芽的伸长,并且具有很好的壮苗效果,可有效缓解青海青杨的徒长现象。

比较 NAA、IBA 对青海青杨无菌苗生根的情况,IBA 的效果要明显好于 NAA,不论从生根数量,还是生根质量上都较 NAA 好,说明青海青杨对生长素 IBA 的反应更强些;与 IBA 浓度 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 相比,当 IBA 浓度达到 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,生根数量和生根

质量都有所下降,可能是由于较高浓度的 IBA 会对根原基分化产生胁迫,阻碍了根的生成;所以要根据植物材料选择合适的生长素和浓度,以获得较好的生根效果,这是提高试管苗成活率的前提条件之一。

参考文献:

- [1] 陈章水. 杨树栽培实用技术[M]. 北京:中国林业出版社, 2004:93 - 158
- [2] 王碧霞,廖咏梅,黄尤优,等. 青杨雌雄叶片气孔分布及气体交换的异质性差异[J]. 植物研究,2009,31(5):439 - 446
- [3] Baucher M, Monties B, Van Montagu M, et al. Biosynthesis and genetic engineering of lignin[J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 1998,17(2):125 - 197
- [4] Fillatti J J, Sellmer J, McCown B, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation and of regeneration *Populus* [J]. Mol Gen Genet, 1987, 206:192 - 199
- [5] Howe G T, Goldfarb B, Strauss S H. *Agrobacterium* mediated transformation of hybrid poplar suspension cultures and regeneration of transformed plants[J]. Plant Cell Tissue Organ Culture, 1994, 36: 59 - 71
- [6] Leplé J C, Miranda B A C, Michel M F, et al. Transgenic poplars: expression of chimeric genes using four different constructs [J]. Plant Cell Rep, 1992, 11:137 - 141
- [7] Nilsson O, Aldén T, Sitbon F, et al. Spatial pattern of cauliflower mosaic virus 35S promoter-luciferase expression in transgenic hybrid aspen trees monitored by enzymatic assay and non-destructive imaging[J]. Transgenic Res, 1992, 1:209 - 220
- [8] 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
- [9] De Block M. Factors influencing the tissue culture and the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of hybrid aspen and poplar clones[J]. Plant Physiol, 1990, 93:1110 - 1116
- [10] 詹祥灿. 植物体细胞胚状体与器官发生的激素调节[J]. 植物生理学报,1983,9(3):317 - 323
- [11] 张学彬. CMO 基因转化欧美杨 107 的研究[D]. 大连:大连理工大学,2006:1 - 3
- [12] Russell J A, McCown B H. Thidiazuron-stimulated shoot differentiation from protoplast - derived calli of *Populus* [J]. Plant Tissue Cell Culture Abstract, 1986: 49 - 51