

白桦成熟合子胚快速不定芽诱导体系的建立

张瑞萍, 刘桂丰, 姜静, 杨传平, 李成浩*

东北林业大学林木遗传育种与生物技术教育部重点实验室, 哈尔滨 150040

摘要: 以白桦成熟合子胚为外植体, 建立了白桦合子胚快速不定芽诱导体系: 合子胚经消毒纵切后, 在培养基WPM+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L⁻¹ NAA中, 可直接诱导形成不定芽, 诱导率最高为93.3%, 不定芽诱导数为8.7个; WPM+4.0 mg·L⁻¹ TDZ上也有较好的诱导效果, 不定芽诱导率为90.2%, 不定芽诱导数为7.6个, 这表明WPM+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L⁻¹ NAA是白桦成熟合子胚不定芽诱导的较优培养基。NAA能有效促进嫩茎生根, 其最佳浓度为0.2 mg·L⁻¹。

关键词: 白桦; 合子胚; 不定芽诱导

Establishment of Rapid Adventitious Bud Induction from Mature Zygotic Embryos of Birch (*Betula platyphylla* Suk.)

ZHANG Rui-Ping, LIU Gui-Feng, JIANG Jing, YANG Chuan-Ping, LI Cheng-Hao*

Key Laboratory of Forest Tree Genetic Improvement and Biotechnology of Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: Rapid adventitious bud induction of *Betula platyphylla* was established from mature zygotic embryos. After disinfect, the zygotic embryos were cut vertically, and induced adventitious buds directly. In the media of WPM+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L⁻¹ NAA, the rate of adventitious buds induction was 93.3%, and number of adventitious buds was 8.7. In the media of WPM+4.0 mg·L⁻¹ TDZ, the rate was 90.2%, and the number was 7.6. These results indicated that WPM+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L⁻¹ NAA was better for induction of adventitious buds. And NAA could promote the rooting of adventitious shoots, the optimum concentration was 0.2 mg·L⁻¹.

Key words: *Betula platyphylla*; zygotic embryos; adventitious bud induction

白桦是东北地区具有应用价值和发展潜力的树种之一。在白桦种源区划和亲缘关系(朱翔等 2001; 姜静等 2001)、强化育种(杨传平等 2004)、杂交育种(李开隆等 2006)等方面都做了大量的研究工作。但由于白桦育种周期长, 改良进程缓慢, 改良效率低, 传统的白桦育种技术已经满足不了当前生产的需要。因此, 积极开展白桦基因工程育种研究已引起人们的关注, 但实现基因工程育种的前提是要建立高效组培再生体系。到目前为止, 人们对茎轴、茎段(带腋芽)、无菌苗、下胚轴及成年树一年生剥皮茎段等外植体进行了白桦不定芽诱导的研究(陶静等 1998; 祖元刚等 2001; 詹亚光等 1998, 2002; 詹亚光和杨传平 2002)。并且以叶片、叶柄和茎段为受体, 采用根瘤农杆菌介导法, 向白桦转入 *Bt* 抗虫基因(詹亚光等 2003, 2006)和甜菜几丁质酶基因(Hanna-Leena 等 2005)。但是, 以叶片、叶柄、茎段等外植体建立的白桦再生体系一般都要采用经由愈伤组织培养诱导不定芽形成的方法, 不定芽诱导周期长、诱导率较低, 使得白桦基因工

程育种的进程缓慢。而由成熟合子胚直接形成器官的途径能够克服这一不足, 可快速诱导不定芽的形成, 进而获得再生植株(Ellis 等 1991; Mehta 等 2000), 为此, 本文选用白桦成熟合子胚为外植体, 对其不定芽诱导和植株再生进行了研究, 并建立了白桦组培的再生体系, 现报道如下。

材料与方 法

白桦(*Betula platyphylla* Suk.)成熟种子采自本校白桦强化育种棚, 种子保存于 -20℃ 冰箱内。

作6-BA与NAA影响白桦合子胚不定芽诱导的试验时, 将种子用自来水冲洗 5~7 d, 种子充分吸水变得饱满, 即将露出芽点时, 置于超净工作台上, 用 70% 乙醇浸泡 30 s, 再用 30% H₂O₂ 进

收稿 2008-12-24 修定 2009-02-18

资助 黑龙江省攻关重点项目(GB06B303)和国家科技支撑项目(2006BAD01A1603、2006BAD24B05)。

* 通讯作者(E-mail: chli0@163.com; Tel: 0451-82190607)。

行表面消毒处理 15 min, 最后用灭菌蒸馏水冲洗 4~5 次。接着纵切合子胚(图 1-a、b、c), 分别接种于附加不同浓度的6-BA和NAA组成不定芽诱导培养基中, 其中 6-BA 的浓度分别为 0、1.0、2.0、3.0、5.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, NAA 的浓度分别为 0、0.1、0.2、0.3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 每个生长调节素处理设

重复 3 次, 上述培养基均用 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 或调至 pH 为 5.8, 经高压灭菌 20 min。接种后, 培养室内温度为 $(24\pm 1)\text{ }^\circ\text{C}$, 光照 $16\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ 、光照度为 $40\sim 50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。培养期间观察不定芽诱导形成时间, 并于培养 4 周后, 统计不定芽诱导率和不定芽数。

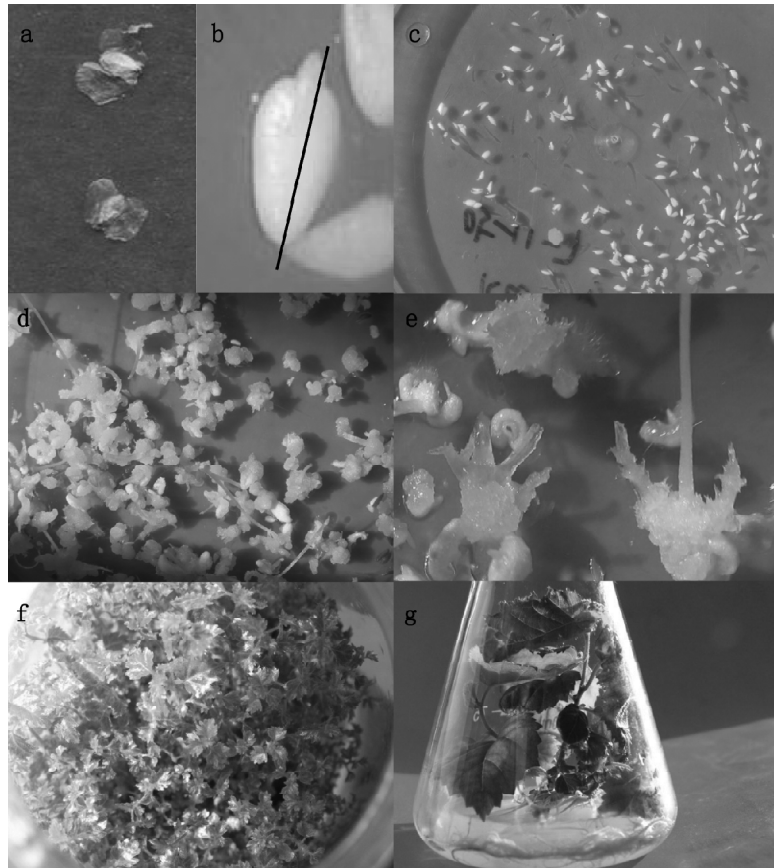


图 1 白桦成熟合子胚快速不定芽诱导和植株再生

Fig.1 Rapid adventitious bud induction from mature zygotic embryos and plant regeneration of *B. platyphylla*

a: 白桦成熟种子; b: 纵切成熟合子胚; c: 合子胚接种至培养基; d: 培养 9 d 后诱导的不定芽; e: 培养 9 d 后诱导的不定芽(图 1-d 的放大图像); f: 不定芽伸长培养; g: 不定芽生根培养。

作 TDZ 与 NAA 影响白桦合子胚不定芽诱导的试验时, 以 WPM 为基本培养基, 附加不同浓度的 TDZ 和 NAA 组成不定芽诱导培养基, 其中 TDZ 的浓度分别为 0、1.0、2.0、3.0、4.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, NAA 的浓度分别为 0、0.1、0.2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 纵切合子胚, 每皿约 100 粒种子, 每个生长调节素处理 3 次重复, 培养条件同上节, 4 周后, 统计不定芽诱导情况。

白桦不定芽伸长培养参见詹亚光等(1998)文中

的方法, 在培养基 WPM+1.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA 继代培养 2 次, 期间观察不定芽伸长情况, 当不定芽长到超过 3 cm 时, 进行生根培养。

作生根培养试验时, 将生长旺盛的芽茎保留 3 cm 转入生根培养基中诱导生根, 基本培养基为 WPM, NAA 浓度为 0.1、0.2、0.3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 每个处理至少 30 个外植体, 重复 3 次, 于 $25\text{ }^\circ\text{C}$ 下培养 4 周后检测生根情况。

结果与讨论

1 6-BA 与 NAA 组合对白桦合子胚不定芽诱导的影响

成熟白桦种子经消毒处理后,纵切带皮种子,取出合子胚,分别接种于附加不同浓度 6-BA 与 NAA 组合的 WPM 培养基中。培养 4 d 左右时,下胚轴开始膨大;9 d 后开始陆续出现不定芽。形成不定芽的同时,膨大的下胚轴也开始形成愈伤组织,但是未观察到从愈伤组织中诱导的不定芽,因此,认为不定芽是由合子胚直接诱导形成的。其中,在培养基 WPM+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L⁻¹ NAA 中最早诱导形成不定芽;2 周后,培养基 WPM+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA 也可见不定芽形成(图 1-d、e)。培养 4 周后统计的结果(表 1)表明,只有 6-BA 时,在培养 4 周后仅见有愈伤组织形成,不定芽分化率为 0;而与 NAA 配合时,可以直接诱导不定芽形成。培养基 WPM+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.2 mg·L⁻¹ NAA 的不定芽再分化率最高可达 93.3%,不定芽诱导数达 8.7 个。在该培养条件下继代培养 2 次,不定芽的增殖效果良好,不定芽增殖数量达 40~60 个。

表 1 6-BA 与 NAA 对白桦合子胚不定芽诱导的影响

Table 1 Effects of 6-BA and NAA on adventitious bud induction from zygotic embryos of *B. platyphylla*

6-BA 浓度 / mg·L ⁻¹	NAA 浓度 / mg·L ⁻¹	不定芽数 / 个	平均不定芽诱 导率 /%
0	0	0	0 ^j
1.0	0	0	0 ^j
1.0	0.1	1.2	41.3 ⁱ
1.0	0.2	1.7	47.6 ^h
1.0	0.3	2.0	53.7 ^e
2.0	0	0	0 ^j
2.0	0.1	5.1	78.8 ^b
2.0	0.2	8.7	93.3 ^a
2.0	0.3	6.0	72.9 ^d
3.0	0	0	0 ^j
3.0	0.1	4.5	63.5 ^e
3.0	0.2	4.8	76.5 ^c
3.0	0.3	3.5	57.5 ^f

Duncan 方法多重比较,不同字母表示在 0.05 水平上差异显著。下表同此。

2 TDZ 与 NAA 组合对白桦合子胚不定芽诱导的影响

纵切合子胚,分别接种于附加不同浓度 TDZ 与

NAA 组合的 WPM 培养基中。培养第 8 天,在只添加 TDZ 的培养基上即可见有不定芽形成,这表明 TDZ 能够促进白桦合子胚不定芽快速形成。培养 4 周后,不论是单独添加 TDZ,还是同时添加 TDZ 和 NAA 均有不定芽产生(表 2),其中,单独添加 TDZ 的不定芽诱导效果较好,添加 4.0 mg·L⁻¹ TDZ 的白桦合子胚不定芽的诱导率最高,为 90.2%;当 TDZ 和 NAA 配合使用时外殖体愈伤化严重,不定芽的诱导率很低(<40%)。由此,我们筛选出 WPM+4.0 mg·L⁻¹ TDZ 为白桦合子胚不定芽诱导的较优培养基,其不定芽数为 7.6 个(表 2)。

表 2 TDZ 与 NAA 对白桦合子胚不定芽诱导的影响

Table 2 Effect of concentration of TDZ and NAA on adventitious bud induction from zygotic embryos of *B. platyphylla*

TDZ 浓度 / mg·L ⁻¹	NAA 浓度 / mg·L ⁻¹	不定芽数 / 个	平均不定芽诱 导率 /%
1.0	0	1.6	10.7 ^k
1.0	0.1	2.0	79.4 ^c
1.0	0.2	5.6	82.9 ^d
2.0	0	5.2	75.9 ^d
2.0	0.1	4.0	30.8 ^f
2.0	0.2	4.0	35.2 ^e
3.0	0	6.4	83.5 ^b
3.0	0.1	4.0	30.5 ^f
3.0	0.2	2.6	23.3 ^e
4.0	0	7.6	90.2 ^a
4.0	0.1	2.2	8.3 ⁱ
4.0	0.2	1.0	5.5 ^j

另据周春娜等(2006)报道,白桦茎段最容易诱导不定芽分化;根较难诱导不定芽分化,且分化所需时间长;叶片和叶柄诱导不定芽再生的时间较短。但叶盘的不定芽诱导率最高仅为 64%,平均不定芽数为 6 个(石福臣等 2001),明显低于成熟白桦合子胚的不定芽诱导率,这说明白桦成熟合子胚不定芽诱导的高效性。6-BA 和 TDZ 均能促进白桦合子胚不定芽快速形成,但值得注意的是,只有同时添加 6-BA 和 NAA 的白桦不定芽的诱导效果较好(表 1);而单独添加 TDZ 就能高效诱导不定芽形成(表 2),因此认为,在进行不定芽快速诱导时,确定适合的生长调节物质及其配比是进行定向诱导的基础。

3 不定芽的伸长与生根

在不定芽诱导4周后, 切取带有3~5个芽的小块, 转接入培养基 WPM+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA 培养, 不定芽明显伸长(图 1-f)。当其长度超过 3 cm 时, 切取 3 cm 嫩茎进行生根培养。

将生长状态良好的嫩茎接入含不同浓度NAA的生根培养基中培养4周后, 统计生根结果(表3)生长调节物质表明, 嫩茎生根率均为 100%。其中, 在有 NAA 作用下 5 d 时就有根生出。然而, 在培养基 WPM+0.1 mg·L⁻¹ NAA 中, 根生长缓慢; WPM+0.2 mg·L⁻¹ NAA 中生根效果最好, 主根和须根数量均较多, 且生长较快; 而培养基 WPM+0.3 mg·L⁻¹ NAA 生根效果也较好, 其主根粗壮, 但数量少, 且须根数量也较少; 在不加NAA的培养基中, 嫩茎则在培养 12 d 后才产生不定根, 生根延迟, 数量少, 且细弱。这很可能会影响移栽后的成活率(詹亚光等 1998)。这表明 NAA 能有效促进不定根生成, WPM+0.2 mg·L⁻¹ NAA 是白桦嫩茎生根培养的最佳培养基。

表3 不同浓度NAA对白桦嫩茎生根的影响

Table 3 Effect of NAA concentration on rooting of adventitious shoots of *B. platyphylla*

NAA 浓度 /mg·L ⁻¹	生根数 / 条	生根率 / %	主根长度 /cm
0	5.0 ^c	100	2.7±0.04
0.1	10.7 ^b	100	3.7±0.03
0.2	16.0 ^a	100	4.2±0.06
0.3	7.7 ^c	100	3.1±0.45

综上所述, 以白桦成熟合子胚为外殖体能够快速诱导不定芽形成(诱导时间为 8~9 d)。而以叶片或茎段为外殖体诱导不定芽则需要 2~3 个月(詹亚光等 1998)。并且, 白桦成熟合子胚作为外殖体有很多优点, 即不论是在通风条件、常温密封条件, 还是在冷冻密封条件下均可以长时间保存, 这样不定芽的诱导可不受季节的限制, 随时取用。

参考文献

- 姜静, 杨传平, 刘桂丰, 刘玉喜, 任旭琴(2001). 利用 RAPD 标记技术对白桦种源遗传变异的分析及种源区划. 植物研究, 21 (1): 126~130
- 李开隆, 姜静, 姜莹, 夏德安, 杨传平, 刘桂丰(2006). 白桦 5×5 完全双列杂交种苗性状的遗传效应分析. 北京林业大学学报, 28 (4): 82~87
- 石福臣, 孔瑾, 吴双秀, 聂明珠, 族元刚(2001). 以叶盘为外植体的白桦的再生. 植物研究, 21 (4): 611~614
- 陶静, 詹亚光, 姜静, 杨传平, 刘玉喜(1998). 白桦组培再生系统的研究(I). 东北林业大学学报, 26 (5): 6~9
- 杨传平, 姜静, 梁艳, 刘桂丰, 王大海, 李慧玉(2004). 白桦雄花序发育初期蛋白质的双向电泳图谱分析. 东北林业大学学报, 40 (6): 14~17
- 詹亚光 陶静, 杨传平, 刘玉喜(1998). 白桦组培再生系统的研究 (II)- 影响因素及培养程序. 东北林业大学学报, 26 (6): 1~5
- 詹亚光, 杨传平, 王玉成(2002). 白桦组培离体再生的解剖学研究. 林业科学, 38 (6): 142~145
- 詹亚光, 杨传平(2002). 白桦愈伤组织的高效诱导和不定芽分化. 植物生理学通讯, 38 (2): 111~114
- 詹亚光, 王玉成, 王志英, 杨传平, 刘志华, 李彩华(2003). 白桦的遗传转化及转基因植株的抗虫性. 植物生理与分子生物学报, 29 (5): 380~386
- 詹亚光, 苏涛, 韩梅, 孙冬(2006). 转基因白桦外源基因的多重 PCR 快速检测. 植物研究, 26 (4): 480~485
- 周春娜, 郑辉, 宋立功, 杨敏生, 王进茂(2006). 外植体及培养基对欧洲白桦器官再生的影响. 河北林果研究, 21 (1): 1~4
- 朱翔, 刘桂丰, 杨传平, 刘志新, 袁桂华, 刘吉春, 李景云(2001). 白桦种源区划及优良种源的初步选择. 东北林业大学学报, 29 (5): 11~14
- 祖元刚, 孔瑾, 吴双秀, 聂明珠(2001). 白桦下胚轴再生系统的建立. 植物研究, 21 (4): 615~619
- Ellis DD, Barczynska H, McCown BH, Nelson N (1991). A comparison of BA, zeatin and thidiazuron for adventitious bud formation from *Picea glauca* embryos and epicotyl explants. Plant Cell Tiss Org Cul, 27: 281~287
- Hanna-Leena P, Yeshitila D, Javier B, Katileena L, Ari P, Sari T, Sanna-Kaisa S (2005). Transgenic *Betula pendula* expressing sugar beet chitinase IV forms normal ectomycorrhizae with *Paxillus involutus in vitro*. Scandinavian Forest, 20 (5): 385~392
- Mehta UJ, Krishnamurthy KV, Hazra S (2000). Regeneration of plants via adventitious bud formation from mature zygotic embryo axis of tamarind (*Tamarindus indica* L.). Curr Sci, 78 (10): 1231~1234