

欧美杂种山杨愈伤组织再生系统的建立

詹亚光* 齐凤慧 杨传平

东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨 150040

提要 为解决欧美杂种山杨成年树种快速繁殖的问题, 并为研究原生质体分离、遗传转化和体细胞变异打下基础, 我们建立了愈伤组织再生系统。其愈伤组织诱导最适培养基为WPM+6-BA 1.0 mg·L⁻¹ +NAA 0.1 mg·L⁻¹、WPM+6-BA 1.0 mg·L⁻¹, 分化培养基为WPM+6-BA 0.3~1.0 mg·L⁻¹, 愈伤组织诱导率和分化率分别为90.67%和92%。

关键词 欧美杂种山杨; 愈伤组织; 分化

Establishment of Callus Regeneration System of *Populus tremula* × *P. tremuloides*

ZHAN Ya-Guang*, QI Feng-Hui, YANG Chuan-Ping

College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin 150040

Abstract In order to develop a simple and feasible approach to achieve high frequency plant regeneration for *Populus tremula* × *P. tremuloides*, and to make a base for protoplast isolation, transformation, and somaclonal variation study, the callus regeneration system was established. The most suitable medium for callus induction of *Populus tremula* × *P. tremuloides* was WPM supplemented with 1.0 mg·L⁻¹ 6-BA and 0.1 mg·L⁻¹ NAA, WPM supplemented with 1.0 mg·L⁻¹ 6-BA, and for differentiation was WPM supplemented with 0.3~1.0 mg·L⁻¹ 6-BA. The rate of callus induction and differentiation were 90.67% and 92% respectively.

Key words *Populus tremula* × *P. tremuloides*; callus; differentiation

目前, 欧美杂种山杨无性繁殖研究主要是围绕腋芽增殖途径的扩繁技术进行的, 但繁殖系数低, 不能满足遗传转化细胞再生的需要。就其组培研究来说, Ahuja^[1]用其芽、茎、叶和根作外植体, 在修改的WPM培养基上得到组培苗。Chalupa^[2]用其枝条作外植体, 以加入细胞分裂素和生长素的WPM和MS培养基进行培养, 在GD培养基上生根成功。Krein和Ahuja^[3]用不同外植体进行体外培养的结果表明, 如果形成愈伤组织, 其结构常常是异源的。用不同浓度2, 4-D和KT对叶、茎和胚轴等外植体进行诱导, 在大多数情况下均能产生根, 而用子叶诱导, 能产生不定芽。国内仅徐妙珍等^[4]对中国山杨进行过腋芽增殖途径的扩繁技术研究, 分化频率最高达60%。迄今还未见通过愈伤组织途径再生的报道。

欧美杂种山杨以传统的无性扦插繁殖技术生根极其困难, 采用组织培养方法是否可行, 值得研究。通过建立愈伤组织再生途径, 可在短期内得到大量的再生植株, 是原生质体分离和采用农杆菌进行遗传转化的基础^[5~7]。我们于2001年春从芬兰引进该树种, 以其为材料, 对愈伤组织再生

途径进行了研究, 解决了其成年树种快速繁殖的问题。

材料与方法

材料为欧美杂种山杨(*Populus tremula* × *P. tremuloides*), 取自从芬兰引进的20个约四十年生的成年优良无性系。

2001年2月将约四十年生的成年欧美杂种山杨的枝条采回。经过水培后, 取新枝接种。将嫩枝上的叶片去除后, 用消毒水冲洗3~4次, 75%酒精浸泡30 s, 边泡边摇, 然后用0.1%升汞灭菌2 min, 再用灭菌的蒸馏水洗净残液, 切成1 cm长的茎段接种在WPM+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+KT 0.5 mg·L⁻¹+2%蔗糖培养基上, 启动侧芽分化形成无菌试管苗。再从试管苗上取叶片、茎段、叶柄进行愈伤组织诱导。

培养基以WPM^[8]、MS^[9]、IS^[10]、NT^[9]为基

收稿 2003-09-02 修定 2004-04-08

资助 国家林业局“948”项目(2000-04-10)。

* E-mail: yaguangzhan@126.com, Tel: 0451-82191754

础, 补加 $0.5 \sim 5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA、 $0.25 \sim 0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KT、 $1 \sim 9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2, 4-D、 $0.1 \sim 0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA、2%蔗糖、 $5.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂, pH 5.8~6.0, 高压灭菌($1.1 \text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$) 20 min。培养温度为 $25 \sim 28^\circ\text{C}$, 光照 $16 \text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$, 光照度为 $0.053 \sim 0.088 \text{ mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 相对湿度为40%~50%。

诱导愈伤组织及分化培养时, 选择10个无性系, 各取叶片、茎段、叶柄, 分别接种于不同激素水平和配比的愈伤组织诱导培养基(具体成分见“结果与讨论”部分)中。设2次重复实验, 每20 d继代1次; 将继代2次后的愈伤组织转入分化培养基, 1~2月后分化出芽。从愈伤组织分化出的小苗转至生根培养基中, 一般情况下, 刚分化出的苗长势较弱, 应先将其连同基部的小块愈伤组织一并转入WPM+NAA $0.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +2%蔗糖的培养基中, 通过生根培养即可达到壮苗和生根的双重目的。当试管苗长到2 cm以上时, 将其切下, 再进行单株生根培养, 10 d左右生根。打开瓶塞, 在室温下进行炼苗, 3 d后洗去根上培养基, 转入盛有沙与泥炭混合(2:1)基质的营养杯中, 在 25°C 、相对湿度90%的条件下, 15 d即成活。

结果与讨论

1 愈伤组织的诱导

1.1 不同生长调节物质组合的诱导 基本培养基为WPM, 培养后出现两类愈伤组织。第一类为粉

绿色或红绿色愈伤组织。这类愈伤组织在茎段两端首先开始膨大, 并形成哑铃型, 15 d后形成较好的愈伤组织; 叶片培养中愈伤组织出现不一, 有的沿着叶片边缘伤口处, 有的沿叶脉形成紧密愈伤组织。这类愈伤组织再生能力较强, 可以继代培养。第二类为黄绿色或粉黄色, 表面带有白色绒毛, 多在愈伤组织上部形成, 细胞松软, 不易继代和分化。叶片和茎段上容易形成愈伤组织, 而在叶柄培养中形成愈伤组织及随后的不定芽分化率较低。

从表1可以看出, 将叶片、茎段、叶柄接种在WPM+ $1.0 \sim 9.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2, 4-D+ $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KT的培养基上时, 愈伤组织的发生随2, 4-D浓度的提高, 生长速率逐渐增, $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 后, 形成愈伤组织频率最高达98.11%, 而后又逐渐降低, 愈伤组织的质地由松散到致密再到松散。培养基WPM+ $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA+ $0.5 \sim 1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA有利于愈伤组织的发生和良好愈伤组织块的形成, 愈伤组织生长得到促进。在WPM+ $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA+ $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA培养基中, 形成愈伤组织频率为90.67%, 虽然分化频率不如加入2, 4-D的高, 但其愈伤组织为绿色, 而且上面有许多瘤状突起, 进一步继代培养易分化出芽。在WPM+ $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ KT+ $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA培养基中, 虽然形成的愈伤组织百分率较高, 但愈伤组织上面长有白色的绒毛, 继续培养时可形成不定根, 不易分化出芽。

1.2 不同培养基的诱导 选用WPM、MS、IS、NT

表1 不同生长调节物质组合对愈伤组织的诱导

Table 1 Calli induced by combinations of different growth regulators

生长调节物质组合(浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	总数/个	叶片			茎段				叶柄				平均诱导率/%	
		形成时间/d	质地	颜色	诱导率/%	形成时间/d	质地	颜色	诱导率/%	形成时间/d	质地	颜色		诱导率/%
2, 4-D 1.0+KT 0.5	50	7	松散	粉绿	91.95	7	松散	粉绿	92.47	7	松散	粉绿	80.46	88.96
2, 4-D 2.0+KT 0.5	50	10	致密	红绿	96.10	10	致密	红绿	93.56	10	致密	红绿	81.12	90.26
2, 4-D 3.0+KT 0.5	50	10	致密	粉绿	98.84	10	致密	粉绿	99.35	10	致密	粉绿	96.11	98.11
2, 4-D 5.0+KT 0.5	50	7	松散	黄绿	96.67	7	松散	黄绿	99.58	7	松散	黄绿	83.14	93.13
2, 4-D 7.0+KT 0.5	50	7	松散	粉黄	93.63	7	松散	粉黄	94.21	7	松散	粉黄	89.09	92.31
2, 4-D 8.0+KT 0.5	50	5	松散	粉黄	83.86	5	松散	粉黄	85.43	5	松散	粉黄	71.43	80.24
2, 4-D 9.0+KT 0.5	50	9	松散	粉黄	77.65	9	松散	粉黄	80.43	9	松散	粉黄	70.28	76.12
2, 4-D 3.0+6-BA 0.5	50	10	致密	红绿	34.46	10	致密	红绿	56.00	10	致密	红绿	31.55	40.67
2, 4-D 3.0+6-BA 1.0	50	10	致密	红绿	67.99	10	致密	红绿	70.00	10	致密	红绿	50.12	62.67
6-BA 1.0+NAA 0.1	50	7	致密	浅绿	95.64	7	致密	浅绿	94.52	7	致密	浅绿	81.85	90.67
6-BA 1.0+NAA 0.5	50	10	致密	红绿	86.56	10	致密	红绿	89.65	10	致密	红绿	69.79	82.00
KT 0.5+NAA 2.0	50	15	致密	红绿	94.57	15	致密	红绿	94.69	15	致密	红绿	90.43	93.23

表2 不同培养基对愈伤组织的诱导
Table 2 Calli induced on different media

生长调节物质(浓度/ mg·L ⁻¹)	培养基类型	外植体数/个	出愈率/%	出芽率/%	颜色
2, 4-D 3.0+KT 0.25	W P M	150	98.11	0	红绿色
	M S	150	48.67	0	黄绿色
	N T	150	40.00	0	浅黄绿色
	IS	150	36.00	0	浅黄色
6-BA 1.0+NAA 0.1	W P M	150	90.67	98.33	浅绿色
	M S	150	60.00	50.00	浅黄绿色
	N T	150	56.67	31.50	浅黄色
	IS	150	49.33	26.67	浅黄绿色
6-BA 1.0+2, 4-D 3.0	W P M	150	78.64	0	红绿色
	M S	150	73.33	0	黄绿色
	N T	150	73.33	0	浅绿色
	IS	150	50.00	0	浅黄绿色

除培养基 WPM+6-BA 1.0+NAA 0.1 上愈伤组织开始发生的时间为 7 d, 其它均为 10 d。

4 种不同培养基, 附加 2, 4-D、KT、6-BA、NAA 组成的 3 种组合进行愈伤组织的培养。结果表明, 4 种不同培养基中以 WPM 的效果最好, IS 培养基最差, 在加有 6-BA+NAA 的所有培养基中培养 20 d 后均长出不定芽(表 2)。

2 愈伤组织不定芽分化

2.1 愈伤组织不定芽分化 一般来说, 2, 4-D 诱导的愈伤组织不能分化出芽, 需将其转入含有细胞分裂素的分化培养基中, 继代培养 2~3 次(每 20 d 继代 1 次), 方可以分化出不定芽。随着 6-BA 浓度的增加, 出芽率降低, 出芽时间增加。0.5 mg·L⁻¹ 6-BA 的出芽率最高为 93%, 6-BA 浓度增加到 5.0 mg·L⁻¹ 时, 愈伤组织不形成不定芽(表 3)。

2.2 6-BA 对不定芽的直接诱导 以叶片为外植体, WPM 为基本培养基, 只附加不同浓度 6-BA, 诱导不定芽的直接分化。培养 10 d 后在叶基部有的出现 0.4 mm³ 愈伤组织, 有的仅基部膨大而无愈

伤组织, 12 d 后不定芽开始出现, 20 d 后长出丛芽。产生丛芽的诱导率和数量随着 6-BA 浓度的升高而升高, 而后逐渐降低, 长势也随之减弱(表 4)。

总之, 6-BA 能有效地促进欧美杂种山杨愈伤组织不定芽的发生。6-BA 与 NAA 配合时, 低浓度(6-BA 1.0 mg·L⁻¹+NAA 0.1~0.5 mg·L⁻¹)可诱导愈

表3 6-BA对愈伤组织分化不定芽的影响
Table 3 Effect of 6-BA on the differentiation of adventitious buds from calli

6-BA/ mg·L ⁻¹	愈伤组织数/个	生成芽时间/d	出芽率/%
0.5	150	45	93
1.0	150	60	88
2.0	150	60	82
3.0	150	60	30
4.0	150	120	23.3
5.0	150	>120	0

表4 6-BA对诱导外植体直接分化不定芽的影响

Table 4 Effect of 6-BA on the differentiation of adventitious buds originated directly from explants

6-BA/mg·L ⁻¹	外植体数/个	生成芽时间/d	颜色	出芽率/%	愈伤组织大小/cm ³
0.3	75	12	绿	80.24	0.5
0.6	75	13	浅绿	78.24	0.5
0.9	75	12	绿	76.56	0.5
1.0	150	10	绿	92.00	0.5
1.2	75	15	浅绿	62.10	0.5
1.5	75	15	绿	54.23	0.5
2.0	150	15	绿	54.00	0.5
3.0	150	20	浅绿	30.67	0.5
4.0	150	30	浅绿	14.00	0.5
5.0	150	60		0	0

伤组织,并可分化形成丛状芽,比2,4-D的时间短,分化率也高;若单用6-BA培养也能达到直接出芽的效果,分化率达92.00%(表4),而且分化时间最短,丛生芽多。因此可认为,WPM+1.0 mg·L⁻¹ 6-BA+2%蔗糖是诱导欧美杂种山杨不定芽快繁的最适培养基,能快速成苗,形成的不定芽量大,可以解决老龄欧美杂种山杨不易诱导分化的问题,同时可满足遗传转化研究中外植体不定芽高频率发生的要求。

3 再生植株的壮苗生根

不定丛芽转入WPM+0.5 mg·L⁻¹ NAA+2%蔗糖的生根培养基中,7~10 d长出不定根,茎也伸长,叶片展开,茎丛健壮。在不定芽长到3~5 cm时,再将其切成单株转入相同的培养基中,生根率达90%~100%,不定根数平均4条以上。此时,可移到室温中炼苗和移栽。5~6月份移栽成活率为70%~90%,15 d成活,并长出新叶。

参考文献

- 1 Ahuja MR. Somatic cell differentiation and rapid clonal propagation of aspen. *Silvae Genet*, 1983, 32(3/4): 131~135
- 2 Chalupa V. Micropropagation of mature trees of birch (*Betula pendula* Roth.) and aspen (*Populus tremula* L.). *Lesnictvi*, 1989, 35(11): 983~993
- 3 Krein B, Ahuja MR. Hybrid aspen for rapid-growth plantations as an alternative for agricultural land: development of a mass propagation method for hybrid aspen clones using cell culture technique. In: *Landwirtschaft und Forsten. Schriftenreihe des Bundesministers für Ernährung. Reihe A, Angewandte Wissenschaft. Münster-Hiltrup: Landwirtschaftsverlag GmbH*, 1991. 129~138
- 4 徐妙珍, 刘培林, 于启滨. 山杨组织培养的研究. 见: 刘培林主编. 山杨育种研究. 黑龙江: 黑龙江科学技术出版社, 1993. 50~62
- 5 Jafari MA, Kiss J, Gergacz J et al. High efficiency callus induction and plant regeneration in petiole culture of four poplar genotypes. *Acta Biol Hung*, 1995, 46(1): 51~59
- 6 Smyth DR. Plant genetics: fast flowering. *Curr Biol*, 1996, 6(2): 122~124
- 7 Tuominen H, Sitbon F, Jacobsson C et al. Altered growth and wood characteristics in transgenic hybrid aspen expressing *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA indoleacetic acid-biosynthetic genes. *Plant Physiol*, 1995, 109(4): 1179~1189
- 8 顾淑荣, 刘淑琼, 桂耀林. 园艺植物组织培养技术和应用. 北京: 北京科学技术出版社, 1989. 53
- 9 孙敬三, 桂耀林. 植物细胞工程实验技术. 北京: 科学出版社, 1995. 403~422
- 10 Sato T, Ide Y, Saito A. Tissue culture technology in rapid clonal propagation of Japanese White birch. *J Jpn For Soc*, 1986, 68: 343~346