

群众杨 39 无性系耐盐悬浮细胞系的建立 和体细胞变异体完整植株的诱导*

张绮纹 张望东

摘要 本试验以群众杨 39 号为试材,通过耐盐胁迫悬浮培养建立耐盐悬浮细胞系,经愈伤组织成功培育出耐 NaCl 3.0‰~3.5‰的群众杨体细胞变异体的完整植株。实验表明,MS 培养基附加 0.45 mg/L 2,4-D、0.3 mg/L NAA 和 0.1 mg/L Kinetine 的 M4 培养基能较好地获得松散、易分散的愈伤组织。液体以 MS 培养基只附加 0.5 mg/L 2,4-D 的 LM3 为最好,附加氨基酸有益于悬浮细胞的正常生长。还对悬浮培养细胞的有关参数进行了测定。耐盐悬浮细胞培养实验结果表明 NaCl 对细胞生长有抑制作用,并随着 NaCl 升高而加强。对获得的耐 3‰~6‰各水平 NaCl 悬浮细胞经高密度植板,都能形成愈伤组织。耐盐愈伤组织诱导只获得耐 3‰~4‰NaCl 的不定芽,高于 4‰NaCl 未能诱导出不定芽,说明高浓度 NaCl 对芽组织分化有明显的抑制作用。不定根分化对 NaCl 反应非常敏感,只在耐 3‰和 3.5‰NaCl 浓度培养基诱导出不定根。

关键词 群众杨 39、耐盐细胞悬浮培养、耐盐细胞系、耐盐体细胞变异体植株

林木的细胞悬浮培养的研究起步较晚。目前,利用悬浮细胞培养再生植株只限于美国榆 (*Ulmus americana* L.)^[1]、欧洲七叶树 (*Aesculus hippocastanum* L.)、花旗松 (*Pseudotsuga menziesii* (Mirbel) Franco)^[2]、缘毛杨 (*P. cililiata* Wall.)^[3]和小叶杨 (*P. simonii* Carr.)^[4]树种有成功的报道。而利用建立的细胞悬浮系定向筛选变异体的工作则很少。1986 年美国试验站^[5]利用体细胞变异体成功筛选出杨树抗病新无性系。1988 年加拿大 Cheliak 等^[6]选出了抗除草剂 Glyphosate 的细胞系,诱导出的不定芽能在含除草剂的培养基上生长,但都未能生根。依据前人的经验,对群众杨 39 (*P. × xiaozhuanica* W. Y. Hsu et Lian cv. 'Popularis'-39)无性系的耐盐细胞悬浮培养技术进行了研究,并利用建成的悬浮细胞系对耐盐体细胞变异体又进行了筛选,成功地培养出耐 3‰~3.5‰NaCl 体细胞变异体的完整植株。

1 试验材料和方法

1.1 试验材料

取 1 年生群众杨 39 号的根萌休眠枝条,经水培生成的嫩茎为外植体。

1.2 试验方法

1.2.1 愈伤组织的诱导和继代培养 将嫩茎经 70%酒精、0.3%HgCl 消毒后,切成 1 cm 的小段,接种在脱分化培养基上,20~25 d 后进行继代培养。脱分化激素配比见表 1。

1.2.2 耐盐悬浮培养 将松散愈伤组织按每瓶约 3 g 量转入 100 mL 三角瓶中,用镊子夹碎,加入 40~50 mL 各种液体培养基(表 2),在室温 25±2 ℃、散射光条件下,进行振荡 7 d。第 1

1994—07—04 收稿。

张绮纹研究员,张望东(中国林业科学研究院林业研究所 北京 100091)。

* 本文系国家“八五”攻关“杨树造纸材和纸浆材良种选育”部分内容。

表1 愈伤组织诱导和液体供试培养基

(单位:mg/L)

编号	愈伤组织诱导培养基 ^①					Sugur (g)	编号	液体悬浮供试培养基 ^①						备注
	2,4-D	NAA	6-BAP	Kinet				2,4-D	NAA	Kinet	Glu	Asp	Arg	
M1	0.20	—	—	—	30		LM1	0.50	0.4	0.10	—	—	—	①基本培养基采用MS ②基本培养基为Durzan ^[1] 悬浮培养美国榆时采用的基本培养基成份
M2	0.45	—	—	0.30	30		LM2	0.60	—	0.10	—	—	—	
M3	0.60	—	0.05	—	30		LM3	0.50	—	—	400	150	50	
M4	0.45	0.30	—	0.10	30		LM4 ^②	0.40	—	0.05	600	200	30	
M5	0.50	—	—	1.00	30									
M6	1.00	—	0.10	—	30									

代转速为 130 r/min,以后转速调至 120 r/min。每次继代前将悬浮液静置 10 min,等细胞沉淀后倾去上层旧液,以 1:1 比例换入新液。随着继代培养,愈伤组织逐渐散碎,用 100 目和 200 目过滤。滤液再在 300 r/min 离心约 5 min,将收集的单细胞和小细胞团以 1:5 比例加入新液,继续悬浮培养。供试液体培养基见表 1。

建立耐盐悬浮细胞系,采用直接多步选择法^[7],以 0.5%NaCl 为梯度起点,逐级对悬浮细胞进行选择培养,每个水平继代培养 3 次。

1.2.3 不定芽的诱导和植株再生 将耐 NaCl 悬浮细胞分别放在含相应 NaCl 浓度的固体培养基上(ZM+NaCl)进行高密度植板^[8],形成愈伤组织后再进行不定芽分化诱导和不定根的诱导。

诱导不定芽分化培养基的大量元素减半即采用 1/2MS,激素配比为:Mf1(1/2MS+无激素)、Mf2(1/2MS+0.4 mg/L BA)和 Mf3(1/2MS+0.45 mg/L 6-BAP+0.04 mg/L NAA)。生根培养基(RM)为:RM1(1/2MS+0.2 mg/L IBA)、RM2(1/2MS+0.02 mg/L IBA)和 RM3(1/2MS+0.02 mg/L NAA)。

2 试验结果与分析

2.1 松散型愈伤组织获得和脱分化培养基的筛选

随着生长素 2,4-D 浓度的升高,外植体在茎两切面的愈伤组织出现的时间提前,一般需要 7~9 d。M6 出现最早,表面很快出现白色絮状物,随后褐化死亡;M1 诱导的愈伤出现较慢,且近白色、质密坚硬。M2、M3、M5 上诱导愈伤组织为淡黄色、表面有乳白色颗粒物,生长快,质地较紧密,但愈伤组织在表面中央常常出现疏松的白色絮状物,这些絮状物不断增多而且还有褐化现象。在显微镜下观察这些絮状组织为长型细胞,并且高度液泡化,为不能再分化的成熟细胞。这种情况在 M5 上最为严重,M2 居中,M3 上最轻;M4 上诱导的愈伤为淡黄色或黄绿色,表面有很多小凸起,增殖快且较松散。继代培养 M4 上诱导的愈伤组织能继续正常增殖,松散型愈伤组织随继代增多。因此 M4 被确立为培育愈伤组织最好培养基。

2.2 耐盐悬浮细胞系的建立

2.2.1 液体悬浮培养基的筛选 不同悬浮培养基经 100 目过滤后收集的细胞,在显微镜下观测(见表 2)。由表 2 可以看出,附加 NAA 的 LM1 培养基的管状细胞数量增加;附加 Kinetin 的 LM2 培养基的液泡化成熟细胞数量增加;只有附加 2,4-D 和 400 mg/L 谷氨酸、150 mg/L 天冬氨酸、50 mg/L 精氨酸的 LM3 培养基能形成良好的细胞系。试验还说明附加美国榆悬浮

培养基的 LM4 并不适合群众杨进行悬浮细胞培养。

2.2.2 生长参数的测定 将经 200 目过滤和离心所获得的悬浮细胞系(由单细胞和含 4~25 个细胞的小细胞团组成),按 1:5 换新鲜培养液,再在转速为 110 r/min 条件下,培养两代的悬浮细胞生长趋于平稳后,测定悬液中细胞的增殖情况。具体方法从略。

表 2 显微观测(120×)培养基中细胞 (单位:%)

培养基号	管状细胞	液泡化细胞	死细胞	细胞碎片
LM1	32.1	23.0	12.0	多
LM2	19.4	27.7	14.5	中
LM3	8.0	11.0	5.0	少
LM4	21.0	24.0	17.0	很多

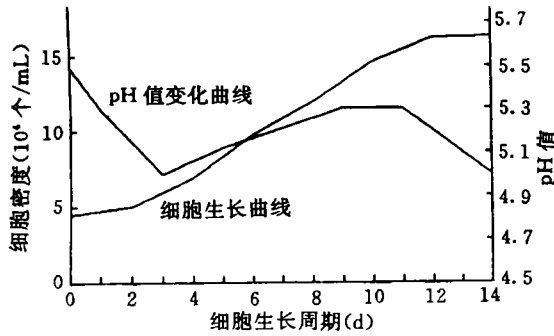


图 1 悬浮细胞生长及 pH 变化曲线

由图 1 可以看出,杨树悬浮细胞系也同其它植物建立的悬浮细胞系一样,在一个生长周期中存在着延迟、对数生长、直线生长、减慢、静止 5 个特征时期。细胞密度起始时约 4.8×10^4 个/mL,培养一个周期(14 d)后增殖为 1.7×10^5 个/mL,平均每个细胞分裂 3~4 次。从继代开始,单数天抽取部分悬浮液测 pH 值,每次取两个样品,取平均值(图 1)。

对照细胞生长动态曲线和 pH 变化曲线(图 1)可以看出,在一个生长周期中,当悬浮液 pH 值迅速下降时(即更液后的第 1~3 d),细胞处于缓慢增殖的延迟期。当 pH 值开始升高到 5.2 时(约在第 6 天),细胞的增殖速度也显著加快,随 pH 升高进入直线生长期;当 pH 值开始升高到 5.3 时(约在第 11 d),开始迅速下降,细胞增殖减慢,并进入生长的相对静止期。

2.2.3 耐 NaCl 悬浮细胞系的获得 为了解不同浓度 NaCl 对细胞生长的影响,在继代时,分别将 1 mL 细胞体积的细胞量转入含 0.5%、1.0%、1.5% NaCl 浓度水平的 40 mL 液体培养基中,一个生长周期后,离心 5 min(2 000 r/min),测定下层沉淀细胞的体积。

从图 2 中可以看出,细胞分裂随 NaCl 浓度升高而减慢。与对照相比,0.5% NaCl 使细胞体积减少了约 26%;1.0% NaCl 浓度使细胞体积减少了 63%,只有少部分细胞发生了分裂。在 1.5% NaCl 悬浮液中的细胞体积与 1.0% NaCl 几乎没有增加。在继代发现含 0.5% NaCl 悬浮液中的细胞生长逐渐与对照接近,含 1.0%和 1.5% NaCl 悬液逐渐变褐,而且充满细胞碎片。

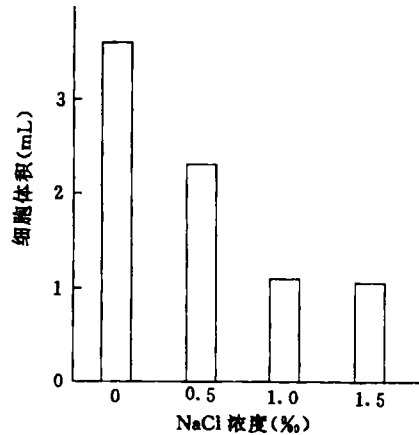


图 2 不同 NaCl 浓度对悬浮细胞生长影响

2.3 耐盐细胞变异体植株再生

2.3.1 耐盐愈伤组织再形成

为了从耐 NaCl 悬浮细胞系获得愈伤组织块,将耐不同水平

目前已获得 3.0%~6.0%各 NaCl 水平的悬浮细胞系见图版 I-1,2。

NaCl 直线生长期的悬浮细胞进行植板。植板用的固体培养基(ZM)为:MS+0.45 mg/L 2,4-D+0.1 mg/L Kinetine+25 g/L 蔗糖,附加谷氨酸,天冬氨酸和精氨酸,pH 调至 5.8(植板过程略)。

植板 2~3 周后,在琼脂表面可观察到均匀分布的小于 1 mm 颗粒。继续培养 4 周后,琼脂表面长满约 1~3 mm 厚的愈伤组织,颜色也渐变为淡黄色至黄绿色,约 40 d 后耐盐 3‰和 6‰的悬浮细胞系都形成一层绿色的愈伤组织(图版 I-3)。

2.3.2 耐盐细胞系不定芽的诱导分化 将耐盐 3‰~4‰愈伤组织接种到 Mf1 上,愈伤组织很快停止生长,而且黄色加深,表面干燥,约 4 周后生出许多不定根,但未见不定芽的产生;接种到 Mf2 和 Mf3 上的愈伤组织颜色逐渐由原来的淡黄色变为黄绿,最后变为绿色,3~4 周后表面出现红褐色芽点,尤其 Mf3 不但能诱导出芽点,同时也能促进愈伤组织增殖,减少愈伤组织的软化和死亡。再将 Mf3 与 Mf3+NaCl 培养基同时做分化培养比较见表 3。

表 3 耐 NaCl 悬浮细胞系的分化

分化培养基	含 NaCl 量(‰)								
	3.0			3.5			4.0		
	接种块数	出芽块数	百分率(%)	接种块数	出芽块数	百分率(%)	接种块数	出芽块数	百分率(%)
Mf3	12	5	41.2	14	5	35.7	10	3	30.0
Mf3+NaCl	25	9	36	25	7	32	23	5	21.7

耐盐细胞系在分化培养基 Mf3 和 Mf3+NaCl 上的分化率相差不大,说明在细胞系水平上进行选择的效率是比较高的。同时也可以看出,随着 NaCl 浓度的升高,耐盐细胞系的分化能力下降。其结果只有耐盐 3‰、3.5‰和 4.0‰愈伤组织在 Mf3+NaCl(3‰~4‰)培养基上分化出不定芽,不定芽分化率为 36%、32%、21.7%(图版 I-4)。

2.3.3 耐盐体细胞变异体完整植株的诱导 当耐盐 3.0‰~4.0‰分化出不定芽长到 1.0~1.5 cm 高时切掉,将不定芽基部转入含相应 NaCl 浓度的不同生根培养基进行培养。培养 3 周其结果见表 4。

表 4 诱导耐盐不定芽生根

分化培养基	含 NaCl 量(‰)								
	3.0			3.5			4.0		
	接种不定芽数	生根株数	百分率(%)	接种不定芽数	生根株数	百分率(%)	接种不定芽数	生根株数	百分率(%)
RM1	10	3	30	10	2	20	10	0	0
RM2	10	2	20	10	1	10	10	0	0
RM3	10	4	40	10	2	20	10	0	0

试验结果表明 RM1、RM2、RM3 生根培养基上分化的耐盐 3‰~3.5‰不定根结果相似。以 RM3 效果最好,RM1 次之,RM2 最差。耐盐 3‰在 3 种培养基上的诱导生根率为 40%、30%和 20%,但随盐梯度增加到 3.5‰时分化生根率降低 50%。而耐 NaCl 4‰不定芽未诱导出生根。实验发现生根培养基附加 NAA 量大于 0.02 mg/L 时,不定根分化受到抑制;RM2 即 0.02 mg/L IBA 的生根培养基要比 RM3 0.02 mg/L NAA 出现生根时间晚一周(图版 I-5)。目前,已栽植成活 5 株耐盐变异体植株(图版 I-6)。

3 结语与讨论

试验将群众杨 39 进行体细胞悬浮培养,产生耐盐 3‰~6‰细胞系和同级水平的愈伤组织;进一步诱导出耐盐 3‰~4‰的不定芽;再进行诱导获得耐 NaCl 3.0‰~3.5‰的完整植株。

实验还发现:不同的激素配比,诱导出的愈伤组织的颜色、质地、生长速度不同。培养基 M4 能较好地诱导出松脆型愈伤组织,并随继代次数增加,愈伤组织产量也增多。液体培养基激素以只附加 0.5 mg/L 的 2,4-D 为最好,另外附加适量氨基酸有助于细胞的正常分裂和增殖。悬浮细胞在一个周期内平均每个细胞分裂 3~4 次。其生长曲线与悬液 pH 值变化呈明显相关,当 pH 偏低时,正是细胞分裂处于相对静止的时期;pH 升高后,细胞增殖速度也随之加快,并进入直线增长期。这种相关性现象与其它悬浮系细胞生长中所得的结论是一致的。

耐盐愈伤组织经过继代形成不定芽,高浓度 NaCl 对芽组织分化有明显抑制作用,本试验只获得耐 NaCl 3.0‰~4.0‰的不定芽。分化不定根时 NaCl 反应也非常敏感。常规土壤中含 NaCl 超过 3.0‰时杨树不能正常生长,而本试验经细胞工程诱导 NaCl 3.0‰和 3.5‰不定根能形成完整植株。

树木耐盐机理是一个比较复杂的问题,但一般认为在高水平选择压力下,经过较长时间的选择培养,就能在遗传上发生变异细胞,这种变异可能是稳定的。本试验经 11 个月培养形成耐盐细胞系并诱导出耐盐 3.0‰~3.5‰的完整植株近 40 株,其中有 20 株已移到含盐的土壤中去。研究认为这种植株是体细胞无性系变异体植株,推测其中是否有自发显性的突变细胞形成植株,需作进一步的遗传分析才能确定。

参 考 文 献

- 1 Durzan D J, Lopushanski S M. Propagation of American elm via cell suspension cultures. *Can J. For. Res.*, 1975, 5(2):273~277.
- 2 Durzan D J, Gupta P K. Somatic embryogenesis and polyembrogenesis in Douglas fir cell suspension culture. *Plant Sci.*, 1987, 52(3):229~235.
- 3 Currinder S Cheema. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cell suspension and tissue culture of mature himalayan poplar (*Populus ciliata*). *Plant Cell Reports*, 1989, 9(8):124~127.
- 4 王影,黄敏仁,陈道明,等.杨树细胞悬浮培养及体细胞胚胎发生的研究. *南京林业大学学报*,1991,15(3):31~36.
- 5 Ostry M E. Application of biotechnology for the development of disease-resistant poplar. in: Ed. Lin D, Hubbes M, Zsuffa L. *Proceedings IEA/BA Task I Workshop Biotechnology Development*. Toronto: University of Toronto, 1988. 13~28.
- 6 Cheliak W M. Selection for Glyphosate-tolerant cell cultures in poplar. in: Ed. Lin D, Hubbes M, Zsuffa L. *IEA Task I Meeting and Workshops on Cell Culture and Coppicing*. Toronto: University of Toronto, 1988. 17~23.
- 7 胡含,陈英.植物体细胞遗传与作物改良.北京:北京大学出版社,1988.268~283.
- 8 张自立,俞新大.植物细胞和体细胞遗传学技术与原理.北京:人民教育出版社,1990.168~170.

Establishment of Saline-tolerant Cell Lines of *Populus* × *xiaozhuanica* cv. 'Popularis'-39 and the Induction of Somaclonal Variant Plant

Zhang Qiwen Zhang Wangdong

Abstract Somaclonal variants of *Populus* × *xiaozhuanica* cv. 'Popularis'-39, which is tolerant to 3.0‰~3.5‰ NaCl, is successfully obtained through the establishment of NaCl-tolerant pressure cell culture to produce calli and control the conditions of adventitious bud and root induction. The friable calli are well produced on the medium M4: MS+0.45 mg/L 2,4-D+0.3 mg/L NAA+0.1 mg/L Kinetine. The best suspension liquid medium is LM3: MS + 0.5 mg/L 2,4-D+30 g/L sucrose. The addition of amino acids was beneficial for the growth of the suspension cells. The relative parameters about cell growth are also measured. The culture test of NaCl-tolerant cells indicates that NaCl restrains cell growth and the higher the concentration of NaCl, the stronger the restraint. Calli can be produced from all the cell lines tolerant to the every NaCl level from 3.0‰~6‰. The test, in which the shoots can be induced only from the calli tolerant to 3.0‰~4.0‰, indicates that the high concentration of NaCl exerts an obvious restraining impact on the shoot induction. The root differentiation is also highly sensible to NaCl and the roots can only be induced on the medium with 3.0‰ and 3.5‰ NaCl.

Key words *Populus* × *xiaozhuanica* cv. 'Popularis'-39, suspension culture of NaCl-tolerant cells, NaCl-tolerant cell line, NaCl-tolerant somaclonal variant plant

