

滇杨组织培养再生及遗传转化体系建立

张晓琳¹, 纵丹^{1,2}, 李嘉其¹, 杨玲¹, 余进德¹, 何承忠^{1,2}

(1. 西南林业大学 云南省高校林木遗传改良与繁育重点实验室, 云南昆明 650224; 2. 西南林业大学 西南山地森林资源保育与利用教育部重点实验室, 云南昆明 650224)

摘要: 【目的】建立高效的滇杨 *Populus yunnanensis* 离体叶片再生及遗传转化体系, 有助于滇杨基因工程育种研究。【方法】以滇杨叶片为外植体, 研究不同植物生长调节剂组合对叶片愈伤组织和不定芽诱导及生根的影响, 从而获得滇杨再生组培苗; 进一步以农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 介导法探讨菌液吸光度、侵染时间和共培养时间等对滇杨遗传转化效率的影响。【结果】滇杨愈伤组织诱导的最适培养基为 1/2 MS + 0.005 mg·L⁻¹ 噻苯隆 (TDZ) + 0.010 mg·L⁻¹ 萘乙酸 (NAA), 诱导率达 91.7%; 不定芽诱导的最佳培养基为 1/2 MS + 0.002 mg·L⁻¹ TDZ + 0.010 mg·L⁻¹ NAA, 诱导率为 75.0%; 生根最适培养基为 1/2 MS + 0.010 mg·L⁻¹ NAA + 0.100 mg·L⁻¹ 吲哚乙酸 (IBA), 生根率高达 96.7%, 平均生根数为 2.57 条。利用 pBI121-*GUS* 载体转化滇杨, 最适转化菌液吸光度 $D(600)$ 为 0.2, 侵染时间为 5 min, 共培养时间为 2 d; 在分化过程中, 抑制农杆菌生长的头孢霉素 (Cef) 最佳质量浓度为 200 mg·L⁻¹, 抗性筛选中最佳培养基的卡那霉素 (Kan) 质量浓度为 20 mg·L⁻¹。对再生植株进行 β -D-葡萄糖苷酸酶 (GUS) 组织化学染色和 PCR 鉴定, 获得 20 株阳性植株, 转化阳性率为 45.45%。【结论】本研究成功建立了滇杨离体叶片再生和遗传转化体系。图 5 表 5 参 27

关键词: 滇杨; 叶片; 愈伤组织; 再生体系; 遗传转化

中图分类号: S722.3 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2024)02-0314-08

Regeneration system and genetic transformation of *Populus yunnanensis*

ZHANG Xiaolin¹, ZONG Dan^{1,2}, LI Jiaqi¹, YANG Ling¹, YU Jinde¹, HE Chengzhong^{1,2}

(1. Key Laboratory for Forest Genetic and Tree Improvement & Propagation in Universities of Yunnan Province, Southwest Forestry University, Kunming 650224, Yunnan, China; 2. Key Laboratory for Forestry Resources Conservation and Utilization in the Southwest Mountains of China, Ministry of Education, Southwest Forestry University, Kunming 650224, Yunnan, China)

Abstract: [Objective] This study is aimed to establish a highly efficient system for regeneration and genetic transformation of *in vitro* leaves of *Populus yunnanensis* so as to help genetic engineering breeding research in *P. yunnanensis*. [Method] First, with *P. yunnanensis* leaves as explants, an investigation was conducted of the effects of different combinations of exogenous hormone concentrations on the induction of callus, adventitious bud differentiation and rooting so as to obtain regenerated seedlings of *P. yunnanensis*. Then, *Agrobacterium tumefaciens* mediated method was used to explore the effects of bacterial concentration, infection time and co-culture time on the genetic transformation efficiency of *P. yunnanensis*. [Result] The optimal medium for callus induction was 1/2 MS + 0.005 mg·L⁻¹ thidiazuron (TDZ) + 0.010 mg·L⁻¹ 1-naphthylacetic acid (NAA), with an induction rate of 91.7%. The optimal medium for the induction of adventitious bud was 1/2 MS + 0.002 mg·L⁻¹ TDZ + 0.010 mg·L⁻¹ NAA, with an induction rate of 75.0% whereas the optimal medium for rooting

收稿日期: 2023-05-15; 修回日期: 2023-12-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31860219); 云南省教育厅自然科学基金资助项目 (2021Y272)

作者简介: 张晓琳 (ORCID: 0009-0005-9384-3844), 从事林木育种与分子生物学研究。E-mail: sunnyxlz27@163.com。通信作者: 何承忠 (ORCID: 0000-0001-9487-8612), 教授, 博士, 从事林木育种与分子生物学研究。E-mail: hcz70@163.com

was 1/2 MS + 0.010 mg·L⁻¹ NAA + 0.100 mg·L⁻¹ 3-indolebutyric acid (IBA), and the rooting rate was as high as 96.7%, with an average number of 2.57 roots. The optimal concentration of transforming bacterium *D*(600) was 0.2, the infection time was 5 min, and the co-cultivation time was 2 days. During differentiation, the optimal concentration of cefotaxime to inhibit the growth of *A. tumefaciens* was 200 mg·L⁻¹, and the optimal concentration of kanamycin in the screening medium for resistant buds was 20 mg·L⁻¹. The regenerated plants were identified by β-glucuronidase (*GUS*) staining and PCR, identified 20 positive plants, with a positive transformation rate of 45.45%. [Conclusion] The leaf regeneration system and genetic transformation system of *P. yunnanensis* were successfully established. [Ch, 5 fig. 5 tab. 27 ref.]

Key words: *Populus yunnanensis*; leaf; callus; regeneration system; genetic transformation

滇杨 *Populus yunnanensis* 为杨柳科 Salicaceae 杨属 *Populus* 青杨派树种, 主要分布于云南中北部和南部、贵州西部及四川西南部等地区^[1]。因速生性强、易无性繁殖和适应性强等优良特性^[2], 滇杨在中国西南地区具有重要的经济、生态和社会效益^[3]。但传统的滇杨遗传育种面临易感染黑斑病以及易遭蛀干虫害等问题^[1]。相比之下, 转基因育种能够将所需基因引入植物基因组培育新品种以及创制新种质^[4]。然而, 有效遗传转化体系的缺乏严重制约了滇杨转基因育种和功能基因组研究。

目前, 有关滇杨再生体系的建立鲜有报道, 仅有张春霞等^[5]、辛培尧等^[6]以滇杨叶片、叶柄和茎段为外植体进行不定芽的诱导, 但均难以形成愈伤组织, 不利于滇杨的高效再生和遗传转化研究。而关于滇杨遗传转化的研究尚未开展。据此, 本研究以滇杨叶片为外植体, 探讨植物生长调节剂对叶片愈伤组织、不定芽及生根的影响, 从而建立高效的滇杨再生体系。在此基础上, 利用农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 介导法对滇杨进行遗传转化研究, 进而解析影响滇杨转化效率的各种因素, 以期为滇杨的快速繁殖、定向育种及种质资源保存提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 以西南林业大学苗木基地栽培的 10 年生滇杨优株为母株, 采集 1 年生枝条, 剪切为 45 cm 长度的枝段, 于室温条件下水培, 取嫩叶作为试验材料。

1.1.2 载体菌株 根癌农杆菌为 GV3101, 含 β-D-葡萄糖苷酸酶 (*GUS*) 报告基因及卡那霉素 (Kan) 筛选标记的质粒载体 pBI121 (pBI121-*GUS*), 菌株和质粒均由实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 外植体消毒 以嫩叶作为外植体, 将叶片冲洗干净后置于体积分数为 2% 的次氯酸钠 (NaClO) 消毒 150 s, 用体积分数为 75% 的乙醇浸泡 10 s, 无菌水清洗 3 次, 用无菌滤纸吸干叶片表面水分。将叶片剪切成 1.0 cm² 小方块 (叶盘), 叶背向下接种于分化培养基上。

1.2.2 愈伤组织及不定芽诱导 将叶盘接种于含有噻苯隆 (TDZ, 质量浓度分别为 0.001、0.002、0.005 mg·L⁻¹)、萘乙酸 (NAA, 质量浓度分别为 0.010 和 0.050 mg·L⁻¹) 的 MS 和 1/2 MS 培养基上进行诱导分化。每瓶接种 4 个外植体, 每个处理接种 10 瓶, 置于暗条件下培养, 30 d 后统计愈伤组织诱导率。

将获得的愈伤组织继续接种于上述培养基中进行不定芽诱导, 置于光条件下培养, 30 d 后统计不定芽诱导率。

1.2.3 生根培养基筛选 以 1/2 MS 为基本培养基, 添加不同质量浓度组合的 NAA (0、0.010、0.050、0.100 mg·L⁻¹) 和吲哚乙酸 (IBA, 0、0.010、0.050、0.100 mg·L⁻¹)。待不定芽生长至 2~3 cm 时转接于生根培养基中, 每瓶接种 3 个不定芽, 每个处理接种 10 瓶, 置于光条件下培养, 30 d 后统计生根率和单株生根数。

以上培养基均添加 20.0 g·L⁻¹ 蔗糖和 4.5 g·L⁻¹ 琼脂, 在光照强度为 2 000~2 500 lx、光照时间为 12 h(光)/12 h(暗)、温度为 (25±2) °C 条件下培养。

1.2.4 抑菌剂头孢霉素 (Cef) 质量浓度的确定 采用液氮速冻法将 pBI121-*GUS* 质粒转化至农杆菌中, 加

入LB培养液,置于28℃恒温振荡培养箱(200 r·min⁻¹)培养,待菌液吸光度 $D(600)$ 达0.6~0.8时,吸取菌液,涂布于添加不同质量浓度头孢霉素(0、100、200、300和400 mg·L⁻¹)的LB固体培养基上,28℃倒置培养48 h,观察农杆菌生长情况。同时,将叶盘接种于添加不同质量浓度头孢霉素(0、100、200、300和400 mg·L⁻¹)的分化培养基上进行筛选,每瓶接种3个叶盘,每个处理接种10瓶。30 d后统计分化率。

1.2.5 筛选剂卡那霉素(Kan)质量浓度的确定 将叶盘接种于添加不同质量浓度卡那霉素(0、10、20、30和40 mg·L⁻¹)的分化培养基中进行筛选。每瓶接种3个叶盘,每个处理接种10瓶,置于暗条件下培养,30 d后观察统计不定芽生长情况。

1.2.6 菌液吸光度、侵染时间、共培养时间的筛选 取1.2.3获得的滇杨组培苗,将叶片剪切为1.0 cm²叶盘,采用吸光度 $D(600)$ 为0.2、0.6和1.0的农杆菌菌液对其侵染,每种浓度侵染时间分别为5、10和15 min,侵染后分别进行共培养0、2和4 d。将共培养后的叶盘接种于含有头孢霉素和卡那霉素筛选培养基进行筛选。40 d后统计产生抗性芽的叶盘数,并统计转化率,转化率=产生抗性芽的叶盘数/叶盘总数×100%。当抗性芽高度达2~3 cm时,接种至生根培养基中培养约20 d。

1.2.7 阳性植株检测 取1.2.6中的抗性植株及野生型再生苗的叶片置入GUS染色液(体积比为X-Gluc Solution:GUS Buffer=1:50)中,抽真空30 min,37℃保育24 h,体积分数为75%的乙醇脱色3 h,观察叶片着色情况。进一步将GUS染色为蓝色的植株提取基因组DNA,以野生型再生苗为阴性对照,PCR扩增GUS基因,引物序列为GUS-F:5'-TCTCAGAAGACCAAAGGGCAA-3';GUS-R:5'-TGCGCCAGGAGAGTTGTTG-3',片段大小为2 239 bp。PCR扩增体系:12.5 μL Taq PCR Master Mix,1.0 μL DNA模板,GUS-F和GUS-R(10.0 μmol·L⁻¹)各1.0 μL,ddH₂O补足至20.0 μL。扩增条件:94℃预变性5 min;94℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸1 min,30个循环;72℃延伸10 min。

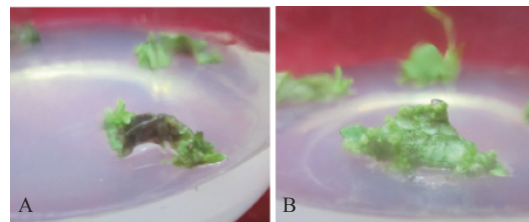
1.3 数据分析

所有数据采用Excel 2016进行记录处理,利用SPSS 26.0进行单因素方差分析(ANOVA),采用Duncan's法进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 植物生长调节剂对滇杨愈伤组织和不定芽诱导的影响

将滇杨叶盘接种于含TDZ和NAA的MS和1/2 MS培养基上,20 d后叶盘切口处形成淡绿色瘤状组织且出现芽点。接种于MS培养基的叶盘在30 d后仅于切口处长出少量愈伤组织(图1A),而接种于1/2 MS培养基的叶盘均分化出紧密的淡绿色愈伤组织(图1B)。因此,选取1/2 MS作为基本培养基进行愈伤组织和不定芽的诱导。



A. MS培养基; B. 1/2 MS培养基。

图1 滇杨叶片愈伤组织的诱导

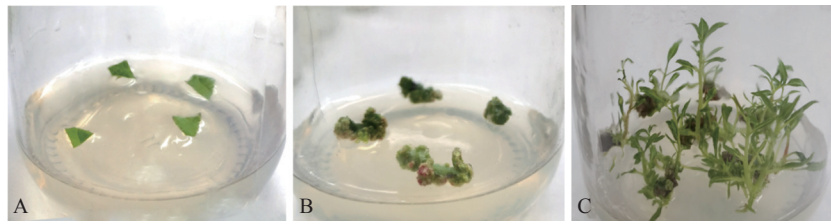
Figure 1 Induction of callus in leaves of *P. yunnanensis*

此外,将叶盘(图2A)置于含有TDZ和NAA不同质量浓度组合的1/2MS培养基上,30 d后统计愈伤组织诱导率及生长情况。结果表明(表1):组合0.005 mg·L⁻¹TDZ和0.010 mg·L⁻¹NAA培养基中的诱导效果最好,愈伤组织紧实,呈浅绿色(图2B),且诱导率达91.70%。

将上述愈伤组织转接入含有TDZ和NAA不同质量浓度组合的分化培养基中,30 d后统计不定芽诱导率及芽生长状况。由表2可知:在分化培养基中,组合0.002 mg·L⁻¹TDZ和0.010 mg·L⁻¹NAA培养基诱导不定芽的效果最佳,诱导率达75.00%,与其余组合的差异均达到显著水平($P<0.05$),且不定芽健壮、生长旺盛(图2C)。

2.2 植物生长调节剂对不定芽生根的影响

从表3可见:在组合为0.010 mg·L⁻¹NAA和0.100 mg·L⁻¹IBA的培养基中,植株生长旺盛(图3A),生根率高达96.70%,平均生根数为2.57条,均有较多的侧根及根毛(图3B);其次为组合0.010 mg·L⁻¹NAA和0.050 mg·L⁻¹IBA培养基,苗木长势较好,生根率为83.30%,平均生根数为1.93条。此外,当



A. 叶盘; B. 愈伤组织诱导; C. 不定芽诱导。

图 2 滇杨不定芽诱导

Figure 2 Induction of adventitious buds in *P. yunnanensis*

表 1 TDZ 和 NAA 对愈伤组织诱导的影响

植物生长调节剂组合		愈伤组织诱导率/%	愈伤组织状况
TDZ/ (mg·L ⁻¹)	NAA/ (mg·L ⁻¹)		
0.001	0.010	36.00±12.73 e	浅黄色, 疏松, 长势较差
0.001	0.050	55.60±12.72 d	浅黄色, 疏松, 长势较差
0.002	0.010	63.90±9.64 cd	浅绿色, 疏松, 长势一般
0.002	0.050	83.30±8.35 abc	浅绿色, 紧实, 长势一般
0.005	0.010	91.70±8.35 ab	浅绿色, 紧实, 长势较好
0.005	0.050	77.80±4.79 bc	浅绿色, 紧实, 长势一般

说明: 数据为平均值±标准差。同列不同小写字母表示不同组合间差异显著 ($P < 0.05$)。

表 2 TDZ 和 NAA 对不定芽诱导的影响

植物生长调节剂组合		不定芽诱导率/%	不定芽生长状况
TDZ/ (mg·L ⁻¹)	NAA/ (mg·L ⁻¹)		
0.001	0.010	8.30±14.43 cd	苗矮小, 生长较差
0.001	0.050	5.50±4.79 cd	苗矮小, 生长较差
0.002	0.010	75.00±14.43 a	苗健壮, 生长旺盛
0.002	0.050	19.50±4.79 bc	苗细弱, 生长一般
0.005	0.010	27.80±12.73 b	苗细弱, 生长一般
0.005	0.050	16.60±14.43 bcd	苗细弱, 生长一般

说明: 数据为平均值±标准差。同列不同小写字母表示不同组合间差异显著 ($P < 0.05$)。

表 3 NAA 和 IBA 对不定芽生根的影响

Table 3 Effects of NAA and IBA on the rooting of adventitious bud

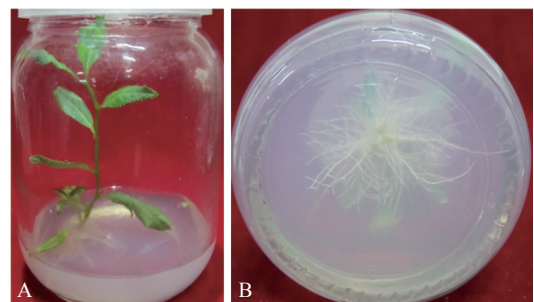
植物生长调节剂组合		生根率/%	平均生根数/条	生长状态
NAA/(mg·L ⁻¹)	IBA/(mg·L ⁻¹)			
0.000	0.000	63.30±5.77 bc	1.33±0.49 bc	主根细长、无侧根苗长势较好
0.010	0.000	56.70±15.28 c	0.97±0.51 c	主根短少、侧根少、苗长势一般
0.010	0.100	96.70±5.77 a	2.57±0.25 a	主根粗壮、侧根发达、苗健壮
0.010	0.050	83.30±5.77 ab	1.93±0.57 ab	主根较粗、侧根较多、苗长势较好
0.010	0.010	66.70±15.28 bc	1.10±0.44 c	主根粗壮、侧根较少、苗长势一般
0.000	0.010	70.00±10.00 bc	1.23±0.30 bc	主根短少、侧根少、苗长势一般
0.050	0.010	63.30±5.77 bc	0.77±0.15 c	茎部有短根、苗长势一般
0.100	0.010	60.00±26.46 bc	0.70±0.40 c	主根短少、侧根少、苗长势一般

说明: 数据为平均值±标准差。同列不同小写字母表示不同组合间差异显著 ($P < 0.05$)。

NAA 为 0.010 mg·L⁻¹ 时, 随着 IBA 质量浓度的增加, 生根率逐渐升高, 平均生根数也逐渐增多, 同时不定根和组培苗的长势逐渐增强。而 IBA 为 0.010 mg·L⁻¹ 时, 随着 NAA 质量浓度的增加, 生根率逐渐降低, 平均生根数逐渐减少, 不定根和组培苗的长势减弱。因此, 组合 1/2 MS、0.010 mg·L⁻¹ NAA、0.100 mg·L⁻¹ IBA 培养基适合不定芽的生根诱导。

2.3 头孢霉素对叶盘及农杆菌生长的影响

图 4 可见: 当头孢霉素质量浓度为 0 时, 农杆

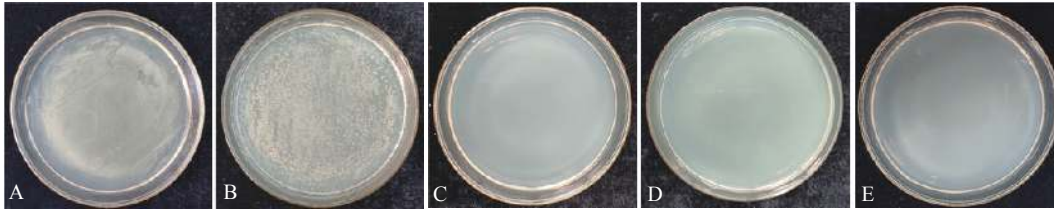


A. 再生植株; B. 不定根。

图 3 滇杨不定芽生根诱导

Figure 3 Induction of adventitious rooting in *P. yunnanensis*

菌生长迅速,但随着头孢霉素质量浓度的增加,农杆菌的数量逐渐减少,当头孢霉素质量浓度 $\geq 200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,可较好地抑制农杆菌的生长,此时,农杆菌数量为0(图4)。此外,将叶盘接种至含有不同质量浓度头孢霉素(0、100、200、300和 $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)培养基中进行培养,结果表明头孢霉素质量浓度为0时,叶盘分化率为97.20%,随着头孢霉素质量浓度的增加,叶盘的分化率无显著差异(表4)。因此,选取 $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 头孢霉素作为后续抑制农杆菌生长的最佳质量浓度。



A~E表示头孢霉素质量浓度分别为0、100、200、300、 $400 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

图4 不同质量浓度头孢霉素对农杆菌的抑制

Figure 4 Inhibition of different concentration of cefotaxime on *A. tumefaciens*

2.4 卡那霉素质量浓度对叶盘诱导不定芽的影响

由表5可知:当卡那霉素质量浓度为0时,叶盘分化率为88.90%。随着卡那霉素质量浓度的增加,叶盘分化率急剧下降。当卡那霉素质量浓度 $\geq 20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,叶盘生长速度缓慢,叶盘开始变黄甚至褐化,且分化率均为0。因此,选取 $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 卡那霉素对滇杨转化植株进行抗性筛选。

表4 头孢霉素对滇杨不定芽分化的影响

Table 4 Effect of cefotaxime on regeneration of the adventitious buds of *P. yunnanensis*

头孢霉素质量浓度/ $(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	诱导率/%	生长状况
0	97.20 \pm 4.79 a	不定芽多,生长正常
100	88.90 \pm 12.73 a	不定芽较多,生长正常
200	83.30 \pm 8.35 a	不定芽较多,生长正常
300	83.30 \pm 8.35 a	不定芽较多,生长正常
400	83.30 \pm 8.35 a	不定芽较多,生长正常

说明:数据为平均值 \pm 标准差。同列不同小写字母表示不同组合间差异显著($P<0.05$)。

表5 不同质量浓度卡那霉素对叶盘分化的影响

Table 5 Effects of different concentrations of kanamycin on leaf disc differentiation

卡那霉素质量浓度/ $(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	诱导率/%	生长状况
0	88.90 \pm 12.73 a	产生大量不定芽
10	38.90 \pm 12.73 b	产生少量不定芽
20	0.00 \pm 0.00 c	生长速度缓慢,无不定芽的形成
30	0.00 \pm 0.00 c	叶盘变黄
40	0.00 \pm 0.00 c	叶盘变黑死亡

说明:数据为平均值 \pm 标准差。同列不同小写字母表示不同组合间差异显著($P<0.05$)。

2.5 农杆菌菌液吸光度、侵染时间及共培养时间对滇杨遗传转化效率的影响

由图5可知:菌液 $D(600)=0.2$ 时的转化率显著高于0.6和1.0时($P<0.05$),此时转化率最高(50%),随着 $D(600)$ 的增加,转化率明显降低,可能由于较高的 $D(600)$ 对叶盘产生了毒害作用(图5A);侵染时间为5 min时,转化率显著高于10和15 min,随着侵染时间的增加,转化率呈下降趋势(图5B);共培养2 d时,转化率最高,而较短的共培养时间和较长的共培养时间均导致转化效率降低,这是由于时间较短不利于基因与外植体整合,而时间较长会对叶盘造成伤害(图5C)。因此,菌液 $D(600)$ 为0.2,侵染时间为5 min,共培养时间为2 d时,转化效率最高。

2.6 转化植株的阳性鉴定

通过农杆菌转化共获得44株抗性植株,分别取抗性植株叶片和茎段进行GUS染色。图6表明:有20株的叶片和茎段均显蓝色,说明GUS基因已成功转入滇杨并且能顺利表达。进一步提取经GUS染色

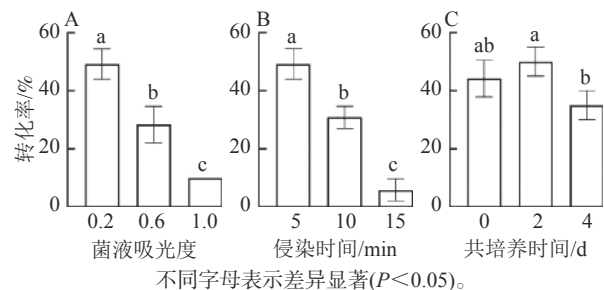
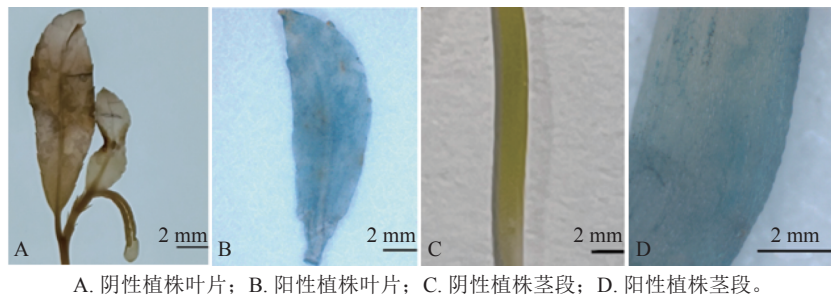


图5 不同因素对滇杨转化效率的影响

Figure 5 Effects of different factors in the transformation efficiency of *P. yunnanensis*

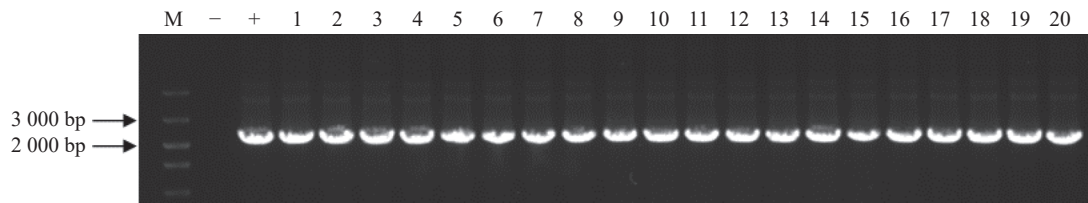
鉴定的基因组 DNA，进行 *GUS* 基因 (预期 2 239 bp) 的 PCR 扩增，结果显示：经染色鉴定为阳性的植株均可扩增出清晰的 *GUS* 基因条带 (图 7)。最终获得阳性植株 20 株，阳性率为 45.45%。



A. 阴性植株叶片; B. 阳性植株叶片; C. 阴性植株茎段; D. 阳性植株茎段。

图 6 再生植株 *GUS* 染色结果

Figure 6 *GUS* staining results of regenerated plants



M. 标记物; -, 阴性对照(野生型植株); +, 阳性对照(质粒); 1~20. 阳性植株。

图 7 *GUS* 基因 PCR 检测

Figure 7 PCR analysis of *GUS* gene

3 讨论与结论

3.1 植物生长调节剂对杨树组织培养的影响

杨树 *Populus* 作为乔木树种的模式植物，一些种的再生体系已得到广泛研究，其中辽宁杨 *P. × liaoningensis* 和河北杨 *P. hopeiensis* 在以叶片为外植体进行愈伤组织诱导和不定芽分化时，均以 MS 为最佳培养基^[7-8]，而大青杨 *P. ussuriensis* 和毛果杨 *P. trichocarpa* 则以 WPM 培养基较为适宜^[9-10]。本研究采用 MS 为基本培养基时，滇杨叶片外植体褐化较严重，而 1/2 MS 基本培养基中的外植体呈嫩绿色，说明 1/2 MS 培养基适合滇杨叶片外植体的培养，该结果也与张春霞等^[5]的研究结果一致。表明不同杨树种的外植体愈伤组织和不定芽生长所需要的无机元素和营养物质具有差异性^[11-13]。

植物生长调节剂的种类和质量浓度对植物愈伤组织和不定芽的诱导至关重要^[14-15]。本研究选取了不同质量浓度的 TDZ 和 NAA 进行组合添加至愈伤组织及不定芽诱导培养基中，发现 TDZ 质量浓度为 0.005 mg·L⁻¹ 时，叶盘的愈伤组织诱导率较高，而当 TDZ 质量浓度为 0.001 mg·L⁻¹ 时，愈伤组织诱导率较低。同时，适宜质量浓度的 NAA (0.010 mg·L⁻¹) 与低质量浓度的 TDZ (0.002 mg·L⁻¹) 对不定芽的诱导有明显的促进作用。该结果与乌日罕等^[8]对河北杨的研究结果一致。此外，杨树不定芽的生根是其再生的关键步骤^[16]，青海青杨 *P. cathayana* var. *qinghai*、胡杨 *P. euphratica* 和金叶杨 *P. nigra* ‘Jinye’ 的最佳生根培养基为 1/2 MS + IBA，生根率可达 90% 以上^[17-19]，而彭言劼等^[20]筛选出大叶杨 *P. lasiocarpa* 的最适生根培养基为 1/2 MS + NAA。辛培尧等^[21]研究发现：滇杨不定芽在 1/2 MS + 0.020 mg·L⁻¹ NAA 生根培养基中进行培养，10 d 开始生根。本研究在 1/2 MS + 0.010 mg·L⁻¹ NAA + 0.100 mg·L⁻¹ IBA 培养基中，不定芽提前至 5 d 开始生根，且根系粗壮，须根多，生根率高达 96.7%。说明采用 IBA 与 NAA 的组合更有利于滇杨不定芽的生根诱导。

3.2 筛选剂质量浓度对农杆菌介导的杨树遗传转化的影响

在卡那霉素抗性筛选中，发现当卡那霉素质量浓度为 20 mg·L⁻¹ 时，滇杨叶盘的生长受到严重抑制，而李春利等^[22]研究表明：当卡那霉素质量浓度为 30 mg·L⁻¹ 时，毛白杨 *P. tomentosa* 愈伤组织不能分化形成不定芽。说明不同树种的不同受体材料对筛选剂的敏感度不同，因此选择合适的筛选剂质量浓

度对获得转化植株至关重要^[23]。此外, LI等^[24]选用 $250\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 头孢霉素作为毛果杨的抑菌浓度。而本研究发现: $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 头孢霉素就能完全抑制农杆菌生长, 且对滇杨不定芽的生长影响较小。农杆菌质量浓度、侵染时间及共培养时间对植物的遗传转化效率起到重要作用^[25-27]。本研究对这3个因素分析发现: 当菌液吸光度为0.2, 侵染时间为5 min, 共培养为2 d时, 最有利于滇杨的遗传转化, 这与LI等^[24]在毛果杨中的研究结果相似。

本研究以滇杨叶片为外植体, 探讨了植物生长调节剂对叶片愈伤组织、不定芽诱导及其生根的影响, 成功建立了滇杨离体叶片再生体系, 并在此基础上, 通过卡那霉素抗性筛选, 利用农杆菌介导法从菌液吸光度、侵染时间和共培养时间开展了较为系统的研究, 构建了滇杨的遗传转化体系。

4 参考文献

- [1] 何承忠, 张志毅, 陈宝昆, 等. 滇杨遗传改良策略初论[J]. *西部林业科学*, 2004, **33**(1): 44–48.
HE Chengzhong, ZHANG Zhiyi, CHEN Baokun, *et al.* Preliminary exploration on genetic improvement strategy of *Populus yunnanensis* [J]. *Journal of West China Forestry Science*, 2004, **33**(1): 44–48.
- [2] 尹丽莎, 陈杰, 周军, 等. 滇杨根尖细胞染色体制片技术优化[J]. *南方农业学报*, 2015, **46**(7): 1253–1258.
YIN Lisha, CHEN Jie, ZHOU Jun, *et al.* Technique optimization on chromosome preparation of *Populus yunnanensis* Dode root-tip cell [J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2015, **46**(7): 1253–1258.
- [3] 何承忠, 车鹏燕, 周修涛, 等. 滇杨基因资源及其研究概况[J]. *西南林学院学报*, 2010, **30**(1): 83–88, 94.
HE Chengzhong, CHE Pengyan, ZHOU Xiutao, *et al.* A survey of research progress on gene resources of *Populus yunnanensis* [J]. *Journal of Southwest Forestry University*, 2010, **30**(1): 83–88, 94.
- [4] ZHOU Tingting, LIN Ying, LIN Yan, *et al.* Regeneration and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of twelve *Eucalyptus* species [J/OL]. *Forestry Research*, 2022, **2**: 15[2023-05-01]. doi: 10.48130/FR-2022-0015.
- [5] 张春霞, 樊军锋, 黄建, 等. 滇杨的组织培养和植株再生[J]. *植物生理学通讯*, 2006, **42**(6): 1131.
ZHANG Chunxia, FAN Junfeng, HUANG Jian, *et al.* Tissue culture and plantlet generation of *Populus yunnanensis* Dode [J]. *Plant Physiology Communications*, 2006, **42**(6): 1131.
- [6] 辛培尧, 刘岩, 段安安, 等. 滇杨不同外植体分化培养研究[J]. *云南农业大学学报*, 2011, **26**(6): 828–832, 860.
XIN Peiyao, LIU Yan, DUAN An'an, *et al.* Study on differentiation culture from different explants of *Populus yunnanensis* [J]. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 2011, **26**(6): 828–832, 860.
- [7] 赵鑫闻, 彭儒胜, 赵继梅. 辽宁杨叶片高频植株再生体系的建立[J]. *中国农学通报*, 2015, **31**(10): 13–16.
ZHAO Xinwen, PENG Rusheng, ZHAO Jimei. Establishment of a highly efficient plant regeneration system of *P. ×liaoningensis* [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2015, **31**(10): 13–16.
- [8] 乌日罕, 代金玲, 白向东, 等. 河北杨叶片诱导不定芽再生体系的建立[J]. *内蒙古农业大学学报(自然科学版)*, 2021, **42**(4): 34–38.
Wurihan, DAI Jinling, BAI Xiangdong, *et al.* Establishment of the regeneration system of *Populus hopeiensis* leaf induced adventitious buds [J]. *Journal of Inner Mongolia Agricultural University (Natural Science Edition)*, 2021, **42**(4): 34–38.
- [9] 姜洋, 刘焕臻, 李开隆. 大青杨再生体系的优化[J]. *东北林业大学学报*, 2017, **45**(4): 28–32.
JIANG Yang, LIU Huanzhen, LI Kailong. Optimizing *Populus ussuriensis* regeneration system [J]. *Journal of Northeast Forestry University*, 2017, **45**(4): 28–32.
- [10] 甄成. 毛果杨组培再生及遗传转化体系研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2016.
ZHEN Cheng. *Study on Regeneration and Genetic Transformation System of Populus trichocarpa* [D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2016.
- [11] 马生健, 刘金祥, 曾富华, 等. 高羊茅高效组织培养再生体系的建立[J]. *分子植物育种*, 2020, **18**(5): 1611–1616.
MA Shengjian, LIU Jinxiang, ZENG Fuhua, *et al.* Establishment of efficient tissue culture regeneration system of *Festuca arundinacea* [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2020, **18**(5): 1611–1616.
- [12] SONG Chengwei, LU Liang, GUO Yayu, *et al.* Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of the commercial hybrid poplar *Populus alba* × *Populus glandulosa* Uyeki [J/OL]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, **20**(10): 2594[2023-05-01]. doi: 10.3390/ijms20102594.
- [13] 王晨, 张俊红, 张苗, 等. 柳杉优良无性系组培快繁体系研究[J]. *浙江农林大学学报*, 2020, **37**(4): 810–816.

- WANG Chen, ZHANG Junhong, ZHANG Miao, *et al.* Study on rapid propagation system of superior clones in *Cryptomeria fortune* [J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2020, **37**(4): 810 – 816.
- [14] BISWAS K K, MOHRI T, KOGAWARA S, *et al.* An improved system for shoot regeneration from stem explants of Lombardy poplar (*Populus nigra* L. var *italic* Koehne) [J]. *American Journal of Plant Sciences*, 2012, **3**: 1181 – 1186.
- [15] 叶雯, 袁超群, 秦伟, 等. 火焰南天竹茎段离体培养再生体系的优化[J]. *浙江农林大学学报*, 2020, **37**(2): 391 – 396.
- YE Wen, YUAN Chaoqun, QIN Wei, *et al.* Optimization of regeneration system of stem segments of *Nandina domestica* ‘Firepower’ in vitro culture [J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2020, **37**(2): 391 – 396.
- [16] WEI Fang, ZHAO Fangfang, TIAN Baoming. In vitro regeneration of *Populus tomentosa* from petioles [J]. *Journal of Forestry Research*, 2017, **28**(3): 465 – 471.
- [17] 杜晓艳, 韩素英, 梁国鲁, 等. 青海青杨高效再生体系的建立[J]. *林业科学研究*, 2011, **24**(6): 701 – 706.
- DU Xiaoyan, HAN Suying, LIANG Guolu, *et al.* Establishment of an efficient regeneration system of *Populus cathayana* Rehd. var. *qinghai* [J]. *Forest Research*, 2011, **24**(6): 701 – 706.
- [18] 王大鹏, 唐嘉泽, 邵明成, 等. 胡杨组织培养叶片及插穗毛状根发生[J]. *植物学报*, 2017, **52**(2): 210 – 217.
- WANG Dapeng, TANG Jiase, SHAO Mingcheng, *et al.* Rooting induced on *in vitro* leaves and fresh cuttings of *Populus euphratica* [J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2017, **52**(2): 210 – 217.
- [19] 张赫岩, 叶冬梅, 林涛, 等. 金叶杨组织培养再生体系的建立[J]. *北方园艺*, 2020(9): 97 – 103.
- ZHANG Heyan, YE Dongmei, LIN Tao, *et al.* Construction regeneration system of *Populus nigra* cv. ‘Jinye’ tissue culture [J]. *Northern Horticulture*, 2020(9): 97 – 103.
- [20] 彭言劫, 李明勇, 赵亚津, 等. 大叶杨组培快繁体系的建立[J]. *湖北林业科技*, 2015, **44**(2): 13 – 16.
- PENG Yanjie, LI Mingyong, ZHAO Yajin, *et al.* Establishment of tissue culture system of *Populus lasiocarpa* from its axillary bud induction [J]. *Hubei Forestry Science and Technology*, 2015, **44**(2): 13 – 16.
- [21] 辛培尧, 刘岩, 孙正海, 等. 滇杨的增殖及生根培养研究[J]. *湖北农业科学*, 2012, **51**(15): 3366 – 3368.
- XIN Peiyao, LIU Yan, SUN Zhenghai, *et al.* Study on multiplication and rooting culture of *Populus yunnanensis* [J]. *Hubei Agriculture Sciences*, 2012, **51**(15): 3366 – 3368.
- [22] 李春利, 王孝敬, 丁强强, 等. 毛白杨叶片再繁和遗传转化体系的优化[J]. *植物研究*, 2016, **36**(2): 177 – 183.
- LI Chunli, WANG Xiaojing, DING Qiangqiang, *et al.* Optimization of leaf regeneration and genetic transformation system of *Populus tomentosa* [J]. *Bulletin of Botanical Research*, 2016, **36**(2): 177 – 183.
- [23] LIU Guoqin, YUAN Yuan, HUI Jiang, *et al.* *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of modern rose (*Rosa hybrida*) using leaf-derived embryogenic callus [J]. *Horticulture Plant Journal*, 2021, **7**: 359 – 366.
- [24] LI Shujuan, ZHEN Cheng, XU Wenjing, *et al.* Simple, rapid and efficient transformation of genotype Nisqually-1: a basic tool for the first sequenced model tree [J/OL]. *Scientific Reports*, 2017, **7**(1): 2638[2023-05-01]. doi: 10.1038/s41598-017-02651-x.
- [25] MATVEEVA T V, OTTEN L. Widespread occurrence of natural genetic transformation of plants by *Agrobacterium* [J]. *Plant Molecular Biology*, 2019, **101**(4/5): 415 – 437.
- [26] LI Meiping, WANG Dan, LONG Xiaofei, *et al.* *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of embryogenic callus in a *Liriodendron* Hybrid (*L. chinense* × *L. tulipifera*) [J/OL]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, **13**: 802128[2023-05-01]. doi: 10.3389/fpls.2022.802128.
- [27] 周佳君, 胡恒康, 龚丽, 等. 农杆菌介导的香榧幼胚遗传转化体系[J]. *浙江农林大学学报*, 2022, **39**(1): 13 – 21.
- ZHOU Jiajun, HU Hengkang, GONG Li, *et al.* *Agrobacterium*-mediated genetic transformation system of *Torreya grandis* ‘Merrillii’ immature embryos [J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2022, **39**(1): 13 – 21.