

# 构树雌雄植株外植体组织培养再生能力的差异

徐梦珍\*, 胡文涛#

华南农业大学林学与风景园林学院, 广东 广州

收稿日期: 2024年5月22日; 录用日期: 2024年7月8日; 发布日期: 2024年7月24日

## 摘要

目前关于构树(*Broussonetia papyrifera*)植株外植体组织培养体系的研究有很多, 但是探究构树雌雄株外植体组织培养再生能力的差异的研究鲜有报道。为了研究构树雌雄植株外植体组织培养再生能力的差异性, 本实验采集在野外条件下构树雌雄株的外植体, 选取构树雌雄株叶片和茎段进行组织培养, 观察愈伤组织分化、不定芽的分化和生根情况, 实验发现构树雌雄株生殖力差异较大, 尤其是不定芽的分化阶段, 雌雄株生殖力有很明显的区别, 无论是构树叶片还是茎段作为外植体, 雄株的生殖力均低于雌, 叶片外植体的生殖力大于茎段。这为扩大构树苗木的栽培规模、加快构树苗木生产的产业化提供科学依据及技术保障, 为构树生态修复的应用奠定基础。

## 关键词

叶片, 茎段, 雌雄差异, 生殖能力, 组织培养

## Comparison of Fertility between Male and Female *Broussonetia papyrifera* Plants in Tissue Culture

Mengzhen Xu\*, Wentao Hu#

College of Forestry and Landscape Architecture, South China Agricultural University, Guangzhou Guangdong

Received: May 22<sup>nd</sup>, 2024; accepted: Jul. 8<sup>th</sup>, 2024; published: Jul. 24<sup>th</sup>, 2024

## Abstract

At present, there are many studies on tissue culture system of *Broussonetia papyrifera* plant ex-

\*第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 徐梦珍, 胡文涛. 构树雌雄植株外植体组织培养再生能力的差异[J]. 植物学研究, 2024, 13(4): 446-452.

DOI: 10.12677/br.2024.134047

plants, but there are few reports on the difference of tissue culture and regeneration ability between male and female *Broussonetia papyrifera* plants. In order to study the difference of tissue culture and regeneration ability of male and female *Broussonetia papyrifera* explants, the explants of male and female *Broussonetia papyrifera* were collected in the field, and the leaves and stem segments of male and female *Broussonetia papyrifera* were selected for tissue culture, and the callus differentiation, adventitious bud differentiation and rooting were observed. It was found that the fertility of male and female *Broussonetia papyrifera* was quite different, especially in the stage of adventitious bud differentiation. This provides scientific basis and technical support for expanding the cultivation scale of *Broussonetia papyrifera* seedlings and accelerating the industrialization of *Broussonetia papyrifera* seedlings production, and lays a foundation for the application of *Broussonetia papyrifera* ecological restoration.

## Keywords

Leaves, Stem Segment, Male and Female Differences, Reproductive Capacity, Tissue Culture

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

雌雄异株是自然界普遍存在的现象[1]。在 442 种已知性系统的树种中, 15%的树种为雌雄异株[2]。这是林木适应环境而进化的结果, 通常被认为是从雌雄同株或雌雄同花进化而来[3]。常见的雌雄异株的科有银杏科(Ginkgoaceae)、大麻科(Cannabaceae)、猕猴桃科(Actinidiaceae)、杨柳科(Salicaceae)、冬青科(Aquifoliaceae)、葡萄科(Vitaceae)、柿树科(Ebenaceae)、薯蓣科(Dioscoreaceae)等[4], 雌雄异株在自然界分布广泛, 这是林木在适应环境的过程中演化而来, 雌雄异株植物在生长特性、资源分配、生理生化特征和基因表达特性等方面都具有一定的性别差异[5]-[13], 具有很大的研究价值, 也是现在雌雄差异的热点问题。

构树(*Broussonetia papyrifera*)为桑科构属落叶乔木, 雌雄异株, 在我国大部分地区广泛分布。构树本身不仅具有较大的经济价值与饲用价值[14], 而且构树具有适应性和抗性较强的特点, 能在干旱、贫瘠、盐碱、荒坡、荒滩等恶劣环境下正常生长, 同时还具有水土保持, 防风固沙, 改善环境的功能, 常被用作先锋树种, 广泛应用于植被生态的恢复[15]。目前构树的繁殖方法主要是靠种子、扦插以及快速繁殖[16], 但种子繁殖获得苗木周期较长; 扦插繁殖成活率不高, 这样的方法是获得优良苗木的速度非常慢, 难以满足大面积的栽植和推广, 只有进行组织培养技术才有望满足构树快速繁殖的需求。

构树快繁技术目前被越来越多人研究, 吴际友等[17]着力于提高杂交构树扦插成活率, 万文等[18]探索了构树在各个阶段的最优培养基配方, 郁蒙蒙等[19]建立了光叶楮叶片叶柄的高效再生体系, 魏会琴等[20]构建了杂交构树叶片的再生体系, 对构树育种提供借鉴。目前国内开展过构树的组培研究, 但未见区分雌雄株进行研究, 构树雌雄株差异具有很大的研究价值, 因此本次组培着重研究构树雌雄株外植体繁殖力的差异性研究。本实验将从野外采集的构树雌雄株, 取其叶片和茎段进行培养, 观察其愈伤组织分化的情况、不定芽分化情况和生根情况, 比较构树雌雄株叶片和茎段组织培养再生能力差异性, 为扩大构树苗木的栽培规模、加快构树苗木生产的产业化提供科学依据及技术保障, 为构树生态修复的应用奠定基础。

## 2. 方法

### 2.1. 试验材料

#### 2.1.1. 供试植物

采集于华南农业大学校内野生构树雌雄株各 10 盆, 实验室条件下浇水培养, 每次试验采集构树的叶片和茎段, 取长宽为 5 mm × 5 mm 构树雌雄株叶片, 用次氯酸钠消毒 5 min, 取 1 cm 茎段。

#### 2.1.2. 供试培养基基质

使用 Murashige and Skoog 培养基[21]加不同激素进行处理, MS 4.43 g/L、琼脂 8 g/L、蔗糖 30 g/L、活性炭 0.2 g/L, 121℃ 25 min 高压蒸汽灭菌, pH 为 5.8。根据预实验, 愈伤组织诱导培养基需添加 6-苄基氨基嘌呤 1000 μL/L、吲哚丁酸 100 μL/L; 不定芽分化培养基需添加 6-苄基氨基嘌呤 1000 μL/L、吲哚丁酸 100 μL/L, 赤霉素 500 μL/L, 赤霉素高温易分解, 需过滤灭菌; 生根培养基加吲哚丁酸 100 μL/L。

### 2.2. 试验设计

分别比较构树雌雄株的叶片和茎段的生殖力, 采集外植体, 进行愈伤组织诱导、不定芽分化、生根, 观察雌雄株的表现, 拍照记录, 其中愈伤组织过程中进行黑暗处理, 生芽过程中进行半透光处理, 生根过程中进行光照处理, 以上过程中均在培养箱中进行, 培养箱温度(25 ± 2)℃, 光照强度为 1200 lx, 连续光照 12 h/d, 以此判断构树雌雄株的生殖力。

具体实验过程: 先配制 Murashige and Skoog 培养基, 调节培养基 pH 为 5.8, 再将组培工具等同时放入高温灭菌锅内进行高温灭菌。用次氯酸钠擦拭洗超净工作台, 紫外杀菌 15 min, 通风 5 min。再将灭菌后的培养基放在超净工作台等待培养基凝固。再取大小一致的新鲜构树雌株和雄株的叶片, 先用清水清洗, 再加入洗衣粉用毛刷轻轻刷干净, 用纯水清洗干净备用。在超净工作台内, 用剪刀剪大小约 1 cm 左右的构树叶片组织置入培养皿中, 再用封口膜密封培养皿, 放入培养箱。

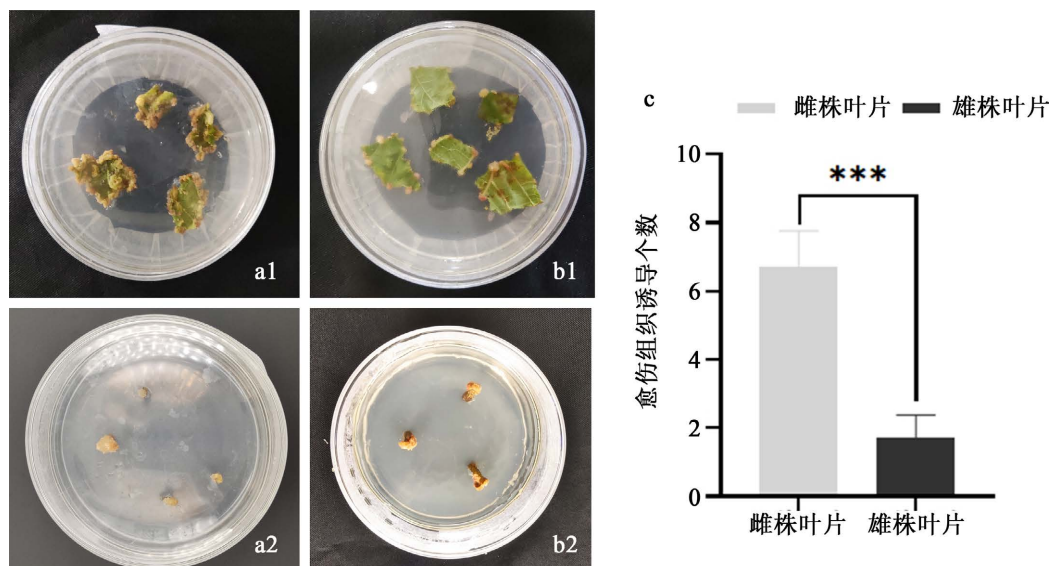
在实验过程中, pH 值如果过酸, 则会导致培养基难以凝固, 因此培养基酸碱度一定要严格调节。其次, 细菌易隐藏于构树叶片的绒毛附近, 一定要清洗干净叶片再进行实验, 否则容易受到污染。此外, 不定芽分化培养基配置时, 由于赤霉素高温易分解, 则需过滤灭菌, 不可在高温灭菌锅里进行灭菌。

## 3. 结果

### 3.1. 雌雄株构树叶片和茎段愈伤组织诱导生殖力比较

取新鲜构树叶片与茎段, 加入洗衣粉用毛刷清理构树叶片表面和背面, 用清水冲洗干净。加入次氯酸钠和吐温消毒 5 min, 用灭菌工具将叶片裁剪为 5 mm × 5 mm, 叶片背面紧贴培养基表面, 茎段形态学下端插入培养基, 每种处理接 10 个培养皿, 每个培养皿接 4 至 5 个外植体, 培养 4~6 周观察其生长情况并统计愈伤诱导率及不定芽分化率, 3 次重复。

构树雌雄株叶片和茎段的愈伤组织诱导情况见图 1 所示, 雌雄株愈伤组织诱导活力有很大差异, 叶片愈伤组织生殖力明显高于茎段愈伤组织的生殖力, 无论从茎段还是从叶片观察愈伤组织, 雌株愈伤组织活力高于雄株愈伤组织活力。构树雌株叶片愈伤组织较多, 雌株叶片较绿、活性较高, 而构树雄株叶片的愈伤组织比较小, 且叶子部分呈现黄褐色, 整体的活力是构树雌株叶片愈伤组织诱导活力大于构树雄株叶片。同时可以明显的看到构树雌株的茎有明显的愈伤组织, 但雄株的愈伤活力较低, 茎段呈现褐色, 雌株茎段的愈伤组织诱导的活力大于构树雄株茎段愈伤组织诱导的活力。

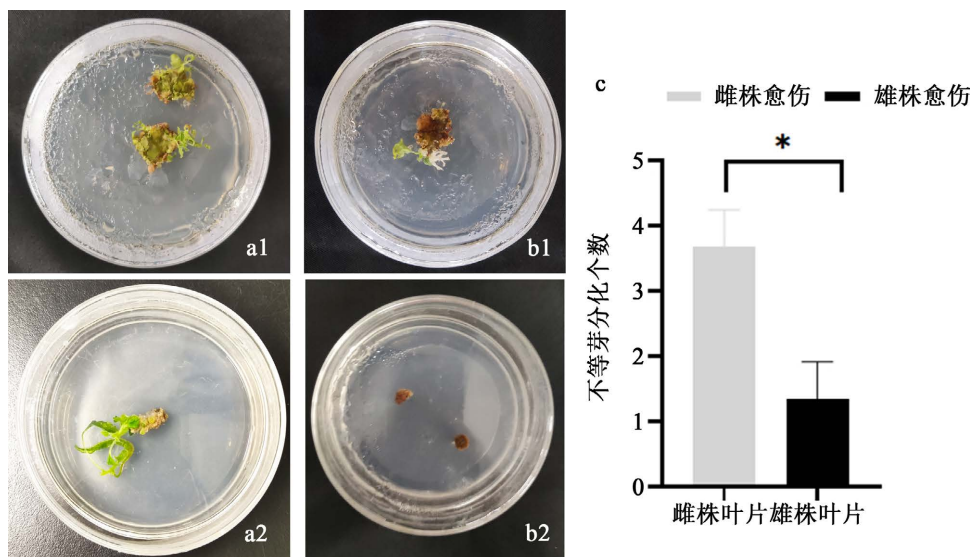


注: a1: 构树雌株叶片, b1: 构树雄株叶片, a2: 构树雌株茎段, b2: 构树雄株茎段, c: 愈伤组织诱导个数。

**Figure 1.** Callus induction in leaves and stems of male and female *Broussonetia papyrifera*.

**图 1.** 构树雌雄株叶片和茎段愈伤组织诱导

### 3.2. 雌雄株构树叶片和茎段不定芽分化生殖力比较



注: a1: 构树雌株叶片, b1: 构树雄株叶片, a2: 构树雌株茎段, b2: 构树雄株茎段, c: 不定芽分化个数。

**Figure 2.** Differentiation of adventitious buds in leaves and stem segments of male and female *Broussonetia papyrifera*.

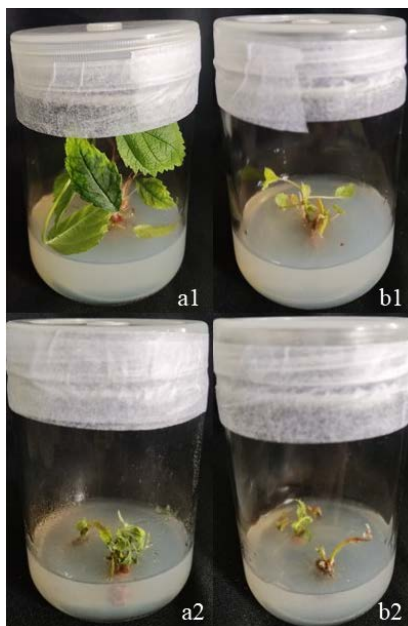
**图 2.** 构树雌雄株叶片和茎段不定芽分化

构树雌雄株叶片和茎段不定芽分化情况见图 2 所示, 构树雌株叶片愈伤组织不定芽的分化个数较多, 颜色呈现嫩绿色表现出更高的活力, 而雄株叶片一段时间以后, 它的愈伤呈现褐色、黑褐色, 它表现出来的活力较低, 发芽个数较少。从茎段发芽情况来看, 构树雌株的茎段不定芽分化情况更好, 呈现的活力更高, 雄株有些发芽但芽活力很低, 一段时间后愈伤变成黄褐色甚至无发芽的情况。整体上来看构树叶片不定芽分化生殖力大于茎段, 构树雌株叶片的不定芽分化生殖力大于雄株, 构树茎段在发芽后期可



能受到内生菌的污染, 严重时会使培养基变成红色, 易受污染。

### 3.3. 雌雄株构树叶片和茎段生根生殖力比较



注: a1: 构树雌株叶片, b1: 构树雄株叶片, a2: 构树雌株茎段, b2: 构树雄株茎段。

**Figure 3.** Rooting of leaves and stem segments of male and female *Broussonetia papyrifera*  
**图 3.** 构树雌雄株叶片和茎段生根

构树雌雄株叶片和茎段生根情况如图 3 所示, 构树雌株叶片的生根情况更好, 叶片呈现绿色, 而雄株的叶片到后期有发黄萎焉的情况, 在茎段的生根过程当中生根生殖力明显低于叶片, 雄株的茎段以及叶子会脱落, 留下茎段变干, 而雌株茎段叶片翠绿色, 根系更茂密。整体上叶片的生根能力强于茎段, 而从性别上来说, 雌株的生根能力要明显高于雄株的生根能力。

## 4. 结论

本研究表明构树雌雄株的愈伤诱导、不定芽的分化及生根情况均达显著差异。从性别上来说, 构树雄株的愈伤诱导活力、不定芽的分化能力及生根能力均低于雌株。从外植体的类型上说, 构树叶片的生殖力高于构树茎段。这表明, 在离体培养条件下构树雌株叶片有更大的优势。

## 5. 讨论

大量研究表明雌雄异株的组织培养再生能力有很大的差异, 如日本茵芋雌雄株的诱导率、增殖率及生根率均达极显著差异, 雄株的诱导率、增殖率及生根率均低于雌株[22]。栝楼雌株愈伤率明显高于雄株[23], 落叶型冬青雌株芽诱导率和芽增殖率及生根率都远高于雄株[24], 紫芦笋的雄株茎尖培养中丛芽分化率高于雌株[25], 银杏的组织培养中也发现银杏的雌雄株芽诱导率存在差异[26]。

构树雌雄株再生能力差异, 可归因于内源性激素含量和不同性别基因型之间的固有差异[27]。雌雄异株植物在基因表达和生理方面有明显差异, 如高山红景天的雌株苗高略高于雄株[28], 银杏雄株的过氧化物酶的活性均大于雌株[29], 沙棘雄株叶片蛋白质含量比雌株高约 31.5%, 可溶性糖高越 22.2%, 总氨基酸高约 28.2% [30]。雌株的抗旱性强于雄株[31], 雌株繁殖投入较高, 表现出更强的营养补偿机制[32],

这些差异也导致植物的雌株和雄株在组织培养难易程度上的差异。在构树组织培养过程中, 雄株构树外植体更容易被菌类污染, 通过构树叶片解剖发现雄株构树叶片上表皮厚度比雌株厚 8.83%, 两者差异极显著[33], 表明构树雄株叶片储水能力更强, 被菌类污染的可能性就更大。此外在构树组织培养过程中, 构树雄株有明显的褐化, 目前认为植物组织培养中褐变主要是由酶促褐变引起的[34], 酶促褐变如同一般的酶促反应, 其发生必备三个条件, 即酶、底物和氧。切割外植体时伤口处会分泌的酚类化合物, 它是酶促反应发生的底物[35]。引起褐变的酶有多酚氧化酶(PPO)、过氧化物酶(POD)、苯丙氨酸解氨酶等, 有研究表明银杏雄株的过氧化物酶的活性均大于雌株[25], 在构树组织培养过程中, 可能因为构树雄株褐变等酶活性高于雌株, 与切口处酚类化合物发生反应, 导致雄株外植体褐化比雌株更严重。其次培养基易呈现红色这与外植体的内生菌有很大关系。植物内生真菌(endophytic fungi)是生活在植物组织内, 它大部分或全部时期都在植物体内[36], 这是一个庞大的种群, 据保守估计大约有  $1.5 \times 10^6$  种[37]。构树体内也有大量内生真菌, 目前构树根、茎、叶的内生真菌分离率分别为 0.86、0.57、0.91, 目前已经在构树体内得到了 47 株内生真菌[38], 在培养过程中雄株叶片出现更多红色培养基, 这可能跟雌雄株内生菌根的差异有关, 可能构树雄株内生菌更多且复杂, 切口处的内生菌进入培养皿中生长污染了培养基, 造成培养基呈现红色。雌株在构树组织培养的优势是毋庸置疑的, 这为构树雌株叶片的利用有很大的现实意义。

## 致 谢

感谢国家自然科学基金(32001289)的资助。

## 参考文献

- [1] Renner, S.S. and Ricklefs, R.E. (1995) Dioecy and Its Correlates in the Flowering Plants. *American Journal of Botany*, **82**, 596-606. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1995.tb11504.x>
- [2] Coder, K.D. (2008) *Tree Sex: Gender and Reproductive Strategies*. University of Georgia.
- [3] Charlesworth, D. (2016) Plant Sex Chromosomes. *Annual Review of Plant Biology*, **67**, 397-420. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043015-111911>
- [4] 董莉娜, 苏雪, 孙坤, 等. DNA 分子标记在雌雄异株植物性别鉴定中的应用[J]. 广西植物, 2006, 26(1): 63-68.
- [5] Obeso, J.R. (2002) The Costs of Reproduction in Plants. *New Phytologist*, **155**, 321-348. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00477.x>
- [6] Case, A.L., and Ashman, T.L. (2005) Sex-Specific Physiology and Its Implications for the Cost of Reproduction. In: Reekie, E.G. and Bazzaz, F.A., Eds., *Reproductive Allocation in Plants*, Academic Press, 129-157. <https://doi.org/10.1016/b978-012088386-8/50005-3>
- [7] Iglesias, M.C., and Bell, G. (1989) The Small-Scale Spatial Distribution of Male and Female Plants. *Oecologia*, **80**, 229-235. <https://doi.org/10.1007/bf00380156>
- [8] Jing, S.W., and Coley, P.D. (1990) Dioecy and Herbivory: The Effect of Growth Rate on Plant Defense in *Acer negundo*. *Oikos*, **58**, 369-377. <https://doi.org/10.2307/3545228>
- [9] Jing, J., Hong, J., Shuquan, Y., and Guomo, Z. (2008) Sex-Linked Photosynthetic Physiologic Research and the Evolutionary Ecological Analysis in Living Fossil Plant, *Ginkgo biloba* L. *Acta Ecologica Sinica*, **28**, 1128-1136. [https://doi.org/10.1016/s1872-2032\(08\)60035-9](https://doi.org/10.1016/s1872-2032(08)60035-9)
- [10] Shi, D., Wei, X., Chen, G., and Xu, Y. (2012) Changes in Photosynthetic Characteristics and Antioxidative Protection in Male and Female *Ginkgo* during Natural Senescence. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **137**, 349-360. <https://doi.org/10.21273/jashs.137.5.349>
- [11] 曹全, 江洪, 曾波, 等. 孑遗植物银杏(*Ginkgo biloba* L.)雌雄株水分生理特征初步研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(18): 8732-8735.
- [12] Xu, X., Peng, G., Wu, C., Korpelainen, H., and Li, C. (2008) Drought Inhibits Photosynthetic Capacity More in Females than in Males of *Populus cathayana*. *Tree Physiology*, **28**, 1751-1759. <https://doi.org/10.1093/treephys/28.11.1751>
- [13] Zhang, S., Chen, L., Duan, B., Korpelainen, H., and Li, C. (2012) *Populus cathayana* Males Exhibit More Efficient Protective Mechanisms than Females under Drought Stress. *Forest Ecology and Management*, **275**, 68-78.

<https://doi.org/10.1016/j.foreco.2012.03.014>

- [14] 王诗雅. 构树幼苗与杂交构树幼苗对盐碱胁迫的生理响应研究[D]: [博士学位论文]. 银川: 宁夏大学, 2019.
- [15] 苟蓉. 干旱对构树幼苗生长发育及生理代谢影响的性别差异[D]: [博士学位论文]. 南充: 西华师范大学, 2020.
- [16] 轩敏感, 李永东, 曹先进, 等. 杂交构树的开发前景及栽培技术[J]. 农家参谋, 2019(27): 70, 72.
- [17] 吴际友, 童方平, 龙应忠. 杂交构树嫩枝短穗扦插育苗技术[J]. 林业科技开发, 2003, 17(6): 60.
- [18] 万文, 刘忠华, 魏会琴. 杂交构树茎段组培快繁体系的建立[J]. 福建林业科技, 2010, 37(1): 72-76, 109.
- [19] 郁蒙蒙, 施国新, 吕群丹, 等. 光叶叶片和叶柄再生体系的建立[J]. 林业科学研究, 2006, 19(2): 253-256.
- [20] 魏会琴. 杂交构树再生体系的建立及形态解剖观察[D]: [博士学位论文]. 北京: 北京林业大学, 2009.
- [21] Murashige, T., and Skoog, F. (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia plantarum*, **15**, 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- [22] 吴丽君, 陈达, 许冰. 日本茵芋雌雄株的组织培养[J]. 森林与环境学报, 2019, 39(3): 292-296.
- [23] 郭晓亮. 栝楼苗期性别差异及组织培养研究[D]: [博士学位论文]. 武汉: 华中农业大学, 2009.
- [24] 陈茜, 范佳露, 王宝腾, 等. 落叶型冬青雌、雄株茎段的组织培养技术[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2017, 41(6): 181-186.
- [25] 张元国, 刁家连, 李芳, 等. 紫芦笋茎尖组培快繁技术研究[J]. 中国农学通报, 2004, 20(3): 190-192.
- [26] 陈颖. 银杏组织、细胞培养及其生产黄酮的代谢调控研究[D]: [博士学位论文]. 南京: 南京林业大学, 2005.
- [27] Dauphin-Guerin, B., Teller, G., and Durand, B. (1980) Different Endogenous Cytokinins between Male and Female *Mercurialis annua* L. *Planta*, **148**, 124-129. <https://doi.org/10.1007/bf00386412>
- [28] 李美善, 许明子, 李长军, 等. 高山红景天不同性别植株形态的比较研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(4): 1599-1600.
- [29] 温伟庆, 陈友吾. 银杏雌雄株过氧化物酶和过氧化氢酶活性差异研究[J]. 福建林业科技, 2002, 29(2): 34-39.
- [30] 卢崇恩, 肖虹, 王文英, 闫晋民. 沙棘雌雄株部分生理生化指标的差异[J]. 沙棘, 1995, 8(2): 16-18.
- [31] He, M., Shi, D., Wei, X., et al. (2016) Gender-Related Differences in Adaptability to Drought Stress in the Dioecious Tree *Ginkgo biloba*. *Acta Physiologiae Plantarum*, **38**, 1-14. <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2148-0>
- [32] Delph, L.F., and Herlihy, C.R. (2012) Sexual, Fecundity, and Viability Selection on Flower Size and Number in a Sexually Dimorphic Plant. *Evolution*, **66**, 1154-1166. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2011.01510.x>
- [33] 李娜, 郭学民, 黎明, 等. 构树雌雄株叶片解剖结构特征的比较研究[J]. 植物科学学报, 2017, 35(2): 164-170.
- [34] Bro, R., and Heimdal, H. (1996) Enzymatic Browning of Vegetables. Calibration and Analysis of Variance by Multiway Methods. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **34**, 85-102. [https://doi.org/10.1016/0169-7439\(96\)00019-6](https://doi.org/10.1016/0169-7439(96)00019-6)
- [35] 刘玲玲. 植物组织培养中外植体发生褐变的原因及防止措施[J]. 喀什师范学院学报, 2011, 32(3): 44-46.
- [36] Ma, Y.M., Li, Y., Liu, J.Y., et al. (2004) Anti-*Helicobacter pylori* Metabolites from *Rhizoctonia* sp. Cy064, an Endophytic Fungus in *Cynodon dactylon*. *Fitoterapia*, **75**, 451-456. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2004.03.007>
- [37] Gunatilaka, A.L. (2006) Natural Products from Plant-Associated Microorganisms: Distribution, Structural Diversity, Bioactivity, and Implications of Their Occurrence. *Journal of Natural Products*, **69**, 509-526. <https://doi.org/10.1021/np058128n>
- [38] 张春燕. 构树内生真菌及其抗肿瘤次级代谢产物研究[D]: [博士学位论文]. 上海: 第二军医大学, 2013.