

光果西南杨带芽茎段的组培技术研究

代仕高¹ 程秦明² 贺 维³ 辜云杰¹ 贾 晨¹ 李佳泳¹ 张 炜¹

(1. 四川林业科学研究院, 四川 成都 610081;

2. 稻城县林业局, 四川 稻城 627750; 3. 四川农业大学, 四川 雅安 625014)

摘 要:以光果西南杨(*Populus schneideri* var. *tibetica*)带芽茎段为外植体,进行消毒灭菌处理、不定芽诱导、再生芽增殖、再生苗壮苗以及生根后移栽的一系列试验,对组培过程中最佳培养方法进行研究,筛选出了适合植株分化、生根的培养基成分。结果表明:酒精消毒45 s,升汞消毒8 min的灭菌效果最好;在MS + NAA 0.05 + 6-BA 2.0的培养基中芽诱导率达79%,10 d后腋芽萌发;在MS + NAA 0.1 + 6-BA 2.0的培养基中增殖效果最好,增殖系数达到5.8;经过培养基为MS + NAA 0.1 + 6-BA 0.5的壮苗过程之后,在1/2 MS + NAA 0.5的培养基中增根效果最佳。这将为光果西南杨苗木的大量繁殖以及遗传改良提供技术储备。

关键词:光果西南杨;组织培养;诱导;增殖;生根

中图分类号:S722.3

文献标识码:A

文章编号:1003-5508(2015)01-0038-05

The Tissue Culture Technique of Stems with Buds of *Populus schneideri* var. *tibetica*

DAI Shi-gao¹ CHENG Qin-ming² HE Wei³ GU Yun-jie¹

JIA Chen¹ LI Jia-yong¹ ZHANG Wei¹

(1. Sichuan Academy of Forestry, Chengdu 610081, China; 2. Daocheng Forestry Bureau,

Daocheng 627750, China; 3. Sichuan Agriculture University, Ya'an 625014, China)

Abstract: In this study *Populus schneideri* var. *tibetica*'s stems with buds were selected as explants. A series of tests were conducted on disinfection and sterilization, the induction of adventitious buds, the proliferation of regeneration buds, strong regenerated seedlings, rooting and transplantation in order to study the best training methods during the tissue culture process, and to screen out medium components for plant differentiation and rooting. The results showed that 45 seconds of alcohol disinfection and 8 minutes of mercuric chloride sterilization worked best. The bud induction rate of explants reached 79% in MS + NAA 0.05 + 6-BA 2.0 medium, and the axillary bud sprouted after 10 days. The proliferation coefficient was up to 5.8 in MS + NAA 0.1 + 6-BA 2.0 medium, displaying the best effects. The effect of promoting rooting was significant in 1/2 MS + NAA 0.5 medium after strengthening the regenerated seedlings in MS + NAA 0.1 + 6-BA 0.5 medium. This would provide technical reserve for the cultivation speed acceleration and genetic improvement of *Populus schneideri* var. *tibetica*.

Key words: *Populus schneideri* var. *tibetica*; Tissue culture; Induction; Proliferation; Rooting

杨树是世界各国普遍种植的木本植物,属杨柳科(*Salicaceae*)杨属(*Populus* L.),具有适应性强、生

长速度快、丰产等特性,已被广泛作为短期轮作的造林树种,在生态环境治理和解决木材短缺方面占有

收稿日期:2014-12-09

基金项目:四川省林业科学研究院自列课题-川西高山人工用材林培育技术研究,川西北高山乡土杨树优良单株选择及其无性系开发(ZL2014-08),四川省交通科技项目-川西高原生态脆弱区理塘至亚丁改建公路生态恢复技术研究。

作者简介:代仕高(1967-),男,高级工程师,从事森林培育研究。

重要地位^[1], 共分为胡杨派、白杨派、黑杨派、青杨派和大叶杨派五大派系。光果西南杨 (*Populus schneideri* var. *tibetica*) 属青杨派 (Section *tacamchaca* spach), 为我国特有树种, 主要分布于四川西部、西藏西部至东南部地区, 海拔可达 3 900 m, 胸径年平均生长量 1.1 cm 以上, 树高年平均生长量 0.8 m 以上, 是一种适应性和抗逆性强、生长迅速、材质优良的速生树种^[2]。近年来, 作为在川西高原宽谷地带推广的主要树种, 光果西南杨的大面积营造, 不但可以加快高原宽谷区的荒地绿化, 提高森林覆盖率; 还能满足用材、水土保持、水源涵养、防风固沙等方面的需要, 较好地发挥生态、经济和社会效益。植物组织培养作为在短时间内大量繁殖出性状一致的良种的最佳途径, 有效合理的运用可以使大面积造林更加快捷、便利。

尽管杨树的组织培养技术日趋成熟, 但对不同的杨树品种而言, 外植体、培养基、生长调节物质和温度、光照等因子的作用存在较大差别, 需要在实验过程中做出必要的调整, 通过对各个因子的优化, 获得最佳的培养效果。因此, 本研究以光果西南杨带芽茎段为外植体, 对组培过程中最佳培养方法进行研究, 为光果西南杨苗木的大量繁殖以及遗传改良提供技术储备。

1 材料与方 法

1.1 材料与培养条件

材料为 1 a 生光果西南杨 (*Populus schneideri* var. *tibetica*), 从稻城县采回光果西南杨的枝条, 在成都扦插成活后备用。组织培养温度均为 (25 ± 2) °C, 光照强度 1 000 lx ~ 1 500 lx, 光照时间 16 h · d⁻¹。

1.2 外植体获得

外植体通过以下两种方法进行选择, 方法一: 杨树扦插茎段萌发后, 直接取带芽茎段, 去污剂清洗, 流水冲洗 30 min; 方法二: 扦插苗移栽后, 温室培养 1-2 个月左右, 取带芽茎段, 去污剂清洗, 流水冲洗 30 min。结果显示: 方法二获得带芽茎段染菌率低, 腋芽启动率高。

外植体消毒处理: 先用 70% (V/V) 的酒精分别消毒 30 s、45 s、60 s; 后用升汞 (0.1% (W/V)) 分别消毒 6 min、8 min、10 min, 对比染菌率及致死情况, 如表 1。

1.3 不定芽诱导

诱导、增殖、壮苗和生根培养均采用 MS 基本培养基, 外加 3% 蔗糖和 0.6% 琼脂, pH 为 5.8。用无菌滤纸吸干带芽茎段表面的水分, 获得无菌外植体。将无菌带芽茎段接种于含不同浓度 6-BA (0.05 mg · L⁻¹、0.1 mg · L⁻¹、0.2 mg · L⁻¹) 和 NAA (1.0 mg · L⁻¹、2.0 mg · L⁻¹、4.0 mg · L⁻¹、6.0 mg · L⁻¹) 的不定芽诱导培养基上, 诱导不定芽。共 6 个处理, 每个处理接 15 瓶, 每瓶接种两个外植体。培养 15 d 后统计诱导率。

1.4 再生芽增殖

将上述经过诱导得到的不定芽分株、切割, 然后转入 NAA (0.1 mg · L⁻¹) 和不同浓度 6-BA (0.5 mg · L⁻¹、1.0 mg · L⁻¹、2.0 mg · L⁻¹) 的继代培养基上, 培养条件同上。共 3 个处理, 每个处理接 20 瓶, 每瓶接种两个不定芽。20 d 后观察和统计不同激素浓度对再生芽形成的影响, 计算增殖系数。

1.5 再生苗壮苗

经过继代增殖培养的无菌苗矮小, 需进一步继代培养, 此阶段的试验目的在于使无菌苗健壮和长高。根据预备实验, 壮苗培养基为 MS + NAA 0.1 + 6-BA 0.5。

1.6 壮苗后生根

分别以 MS 和 1/2 MS 为基本培养基, 添加 NAA (0 mg · L⁻¹、0.5 mg · L⁻¹)。选取长势好的无菌苗, 接种在生根培养基上, 共 3 个处理, 每个处理接 20 瓶, 每瓶接种两个无菌苗。15 d 后开始观察根的生长情况, 统计生根率。

1.7 生根苗移栽

取根系伸长至 2 cm ~ 3 cm、植株高为 3 cm ~ 4 cm 的幼苗进行移栽。揭去培养瓶上的封口膜, 在塑料大棚中炼苗 3 d, 注意保持培养基表面湿润。然后移栽到蛭石: 营养土 = 1:1 的基质中, 移栽时套袋保湿 3 d 后, 逐步去掉套袋。

1.8 数据统计分析

采用 SPSS17.0 数据分析系统和 Microsoft Excel 对试验观察数据资料进行方差分析、LSD 多重比较等。在结果统计中所涉及的测定项目计算公式如下:

$$\text{诱导率}(\%) = \frac{\text{长出腋芽的外植体数}}{\text{接种的外植体数}} \times 100$$

$$\text{增殖系数} = \frac{\text{继代后的不定芽数}}{\text{接种不定芽数}}$$

$$\text{生根率}(\%) = \frac{\text{生根苗数}}{\text{接种苗数}} \times 100$$

2 结果与分析

2.1 不同消毒处理对外植体灭菌效果的影响

如表1所示,不同消毒处理对外植体灭菌效果的结果表明:70%(V/V)酒精消毒30s,外植体染菌率高达90%(1号培养基);而酒精消毒60s后培养发现,外植体出现死亡,茎段变黑现象(7、8、9号培养基)。70%(V/V)酒精消毒45s后,再用0.1%(W/V)升汞消毒6min,外植体染菌率高达45%(4号培养基);而消毒10min后,出现启动迟缓甚至致死的现象(6号培养基)。由此可见,最佳处理方法为酒精消毒45s,升汞消毒8min,外植体的污染率仅5%(5号培养基)。

表1 不同消毒处理对外植体灭菌效果的影响

Table 1 Effects of different disinfection on explants sterilizing

处理号	70% (V/V) 酒精 处理时间(s)	0.1% (W/V) 升汞 处理时间(min)	污染率 (%)
1	30	6	90
2	30	8	50
3	30	10	20
4	45	6	45
5	45	8	5
6	45	10	启动迟缓 致死
7	60	6	茎段变黑 死亡
8	60	8	茎段变黑 死亡
9	60	10	茎段变黑 死亡

2.2 不同植物生长调节剂对不定芽诱导的影响

表2显示,在本试验的不定芽分化中,NAA和6-BA的比例对不定芽分化影响较大。当NAA浓度一定时,随着6-BA浓度的增加,外植体芽诱导率呈先升后降的趋势,且外植体茎段在(2)号培养基上诱导效果最佳,10d后腋芽萌发,芽诱导率达79%,30d左右可以进行增殖培养。而在6-BA浓度不变的情况下(2、5、6号培养基),低浓度NAA明显促进芽诱导,而NAA浓度增加芽诱导率减小。故NAA与6-BA比例为1:40时(2号培养基),可以

表2 不同植物生长调节剂对不定芽诱导的影响

Table 2 Effects of plant growth regulators on the induction of adventitious buds

处理号	基本培养基类型	NAA 浓度 (mg · L ⁻¹)	6-BA 浓度 (mg · L ⁻¹)	芽诱导率 (%)
1	MS	0.05	1.0	55.3
2	MS	0.05	2.0	78.9
3	MS	0.05	4.0	30.0
4	MS	0.05	6.0	12.5
5	MS	0.10	2.0	25.0
6	MS	0.20	2.0	42.5

促进细胞的分裂和分化,增大外植体的芽诱导率。

2.3 植物生长调节剂6-BA对再生芽增殖的影响

从表3中可以发现,基本培养基类型均为MS以及NAA浓度均为0.1mg · L⁻¹的情况下,不同浓度的6-BA对外植体再生芽增殖的影响不同。具体表现为:增殖系数随6-BA浓度的升高逐渐增大,其中(3)号培养基中增殖效果最好,增殖系数达到5.8。再生芽增殖时,可能由于其自身可以合成内源激素,故NAA与6-BA的比例与不定芽诱导相比稍有下降(比例为1:20)。

表3 植物生长调节剂6-BA对再生芽增殖的影响

Table 3 Effects of plant growth regulators 6-BA on the proliferation of regeneration buds

处理号	基本培养基类型	NAA 浓度 (mg · L ⁻¹)	6-BA 浓度 (mg · L ⁻¹)	增殖系数
1	MS	0.1	0.5	1.1
2	MS	0.1	1.0	1.5
3	MS	0.1	2.0	5.8

2.4 植物生长调节剂NAA对生根的影响

在表4中,培养基中不添加NAA,将MS培养基与1/2MS培养基做对比,发现1/2MS培养基对外植体茎段生根的促进作用大于MS培养基,即(2)号培养基生根效果优于(1)号。而在培养基类型一致(均为1/2MS)的条件下,添加0.5mg · L⁻¹NAA后生根率增加了15%,表明NAA对外植体的增根效果明显,即(3)号培养基增根效果最佳。光果西南场带芽茎段的不定芽诱导和再生情况见图1。

表4 植物生长调节剂NAA对生根的影响

Table 4 Effects of plant growth regulators NAA on the percentage of rooting

处理号	基本培养基类型	NAA 浓度(mg · L ⁻¹)	生根率(%)
1	MS	0	55
2	1/2MS	0	60
3	1/2MS	0.5	75

3 结论

光果西南杨组织培养效率受多个因子的影响。基本培养基能保证培养物的生存与最低生理活动,但只有配合使用适当的外源激素才能诱导细胞分裂启动、愈伤组织生长以及根、芽分化等合乎理想的变化^[3]。常用于组织培养的植物激素有两大类:即生长素类和细胞分裂素类。生长素通常被用于诱导细胞的分裂和根的分化,而细胞分裂素主要是促进细

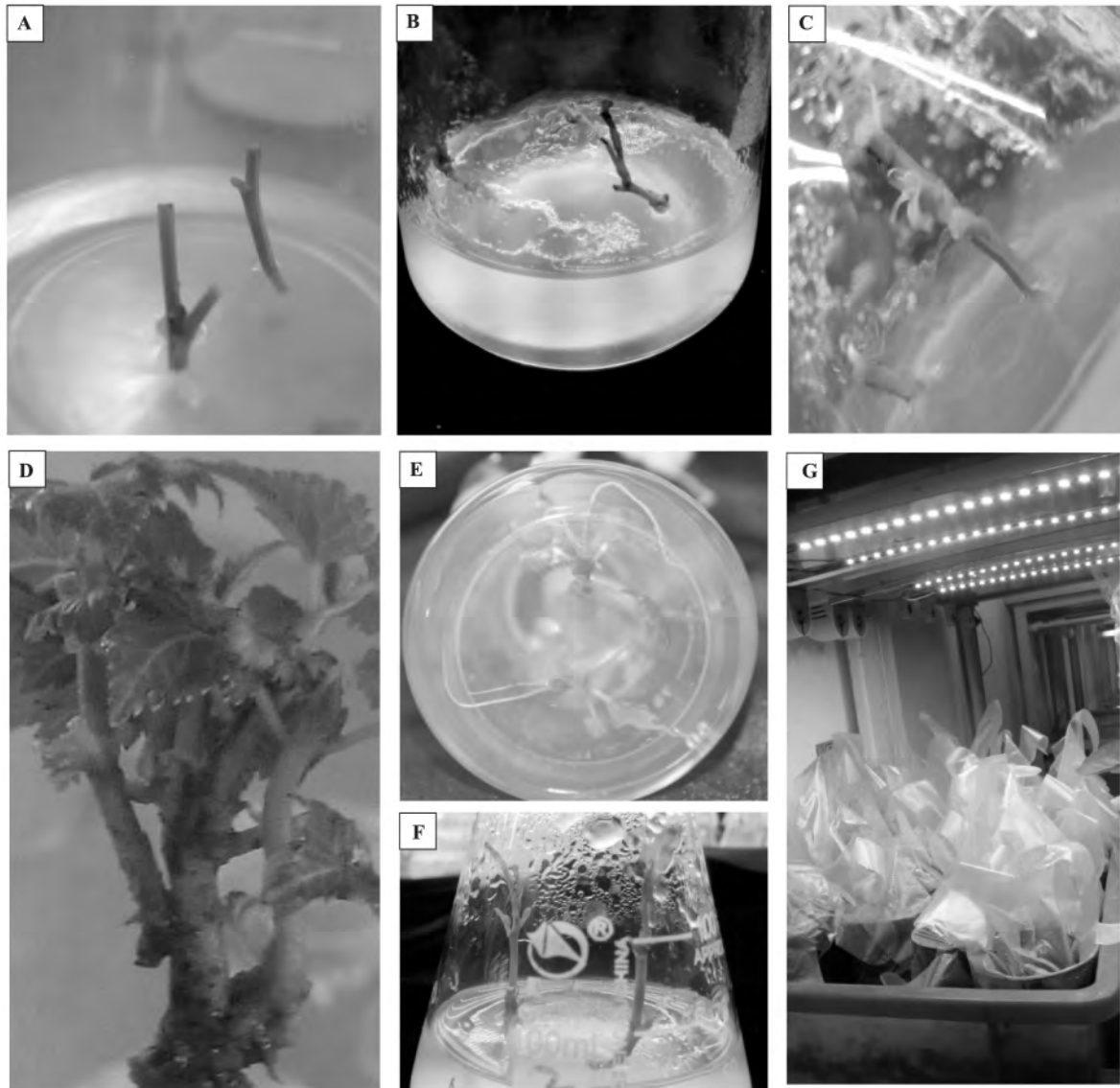


图1 光果西南杨带芽茎段的不定芽诱导和植株再生

Fig. 1 Adventitious buds induction and plant regeneration of *P. schneideri*'s stems with buds

A: 外植体消毒后无菌培养; B: 消毒时间对比; C: 不定芽诱导; D: 再生芽增殖; E: 再生苗壮苗; F: 壮苗后生根; G: 生根后移栽

胞分裂和由愈伤组织或器官上分化不定芽,对根的发生具有抑制作用^[4]。在器官发生和增殖过程中,细胞分裂素和生长素的比例非常重要^[5]。

污染、褐化、玻璃化被认为是组织培养的3大杀手。与褐化、玻璃化相比污染更易发生,给科研和生产带来巨大的危害。因此采取有效的防控措施,降低污染发生的机率,是组织培养成功的重要保障^[6]。本实验中,在启动培养阶段,采用温室培养方法,获得污染较少的带芽茎段作为外植体,通过不同灭菌时间处理来控制污染,发现消毒时间过短灭菌不彻底,消毒时间过长茎段变黑,启动迟缓甚至致死。结果显示,酒精消毒45 s,升汞消毒8 min的灭

菌效果最好,其污染率降到了5%,可以快速建立杨树的无菌培养体系。

生长素与细胞分裂素在植物组织培养中诱导器官分化的协同调控作用极为重要,需要针对具体外植体类型进行细胞分裂素和生长素最适浓度及比例的筛选^[7-8]。在不定芽的诱导和增殖阶段,通过调节MS培养基中NAA和6-BA的配比,建立带芽茎段分化不定芽的再生体系,在短期内可以获得大量的不定芽,提高光果西南杨的繁殖系数。本实验中,适宜浓度的6-BA有利于外植体诱导,而6-BA浓度过低或过高则不利于外植体诱导;而低浓度的NAA对不定芽诱导具有促进作用,高浓度具有抑制

作用。这说明:光果西南杨在不定芽诱导时主要依靠内源激素,少量的外源激素可补充内源激素的不足促进其抽芽^[9]。在大部分的生根实验中,生根的基本培养基均采用1/2MS培养基^[10,11],因为培养基中的无机盐分减半会促进生根和侧根发育^[12]。本实验同样采用1/2MS培养基,并在培养基中添加适量NAA后生根率增加了15%,增根效果明显,这加快了培养速度。

综合已有的研究结果可以看出,较合适的组织培养模式是:MS为基本培养基、适当的NAA和6-BA配比和适宜的培养环境。实际操作过程中,还应针对不同培养阶段的培养目标,选择相应的技术措施。

参考文献:

- [1] 沈周高,项艳,蔡诚,等.3个杨树品种叶片再生体系的建立[J].中国农学通报,2006,22(11):90~96.
[2] 彭培好,彭俊生,王成善,等.川西高原光果西南杨人工林生物

- 量及生产力的研究[J].林业科技,2003,28(4):14~18.
[3] 程云.黑杨派无性系SN05-11和LN05-51再生体系的研究[M].华中农业大学,2009.
[4] 李浚明,朱登云.植物组织培养教程[M].3版.北京:中国农业大学出版社,2005.
[5] Ramage C,Williams R R. Mineral Nutrition and Plant Morphogenesis [J]. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant, 2002, 38: 116~124.
[6] 胡凯.超级稻组织培养及农杆菌介导基因转化的研究[M].沈阳农业大学,2007.
[7] 师校欣,高仪,杜国强,等.红叶加拿大紫荆离体快繁技术研究[J].西北植物学报,2008,28(10):212~213.
[8] 牛西午,詹海仙,杨志坚,等.不同激素浓度对柠条茎段组织培养及植株再生的影响[J].华北农学报,2005,20(1):35~37.
[9] 龚伟,王米力,石大兴.二色茉莉组织培养技术体系研究[J].四川农业大学学报,2003,21(1):77~81.
[10] 程云清,刘剑锋,王占武,等.鞍杂杨组培快繁技术[J].东北林业大学学报,2011,39(2):11~12.
[11] 邓建军,李芳东,乔杰,等.白花泡桐优树试管嫁接幼化及组培快繁技术研究[J].林业科学研究,2011,24(5):646~650.
[12] 祁春芳,郝智礼.白杨派杨树组培技术研究[J].山西林业科技,2000,(4):21~23.

(上接第103页)

降到光照强度为1 000 Lx时的水平;在光照时间为16 h时,光照强度各个处理条件下,地下鲜重的表现与光照时间为24 h条件下没有太多区别。这说明光照强度超过6 000 Lx,地下鲜重生长受到抑制,生长呈现下降趋势。这和地上鲜重变化是一致的,说明绿萝地上地下鲜重生长因素呈现一致性。光照强度6 000 Lx成为一个分界线。

另外,试验相关数据显示,绿萝叶片离心率也是绿萝生长重要指标。绿萝叶片呈现倒心形,它的生长值代表绿萝叶片形状的变化程度。不同光照时间和光照强度下,绿萝叶片离心率变化呈现波形浮动,但总体表现比较平稳。在光照时间为24 h条件下,光照强度小于3 000 Lx,绿萝叶片离心率呈现递减趋势,当光照强度大于3 000 Lx时,绿萝叶片离心率则呈现递增趋势。

3 结论

根据实验数据分析,可以得出如下结论:

(1) 不同光照时间和光照强度对绿萝叶面积的影响呈现显性。从时间设置来看,光照时间为8 h处理时,绿萝叶面积表现最突出,其次是光照时间为16 h处理时,叶面积峰值最小的为24 h处理时。

(2) 不同光照因子作用对绿萝茎长生长影响比较明显。光照时间为16 h时,6 000 Lx光照强度下,绿萝茎长随光照时间的增加而增加,也就是光照时间和茎长生长成正比例。

(3) 不同光照条件下对绿萝地上部鲜重和地下鲜重都有影响。光照强度小于6 000 Lx时,地上地下鲜重随光照强度增加而增加,超过6 000 Lx时,随着光照强度增大地上地下鲜重都呈下降趋势。

参考文献:

- [1] 桂克印.不同光照处理对绿萝生长发育的影响研究[D].湖南农业大学,2007,(09).
[2] 桂克印,文亮晶,李炎林,等.不同光照处理对绿萝表型可塑性的影响[J].安徽农业科学,2009,(20).
[3] 缪丽丽.“水养”和“土养”绿萝生长情况的观察与对比研究[J].新课程学习(下),2014,(15).