

金叶榆组培快繁技术体系的建立

李 静^{1,2},高思禹¹,张福利¹,姚庆智^{1,2},刘 洋²,吴小红²,白婷玉²

(1.内蒙古农业大学 生命科学学院,内蒙古 呼和浩特 010018;

2.内蒙古和盛生态科技研究院有限公司,内蒙古 呼和浩特 011517)

摘 要:金叶榆(*Ulmus pumila*),榆科榆属,又称美人榆,有很强的生长能力且枝繁叶茂,在园林造景方面有很大景观价值。文章以金叶榆的茎段、腋芽、叶片为外植体,采用不同浓度激素处理,对外植体的消毒方法和诱导培养进行筛选和探索,更快地创建金叶榆组织培养快速繁殖技术体系。结果表明:最佳培养基是 MS 培养基(附加蔗糖 20 g/mL),0.1%的 HgCl₂ 为最佳消毒剂,消毒时间为 6 min;不同外植体在各种激素配比中诱导率有很大差异,其中茎段的愈伤组织在 0.5 mg/L 6-BA+2.00 mg/L NAA 条件下,诱导率相对较高;腋芽发生不定芽增殖数最多是在 1.0 mg/L 6-BA+0.25 mg/L NAA 条件下;叶片在 4.0 mg/L 6-BA+1.00 mg/L NAA 组合中,诱导率最高,该研究成果优化了金叶榆组织培养快繁体系的生长条件。

关键词:组织培养;金叶榆;外植体

中图分类号:S687

文献标识码:A

文章编号:2096-1197(2017)06-0107-05

Rapid propagation technology system of *Ulmus pumila* tissue culture

LI Jing^{1,2},GAO Siyu¹,ZHANG Fuli¹,YAO Qingzhi^{1,2},LIU Yang²,WU Xiaohong²,BAI Tingyu²

(1.Life College , Inner Mongolia Agriculture University,Hohhot 010018,China;

2.Inner Mongolia and Ecological Science and Technology Research Institute Co. LTD, Hohhot 011517,China)

Abstract:*Ulmus pumila*,also known as beauty elm,could be trimmed to various shape for its much branches and full crown, and it played an important role on landscape. In order to establish the rapid propagation system of *Ulmus pumila*, using the stem, axillary buds and leaves of *Ulmus pumila* as explants, the effects of different disinfection methods and induction culture on the rapid propagation of *Ulmus pumila* were studied. The results showed that the optimum medium was MS medium with sucrose 20 g/mL, the best disinfectant was 0.1% HgCl₂. The disinfection time was 6 min. The induction rate of different explants was different in different hormones. Under the condition of 0.5 mg/L 6-BA+2.00 mg/L NAA, the callus induction rate of stem section was relatively high. The largest number of axillary buds adventitious bud proliferation was 1.0 mg/L 6-BA+0.25 mg/L NAA. In the 4.0 mg/L 6-BA+1.00 mg/L NAA combination, blades induction rate were the highest. The results can provide reference for the optimization of the tissue culture and rapid propagation of *Ulmus pumila*.

Keywords:Tissue culture;*Ulmus pumila*;Explant

金叶榆(*Ulmus pumila*)是抗性极强的彩叶树种,它有金黄色的叶片,很适合人们观赏,因此在园

林的建设绿化中应用广泛^[1-2]。金叶榆色彩鲜明,有嫩绿色的嫩芽,有时整个植株呈黄绿色^[3]。落叶为乔、灌

收稿日期:2017-09-20

基金项目:呼和浩特市科技计划项目(重大科技专项)(2015-重-社-1);内蒙古农业大学学生科技创新基金项目(DC201556);内蒙古农业大学生科院 2016 年科技创新创业项目(KJCX2016001)

作者简介:李 静(1994—),女,本科生,专业为生物科学。

通讯作者:姚庆智(1974—),男,副教授,博士,主要从事土壤微生物的研究工作。

木且叶缘为锯齿状,圆球形的树冠,耐寒、耐瘠薄、喜好光合充足、适应含少量的盐碱土壤。因此,鉴于金叶榆的喜好生长习性,结合现代高科技育苗培育技术实现规模生产^[4]。金叶榆有较强的环境适应性,较强的抗盐碱性,保持水土能力也很强^[5]。植物组织培养就是在超净台等尽可能无任何菌落的环境中,将植物器官、组织、细胞、胚胎及原生质体等离体繁殖培育,在合适的培养基上,通过选择适合的培养环境,使之直接分化或诱导产生愈伤组织,完整的植株重新被培育出来的过程^[6-7]。植物组织培养技术的大范围推广和应用,就是要达到金叶榆快速地繁育,实现大面积的发展优良品种,还能在保证幼苗的稳定遗传性的同时降低生产成本。为快速生产良好品质的金叶榆苗木为满足市场需要的同时,探究金叶榆植物组培的最佳培养条件。该试验对金叶榆组织培养快繁技术的研究与探讨,提供技术依据。

1 材料和方法

1.1 供试材料

本试验材料所需的一年生金叶榆枝条取于内蒙古农业大学南区教学楼前。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体消毒 将用一年生枝条的金叶榆茎尖和茎段剪成 1.0 cm 带有一个芽眼和无芽眼的茎段,依次用洗洁精水、肥皂水、酒精、NaClO₃ 及 HgCl₂ 对其表面进行消毒处理,再用无菌水冲洗数次,接种到合适的培养基中,具体处理见表 1。以叶片为

材料的消毒方法:0.1% HgCl₂ 和 75%酒精,共设有 6 个处理:0.1% HgCl₂ (2,4,6 min);75%酒精 30 s+7% NaClO₃(4,6,8 min),均设置 3 次重复。

1.2.2 不同激素浓度对金叶榆影响 选用 MS 培养基,分别附加 6-BA 和 IBA,具体处理浓度见表 2,在 25 ℃,2 000~3 000 lx 灯光强度下,待 15 d 后观察不定芽增殖情况进行统计。

1.2.3 数据分析 采用 Excel 进行数据分析和处理,用 SPSS(20.0)进行数据间的方差分析。

2 结果与分析

2.1 金叶榆茎段外植体的初培养

将灭菌处理后的茎段外植体接种在 MS+0.1 mg/L 6-BA+0.01 mg/L IBA+蔗糖 20 g/L 培养基上。

2.1.1 金叶榆茎段的消毒效果 从表 1 得知,茎段消毒方式随着时间的增加差异性显著($P\leq 0.05$)。编号 1,2,3 的茎段,用 75%酒精和 7%NaClO₃ 的消毒方式,污染率随处理时间的增加由 70.5%降低至 55.5%,而褐化率显著提高为 92.0%,成活率表现为 50.0%。对于编号 4,5,6 的茎段消毒方式可看出,用 0.1%的 HgCl₂ 溶液消毒,褐化率随时间的增加而提高,达到 43.5%,但污染率与成活率均逐渐降低,相对来看,时间在 6 min 时,效果最好,成活率达到 42.5%。用 75%的酒精附加 0.1% HgCl₂ 进行消毒(编号 7,8,9),看出消毒效果较良好,褐化率显然增大,成活率却几乎为零。所以,最佳的消毒方式是用 0.1%HgCl₂ 消毒 6 min。

表 1 不同消毒剂和处理时间对茎段外植体的消毒效果

处理编号	药剂	处理时间/min	褐化率/%	污染率/%	成活率/%
1	75%酒精 30 s +7%NaClO ₃	25	88.0 b	70.5 a	45.0 ab
2		26	90.5 ab	62.5 b	47.5 ab
3		28	92.0 a	55.5 c	50.0 a
4	0.1%HgCl ₂	6	15.0 c	37.5 a	42.5 a
5		8	31.5 b	12.5 b	30.0 b
6		10	43.5 a	10.5 b	28.0 b
7	75%酒精 30 s +0.1%HgCl ₂	6	90.0 b	50.0 a	5.0 a
8		8	91.5 b	30.0 b	0.0 b
9		10	98.0 a	6.0 c	0.0 b

2.1.2 对不同浓度激素茎段诱导愈伤组织的影响 以 MS 培养基的金叶榆茎段诱导愈伤组织的过程中, 附加蔗糖 20 g/L、不同浓度的 6-BA 和 IBA, 进行愈伤组织诱导。结果显示:在浓度是 0.5 mg/L 6-BA、2.0 mg/L IBA 时,诱导率最高,达 30%。茎段愈伤组织诱导培养的最佳条件为附加有 0.5 mg/L 6-BA、2.0 mg/L IBA 的 MS 培养基(表 2)。

表 2 不同浓度激素配比茎段诱导愈伤组织的影响

处理	6-BA/(mg/L)	IBA/(mg/L)	诱导率/%
1	2.5	0.1	25.00
2	0.5	2.0	30.00
3	0.5	1.5	5.00
4	2.0	0.1	25.00
5	1.5	0.1	25.00
6	1.5	1.0	5.00

2.2 金叶榆腋芽外植体培养

2.2.1 金叶榆腋芽的消毒效果 从表 3 得知,腋芽的消毒时间和方式随着时间的增加差异性显著 ($P\leq 0.05$)。编号 1、2、3 的腋芽,用 75%酒精和 7% NaClO₃ 的消毒方式,污染率随处理时间的增加由 77.5%渐降低至 55.5%,但褐化率均逐渐增高至 92.0%,而成活率达到 49.0%。对于编号 4、5、6 的腋芽消毒方式可知,使用 0.1%的 HgCl₂ 溶液消毒,同样是时间越长,褐化率越高,达到 43.5%,且污染率降低,但成活率在逐渐降低。总体来看,时间在 6 min 时,效果最好,成活率达到 40.0%。随后又采用 75%的酒精+ 0.1% HgCl₂ 进行消毒(编号 7、8、9),消毒效果良好,但是褐化率增加,成活率几乎为零。所以,最好的消毒是选用在 0.1%的 HgCl₂ 中消毒 6 min,效果达到最佳。

表 3 不同消毒剂和處理時間對腋芽外植體的消毒效果

处理	药剂	处理时间/min	褐化率/%	污染率/%	成活率/%
1	75%酒精 30 s+7%NaClO ₃	25	88.0 b	77.5 a	38.0 c
2		26	90.5 ab	67.0 b	46.0 ab
3		28	92.0 a	55.0 c	49.0 b
4	0.1%HgCl ₂	6	15.0 c	39.5 a	40.0 a
5		8	31.5 b	15.0 b	27.0 b
6		10	43.5 a	14.0 b	25.0 b
7	75%酒精 30 s+0.1%HgCl ₂	6	90.0 c	53.5 a	3.00 a
8		8	91.5 b	40.0 b	0.00 b
9		10	98.0 a	8.00 c	0.00 b

2.2.2 不同浓度激素培养基组合对腋芽诱导愈伤组织的影响 由表 4 可知,以 MS 培养基附加蔗糖 20 g/L 培养金叶榆的腋芽,不同配比的两种激素(6-BA、NAA)诱导培养,从而筛选出较高诱导率的激素浓度。当浓度为 1.0 mg/L 6-BA、0.25 mg/L NAA 时,是最适宜金叶榆腋芽诱导的培养基,腋芽诱导率最高,达到 83.33%(处理 5)。腋芽增殖阶段的培养中,6-BA 浓度为 1.5 mg/L,NAA 浓度为 0.10 mg/L 的增殖率最高,达到 2.28%,是腋芽增殖培养最合适的培养基组合。

表 4 不同浓度激素配比对腋芽诱导愈伤组织的影响

处理	6-BA/(mg/L)	NAA/(mg/L)	诱导率/%	增殖率/%
1	0.5	0.10	42.85	1.40
2	0.5	0.25	75.00	1.33
3	0.5	0.50	50.00	1.13
4	1.0	0.10	42.85	1.46
5	1.0	0.25	83.33	1.26
6	1.0	0.50	50.00	1.26
7	1.5	0.10	60.00	2.28
8	1.5	0.25	71.42	1.80
9	1.5	0.50	42.85	1.40

2.3 金叶榆叶片段外植体的初培养

2.3.1 金叶榆叶片的消毒效果 本试验叶片使用 0.1%的 HgCl₂、75%酒精 30 s 及 7% NaClO₃ 方式进行消毒,随着时间增加,污染率、褐化率和成活率差异性显著($P\leq0.05$)。成活率最高的叶片达到 60%。本试验发现,褐化率随时间越长而增高,但污染率和成活率下降。所以,0.1%的 HgCl₂ 溶液消毒 6 min 效果最佳。

表 5 消毒方式的不同对叶片消毒的影响

药剂	处理时间/min	褐化率/%	污染率/%	成活率/%
0.1%HgCl ₂	2	10.0 c	38.0 a	60.0 a
	4	58.0 b	23.5 b	28.5 b
	6	87.0 a	10.5 c	10.5 c
75%酒精 30s +7%NaClO ₃	4	33.5 b	35.0 a	23.0 a
	6	36.5 b	28.5 b	16.0 b
	8	45.0 a	20.3 c	10.0 c

2.3.2 不同浓度激素培养基组合对叶片诱导愈伤组织的影响 由表 6 可知,不同种类浓度激素的对比对愈伤组织的形成有很大的影响。金叶榆叶片使用是 MS+4.0 mg/L 6-BA+1.00 mg/L NAA,其诱导率最高达到 100%。而处理 2 的诱导结果次之,其采用 1/2MS+1.0 mg/L 6-BA+0.10 mg/L NAA,诱导率达到 93.30%,但其愈伤组织生长速度较慢。

表 6 不同浓度激素培养基组合对叶片诱导愈伤组织的影响

处理	培养基类型	6-BA/(mg/L)	NAA/(mg/L)	诱导率/%
1	1/2MS	0.5	0.05	86.60
2		1.0	0.10	93.30
3		1.5	0.20	61.50
4		2.0	0.50	64.30
5	MS	1.0	4.00	75.00
6		2.0	3.00	84.60
7		3.0	2.00	81.80
8		4.0	1.00	100.00

参考文献:

[1] 段龙飞. 中华金叶榆及其无性系光合特性及抗寒性研究[D]. 保定:河北农业大学,2015.

3 讨论与结论

外植体的消毒,以消毒时间的合理、消毒剂的选
择尤为重要。接种是试验中的关键步骤,有效降低污
染率是试验成功的前提,要求操作人员在操作过程
中细致且有耐心,每接一个外植体之后,都应该用酒
精灯灼烧接种仪器,防止外植体出现大批量的交叉
污染^[7]。植物组织培养中,只有满足它们(组织、器官
等)各自的要求才能使其正常生长^[8]。

在植物组织培养中,外源生长激素对愈伤组织
的诱导起关键性作用。6-BA、IBA 及 NAA 是效果最
好和应用最普遍的激素,对植物生长繁殖有很大的
影响^[9-12]。唐晓杰^[13]研究的金叶榆的组织培养,6-BA
对植株的分化起主要作用。但 6-BA 浓度过高时,会
对组培苗的生长产生抑制作用^[14]。本试验中不断提
高 6-BA 浓度,对金叶榆增殖的影响呈现先增加再
降低的趋势。在本试验中,添加 0.05~0.10 mg/L 的
NAA 时,并没有发现其对金叶榆的生长产生显著促
进影响,是否受到浓度限制还值得深思。王静华^[15]在
研究 MS 培养基能促进植株的茎和叶的生长。愈伤组
织容易变黑,有时会死亡是因为植株所在的环境(培
养基)中,可利用物质已耗尽,并且残留有自身代谢
的有毒物质^[16]。因此,研究金叶榆外植体的诱导和增
殖培养中,用 6-BA、IBA 和 NAA 等激素时,它们的配
比对实验的结果起到关键作用。因条件所限,是否其
他的激素组合更有益于腋芽的诱导,还有待进一步
的研究。

研究金叶榆的组织培养快繁技术,筛选诱导培
养基、激素条件,这为获得大量的金叶榆既节省了时
间也节约了成本,并且解决了引种过程中种子萌发
慢、成活率较低等矛盾。对金叶榆的诱导培养影响较
大的是在培养基中添加外源激素,通过筛选不同激
素组合,可大大缩短了金叶榆从育苗到推广所需的
时间。

[2] 王云云,梁鸣. 中华金叶榆叶色与光照相关性研究[J].
国土与自然资源研究,2014(4):78-80.

- [3] 朱春燕, 宋卫凯. 金叶榆的繁育技术 [J]. 中国农业信息, 2013(11):50.
- [4] 沈军, 吕文娟. 金叶榆不同异型造型繁育技术及园林景观应用[J]. 北京农业, 2015(1):36-37.
- [5] 边景权, 常飞. 金叶垂榆嫁接及其育苗技术[J]. 吉林农业, 2016(17):101.
- [6] 杨秀平, 刘莉丽. 植物组织培养常用基本培养基的数量分析[J]. 西北林学院学报, 2010, 25(1):97-100.
- [7] 徐笑玥. 中华金叶榆嫩枝扦插繁殖技术和生根机理的研究[D]. 沈阳:沈阳农业大学, 2016.
- [8] 赵青, 李造哲, 马青枝, 等. 披碱草×野大麦 F_1 代愈伤组织诱导研究[J]. 草原与草业, 2017(1):18-23.
- [9] 郭秋云, 王萍, 刘兆普. IBA 和 6-BA 浓度对比对诱导大豆下胚轴不定芽的影响 [J]. 大豆科学, 2012, 31(5): 725-730.
- [10] 程志娟, 唐莹莹, 丁亭亭, 等. 生长素和细胞分裂素相互作用调节拟南芥器官发生的分子基础 [C]//全国植物生物学大会论文集. 杨凌: 2012.
- [11] WANG J, LI J, WU X, et al. Assessment of genetic fidelity and composition, mixed elicitors enhance triterpenoids and flavonoids biosynthesis of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. tissue cultures [J]. *Biotechnology & Applied Biochemistry*, 2016, 64(2):211-217.
- [12] 漆信同. 植物生长调节剂在李杏梅生产中的应用[M]. 北京:中国园艺学会, 2008:5.
- [13] 唐晓杰, 孟范例, 程广有. 金叶榆组培快速繁殖技术研究[J]. 北方园艺, 2010(21):156-158.
- [14] 彭言劼, 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.
- [15] 徐宁, 朱建华, 彭宏祥, 等. 龙眼、荔枝杂交苗培育方法 [J]. 农业研究与应用, 2015(1):78-82.
- [16] MAGALLANES N C, CECATI F M, MASCOTTI M L, et al. Plant tissue cultures as sources of new ene- and ketoreductase activities [J]. *Journal of Biotechnology*, 2017, 251:14-20.

(责任编辑 康文钦)