维普资讯 http://www.cqvip.com

三倍体毛白杨组培快繁技术试验研究

梁称福,左家哺,易 诚,范 适,郑意生,李学松

(湖南环境生物职业技术学院,湖南 衡阳 421005)

摘 要:分别以三倍体毛白杨植株腋芽(或顶芽)、嫩叶片、嫩茎段等为材料,进行愈伤组织诱导、芽分化、生根等试验,探讨三倍体毛白杨组培快繁技术。结果表明:①以自然状态植株腋芽(或顶芽)、嫩叶片以及无菌苗叶片在适宜的培养基中,均可产生质量较好的愈伤组织,其中以腋芽(或顶芽)产生愈伤组织的频率最高,达100%;以无菌苗叶片为材料,愈伤组织诱导率为53.3%-80.0%。②以愈伤组织为材料,不定芽分化频率达13.3%-26.7%;无菌苗叶片经20天培养后,每叶片可产生不定芽5-8个;自然状态下嫩茎段在普通培养室与人工气候箱中均可培养出芽,其中前者芽体小、数量多,后者芽体壮而高、数量少。③在1/2MS+NAA0.2mg/L,1/2MS+IAA0.2mg/L,1/2MS+IBA0.2mg/L三个培养基均可诱导生根,生根率均在70.0%以上,其中以1/2MS+NAA0.2mg/L效果最佳。④黄壤土+岩糠灰+河沙按2:1:1配比(体积比)作为三倍体毛白杨组培苗移栽基质,成活率可达92.4%,且生长性状优良。

关键词:三倍体毛白杨;组织培养;快速繁殖

中图分类号:S792.117;S722.3+7 **文献标识码**:B **文章编号**:1000-0275(2007)04-0507-03

Tissue Culture and Rapid Propagation of Triploid Populus tomentosa Carr.

LIANG Cheng-fu, ZUO Jia-bu, YI Cheng, FAN Shi, ZHENG Yi-sheng, LI Xue-song

(Hunan Environment-biological Polytechnic, Hengyang, Hunan 421005, China)

A bsract: Taking sprouts, tender leaves, tender stem-sections of triploid *Populus tomentosa* Carr. for experiment samples respectively, experiments such as callus formation, buds differentiation, rooting were conducted. The results showed as follows: The first, sprouts and tender leaves at natural state and leaves of non-bacteria seedlings were taken explants, quantitive callus could be produced in proper mediums among which production rate in sprouts was the highest, amounting to 100%, and that in non-bacteria seedlings for 53.3%-80.0%. The second, callus were taken samples, differentiation rate of adventitious buds amounted to 13.3%-26.7%; 5-8 buds were produced on a piece of leave of non-bacteria seedlings after 20d's culturing; tender stem-sections at natural state were taken samples, buds could be produced in common culture room and artificial climate room, but the former small and numberal, the latter high and little. The third, rooting rate of tube-seedlings amounted to up to 70% on three mediums including 1/2MS+NAA0.2mg/L, 1/2MS+IAA0.2mg/L, 1/2MS+IBA0.2mg/L among which the former was the best. The forth, tube-seedlings grew well and the transplantation living rate amounted to 92.4% on the ground substance composed of yellow soil, 'long kang' ash and river sand(2∶1∶1 by volume).

Key words: *Populus tomentosa* Carr. triploid; tissue culture; rapid propagation

三倍体毛白杨 Populus tomentosa Carr. 是短周期速生树种,具有生长快、材质白度高、木质含量少、纤维长等优点,非常适合于制浆造纸[1,2],是我国北方及黄河沿岸主要的造林绿化树种。现也在南方诸多省份与地区引种试验成功。目前世界速生丰产林的定向培育方向已由单纯的注重速生丰产转向"定向、速生、丰产、优质、稳定、高效"六个方面并重[3]。三倍体毛白杨(3x)不结种子;扦插繁殖生根困难,成活率低下;嫁接繁殖费工费时。因其苗木繁育困难,从而制约与限制了三倍体毛白杨在生产上的大面积推广。

1 材料与方法

1.1 供试材料

根据不同的培养目的,选择三倍体毛白杨的腋芽(或顶芽)、嫩茎段、嫩叶片、愈伤组织等不同的外植体为试验材料。

1.2 试验设计与方法

1.2.1 愈伤组织诱导试验

(1)以自然状态下植株腋芽或顶芽为外植体:选择采集生长旺盛的植株侧芽或顶芽,用镊子剥去3-4层苞片,然后用饱和洗衣粉溶液浸泡10 min,再用自来水反复冲洗干净。置于70%的医用酒精中浸泡30-40s,然后在0.1%的升汞溶液中消毒13min,经无菌水冲洗4-5次后,接种在①MS+BA0.5,②MS+BA0.5+NAA0.2,③MS+BA0.5+NAA0.2+IAA0.2,④MS+BA1.0,⑤MS+BA1.0+NAA0.2,⑥MS+BA1.0+NAA0.2+IAA0.2,⑦MS+BA0.5+KT0.5+NAA0.2(另加琼脂6g/L,蔗糖30g/L,下同)7个启动培养基上。培养温度为20-25。C,相对湿度为60-70%,光强1500-2000lux,光照时间8-10h。

(2)以自然状态下植株嫩叶片为外植体:采集生长旺盛的植株嫩叶片,经用饱和洗衣粉溶液浸泡5-8 min,自来水充分冲洗干净后,用70%的医用酒精浸泡30-40s,然后在0.1%的升汞溶液中消毒8-10min,经无菌水冲洗5-6次后,用刀片划破,接种在⑧MS+BA0.5+KT0.4+NAA0.2+Ad25.0启动培养基上。分别置于普通培养室(温度25±3·C,湿度60%-70%,光

基金项目:湖南环境生物职业技术学院院长科研基金"名贵花木快速繁殖及无土栽培配套技术研究与开发"(编号:Z-04-08)。

作者简介:梁称福(1969—),男,江西于都人,副研究员,硕士,研究方向为有机农业、设施农业、农业生物技术。

收稿日期:2007-03-22;**修回日期**:2007-05-17

维普资讯 http://www.cqvip.com

强200-500lux,时间10-12h)和人工气候箱(温度25°C,湿度70%,光强4450lux,时间10hr;温度20。C,湿度60%,光照0,时间14h)培养。

(3)以无菌苗植株叶片为外植体。把无菌苗叶片切割成0.5cm×0.5cm小块,接种到①MS+BA0.5,⑦MS+BA0.5+KT0.5+NAA0.2,⑥MS+BA1.0+NAA0.2+IAA0.2三个培养基中,每瓶3块。培养条件同1.2.1(1)。

1.2.2 不定芽分化试验

(1)以愈伤组织为材料:把愈伤组织切割成0.5cm×0.5cm小块,接种到①MS+BA0.5,⑦MS+BA0.5+KT0.5+NAA0.2,⑥MS+BA1.0+NAA0.2+IAA0.2三个培养基中,每瓶3块。培养方法同1.2.1(1)。

(2)以无菌苗植株叶片为材料:以⑧MS+BA0.5+KT0.4+NAA0.2+Ad25.0为培养基,把叶片切割成0.5cm×0.5cm小块后接种,每瓶3块。培养方法同1.2.1(1)。

(3)以自然状态下植株嫩茎段为材料:按1.2.1(2)方法进行外植体采集、消毒、接种与培养,以⑧MS+BA0.5+KT0.4+NAA0.2+Ad25.0为培养基。

1.2.3 生根试验

分别以⑨1/2MS+NAA0.2,⑩1/2MS+IAA0.2,⑪1/2MS+IBA0.2为生根培养基,每处理转接10瓶,每瓶接3-4cm长、生长健壮的芽苗1株。培养方法同1.2.1(1)。

1.2.4 移栽基质配比试验

以"黄壤土+砻糠灰+河沙"为移栽基质,分别按3:1:1、2:1:1、1:1:1(体积比)进行配比,共3个配方。每配方移栽60株。

1.3 调查与测定项目、方法

依不同的培养试验及其不同的试验目的,分别调查与测定污染率、愈伤组织生长情况、愈伤组织诱导率、形成不定芽的频率等指标。试管苗移栽35d后调查成活率,观测记载株高、叶片数、叶色等生长性状。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织诱导试验

2.1.1 以自然状态下植株腋芽或顶芽为外植体 以自然状态下植株腋芽或顶芽为外植体,污染较为严重,污染率在40.0%-60.0%范围。经过试验观察,在接种后1个月,仍有污染现象发生,由此可以初步推断,腋芽或顶芽内有内生菌污染。在①-⑦号培养基中培养,均可诱导出愈伤组织。从生长速度、颜色、质地等指标性状加以综合考虑,其中尤以⑦号培养基最佳,愈伤组织致密、深绿色,分化成芽的能力相对较强;③、⑥号次之;接下来要数②、⑤号,愈伤组织也较为致密、绿色;①、④号培养基不太适合,其诱导的愈伤组织质地疏松、颜色泛红(表1)。

表1 自然状态下植株腋芽或顶芽诱导愈伤组织状况

培养基组成	接种瓶数	污染瓶数	污染率(%)	接种65d后愈伤组织生长情况		
				大小(cm×cm)	颜色	质地
MS+BA0.5	30	16	53.3	0.80×0.65	淡红色	疏松
MS+BA0.5+NAA0.2	30	14	46.7	0.85×0.68	绿色	较致密
MS+BA0.5+NAA0.2+IAA0.2	30	17	56.7	0.81×0.67	黄绿色	致密
MS+BA1.0	30	18	60.0	1.00×0.77	红绿色	疏松
MS+BA1.0+NAA0.2	30	15	50.0	1.01×0.76	绿色	较致密
MS+BA1.0+NAA0.2+IAA0.2	30	14	46.7	0.76×0.67	褐绿色	致密
MS+BA0.5+KT0.5+NAA0.2	30	12	40.0	1.15×0.83	深绿色	致密

2.1.2 以自然状态下植株嫩叶片为外植体 试验结果表明,以自然状态下植株嫩叶片为外植体接种在⑧号培养基中,在普通培养室与人工气候箱中培养,均可产生致密、绿色的愈伤组织,说明该培养基适合于以嫩叶片为外植体的愈伤组织诱导(表2)。

表2 自然状态下植株嫩叶片诱导愈伤组织状况

培养基	外植体	培养条件	培养35d后生长状况
MS+BA0.5+KT0.4+NAA0.2+Ad25.0	经划破数刀的嫩叶片	温度25℃,湿度70%,光照4450lux,时间10h;温度20℃,湿度60%,光照0,时间14h(人工气候箱内培养)	叶片卷曲,产生致密、绿色的愈伤组织
MS+BA0.5+KT0.4+NAA0.2+Ad25.0	经划破数刀的嫩叶片	温度25±3℃,湿度60-70%,光照强度200-500lux,光照时间10-12h	叶片卷曲,产生致密、绿色的愈伤组织

2.1.3 以无菌苗植株叶片为外植体 利用无菌苗植株叶片诱导愈伤组织,诱导率较高,达到53.3%-80.0%,可避免外植体接种诱导愈伤组织途径而造成污染,为切实可行的诱导到方法,值得在毛白杨组培实践中推广应用(表3)。

表3 无菌苗植株叶片诱导愈伤组织状况(接种后60d)

诱导培养基	接种外植体(无菌苗叶片)数	形成愈伤组织块数	诱导率(%)
MS+BA0.5	15	8	53.3
MS+BA0.5+KT0.5+NAA0.2	15	12	80.0
MS+BA1.0+NAA0.2+IAA0.2	15	10	66.7

2.2 不定芽分化试验

2.2.1 以愈伤组织为材料 愈伤组织在①⑦⑥三个不定芽分化培养基中,形成不定芽频率均较低,其中尤以⑥号培养基最低(13.3%),⑦号培养基最高(26.7%)(表4)。

2.2.2 以无菌苗植株叶片为材料 取无菌苗植株叶片接种在培养基中,20d后调查发现,有大量的不定芽产生,每叶片可产生5-8个不定芽。

2.2.3 以自然状态下植株嫩茎段为材料 把带1-2个芽、长度为1.0-1.5cm的嫩茎段接种在⑧号培养基中,置于普通培养室与人工气候箱中培养,均可产生(或分化)出芽。培养35天后调查发现,前者产生的芽体较小(0.5-1.0cm),数量多,并由非腋芽处产生;而后者产生的芽体苗壮,平均高达5.2cm,且均为腋芽处着生(表5、图1)。

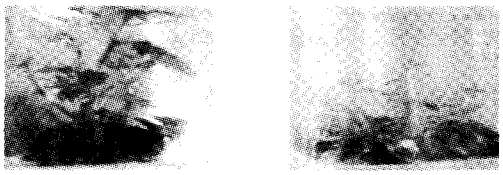
表4 愈伤组织分化不定芽状况(接种后45d)

分化培养基	接种愈伤组织块数(块)	形成不定芽的愈伤组织块数(块)	平均每块愈伤组织产生的不定芽数(个)	形成不定芽的频率(%)
MS+BA0.5	30	5	3	16.7
MS+BA0.5+KT0.5+NAA0.2	30	8	6	26.7
MS+BA1.0+NAA0.2+IAA0.2	60	8	2	13.3

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 5　自然状态下植株嫩茎段分化不定芽状况(35d)

培养基	外植体	培养条件	培养 35d 后生长状况
MS+BA0.5+KT0.4+NAA0.2+Ad25.0	带 1-2 个芽，长度为 1.0-1.5cm 的嫩茎段	温度 25℃,湿度 70%,光照 4450lux,时间 10h;温度 20℃,湿度 60%,光照 0,时间 14h(人工气候箱内培养)	苗壮,叶绿色,苗高 5.2cm,4 个嫩枝,均由腋芽处着生
MS+BA0.5+KT0.4+NAA0.2+Ad25.0	带 1-2 个芽，长度为 1.0-1.5cm 的嫩茎段	温度 25±3℃,湿度 60%-70%,光照强度 200-500lux,光照时间 10-12h	由嫩茎段(非腋芽处)产生多个芽,但芽体较小(0.5-1.0cm)



a.人工气候箱培养　　b.普通培养室培养

图 1　自然状态下植株嫩茎段分化不定芽状况(35d)

2.3 生根试验

在转接后第 8d,的生根率分别为 40%、70%、0。在转接后第 15d,生根情况见表 5。从中可以看出,所设置的 3 个培养基均可诱导生根，生根率均在 70.0%以上。其中以 1/2MS+NAA0.2 效果最佳,1/2MS+IAA0.2 次之,1/2MS+IBA0.2 最次(表 6、图 2)。

表 6　无菌苗生根状况(转接后 15d)

培养基	平均单株总根长(cm)	平均单株根数(条)	平均单株单根长(cm)	生根率(%)	生根质量
1/2MS+NAA0.2	13.2	12.0	1.02	85.7	白色,有气生根
1/2MS+IAA0.2	10.0	8.4	0.77	71.4	白色,有气生根
1/2MS+IBA0.2	4.3	5.0	0.81	71.4	白色

图 2　试管苗生根培养

2.4 移栽基质配比试验

从移栽成活率、株高、叶片数、叶色等综合性状来考虑,黄壤土+砻糠灰+河沙按 2:1:1 配比(体积比)用于三倍体毛白杨组培苗移栽最为合适(表 7)。

表 7　不同基质配比苗子移栽成活率与生长状况(移栽后 35d)

基质配比	移栽成活率(%)	株高(cm)	叶片数(片)	叶色
3:1:1	80.5	10.8	12.0	浅绿色
2:1:1	92.4	12.3	15.6	深绿色
1:1:1	78.0	8.5	13.2	浅绿色

3 讨论与结语

3.1 本试验以自然状态下植株腋芽(或顶芽)、嫩叶片、嫩茎段以及无菌苗等为材料,经愈伤组织诱导途径、不定芽途径等多条途径,系统开展组培快繁技术研究,具有较为重要的科学价值和明显的现实意义。

3.2 试验结果表明，取无菌苗植株叶片接种在 MS+BA0.5+KT0.4+NAA0.2+Ad25.0 培养基中,可产生大量的不定芽(每叶片可产生 5-8 个不定芽)，这为三倍体毛白杨组培快繁技术流程中的继代增殖提供了捷径。但限于条件,本试验未对直接由叶片产生的不定芽植株的遗传性状及染色体倍性进行鉴定。

3.3 从遗传种性稳定、培养速度快、出苗率高、培养成本低廉等综合因素考虑,最适合三倍体毛白杨组培快繁的技术流程是:以三倍体毛白杨植株嫩茎段为材料→0.1%的升汞溶液中消毒 8-10min,再用无菌水冲洗 5-6 次→接种在 MS+BA0.5+KT0.4+NAA0.2+Ad25.0 培养基中→置于普通培养室(温度 25±3℃,湿度 60-70%,光照强度 1500-2000lux,光照时间 10-12h)或人工气候箱(温度 25℃,湿度 70%,光照 4450lux,时间 10h;温度 20℃,湿度 60%,光照 0,光照时间 14h)培养→在 MS+BA0.5+KT0.4+NAA0.2+Ad25.0 培养基,普通培养室(温度 25±3℃,湿度 60%-70%,光照强度 1500-2000lux,光照时间 10-12h) 中继代培养→1/2MS+NAA0.2 培养基中生根培养 25-30d→在温室炼苗 15-20d→移栽到黄壤土+砻糠灰+河沙(按 2:1:1 体积配比)混合基质中→常规田间管理→出苗。

参考文献:

[1] 姚春丽,蒲俊文.三倍体毛白杨化学组分纤维形态及制浆性能的研究[J].北京林业大学学报,1998,20(5):18-21.

[2] 邢善湘.7 个杂种毛白杨无性系幼龄材化学成分和纤维形态的研究[J].北京林业大学学报,1994,16(1):53-56.

[3] Zobel B J , Buijtenen J P . Wood variation:Its causes and control[J].Berlin:Speringer-verlag,1989:32-48.