

抗病虫毛白杨组织培养快速繁殖技术

马铁山¹, 郝改莲¹, 王晓军² (1. 河南省濮阳职业技术学院, 河南濮阳 457000; 2. 河南省濮阳市园林处, 河南濮阳 457000)

摘要 采用组织培养技术研究了三倍体毛白杨快速繁殖的生产流程, 设计出诱导外植体分化、继代增殖、诱导生根较适宜的培养基配方。

关键词 毛白杨; 组培快繁; 研究

中图分类号 Q943.1 **文献标识码** B **文章编号** 0517-6611(2007)01-0086-02

Technology of Tissue Culture and Rapid Propagation of Triploid White Poplar

MA Tie-shan et al (Puyang Professional and Technical College, Puyang, Henan 457000)

Abstract The production flow of rapid propagation of triploid white poplar with tissue culture was studied. The optimum medium composition for inducing differentiation, shoot proliferation and rooting was pointed out.

Key words White poplar; Tissue culture and rapid propagation; Study

为了满足濮阳市大型造纸企业林纸一体化工程对木材的需求, 2004 年从山东农业大学引进了转基因优良杨树新品种——三倍体毛白杨(青杨派)。该品种除了具有生长快、抗盐碱和抗病虫等优点外, 还具有树型美观、木质纤维含量高、等优良性状。通过组培快繁, 可获得优质造纸苗木, 使濮阳市乃至全省造纸工业走上可持续发展的良性轨道。

1 材料与方法

1.1 无菌材料的获得 采集 1 年生三倍体毛白杨幼嫩枝条, 剪取 4~5 cm 带腋芽茎段, 先用自来水冲洗数遍, 再用蒸馏水冲洗 3 遍, 用无菌水冲洗 3 遍, 用 70% 酒精消毒 10~30 s, 用 0.1% 氯化汞消毒 5~10 min, 无菌水冲洗 6~8 次, 最后用吸水纸吸干。

1.2 试管苗芽诱导和分化培养基的筛选 剪取三倍体毛白杨茎尖或长 1.5 cm 左右带一个腋芽茎段, 接种在芽诱导和分化培养基上, 观察其生长分化情况。芽诱导、分化培养基 M₁ 组成为 KNO₃ 1 025 mg/L、KH₂PO₄ 350 mg/L、(NH₄)₂SO₄ 170 mg/L、MgSO₄·7H₂O 470 mg/L、CaCl₂ 80 mg/L; M₂ 组成为 M₁ 大量元素减半, 并加微量元素, 即 1/2 M₁ + KI 83 mg/L、H₃BO₃ 620 mg/L、MnSO₄·4H₂O 2 230 mg/L、ZnSO₄·7H₂O 860 mg/L、Na₂MoO₄·2H₂O 25 mg/L、CuSO₄·5H₂O 25 mg/L、CoCl₂·6H₂O 25 mg/L; M₃ 组成为 M₂ + NAA 0.01 mg/L; M₄ 组成为 M₂ + 6-BA 0.3 mg/L + NAA 0.05 mg/L; CK 为 MS 培养基。上述 5 种培养基均加入蔗糖 20 g/L、琼脂 7 g/L, pH 值 5.8~6.2, 光照 13 h/d, 光照强度 2 000 lx, 温度 (25±2)℃。

1.3 试管苗生根培养基的筛选 将试管苗剪成长 1.5 cm 带芽茎段, 转移到不同种类的生根培养基中, 观察生根情况。生根培养基 M₁ 组成为 KNO₃ 1 025 mg/L、KH₂PO₄ 350 mg/L、(NH₄)₂SO₄ 170 mg/L、MgSO₄·7H₂O 470 mg/L、CaCl₂ 80 mg/L; M₂ 组成为 M₁ 大量元素减半, 并加微量元素, 即 1/2 M₁ + KI 83 mg/L、H₃BO₃ 620 mg/L、MnSO₄·4H₂O 2 230 mg/L、ZnSO₄·7H₂O 860 mg/L、Na₂MoO₄·2H₂O 25 mg/L、CuSO₄·5H₂O 25 mg/L、CoCl₂·6H₂O 25 mg/L; M₃ 组成为 M₂ + IBA 0.4 mg/L; M₄ 组成为 M₂ + V_{B1} 10 mg/L + IBA 0.3 mg/L; CK 为 MS 培养基。上述 5 种培养基均加入蔗糖 30 g/L、琼脂 7 g/L, pH 值 5.8~6.2。

1.4 三倍体毛白杨组织培养快速繁殖的生产流程

1.4.1 切繁方法。用灭过菌的手术剪将试管分化苗单节切段, 将带芽切段放入新广口瓶培养基, 每瓶放 1~2 节段, 用镊子将其插在培养基上, 最后放在培养室培养。

1.4.2 继代培养。20 d 后当试管苗长到 10 cm 左右, 叶片达 4~7 片叶或者分化出来的新芽长到 3~5 cm 时, 就可以进行扩繁。将试管苗剪切成 1.5 cm 长、带 1 个腋芽的茎段接种于分化培养基上, 继代几次后将长势强健的分化苗剪切成茎段接种到生根培养基, 试管苗一般每隔 30 d 可继代 1 次, 每年实际可继代 8~10 次, 扩繁倍数为 4~5 倍, 按最低继代次数计, 扩繁速率达 4⁸。也就是说, 每株试管苗经一年扩繁后可 65 536 株。为延长试管苗使用寿命, 可在扩繁初期分出一部分苗, 转入保存用培养基, 并给予有利的保存条件, 每 6~8 个月切转一次苗, 这样可大大减少周转次数及污染机率。生长 40 d 后的试管苗, 根系粗壮, 植株强健, 可移栽到珍珠岩和营养土中炼苗。

1.4.3 炼苗和移栽。组培实验室提供的试管苗叶片表面的蜡质层不厚, 一般不能适应外界环境。若直接移栽大田, 则容易失水, 甚至萎蔫致死。因此, 在移栽前要对试管苗进行驯化炼苗。炼苗就是将幼苗自实验室移植到自然状态的过程。

1.4.3.1 自然炼苗。将试管苗从人工培养室取出, 置于普通工作房间, 自然存放 2 d 后揭开瓶盖, 继续炼苗 3 d, 然后取出移栽于营养钵。

1.4.3.2 温室大温差炼苗。将试管苗从人工培养室取出, 置于日光温室内, 试管瓶间距 10 cm, 通过揭盖草苫、调节防风口, 逐渐增加光照、拉大昼夜温差, 4~5 d 后试管苗变得粗壮, 叶色变深。打开试管瓶盖, 注入 1~2 cm 无菌水, 炼苗期间每天应根据试管蒸发量注入适量无菌水, 始终保持 1~2 cm 无菌水层, 以保护培养基, 控制杂菌污染。揭开瓶盖后继续加大通风、拉大昼夜温差, 增强试管苗的适应性, 2~3 d 结束炼苗。

2 结果与分析

2.1 芽诱导培养 将灭菌茎段接种到芽诱导和分化培养基上, 4 d 后就能看出茎段腋芽萌动; 7 d 后茎段生长 2~3 cm, 茎段切口处膨大, 出现愈伤组织; 18 d 后相继出现 1~5 个新芽, 有的可生长至 1.5~2.0 cm, 茎尖颜色逐渐变绿。

2.2 不同培养基处理对三倍体毛白杨苗生长分化的影响 将新产生的腋芽茎段接种到分化培养基上, 培养 15~20 d。

作者简介 马铁山(1963-), 男, 河南濮阳人, 副教授, 从事植物组织培养方面的研究。

收稿日期 2006-08-12

表1表明,M₁、M₂、M₃、M₄4个处理中,植株生长均比较好。与对照相比,生长在M₁和M₂培养基上植株的各种参数差别不大;生长在M₃、M₄培养基上植株的各种参数均优于对照株,尤其新芽分化数目多,颜色逐渐变绿,芽体生长快速、健壮;M₄植株颜色深绿,其生长略优于M₃。因此,M₄培养基比较适宜青杨芽体的诱导分化。

表1 培养15~20 d后三倍体毛白杨苗生长分化情况				
	苗高//cm	叶数//片	新芽数//个	生长情况
CK	6.7	5	0	良好
M ₁	5.3	4	0	良好
M ₂	7.2	6	0	健壮
M ₃	7.3	6	3	健壮
M ₄	10.4	8	5	特别健壮

2.3 不同培养基处理对三倍体毛白杨苗生根的影响 将长势强健的分化苗剪切成茎段,接种到生根培养基。

表2表明,M₁、M₂、M₃、M₆4个处理中,植株长势均比较好。与对照相比,生长在M₁和M₂培养基上植株的各种参数差别不是很大;生长在M₃、M₆培养基上的植株有根系发育,尤其在M₆培养基上14 d左右就能看到白色呈辐射排列的根,30 d后即可生根3~6条,根长可达2~6 cm,根系发达,根多、粗壮,植株深绿,植株生长特别健壮。因此,M₆培养基比较适宜三倍体毛白杨根系的诱导。

表2 三倍体毛白杨苗生根情况				
	苗高//cm	根长//cm	根数//条	生长情况
CK	7.2	0	0	良好
M ₁	6.8	0	0	良好
M ₂	8.0	0	0	健壮
M ₃	10.8	1.95	3.7	健壮
M ₆	11.9	2.36	6.5	特别健壮

2.4 移栽前炼苗对三倍体毛白杨试管苗成活率的影响 表3表明,与不炼苗相比,自然炼苗成活率0.05水平显著低于不炼苗;温室大温差炼苗成活率0.05水平显著高于不炼

苗。试验发现自然炼苗培养基污染严重,有的培养基有霉层出现,有的培养基出现不规则凹陷,有的培养基出现片状稀释,这些都是真菌或细菌侵染在培养基上的典型症状。温室大温差炼苗利用无菌水保护培养基,抑制生物侵染。所以,自然炼苗成活率低的原因是生物侵染。控制炼苗过程中培养基和环境污染是提高成活率的基础。

表3 成活率 %			
	副处理	成活率	显著水平
自然炼苗	冲根	27.0	A
	不冲根	62.3	B
温室大温差炼苗	冲根	79.0	C
	不冲根	93.3	D
不炼苗(CK)	冲根	63.2	B
	不冲根	78.3	C

2.5 移栽时冲根与不冲根对三倍体毛白杨试管苗成活率的影响 表3表明,冲根处理的成活率均低于不冲根处理,其中温室大温差炼苗+不冲根处理成活率最高,为93.3%。该处理是最优组合。根系所带培养基中营养物质可在基质中继续发挥作用,有利于根系发育;温室大温差炼苗见光早,昼夜温差大,养分积累多,可以增强幼苗适应能力。自然炼苗+冲根为最差组合,成活率仅为27.0%。该处理成活率较低的原因主要有3个方面:①冲根处理损伤植株根系中的根毛,降低吸收功能;②炼苗过程中养分消耗较多;③炼苗和冲根过程中易遭受机械损伤和生物侵袭。

三倍体毛白杨试管苗不冲根直接移入无土基质营养钵后,移栽小拱棚内,喷保护性杀菌剂,杀菌消毒,然后覆盖塑料薄膜和遮阳网。驯化后移植成活率可以达到90%以上。

参考文献

[1] 姜秀芳, 张改英, 田炜, 等. 芋茎尖分生组织培养研究[J]. 园艺学报, 2004, 31(3): 466.

[2] 张剑侠, 王跃进, 周鹏, 等. 中国野生葡萄的快速繁殖[J]. 园艺学报, 2004, 31(1): 90-93.

[3] 陈有民. 园林树木学[M]. 北京: 中国林业出版社, 1990: 561-562.

(上接第79页)

2.3 叶面积指数变化规律 表4表明,叶面积指数随密度增加而增加,而且随着玉米的生长叶面积指数逐渐增加。在出苗后50 d左右叶面积指数达到最大值,以后又逐渐降低,但降低速度比较慢,保证了生育后期有较大的叶面积,这是郑单958高产的重要生理基础。

表4 郑单958叶面积指数										
处	出苗后天数//d									成熟期
理	10	20	30	40	50	60	70	80	90	
①	0.05	0.35	0.99	2.34	2.67	2.65	2.63	2.61	2.47	2.27
②	0.08	0.41	1.25	3.28	3.79	3.69	3.66	3.65	3.30	3.19
③	0.10	0.51	1.60	4.22	5.07	4.94	4.90	4.79	4.49	4.32
④	0.13	0.68	2.11	4.98	6.05	5.89	5.81	5.76	5.08	4.66
⑤	0.16	0.95	2.72	5.85	6.36	6.28	6.03	5.85	5.10	4.83
⑥	0.21	1.28	3.56	7.06	7.81	7.38	7.19	6.89	6.15	5.40

2.4 干物质积累变化规律 表5表明,随着密度增加,干物质积累量逐渐增加。随着玉米的生长,干物质积累量逐渐增加,生育前期增加速度快,生育后期仍不断增加,这有利于玉米穗的形成和后期籽粒灌浆。干物质积累量大是郑

单958高产的重要物质基础。

表5 郑单958干物质积累测定结果 kg/hm ²										
处	出苗后天数//d									成熟期
理	10	20	30	40	50	60	70	80	90	
①	24	223	1 014	3 024	5 709	6 975	8 689	9 751	14 476	14 900
②	32	316	1 442	4 296	8 134	8 632	9 853	11 881	17 488	18 080
③	46	486	1 898	5 453	9 932	10 654	11 846	15 795	19 194	20 302
④	61	602	2 299	6 481	10 018	11 755	13 221	17 845	22 061	23 950
⑤	66	672	2 552	7 268	11 216	12 231	14 638	18 669	23 825	27 785
⑥	75	797	2 803	7 360	12 859	13 846	16 335	19 894	27 356	30 830

3 小结与讨论 郑单958是一个高产、稳产玉米新品种,在高肥水条件下能充分发挥其增产潜力。在超高产栽培中应选用75 000~90 000株/hm²的种植密度。

参考文献

[1] 赵致, 张荣达, 吴盛黎, 等. 紧凑型玉米高产栽培理论与技术研究[J]. 中国农业科学, 2001, 34(5): 537-543.

[2] 刘文成, 马瑞霞. 河南省玉米免耕法栽培技术研究[J]. 玉米科学, 2000, 8(2): 41-42.

[3] 南京农学院. 田间试验与统计分析[M]. 北京: 农业出版社, 1978.