

新西伯利亚黑杨组培再生体系的建立

赵凌泉,徐连峰,史绍林,吴长江

(黑龙江省森林与环境科学研究院,黑龙江 齐齐哈尔 161005)

摘 要:以新西伯利亚黑杨叶片为外植体,建立了再生体系。筛选出组织培养的最适外植体愈伤组织诱导的最佳培养基配方为 $1/2 \text{ MS} + 6\text{-BA} 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA} 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;芽诱导的最佳培养基配方是 $1/2 \text{ MS} + 6\text{-BA} 0.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA} 0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;生根诱导的最佳培养基配方为 $1/2 \text{ MS} + 6\text{-BA} 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA} 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

关键词:新西伯利亚黑杨;组培;再生体系

中图分类号:S722.37

文献标识码:A

Establishment of Tissue Culture Regeneration System for *Populus nigra* × *Populus pyramidalis*

ZHAO Ling-quan, XU Lian-feng, SHI Shao-lin, WU Chang-jiang

(Academy of Forest and Environment of Heilongjiang Province, Qiqihar 161005, Heilongjiang, China)

Abstract: Leaves of *Populus nigra* × *Populus pyramidalis* were used as explants to set up regeneration system. The optimal medium formula ($1/2 \text{ MS} + 6\text{-BA} 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA} 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) which is suitable to callus inducement for explant was screened out. The optimal medium formula of bud induction is $1/2 \text{ MS} + 6\text{-BA} 0.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA} 0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. The optimal medium formula of root induction is $1/2 \text{ MS} + 6\text{-BA} 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA} 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

Key words: *Populus nigra* × *Populus pyramidalis*; tissue culture; regeneration system

新西伯利亚黑杨(*P. nigra* × *P. pyramidalis*),是2004年由黑河市林科所从俄罗斯新西伯利亚地区引进的耐高寒杨树品种,它具有速生、抗寒、抗旱、耐瘠薄等特点,是干旱、半干旱高寒地区不可多得的用材林、防护林树种。几年来,通过大量的试验研究,从愈伤组织诱导、继代扩繁、生根培养等方面均取得成功,并建立起稳定的组织培养再生体系,为进一步开展耐寒基因的提取和重组,培育新品种提供了材料和基础。

1 愈伤组织诱导培养基筛选

1.1 试验方法

将引入的新西伯利亚黑杨的枝条短截成30~40 cm,室温下水培,20~30 d后休眠枝长出新鲜嫩叶,待叶片长到一定大小后,相对比较成熟,作为供试的外植体材料。

将叶片放在盛有清水的三角烧杯中,用自来水

反复冲洗3~5次,淋干水分后,用75%的酒精溶液浸10~20 s,然后用0.1%的 HgCl_2 溶液灭菌3~5 min,而后用无菌水冲洗3~4次,淋干水分后在超净台上沿主脉剪成1 cm × 1 cm见方的叶块,在无菌操作台上,接种在配制好的愈伤组织诱导培养基上。

针对新西伯利亚黑杨选择 $1/2\text{MS}$ 作为基本培养基,加入不同浓度的细胞分裂素和生长素,进行嫩叶愈伤组织诱导试验。具体配方如下(只是从许多的配方中筛选出10个列出):

- (1) $1/2 \text{ MS} + \text{BA} 0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA} 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;
- (2) $1/2 \text{ MS} + \text{BA} 0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA} 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;
- (3) $1/2 \text{ MS} + \text{BA} 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA} 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;
- (4) $1/2 \text{ MS} + \text{BA} 0.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA} 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;
- (5) $1/2 \text{ MS} + \text{BA} 0.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA} 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;
- (6) $1/2 \text{ MS} + \text{BA} 0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA} 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;
- (7) $1/2 \text{ MS} + \text{BA} 0.9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA} 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;
- (8) $1/2 \text{ MS} + \text{BA} 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA} 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;
- (9) $1/2 \text{ MS} + \text{BA} 1.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA} 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;
- (10) $1/2 \text{ MS} + \text{BA} 1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA} 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

每个配方接种外植体20块,分别接种在20个装有培养基的三角瓶中,每瓶接种外植体1块,放于24~26℃培养室内培养,光照时间设定为14 h。

收稿日期:2008-08-26

基金项目:黑龙江省科技计划项目(GB06B303-7)

作者简介:赵凌泉(1963-),男,辽宁凌源人,大学,研究员级高级工程师,现从事园林花卉组织培养研究。

d⁻¹,光照强度设定为 2 000 lx 左右。

1.2 试验结果

表 1 不同培养基对愈伤组织形成的影响

培养基编号	接种块数(块)	最初形成时间(d)	组织块直径(cm)
(1)	40	25	0.2
(2)	40	22	0.4
(3)	40	20	0.6
(4)	40	17	0.7
(5)	40	15	0.7
(6)	40	15	1.0
(7)	40	15	1.3
(8)	40	17	1.7
(9)	40	16	0.5
(10)	40	—	—

试验结果(表 1)表明,以 1/2 MS 为基本培养基,加入 6-BA 和 NAA,在不同浓度配比下均可产生愈伤组织(6-BA 在 1.2 mg · L⁻¹以下),但效果却大不相同。以(8)号培养基即 1/2 MS + BA1.0 mg · L⁻¹ + NAA0.5 mg · L⁻¹培养基愈伤组织形成最早,且愈伤组织生长最快。为此,得出新西伯利亚黑杨叶片愈伤组织诱导的最佳培养基配方为:1/2 MS + 6-BA1.0 mg · L⁻¹ + NAA0.5 mg · L⁻¹。经诱导试验后,得到的愈伤组织供进一步继代培养、生根等试验。

2 芽诱导培养基筛选

2.1 试验方法

当愈伤组织生长到一定阶段后,将其转入芽诱导培养基中,诱导不定芽形成。在培养基中加入适量的细胞分裂素(6-BA 等),使接种的愈伤组织形成丛生芽。参考一些黑杨组织培养诱芽试验,设计了许多试验配方,这里仅举出 10 个配方进行说明:

- (1) 1/2 MS + BA0.1 mg · L⁻¹ + NAA0.25 mg · L⁻¹;
- (2) 1/2 MS + BA0.2 mg · L⁻¹ + NAA0.25 mg · L⁻¹;
- (3) 1/2 MS + BA0.3 mg · L⁻¹ + NAA0.25 mg · L⁻¹;
- (4) 1/2 MS + BA0.4 mg · L⁻¹ + NAA0.25 mg · L⁻¹;
- (5) 1/2 MS + BA0.5 mg · L⁻¹ + NAA0.25 mg · L⁻¹;
- (6) 1/2 MS + BA0.6 mg · L⁻¹ + NAA0.25 mg · L⁻¹;
- (7) 1/2 MS + BA0.7 mg · L⁻¹ + NAA0.25 mg · L⁻¹;
- (8) 1/2 MS + BA0.8 mg · L⁻¹ + NAA0.25 mg · L⁻¹;
- (9) 1/2 MS + BA0.9 mg · L⁻¹ + NAA0.25 mg · L⁻¹;
- (10) 1/2 MS + BA1.0 mg · L⁻¹ + NAA0.25 mg · L⁻¹。

2.2 试验结果

将经过诱导形成的愈伤组织接种于上述培养基中,放于 25 ~ 27 ℃ 培养室中培养,光照时数保持 14 h · d⁻¹,光照强度控制在 1 500 ~ 2 000 lx,每天观察记录,大约 10 d 左右,部分愈伤组织上开始出现芽点,最初为浅绿色的小豆点(或突起),然后分化出较尖的芽原基突起,几天后长出嫩芽并分化出幼小

叶子,大约 20 d 时,形成完整的不定芽,40 d 左右不定芽高度可达 1.5 ~ 3 cm,结果见表 2。

表 2 不同培养基对丛生芽形成的影响

培养基编号	接种块数(块)	芽分化率(%)	不定芽数(个)
(1)	40	15.0	1.6
(2)	40	24.2	4.5
(3)	40	63.7	5.7
(4)	40	100	8.4
(5)	40	100	11.2
(6)	40	100	14.5
(7)	40	100	10.3
(8)	40	100	8.0
(9)	40	87.6	5.1
(10)	40	53.3	2.7

表 2 表明,以 1/2 MS 为基本培养基,含有 0.25 mg · L⁻¹的 NAA 时,当 6-BA 浓度在 0.4 ~ 0.8 mg · L⁻¹时,愈伤组织的芽分化率达 100%,而且每个愈伤组织块产生 8 个以上的不定芽;当 6-BA 浓度过高或过低时不定芽分化率最高才达到 87.6%,而平均每块愈伤组织可产生不定芽最多仅为 5.7 个。在一定范围内,愈伤组织再生不定芽的数量与 6-BA/NAA 的比值有十分密切的关系,与其他黑杨品种或品系不同,当比值为 2.4 时,新西伯利亚黑杨愈伤组织芽分化率及每块愈伤组织平均产生的不定芽的数量均达到最大值。比较表明,以(6)号培养基为最佳,不但形成不定芽的数量最多,而且苗高、芽壮。由此确定新西伯利亚黑杨愈伤组织芽诱导的最佳培养基配方是 1/2 MS + 6-BA0.6 mg · L⁻¹ + NAA0.25 mg · L⁻¹。

3 组培苗的继代培养

3.1 试验方法

我们在研究新西伯利亚黑杨继代扩繁时采用愈伤组织继代的方法。

新西伯利亚黑杨组织块经过 30 ~ 40 d 的培养即可分化出大量的不定芽,将这些新芽剪掉后接种在生根培养基上,进行繁育组培苗,剩余的外植体重新分割进行继代培养,以扩大繁殖规模,直至满足繁殖需要为止。当外植体重新接到增芽培养基上时,愈伤组织块继续生长并重新分化出大量的不定芽。

3.2 试验结果

试验表明,继代扩繁的效果与选用的材料密切相关,与其他杨树品种不同,新西伯利亚黑杨利用愈伤组织两次继代后,产生明显的褐化现象,且呈颗粒状,非常疏松,分化率低,有的不分化。而利用无菌瓶苗的叶片诱导的愈伤组织芽分化率及产生的不定芽的数量均很多,结果见表 3。

在继代扩繁中,采用无菌瓶苗叶片诱导新愈伤组织,进行分化不定芽的方法来迅速增加繁殖体的

数量,效果很好。

表 3 不同愈伤组织对继代效果的影响

愈伤组织	接种块数 (块)	芽分化率 (%)	不定芽数 (个)	组织块状况	褐化
无菌叶片 诱导	40	100	14.2	团状紧实	无
不定芽分 化后	40	74.2	9.5	粒状疏松	有

4 组培苗诱导生根试验

生根培养是在完成芽诱导后对于培养出的无根苗诱导生根的过程,同时使苗继续生长。一般 1.5~2 cm 高的苗即可转入生根培养基。由于在芽诱导阶段,芽的生长往往受到较高浓度的细胞分裂素的抑制,而在生根培养基中则一般去除细胞分裂素,因此,幼芽进一步长大而形成有根苗。

4.1 试验方法

经诱导形成的无根幼苗,苗高 1.5~2 cm,粗度为 0.5 mm 左右,作为供试材料。

将幼苗接种在配制好的生根培养基上。每个配方接种幼苗 40 株,分别接种在 40 个装有培养基的三角瓶中,每瓶接种幼苗 1 株,放于 24~26℃ 培养室内培养,光照时间设定为 14 h·d⁻¹,光照强度设定为 2 000 lx 左右。

选择 1/2MS 作为基本培养基,加入不同浓度的生长素,进行生根试验。具体配方如下(只是从许多的配方中筛选出 10 个列出):

- (1) 1/2 MS + IBA0.2 mg·L⁻¹;
- (2) 1/2 MS + IBA0.3 mg·L⁻¹;
- (3) 1/2 MS + IBA0.4 mg·L⁻¹;
- (4) 1/2 MS + NAA0.2 mg·L⁻¹;
- (5) 1/2 MS + NAA0.3 mg·L⁻¹;
- (6) 1/2 MS + NAA0.4 mg·L⁻¹;
- (7) 1/2 MS + IBA0.1 mg·L⁻¹ + NAA0.1 mg·L⁻¹;
- (8) 1/2 MS + IBA0.2 mg·L⁻¹ + NAA0.2 mg·L⁻¹;
- (9) 1/2 MS + IBA0.3 mg·L⁻¹ + NAA0.5 mg·L⁻¹;
- (10) 1/2 MS + IBA0.4 mg·L⁻¹ + NAA0.4 mg·L⁻¹;

4.2 试验结果

接种 5 d 以后,个别幼苗出现生根现象,小根呈粉白色,15 d 时一些培养基上的幼苗出现簇状根。连续观察 25 d 后统计试验结果,结果见表 4。

试验结果表明,以 1/2 MS 为基本培养基,加入 IBA、NAA,对根系的发育影响是不同的。加入 IBA 诱导生根,生根较慢,而且根较小,且较为纤细,这种

生根苗移栽后成活率低;加入 NAA 诱导生根,出根较快,但根幅较小,根系健壮,这种生根苗移栽能达到 60% 左右的成活率;IBA 与 NAA 同时加入,在较为合适的配比下生根迅速,且根系发达,根茎较为粗壮,这种生根苗移栽成活率可达 95% 以上。因此,我们确定新西伯利亚黑杨生根诱导的最佳培养基配方为:(7)1/2 MS + 6-BA0.1 mg·L⁻¹ + NAA0.1 mg·L⁻¹。

表 4 不同培养基对无根苗根系形成的影响

培养基 编 号	生根时间 (d)	生根数 (个)	根长 (cm)	生根特征描述
(1)	15	1.4	1.2	根细,有少量侧根
(2)	12	1.9	1.4	根细,有少量侧根 1~2 个
(3)	9	2.6	1.7	根细,有少量侧根 1~2 个
(4)	11	3.2	0.6	根短粗放射状无侧根
(5)	8	4.1	0.9	根短粗放射状无侧根
(6)	10	3.7	0.7	根短粗放射状无侧根
(7)	5	8.1	1.2	根粗壮簇状侧根较多
(8)	8	6.3	1.0	根粗壮簇状侧根较多
(9)	12	2.1	0.7	根短粗簇状
(10)	17	1.4	0.2	根短

5 结论

5.1 新西伯利亚黑杨叶片愈伤组织诱导的最佳培养基配方为:1/2 MS + 6-BA1.0 mg·L⁻¹ + NAA0.5 mg·L⁻¹。7 d 出现愈伤组织,且愈伤组织生长最快,30 d 直径可达 1.7 cm。

5.2 新西伯利亚黑杨愈伤组织芽诱导的最佳培养基配方是 1/2 MS + 6-BA0.6 mg·L⁻¹ + NAA0.25 mg·L⁻¹。每个愈伤组织块平均可分化出 14.5 个芽,最多可达 21 个。

5.3 新西伯利亚黑杨在继代扩繁中,采用无菌瓶苗叶片诱导新愈伤组织,进行分化不定芽的方法来增加繁殖体的数量效果最好。

5.4 新西伯利亚黑杨生根诱导的最佳培养基配方为:1/2 MS + 6-BA0.1 mg·L⁻¹ + NAA0.1 mg·L⁻¹。生根迅速,根系发达,每株可诱导生根平均 8.1 条。

参考文献:

[1] 吴殿星,胡繁荣.植物组织培养[M].上海:上海交通大学出版社,2004.
[2] 吴克贤,李伟,徐妙珍.长白落叶松组织培养研究[M].林业科学,1996,32(2):125-133.
[3] 廖夕容.圆柏组织培养繁殖研究[J].亚热带植物通讯,2000,29(2):40-42.
[4] 祁春芳,郑智礼.白杨派杨树组培技术研究[J].山西林业科技,2000(4):22-24.