

- [J]. 云南植物研究, 1987, 9(3): 339 - 347.
- [5] 张兴国. 魔芋组织培养研究[J]. 西南农业大学学报, 1988, 10(3): 345 - 349.
- [6] 刘贵周, 谢庆华, 赵庆云, 等. 魔芋组织培养技术研究进展[J]. 中国农学通报, 2003, 19(4): 115 - 119.
- [7] 吴毅歆, 谢庆华. 白魔芋不同外植体的组培和分化条件初探(简报)[J]. 植物生理学通讯, 2001, 37(6): 513 - 514.
- [8] 谢庆华, 吴毅歆, 张勇飞, 等. 魔芋外植体组培分化条件的研究[J]. 云南师范大学学报, 2001, 21(3): 66 - 69.
- [9] 孙远明, 刘佩瑛, 刘朝贵, 等. 花魔芋球茎休眠特性的研究[J]. 西南农业大学学报, 1995, 17(2): 118 - 121.
- [10] 孙远明, 刘佩瑛, 刘朝贵. 贮藏期间花魔芋球茎内源 ABA 和 GA₁, 3, 4, 7 动态变化及外源 ABA 和 GA₃ 处理对其萌发的影响[M]. 北京: 科学出版社, 植物生长物质和除草剂研究及应用进展(第一辑), 1998: 46 - 51.
- [11] 张兴国, 罗庆熙, 陈劲枫, 等. 环境条件对魔芋生长发育的影响[J]. 西南农业大学学报, 1991, 13(3): 75 - 78.
- [12] 刘佩瑛, 陈劲枫. 魔芋光合性能的研究[J]. 西南农业大学学报, 1984, 6(4): 21 - 26.

濒危植物盐桦离体组织培养特性的研究

梅新娣, 张富春*, 王波

(新疆大学生命科学与技术学院分子生物学重点实验室, 新疆生物资源基因工程重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830046)

摘要:目的: 探讨新疆濒危植物盐桦离体组织培养的特性。方法: 从盐桦原生地阿尔泰阿拉哈克盐湖边采摘盐桦休眠实生苗上的落叶枝条, 待其萌发后分别取带芽嫩茎、嫩茎茎段及嫩叶芽尖三种不同材料接种于启动培养基, 比较三种盐桦离体组织的诱导分化, 继而设计不同激素、不同水平的单因子试验和正交试验, 筛选适宜盐桦外植体芽增殖和生根的分化培养基。结果: 诱导盐桦芽增殖的最佳外植体是带芽嫩茎, 盐桦外植体增殖、壮苗最适培养基为: MS + 6-BA 1.0mg/L + IBA 0.5mg/L; 盐桦外植体生根最适培养基为: 1/2MS + IBA 0.5mg/L + 蔗糖 30g/L + 琼脂 7% + 暗光处理 3d。结论: 本研究筛选获得适宜盐桦芽增殖和生根的最佳培养条件, 为高效扩繁和保存盐桦种质资源奠定了基础。

关键词: 盐桦; 组织培养; 外植体; 芽增殖; 生根

中图分类号: Q813.11 文献标识码: A 文章编号: 1004-311X(2006)03-0079-03

Study on Tissue Culture for Rare Endangered Plant *Betula halophila* in Vitro

MEI Xin-di, ZHANG Fu-chun*, WANG Bo

(Key Laboratory of Molecular Biology, College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, Urumqi 830046)

Abstract: Objectives: The research aimed to induce the plant regeneration. For rare endangered plant *Betula halophila* in Xinjiang. The characteristics of shoot induction, differentiation, propagation and rooting in vitro culture were studied. **Methods:** In this experiment, stems with new nodes containing axillary buds, the segments of shoot with bud and leaves of *Betula halophila* were taken as explants and cultured in vitro. **Results:** The immature stems are good explants for shoot multiplication; the multiplication medium is MS + 6-BA 1.0mg/L + IBA 0.5mg/L; the medium for rooting is 1/2MS + IBA 0.5mg/L + sucrose 30g/L, after three or seven days in dark. **Conclusion:** The adventitious shoot culture optimal condition of plant *Betula halophila* was obtained.

Key words: *Betula halophila*; tissue culture; explants; shoot multiplication; rooting; medium

盐桦是桦木科桦木属植物^[1], 是原生地已濒临灭绝的小乔木树种, 仅存于我国新疆阿勒泰地区, 为新疆特有的濒危种, 现已很难见到^[2], 因此对其进行研究保护是当务之急。盐桦无性繁殖研究在我国刚刚开始^[3], 为了高效地扩繁和保存盐桦种质资源, 有必要建立一套完整、高效而稳定的种苗繁育程序, 以便于对盐桦进行全方位的研究和保护。为此, 本文对盐桦芽增殖的培养进行了系统研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料

2002年9月中旬从阿尔泰地区阿拉哈克盐湖边的休眠实生苗上采摘盐桦(*Betula halophila*)的落叶枝条, 休眠芽经流水冲洗后, 在70%乙醇中浸泡5min, 实验室修剪扦插入水中^[3]。待其萌发后取芽尖、茎段作为实验材料^[4]。

1.1.2 试剂

实验所用试剂均为分析纯, 植物激素(6-苄氨基嘌呤, 6-BA); α-萘乙酸(NAA); 赤霉素(GA₃); 4-吡啶丁酸(IBA); 吲哚乙酸(IAA); 激动素(KT); 赛苯隆(TDZ); 聚乙烯吡咯烷酮(PVP40)均购于北京欣经科生物技术公司。

1.2 方法

1.2.1 不同外植体的培养

剪取盐桦茎段和叶片, 先用毛刷蘸洗涤剂溶液轻轻地刷

洗, 将刷洗后的茎和叶片段置于烧杯中, 用纱布封口后流水冲洗2~3h。接种前, 用70%酒精浸泡30s, 然后用0.1%升汞溶液灭菌4~6min, 之后立即用无菌水冲洗6~10次, 最后用剪刀、镊子将茎段剪成约1.5cm左右, 叶片沿叶脉剪几个裂口, 接种于已灭菌的启动培养基上。30d调查分化率、死亡率及平均每个外植体的分化芽数(统计数据为3次试验结果的平均值), 比较三种不同外植体间分化培养的差异^[5,6]。

1.2.2 芽增殖培养

设计不同激素、不同水平的单因子试验和正交试验, 每一处理重复3次, 每次接种20个左右茎段, 增殖培养30d后, 统计盐桦芽增殖系数和芽生物量(统计数据均为3次试验结果的平均值)^[5,7], 选出最适宜芽增殖的分化培养基。

芽增殖系数 = 增殖后有效芽数/接种芽数

芽生物量 = [增殖后试管苗重(g) - 增殖前试管苗重(g)的差值]/增殖芽数

1.2.3 生根培养

根据前面的实验设计三种生根培养基进行试验, 生根培养20d后, 统计生根率和生根系数^[5,8], 选出最适合的生根培养基。

生根率 = (有生根现象的茎段数/接种茎段数) × 100%

生根系数 = 生根条数/有生根现象的茎段数

1.2.4 培养条件

实验所采用的基本培养基是MS培养基, 附加各种激素, 每升培养基加糖30g, 琼脂7g, pH值调为5.8~6.0。组培室温度条件为24~26℃, 光照度为2000~3000lx, 光照时间为14~16h/d^[3,6]。

2 结果与分析

2.1 不同外植体的培养

经过初步试验和前人的研究结果, 本试验选择的启动培

收稿日期: 2006-01-10; 修回日期: 2006-02-22

攻关项目: 国家科技攻关西部科技行动项目(No. 2001BA901A32); 国家“863”项目(No. 2004AA227110-2)

作者简介: 梅新娣(1970-)女, 讲师, 硕士, 研究方向: 植物生物技术, 发表论文10余篇, Tel: 0991-8408882, E-mail: mxdxju@126.com; *通讯作者: 张富春(1962-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 生物技术, Tel: 991-8583517, Fax: 991-8583517, E-mail: zfc@xju.edu.cn。

培养基:MS+BA 1.0mg/L^[3],首先进行最佳外植体的筛选(表1)。结果表明,用带芽嫩茎作为外植体时,芽分化率最高,平均每个外植体分化芽数也最多,死亡率最低。因此确定盐桦带芽嫩茎为诱导分化的最佳外植体。

表 1 不同外植体的分化情况比较

Table 1 Comparison of differentiation of different explants

外植体数	接种外植体(个)	分化率(%)	死亡率(%)	平均每个外植体分化芽数(个)
带芽嫩茎	54	96.40	2.20	1.80
嫩茎茎段	50	7.00	22.20	0.45
嫩叶	51	4.30	59.50	0.23

2.2 芽增殖培养

2.2.1 不同细胞分裂素对芽增殖的影响

根据预备试验,把 NAA 固定在 0.2mg/L 浓度条件下,研究细胞分裂素不同种类及浓度对增殖的影响(表 2)。方差分析结果(表 3)显示:细胞分裂素不同种类间对增殖系数和生物量有显著差异。Q-检验(表 4)显示:对增殖系数而言,TDZ 对增殖系数的影响最为有利。但对芽生物量而言,细胞分裂素 KT 对增殖的影响优于 6-BA 和 TDZ,其中 KT 0.2-1.0mg/L 对芽生物量的影响最为有利。综合增殖系数和生物量看,最佳细胞分裂素种类为 6-BA。

表 2 细胞分裂素不同种类及浓度对芽增殖的影响

Table 2 Effects of cytokinin kinds and different cytokinin concentration on multiplication

A 激素种类	培养基		芽的增殖情况	
	B 激素浓度(mg/L)	增殖系数	芽生物量(g)	
6-BA	0.2	1.142	3.039	
	0.5	1.150	1.345	
	1.0	1.300	1.133	
	2.0	1.400	1.068	
	2.0	1.317	2.894	
KT	0.2	1.175	3.490	
	0.5	1.234	2.817	
	1.0	1.234	1.448	
	2.0	1.325	1.272	
TDZ	0.2	1.516	0.384	
	0.5	1.773	0.314	
	1.0	1.567	0.567	
	2.0			

表 3 细胞分裂素的方差分析

Table 3 Variance analysis of cytokinin

变异来源	D F	SS		M S		F	
		增殖系数	芽生物量(g)	增殖系数	芽生物量(g)	增殖系数	芽生物量(g)
重复	2	0.0566	1.3891	0.0283	0.6946	3.675*	0.720
A	2	0.7264	24.6798	0.3632	12.3399	7.964*	10.266*
B	3	0.2022	9.1144	0.0674	3.0381	1.478	2.528
误差	22	0.1696	21.2363	0.0077	0.9653		
总计	35	1.4285	63.6314				

表 4 细胞分裂素的多重比较

Table 4 Q-test of cytokinin

激素种类	增殖系数			激素种类	生物量(g)		
	极差大小	5%	1%		极差大小	5%	1%
TDZ	1.545	A	A	KT	2.6621	A	A
6-BA	1.2479	B	B	6-BA	1.6461	B	AB
KT	1.2396	B	B	TDZ	0.634	C	B

2.2.2 不同生长素对芽增殖的影响

在前面试验的基础上,把 6-BA 固定在 1.0mg/L 浓度条件下,研究生长素不同种类及浓度对增殖的影响(表 5)。

表 5 生长素不同种类及浓度对芽增殖的影响

Table 5 Effect of auxin kinds and different auxin concentration on multiplication

A 激素种类	培养基		芽的增殖情况	
	B 激素浓度(mg/L)	增殖系数	芽生物量(g)	
NAA	0.2	1.552	0.06	
	0.5	1.323	0.10	
	1.0	1.200	0.26	
	2.0	1.069	0.51	
IBA	0.2	1.690	0.05	
	0.5	1.533	0.06	
	1.0	1.167	0.21	
	2.0	1.033	0.99	

表 6 生长素的方差分析

Table 6 Variance analysis of auxin

变异来源	D F	SS		M S		F	
		增殖系数	芽生物量(g)	增殖系数	芽生物量(g)	增殖系数	芽生物量(g)
重复	2	0.0400	0.1127	0.0200	0.0563	3447073	6.700
A	1	0.0292	0.0255	0.0292	0.0255	1.2670	0.474
B	3	1.1595	1.4489	0.3865	0.4830	16.780*	8.957*
误差	14	0	0.1177	0	0.0084		
总计	23	1.2978	1.8666				

表 7 生长素的多重比较

Table 7 Q-test of auxin

激素种类	增殖系数			激素种类	生物量(g)		
	极差大小	5%	1%		极差大小	5%	1%
B1	1.621	A	A	B4	0.671	A	A
B2	1.428	B	B	B3	0.224	B	B
B3	1.184	C	C	B2	0.088	C	BC
B4	1.051	D	D	B1	0.056	C	C

方差分析(表 6)和 Q 检验(表 7)结果表明:生长素不同水平间对增殖系数和芽生物量有显著差异,而生长素不同种类间差异不显著,综合增殖系数和生物量看,最佳生长素种类为 IBA。当 IBA 0.2mg/L 对增殖系数影响最为有利;IBA 2.0mg/L 对芽生物量影响最为有利。

2.2.3 不同激素对比对芽增殖的影响

在前面两次试验的基础上,选择 6-BA 和 IBA 进行 2 因子 4 水平的正交试验(表 8)。方差分析结果(表 9)和 A×B 各组合的 Q 检验表明,激素不同种类和浓度间均差异不显著,二类激素的交互作用显著。当细胞分裂素 6-BA 1.0mg/L、生长素 IBA 0.5mg/L 或 IBA 2.0mg/L 对结果影响最为有利,进一步验证了以上结果。考虑到节省成本的缘故,最佳的增殖培养培养基配方为:MS+6-BA 1.0mg/L+IBA 0.5mg/L。

2.3 生根培养

根据前人经验,选取三种生根培养基进行实验^[8],每一处理接种 50 个茎段,20d 后统计结果(表 10)。

M2:MS+NAA 0.2mg/L+蔗糖 10g/L+琼脂 7%。

M3:1/2MS+IBA 0.5mg/L+蔗糖 30g/L+琼脂 7%+暗光处理 3d。

M4:MS+IAA 0.2mg/L+蔗糖 30g/L+琼脂 7%。

由表 10、表 11 的结果表明:M4 虽生根率较高,但生根系数较低,根稀少而长,茎节短、粗,茎基部无愈伤组织形成,有利于移栽后的成活;M2 生根系数上升,但生根率下降,根稀少而长,茎节高大、粗壮,叶片大、薄、绿,茎基部无愈伤组织形成,有利于移栽后的成活;M3 虽然生根率不是最高,但生根系数最高,根短、粗、须根多,且无愈伤组织形成,也有利于移栽后的成活。因此,生根培养基的最佳配方应为:M3:1/2MS+IBA 0.5mg/L+蔗糖 30g/L+琼脂 7%+暗光处理 3d。

表8 不同增殖培养基对芽增殖的影响

Table 8 Comparison of various propagation mediums

培养基	激素(mg/L)		芽的增殖情况
	A(6-BA)	B(IBA)	增殖系数
P1	0.1	0.2	1.33
P2	0.1	0.5	1.12
P3	0.1	1.0	1.38
P4	0.1	2.0	1.27
P5	0.2	0.2	1.18
P6	0.2	0.5	1.27
P7	0.2	1.0	1.38
P8	0.2	2.0	1.30
P9	0.5	0.2	1.40
P10	0.5	0.5	1.19
P11	0.5	1.0	1.18
P12	0.5	2.0	1.38
P13	1.0	0.2	1.43
P14	1.0	0.5	1.50
P15	1.0	1.0	1.27
P16	1.0	2.0	1.50

表9 增殖培养的方差分析

Table 9 Variance analysis of various propagation media

变异来源	D F	SS	M S	F
		增殖系数	增殖系数	增殖系数
A	3	0.050	0.0250	2.632
B	3	0.065	0.0217	3.421
A × B	3	0.142	0.0473	7.474
误差	6	0.040	0.0067	



图1 分化培养基上的嫩芽分化出丛生芽后单生芽



图2 M3芽在生根培养基上生根



图3 M3芽在生根培养基上生根

表10 不同生根培养基对生根的影响

Table 10 Comparison of various rooting mediums

培养基	生根率(%)	生根系数
M2	92.68	4.289
M3	96.30	5.308
M4	96.68	1.949

表11 生根培养基的方差分析结果

Table 11 Variance analysis of various rooting mediums

培养基	生根率(%)	5%	1%	培养基	生根系数	5%	1%
M4	96.68	a	a	M3	5.308	a	a
M3	96.30	ac	ac	M2	4.289	ac	ac
M2	92.68	b	B	M4	1.949	b	b

3 讨论

3.1 适宜盐桦离体培养的最适外植体和培养基

适宜盐桦离体培养的最适外植体为带芽嫩茎,增殖的最适培养基为:MS+6-BA 1.0mg/L+IBA 0.5mg/L;生根培养基:1/2MS+IBA 0.5mg/L+蔗糖 30g/L+琼脂 7%+暗光处理 3d。

3.2 Konar 等^[9]认为:在组织培养中,通过器官发生途径产生再生植株的基本方式有三种,一是先分化芽,待芽伸长后在其幼茎基部长根,形成完整植株。这种方式在母本植物组织培养中较为普遍;二是先分化根,再在根上产生芽而形成完整植株;三是愈伤组织的不同部位分别形成根和芽,然后二者的维管组织互相连接形成完整植株。本实验的结果符合第一种情况,即在盐桦芽增殖分化培养基中先分化芽,待芽伸长后在其幼茎基部长根,形成完整植株。本研究发现:在盐桦的增殖培养中,产生愈伤组织很少,盐桦是以腋芽形成丛生芽的方式进行增殖的。这一增殖途径对保证盐桦组培苗遗传性状稳定较为有利^[9]。盐桦离体培养过程中,芽增殖系数高达 1.773,芽平均生物量可达 3.49g,试管苗生长健壮,生根率高达 96%,能较好地满足离体快繁的需要。

参考文献:

- [1] 冯纛,严成,尹林克.新疆植物特有种及其分布[J].西北植物学报,2004,23(2):263-273.
- [2] 张立运,潘伯荣.新疆植物资源评价及其利用[J].干旱区地理,2000,23(4):334-335.
- [3] 梅新娣,张富春,曾幼龄.濒危植物盐桦的组织培养及快速繁殖[J].植物生理学通讯,2004,24(6):714-715.
- [4] 梅新娣,张富春,吕会平.盐桦(*Betula halophila*)愈伤组织的高效诱导和不定芽的分化[J].新疆农业科学,2006,43(1):78-81.
- [5] 张红晓,康向阳.白刺组织培养技术的研究[J].西北植物学报,2004,24(1):56-64.
- [6] 陈家胜.植物组织培养与工厂化育苗技术[M].北京:金盾出版社,2003:56-59.
- [7] 林德光.生物统计的数学原理[M].沈阳:辽宁人民出版社,1982:335-401.
- [8] 梅新娣,马纪,张富春.新疆濒危植物盐桦试管苗生根培养的研究[J].新疆农业科学,2005,2.
- [9] 黄学林,李筱菊.高等植物组织离体培养的形态建成及调控[M].北京:科学出版社,1998:20-24.

盐桦无菌材料的成功获得及其试管苗移栽定植成活的方法

梅新娣,张富春

(新疆大学生命科学与技术学院分子生物学重点实验室,新疆生物资源基因工程重点实验室,新疆乌鲁木齐 830046)

摘要:目的:探讨获得盐桦无菌材料的最适灭菌方法和提高移栽定植成活率的关键性技术要点。方法:以新疆濒危植物盐桦当年生休眠枝条为材料,在适宜的培养基上筛选最适灭菌方法,继而以生长 85~90d 左右的组培试管苗为材料,探讨移植时期、温度、光照、水分、营养对成活率的影响。结果:采用半无菌水表面灭菌+75%酒精 30s+0.1%升汞 7~10min 处理效果最好,污染率为 13.3%。盐桦组培试管苗移栽定植中,以 4 月中旬~5 月中旬成活率较高,平均成活率在 95%以上。结论:研究筛选获得了盐桦的最适灭菌方法和盐桦组培试管苗移栽定植成活的适宜方法,为工厂化扩繁盐桦苗木创造了条件。

关键词:盐桦;灭菌;移栽定植

中图分类号:Q813.11 文献标识码:A 文章编号:1004-311X(2006)03-0081-03

Study on Acquiring Sterilized Explants and Transplant for *Betula halophila*