

文章编号:1007-4961(2006)01-0010-04

芽变毛白杨组织培养初步研究

左永忠¹,崔宝禄¹,李坤霞¹,李帅英¹,于超²,董晓宇²,姜国斌³

(1 河北农业大学 林学院,河北 保定 071000;2 大连大学 生物工程学院,辽宁 大连 116622;

3 大连民族学院 民族地区生物资源与环境研究所,辽宁 大连 116600)

摘要:以芽变毛白杨幼嫩枝条为外植体进行愈伤组织和茎段组织培养试验研究。结果表明:芽变毛白杨诱导愈伤组织培养基为:MS+6-BA 2.0~4.0 mg/L+2,4-D 1.5~2.0 mg/L+NAA 0.25 mg/L+KT 2.0~4.0 mg/L+3%蔗糖,愈伤组织分化芽培养基为MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L+KT 2.0 mg/L+3%蔗糖时,培养效果好。茎段培养时,适宜无根苗生长的培养基为MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L+3%蔗糖,生根诱导适宜的培养基为1/2MS+IBA 0.5~1.0 mg/L+1.5%蔗糖。

关键词:芽变毛白杨;外植体;组织培养**中图分类号:**S 687**文献标识码:**A

Primary study on mutant *Populus tomentosa* in tissue culture

ZUO Yong-zhong¹, CUI Bao-lu¹, LI Kun-xia¹, LI Shuai-ying¹,YU Chao², DONG Xiao-yu², JIANG Guo-bin³

(1 Forestry College, Agricultural University of Hebei, Baoding, 071000;

2 Bioengineering College of Dalian University, Dalian 116622;

3 Institute of Biological Resources and Environment of Nation Region of Dalian Nation Institute, Dalian, 116600)

Abstract: Induction of callus and stems of the mutant *Populus tomentosa* was studied. The results indicated the medium for callus induction was MS+6-BA 2.0~4.0 mg/L+2,4-D 1.5~2.0 mg/L+NAA 0.25 mg/L+KT 2.0 mg/L+3% sucrose; the best differentiation medium was MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L+KT 0.5 mg/L+3% sucrose; the best medium for stem was MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L+KT 2.0 mg/L+3% sucrose; the medium for rooting induction was 1/2MS+IBA 0.5~1.0 mg/L+1.5% sucrose.

Key words: the mutant of *Populus tomentosa*; explants; tissue culture

毛白杨易生根芽变品种是以易生根的大官杨作砧木,进行毛白杨一条鞭芽接时,由接口处的突变芽发育成的嵌合体单株。它的硬枝扦插芽萌动早、生根容易,成活率高,克服了毛白杨硬枝扦插不易成活这一缺点^[1],对其快速繁殖加大推广力度有着重要的现实意义。芽变毛白杨品种虽容易生根,但扦插繁殖的速度远远不及组织培养^[2]。为此,本文对芽变毛白杨进行了组织培养试验的研究。

1 试验材料和方法

供试材料为芽变毛白杨,采集当年生枝条中上

部半木质化新梢,截取茎段,作为外植体。用洗衣粉水进行洗刷,然后清水洗净,在超净工作台内用0.1%次氯酸钠和0.1%升汞各处理10 min。最后用无菌水冲洗3遍。培养条件为温度(25±2)℃,光照强度2 000 lx,每日光照12 h。

2.1 试验设计和培养过程

2.1.1 愈伤组织诱导及分化 诱导愈伤组织时将准备好的梢段截成0.5 cm的小段放在培养基上培养。本试验采用MS培养基,附加KT、6-BA、2,4-D、NAA等4种不同浓度的激素,按正交试验设计,因素水平见表1,按正交表L₉(3⁴)设计4列不同浓度

收稿日期:2005-01-11;修改稿收期:2005-11-10

基金项目:国家自然科学基金《芽变毛白杨生根的分子机理及其基因克隆》的部分内容(30271095)。

作者简介:左永忠(1939-),男,河北河间人,教授,研究方向为林木种苗和生物技术。

的试验配比^[3]。9 种试验处理见表 4。

表 1 诱导愈伤组织因素水平 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
Table 1 Factor level of callus induction

水平 Level	因素 Factor			
	KT	6-BA	2,4-D	NAA
1	1.0	1.0	1.0	0.25
2	1.5	2.0	1.5	0.5
3	2.0	4.0	2.0	0.75

2.1.2 愈伤组织分化芽 采用 MS 培养基,附加 6-BA,NAA,KT 等 3 种不同浓度的激素,正交试验设计因素水平见表 2,按正交表 $L_9(3^3)$ 设计 3 列不同浓度的试验配比。9 种试验处理见表 5。

表 2 愈伤组织分化芽因素水平 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
Table 2 Factor level for shoot differentiation of callus

水平 Level	因素 Factor		
	KT	6-BA	NAA
1	0.5	0.5	0.1
2	1.0	1.0	0.3
3	2.0	2.0	0.5

2.2 茎段培养

消毒后的嫩枝条截成长 0.6~1.0 cm 带腋芽的茎段接种到培养基上。本试验采用 MS 培养基,附加 6-BA、IBA,两种不同浓度的激素的随机试验配比,4 种培养基两种激素的正交试验设计因素水平见表 3。9 种试验处理见表 6。

表 3 茎段繁殖培养因素水平 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
Table 3 Factor level of stems cultivation medium

水平 Level	因素 Factor	
	6-BA	NAA
1	0.5	0.1
2	1.0	0.3
3	2.0	0.5

2.3 生根培养

无根试管苗长到高 3 cm 以上时,截成 1.5~2 cm 长的苗段,每段带 1~2 片小叶,接在生根培养基上培养。本试验采用 1/2MS 培养基,附加 IBA 3 种浓度进行对比,3 种培养基为①1/2MS + IBA 0.25 mg/L + 1.5% 蔗糖;②1/2MS + IBA 0.5 mg/L + 1.5% 蔗糖;③1/2MS + IBA 1.0 mg/L + 1.5% 蔗糖。

3 结果与分析

3.1 愈伤组织的诱导

芽变苗茎段接种 8 d 后,形成了明显的愈伤组织,依培养基中的激素浓度配比不同,愈伤组织的结构、大小、颜色各不相同,16 d 时分别对各愈伤组织的直径进行了测量,不同处理的愈伤组织平均直径测量结果见表 4。由表中 R 值大小可以看出不同因素的影响力:6-BA > 2,4-D > NAA > KT,6-BA 和 2,4-D 的 R 值远远大于 NAA 和 KT。因此,影响芽变毛白杨愈伤组织形成和生长的主要因素是 6-BA 和 2,4-D。从 $T_{\text{平均}}$ 不同水平分析,6-BA 以 2 和 3 水平、2,4-D 以 2 和 3 水平、NAA 以 1 水平、KT 以 3 水平 T 值较大,表明不同因素水平的最适宜组合为:6-BA 2.0 mg/L + 2,4-D 2.0 mg/L + NAA 0.25 mg/L + KT 2.0 mg/L。本试验的 5 号处理与这种组合近乎一致,为 6-BA 2.0 mg/L + 2,4-D 2.0 mg/L + NAA 0.25 mg/L + KT 1.5 mg/L,其结果愈伤组织生长较快,16 d 直径达 0.7 cm。不同因素最佳组合在本次试验的 9 个处理中没有出现,有待进一步验证。

3.2 愈伤组织分化芽

将诱导的愈伤组织放在愈伤组织分化芽培养基上培养,15 d 后观察芽的分化情况,不同浓度激素对比对分化苗高也各不相同(见表 5)。观察 6 d 后,前 6 种培养基都能分化出小苗,但 15 d 后,其中②、④、

表 4 愈伤组织诱导试验结果

Table 4 The results for experiment of callus induction

试验号 Treatment No.	KT	6-BA	2,4-D	NAA	愈伤组织平均直径 Average diameter of callus
(1)	1.0(1)	1.0(1)	1.0(1)	0.25(1)	0.25
(2)	1.0(1)	2.0(2)	1.5(2)	0.50(2)	0.55
(3)	1.0(1)	4.0(3)	2.0(3)	0.75(3)	0.50
(4)	1.5(2)	1.0(1)	1.5(2)	0.75(3)	0.25
(5)	1.5(2)	2.0(2)	2.0(3)	0.25(1)	0.70
(6)	1.5(2)	4.0(3)	1.0(1)	0.5(2)	0.25
(7)	2.0(3)	1.0(1)	2.0(3)	0.5(2)	0.40

续表 4
Continued to table 4

试验号 Treatment No.	KT	6 - BA	2,4 - D	NAA	愈伤组织平均直径 Average diameter of callus
(8)	2.0(3)	2.0(2)	1.0(1)	0.75(3)	0.55
(9)	2.0(3)	4.0(3)	1.5(2)	0.25(1)	0.75
T ₁	1.3	0.9	1.05	1.7	
T ₂	1.2	1.8	1.55	1.15	
T ₃	1.7	1.5	1.6	1.3	
T ₁ 平均	0.43	0.3	0.35	0.57	
T ₂ 平均	0.40	0.6	0.51	0.38	
T ₃ 平均	0.57	0.5	0.53	0.43	
R	0.17	0.3	0.28	0.19	

表 5 愈伤组织分化芽试验结果

Table 5 The results of shoot differentiation of callus

试验号 Treatment No.	6 - BA	NAA	KT	苗高/cm Height of seedling
①	0.5(1)	0.1(1)	0.5(1)	0.8
②	0.5(1)	0.3(2)	1.0(2)	0.4
③	0.5(1)	0.5(3)	2.0(3)	1.0
④	1.0(2)	0.1(1)	1.0(2)	0.2
⑤	1.0(2)	0.3(2)	2.0(3)	0.1
⑥	1.0(2)	0.5(3)	0.5(1)	0.4
⑦	2.0(3)	0.1(1)	2.0(3)	0
⑧	2.0(3)	0.3(2)	0.5(1)	0
⑨	2.0(3)	0.5(3)	1.0(2)	0
T ₁	2.2	1.0	1.2	
T ₂	0.7	0.5	0.6	
T ₃	0	1.4	1.1	
T ₁ 平均	0.7	0.3	0.4	
T ₂ 平均	0.2	0.2	0.2	
T ₃ 平均	0	0.5	0.4	
R	0.7	0.3	0.2	

⑤、⑥培养基中不能长成大苗,小苗丛生,并且有黄化现象,而在①、③培养基中能够长出壮苗,生长势良好。

由表 5 的 R 值大小可以看出,不同因素对芽分化的作用顺序是:6 - BA > NAA > KT,6 - BA 的 R 值达 0.7,显著超过 NAA 和 KT 的 R 值。因此,影响芽变毛白杨愈伤组织芽分化的主要因素是 6 - BA。从 T_{平均}不同水平分析,6 - BA 以 1 水平、NAA 以 3 水

平、KT 在 1 和 3 水平时 T 值较大,这样搭配为好。本试验的③号处理与此组合一致,即 6 - BA 0.5 mg/L + NAA 0.5 mg/L + KT 2.0 mg/L,该处理的无根苗生长速度明显高于其他处理。方差分析表明差异达到显著水平($F = 12.0 > F_{0.1 \sim 9.0}$)。该处理分化率较高,有效分化系数达到 6 以上。

3.3 茎段培养

将带芽茎段接种到茎段培养基上培养 15 d 后观察各玻璃瓶中的小苗生长情况,见表 6。

表 6 茎段繁殖培养试验结果

Table 6 The results of culture of stem propagation

试验号 Treatment No.	6 - BA	NAA	苗高/cm Height of seedling
①	0.5(1)	0.1(1)	2.1
②	0.5(1)	0.3(2)	0.9
③	0.5(1)	0.5(3)	0.9
④	1.0(2)	0.1(1)	0.8
⑤	1.0(2)	0.3(2)	0.3
⑥	1.0(2)	0.5(3)	0.5
⑦	2.0(3)	0.1(1)	0.3
⑧	2.0(3)	0.3(2)	0.3
⑨	2.0(3)	0.5(3)	0.2
T ₁	3.9	3.2	
T ₂	1.6	1.5	
T ₃	0.8	1.6	
T ₁ 平均	1.3	1.1	
T ₂ 平均	0.5	0.5	
T ₃ 平均	0.3	0.5	
R	1.0	0.6	

由表6中的 R 值大小可以看出影响力: $6-BA > NAA$ 。同时 $T_{平均}$ 又表明了 $6-BA$ 、 NAA 的浓度分别为 0.5 mg/L 、 0.1 mg/L 时苗长得最好,相同时间内所获小苗最高,叶色正常,生长正常。因此可以认为,茎段培养无根苗适宜的培养基为 $MS + 6-BA\ 30.5\text{ mg/L} + NAA\ 30.1\text{ mg/L} + 3\%$ 蔗糖。

3.4 生根培养

将试管苗接种在生根培养基上,10 d 后小植株基部即有根产生,15 d 后观察,②、③号培养基都能较快生根并且根系粗壮,生根平均数达4条,小苗生长也很健壮,①号培养基虽也生根但很细弱。试验说明生根培养基 $1/2MS + IBA\ 30.5 \sim 1.0\text{ mg/L} + 1.5\%$ 蔗糖比较适合。

生根组培苗高度达到3 cm 以上时,既可过渡培养后移入大田,又可再剪成 $1.5 \sim 2\text{ cm}$ 的苗段,接种到生根培养基进行继代繁殖。

4 小结和讨论

芽变毛白杨是毛白杨的突变体,在外部形态和解剖构造上很多性状类似毛白杨,但其枝有棱、易生根、抗逆性强等方面表现了大官杨的特点^[1]。芽变毛白杨对环境条件的要求及适应性与毛白杨有一定差异。在组织培养建立再生体系的过程中,芽变毛白杨对培养因素的要求表现出不完全等同于毛白杨。愈伤组织培养条件上两者都需要较高浓度的细胞分裂素和 $2,4-D$ ^[4]。而芽分化过程中,毛白杨所需要的 $6-BA$ 的浓度为 $1 \sim 3\text{ mg/L}$ ^[6],远远高于芽变毛白杨所要求的 0.5 mg/L 。生根培养过程中,毛白

杨需要的生长素浓度也稍高于芽变毛白杨^[7]。

试验结果表明,芽变毛白杨诱导愈伤组织的较好培养基为 $MS + 6-BA\ 2.0\text{ mg/L} + 2,4-D\ 2.0\text{ mg/L} + NAA\ 0.25\text{ mg/L} + KT\ 1.5\text{ mg/L} + 3\%$ 蔗糖,愈伤组织分化芽培养基以 $MS + 6-BA\ 0.5\text{ mg/L} + NAA\ 0.5\text{ mg/L} + KT\ 0.5\text{ mg/L} + 3\%$ 蔗糖较为适宜。茎段培养时,诱导无根苗生长的培养基为 $MS + 6-BA\ 0.5\text{ mg/L} + NAA\ 0.1\text{ mg/L} + 3\%$ 蔗糖。诱导无根苗生根的培养基为 $1/2MS + IBA\ 0.5 \sim 1.0\text{ mg/L} + 1.5\%$ 蔗糖。芽变毛白杨组织培养虽已在生产上应用,但进一步加快繁殖速度,提高成苗率和繁殖系数,有待继续试验研究。

参考文献:

- [1] 崔俊茹,左永忠,陈书明,等.毛白杨易生根芽变品种苗期生长与解剖观察[J].河北林果研究,2001,16(3):211-215.
- [2] 郑均宝.741 杨试管苗培育研究[J].林业科技通讯,1992,(10):1-3.
- [3] 胡蕙露,胡翠玲.银杏茎段组织培养正交试验[J].安徽农业大学学报,1997,24,(2):129-133.
- [4] 胡崇礼.毛白杨组织离体培养初报[J].青海农林科技,1980,(1):32-33.
- [5] 李瑞先,于杰,王淑勤.毛白杨优良无性系的组织培养[J].河北林业科技,1987,(2):8-9.
- [6] 李云,高延亭,李瑞先.提高毛白杨试管苗生长速度降低成本试验[J].河北林业科技,1988,(3):13-15.
- [7] 孙雪新,邓煜.毛白杨萌生带条茎段组培育苗[J].林业科技通讯,1989,(12):16-17.

(编辑 刘彦琴)