

青杨组织培养快速繁殖

耿 飒,姬生栋,袁金云,周春娥,赵晓进

(河南师范大学 生命科学院,河南 新乡 453007)

摘 要:建立了青杨(*Populus cathayana*)组织培养系统.最适合的外植体是新切下的枝条插入含有蛭石和充足水的营养钵中24 h以上,使其在弱光下迅速长出嫩枝的茎切段和茎尖.茎切段和茎尖外植体经0.1% HgCl_2 或5% NaClO 溶液表面消毒后,接种到大量元素减半、含0.5 mg/L 6-BA和0.03 mg/L NAA的MS培养基上诱导芽,试管苗的生根采用含0.5 mg/L IBA的MS培养基.试管苗茎段的分化依外源激素条件的不同而异.

关键词:芽;青杨;组织培养

中图分类号:Q944.6

文献标识码:A

由于杨树生长迅速,木材年轮匀称,被广泛的用于建筑木料、造纸原料、包装材料、燃料以及家俱生产材料.近年来,世界上培育出了许多杨树新品系^[1].青杨作为一种地域性杨树品种,主要分配在黄河中上游海拔500~1 000 m的河谷丘陵地带,具有广泛的适应性和抗逆性^[2],尤其青杨树皮呈嫩绿色,且生长迅速,被广泛的用作一些城市和乡村的行道树.但青杨难以在盐碱地带生长,并且抗虫性较差^[3],这些都需要进行彻底的遗传特性的改造,而且,常规的嫁接方法进行的繁殖手段不适合大规模的生产经营.组织培养技术的建立不但能解决营养繁殖慢并且受季节限制的问题,而且还为青杨的遗传育种提供必要的研究基础.本文将系统地介绍青杨组织培养系统建立过程.

1 资料和方法

1.1 材 料

青杨(*Populus cathayana*)为河南师范大学生物技术系培育.取1~3年生青杨茎尖切段或当年抽的枝条茎尖切断作为组培材料.新切下的枝条插入含有蛭石和充足水的营养钵中24 h以上,使其在弱光下迅速长出嫩枝.

1.2 培养基

在总结相关研究的基础上^[4],设计并更新了相应的培养基,采用MS基本培养基,根据不同的研究目的附加不同的激素(表1).

1.3 表面消毒与接种

对从准备好的枝条取下茎尖、叶片和茎切段都需要进行严格的表面消毒才能用于下一步研究.消毒过程包括:(1)用清水冲洗,并用软刷在流水中清洗表面约10 min,避免用强力洗涤剂,以免损害植物组织细胞;(2)在70%乙醇中浸泡约10~12 s;(3)用0.1% HgCl_2 消毒约8 min或用5% NaClO 消毒约1 min然后用无菌水清洗8次(每次1 min左右).叶片要切成(3~6) mm × (3~6) mm的叶圆块,茎尖和腋芽切成4~8 mm小段,培养在光强度为约3 000 Lux,光周期为16 h,温度为(25±2) °C的培养室中.另外,刚从树上取下的未萌发茎尖消毒比较困难,消毒前要剥去外边芽壳,然后按照上述方法消毒,并且在用0.1% HgCl_2

收稿日期:2005-04-25

基金项目:河南省自然科学基金(0511020600);河南省植物重点学科资助

作者简介:耿 飒(1971-),男,河南潢川人,河南师范大学副教授,博士,主要从事植物分子生物学研究.

消毒时要加长 3 min 左右的消毒时间.

表 1 改造的不同培养基及其组份

名称*	MS 大量元素	植物激素		
		6-BA	NAA	IBA
PCL1	1×	1.0 mg/L	0.5 mg/L	
PCL2	1×	1.0 mg/L	0.1 mg/L	0.05 mg/L
PCL3	1×	1.0 mg/L	0.2 mg/L	0.1 mg/L
PCS1	1/2×	0.8 mg/L	0.3 mg/L	
PCS2	1/2×	0.5 mg/L	0.2 mg/L	
PCS3	1/2×	0.3 mg/L	0.1 mg/L	
PCS4	1/2×	0.3 mg/L	0.05 mg/L	
PCR	1×			0.3 mg/L

*: 所有培养基蔗糖浓度都为 30.0 g/L, 琼脂浓度为 7.0 g/L, pH 值为 5.8.

1.4 芽和幼苗的快繁

从外植体上诱导出的幼苗长至 2~3 cm 时, 将其切成带节间的小段接种到分化培养基 PCS4. 每个小段在这种分化培养基上可以分化成 5~8 个幼苗. 这种扩繁方式在 PCS4 培养基上约 24 d 可以继代一次, 这样在生根培养以前可以使幼苗成指数增加.

1.5 生根培养

选择生长状态良好, 直立, 长约 3~4 cm 带有 2~3 个主要节间的幼苗用于生根培养, 把选择的幼苗接种到附加 IBA 的 PCR 培养基上 14~21 d, 即可移栽. 通常生长状态不好, 弯曲, 微黄的幼苗不易生根.

2 结果与讨论

2.1 影响芽诱导成功率的因素分析

青杨外植体较容易消毒, 如果用消毒强度较底的 NaClO 溶液, 再生植株几乎没有污染, 而如果用 HgCl₂ 溶液消毒茎段和茎尖的污染率为 8.6%, 叶片外植体污染率为 19.0%. 研究发现, 外植体的生长期也会影响芽的诱导成功率. 用 PCL1、PCL2 和 PCL3 培养基培养从树上采集的不同生长期的叶片外植体, 21 d 以后, 只有相对的幼嫩叶片外植体能够产生少量愈伤组织且有极少量的芽分化. 把这些愈伤组织接种到 PCL2 或 PCL3 培养基进一步诱导芽的分化, 发现 4 周后, 这些愈伤基本能分化出小芽 (图 1b). 继续培养 3 周后, 把幼苗接种到扩繁培养基 PCS1, PCS2, PCS3 和 PCS4 上进行继代培养, 但这些幼苗因为前期发育不完善, 不能继续在这些培养基上生长分化. 并且, 这些幼苗也无法在生根培养基 PCR 上生根. 这些都表明, 从树上直接采集外植体而不经处理, 很难诱导出理想的芽和幼苗. 相反, 经过处理的枝条上嫩叶片外植体直接接种. 在分化强度适中 PCL2 或 PCL3 培养基上则表现出很强的分化能力. 21 d 以后, 在 PCL2 和 PCL3 培养基上分别有 26.3% 和 68.7% 的外植体能够分化出芽, 并且这些芽发育成的幼苗在 PCR 培养基上很容易生根, 说明采集枝条经过处理后有效的提高了芽的诱导率.

与其它部位的外植体相比, 利用采集并处理后的枝条茎尖和幼茎切段外植体诱导和分化成的幼苗非常理想 (图 1a), 可以很有效的建立体外培养系统. 在相同的 PCS4 培养基上培养, 有 97.5% 处理的枝条茎切段和茎尖外植体能够分化成芽簇, 而只有 4.8% 的叶片外植体能够分化成芽, 并且这些芽基本都发育不良, 生长缓慢, 并且微黄 (图 1b). 另外, 研究发现休眠芽不适合大量诱导芽, 其不易消毒, 并且含有大量酚类物质抑制芽的分化和生长, 即使能诱导出来芽, 也表现枯黄 (图 1c).

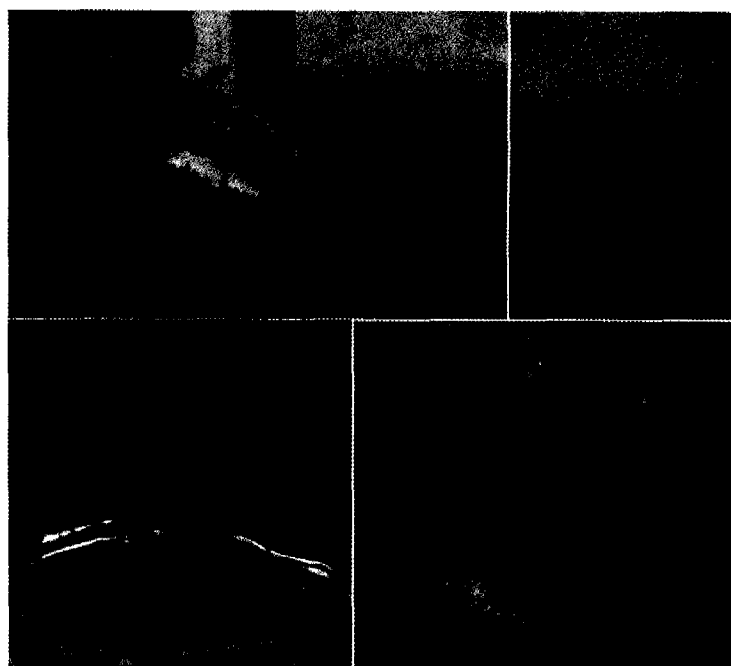
2.2 植物激素对芽分化的影响

尽管研究发现叶片不适合作为建立体外培养系统的外植体, 但研究结果仍然表明培养基的组成成份对芽诱导率的影响很大. 比如, 在 PCL1、PCL2 和 PCL3 3 种培养基上试管苗叶片外植体能够诱导出芽和愈伤组织的比率分别为 1%~3%、12%~16% 和 45%~50%. 基本上所有试管苗茎段和茎尖外植体都能诱导

出芽,但是在不同的培养基上每个外植体能够诱导出芽的数量也不同;在 PCS1 培养基上能够诱导出芽的数量约为 2~3 个,在 PCS2 和 PCS3 培养基上能够诱导出芽的数量约为 3~5 个,而在 PCS4 培养基上能够诱导出 7 个以上的芽,并且在 PCS4 培养基上能够诱导出芽生长迅速,生长状态良好(图 1d)。由以上结果表明,外源激素的浓度极大的影响茎段和茎尖等外植体分化出芽的成功率以及芽的生长状态。

总之,本文基本建立了青杨的体外组织培养快繁系统。最适合的外植体是新切下的枝条插入含有蛭石和充足水的营养钵中 24 h 以上,使其在弱光下迅速长出嫩枝,这种枝条的茎段和茎尖经过严格的表面消毒然后接种可以取得非常理想的结果。建立的理

想的芽诱导培养基为:MS 基本培养基(大量元素减半)附加 0.3 mg/L 6-BA 和 0.05 mg/L NAA。生根培养基为:MS 基本培养基附加 0.3 mg/L IBA,能有效诱导根的生成(图 1e)。本研究结果不仅为青杨建立了快速、经济不受时节限制的繁殖方式,而且为基因改造青杨奠定必要的技术基础。



a. 青杨茎段的分化 b. 叶片外植体诱导成的芽 c. 从休眠芽诱导成的芽
d. 在 PCS4 培养基上诱导成的芽 e. 生根培养基上幼苗生根

图1 青杨组织培养快速繁殖系统的建立

参 考 文 献

- [1] Ahuja M R. Micropropagation of Woody Plants [M]. Dordrecht : Kluwer Academic Publications, 1993:187 - 222.
- [2] 郑淑霞,马广金. 青杨种子资源的研究[J]. 青海农林科技,2004 (增刊):26-27.
- [3] Gao Changqi. Relationship between trophic component of different poplar strains and occurrence of Saperda populnea[J]. Journal of Forestry Research, 2001. 12(4):263-265.
- [4] Lu Shanfa, Zhao Huayan, Wei Jianhua, et al. Establishment of in Vitro Regeneration System of Triploid Chinese White Poplar[J]. Acta Botanica Sinica, 2001, 43 (4):435 - 437.

Rapid Regeneration of Cathay Poplar by Tissue Culture

GENG Sa, JI Sheng-dong, YUAN Jin-yun, ZHOU Chun-e, ZHAO Xiao-jin

(College of Life Science, Henan Normal University, Xixiang 453007, China)

Abstract: The tissue culture system of Cathay Poplar (*Populus cathayana*) was developed in the present paper. The most suitable explants for in vitro growth were shoot-tips and stem segments from sprouting cutting which were plugged in water or in vermiculite under weak light more than 24 h. Surface sterilization of explants was accomplished by 0.1 % HgCl_2 or 5% NaClO . The most suitable medium for differentiation of stem segment from plantlets was the modified MS (half of macro-elements) with 0.3 mg/L 6-BA and 0.03 mg/L NAA and MS with 0.3 mg/L IBA for rooting in vitro. The differentiation of stem segment of plantlets depended on the concentration of exogenous hormone.

Key words: shoot; *Populus cathayana*; tissue culture