

北美蓝云杉愈伤组织的诱导和培养

孙敬爽¹, 于海², 贾桂霞¹

(1. 北京林业大学园林学院, 100083; 2. 中国林科院华北林业试验中心, 北京 100029)

摘要:以北美蓝云杉休眠芽、针叶、嫩茎为外植体, 用 0.1% HgCl₂ 处理 10~15 min 消毒效果最好。在 1/2LM + 2, 4-D (0.5~3.0 mg/L 以下单位相同) + 6-BA (1.0~2.0) 条件下, 均能诱导出愈伤组织, 休眠芽诱导率最高为 77.36%。且以休眠芽诱导的愈伤组织在 1/2LM + NAA (0.5) + 6-BA (1.0) + IBA (0.1) 能分化出少量针叶和芽。针叶和茎产生的愈伤组织增殖困难, 继代培养后很快褐化。

关键词:北美蓝云杉; 愈伤组织; 诱导; 分化

中图分类号:S 791.18 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2007)07-0173-03

北美蓝云杉(*Picea pungens* 'Glauc Globosa'), 松科云杉属, 属于科罗拉多云杉系列, 是经过人工选育的矮生型品种。高约 1m, 主干不明显, 分枝多而且繁密, 枝叶斜向上伸出, 呈半球形。针叶终年为美丽的银蓝色, 国外大量地应用于公园、庭院以及道路两侧, 是观赏价值很高的绿化树种。目前, 我国已成功引种苗木, 如其能够大量地应用于城市绿化, 则可有效地改善北京冬、春景色萧条的现象。为了扩大繁殖数量, 减少引进经费, 试验对其组培快繁技术进行了研究, 一旦技术完善, 即可进行大量苗木的生产。针叶树组织培养相对难度较大, 云杉属主要是以成熟胚或未成熟合子胚为外植体诱导出体细胞胚, 形成完整植株^[1-3], 罗建勋^[6]曾在西加云杉中以休眠芽为外植体通过不定芽诱导出小植株。韩素英等^[7]曾对青扦的休眠芽进行愈伤组织的诱导, 诱导率为 31%~50%。对于北美蓝云杉的组培快繁技术的研究至今未见报道。

1 材料与方法

1.1 外植体、消毒方法和培养条件

北美蓝云杉(*Picea pungens* 'Glauc Globosa'), 采自北京林业大学苗圃引进苗木。分别在 11 月采取休眠芽, 4 月初采取幼嫩针叶、嫩茎作外植体。

休眠芽用清水冲洗后, 在超净工作台上灭菌, 方法如下: 70% 酒精浸泡 30 s 后, 无菌水冲洗 2~3 次, 采用两种不同消毒剂灭菌: (1) 0.1% HgCl₂ (吐温 80) 分别浸泡 10、15、20 min; (2) 15% NaClO (吐温 80) 分别浸泡 10、

15、20 min。无菌水冲洗 5~6 次, 进行接种, 10 d 后观察污染情况。

针叶和嫩茎以 70% 酒精浸泡 30 s, 冲洗 2~3 次后, 用 0.1% HgCl₂ (吐温 80) 灭菌 10 min 无菌水冲洗 5~6 次, 最后用无菌滤纸吸取材料表面水分, 接种到培养基上。每种处理接 30 个外植体。接种后 10 d 统计污染数。培养温度: 25±2℃, 光照强度在 1500~2000 Lx, 光照时间: 10 h/d。

1.2 培养基

1.2.1 愈伤组织诱导培养基 基本培养基采用 1/2LM^[8] 培养基。1/2LM + 2, 4-D (0.5) + 6-BA (1.0); 1/2LM + 2, 4-D (1.0) + 6-BA (2.0); 1/2LM + 2, 4-D (2.0) + 6-BA (1.0); 1/2LM + 2, 4-D (2.0) + 6-BA (2.0); 1/2LM + 2, 4-D (3.0) + 6-BA (2.0)。

1.2.2 增殖培养基 1/2LM + 2, 4-D (0.2) + 6-BA (1.0) + 0.1% 活性炭; 1/2LM + 2, 4-D (1.0) + 6-BA (1.0) + 0.1% 活性炭。

1.2.3 芽分化培养基 1/2LM + NAA (0.5) + 6-BA (0.5) + IBA (0.1); 1/2LM + NAA (0.5) + 6-BA (1.0) + IBA (0.1); 1/2LM + NAA (0.2) + 6-BA (0.5) + IBA (0.1)。培养基 pH 值为 5.7, 琼脂为 6g/L, 蔗糖 30g/L。

2 试验结果

2.1 灭菌结果

北美蓝云杉为多年生植物, 尤其是休眠芽带菌较多, 不易彻底消毒。所以灭菌是组培的关键步骤。由表 1 可以看出: 以 0.1% HgCl₂ (吐温 80) 灭菌, 污染数最少, 成活率为 90%, 褐化现象少; 以 15% NaClO (吐温 80) 灭菌, 在消毒 10 min 时, 成活率 57.1%, 灭菌 15 min 开始有褐化现象, 20 min 严重褐化。

幼嫩针叶和嫩茎根据休眠芽的灭菌结果, 以 0.1% HgCl₂ (吐温 80) 灭菌 10 min, 成活率为 100%。

第一作者简介: 孙敬爽 (1978-) 女, 博士, 从事园林植物遗传育种, E-mail: sjshuang1129@163.com。
基金项目: 国家林业局“948”引进资助项目 (2002-08-01); 北京林业大学研究生资助项目。
收稿日期: 2007-04-02

表 1 北美蓝云杉休眠芽不同消毒剂和灭菌时间的处理效果

药剂	0.1%HgCl ₂ (吐温 80)			15%NaClO(吐温 80)		
消毒时间	10 min	15 min	20 min	10 min	15 min	20 min
接种数/个	50	65	58	45	60	42
污染数/个	5	6	5	19	15	12
褐化数/个	0	0	12	1	15	26
成活率/%	90	90	71	57.1	50	9.5

2.2 愈伤组织的诱导

休眠顶芽接种一周以后观察,从基部开始出现颗粒状突起,颜色绿色,质地松软(图 1)。15 d 以后,愈伤组织长满整个休眠芽,变为黄绿色。

针叶在接种后一周后,针叶变粗、发生扭曲,比原来伸长约 0.5~2 cm,整个针叶变成黄绿色,呈水浸状。25 d 后观察 每个针叶切口处出现愈伤组织,颜色黄绿色,颗粒

表 2 不同处理对不同外植体愈伤组织的诱导

激素	休眠芽			针叶			茎		
	接种数/个	愈伤数/块	愈伤诱导率/%	接种数/个	愈伤数/块	愈伤诱导率/%	接种数/个	愈伤数/块	愈伤诱导率/%
2,4-D(0.5)+6-BA(1.0)	50	24	48	48	28	58.3	42	25	59.2
2,4-D(1.0)+6-BA(2.0)	54	30	55.6	53	39	73.6	43	22	51.2
2,4-D(2.0)+6-BA(1.0)	49	45	91.8	48	42	87.5	36	25	69.4
2,4-D(2.0)+6-BA(0.5)	57	54	94.7	60	51	85.0	40	35	87.5
2,4-D(3.0)+6-BA(2.0)	60	58	96.7	62	53	85.5	48	38	79.2

2.3 愈伤组织的增殖

接种 1 月后进行愈伤组织的增殖。转接时,休眠芽形成的愈伤组织易分裂,每一颗粒类似于针叶原基。转接 15 d 后,愈伤组织生长很快,颜色变成深绿色,形成 1 cm³的团状物。2 种分化培养基对增殖没有明显的区别。针叶、嫩茎形成的愈伤组织在转移 10 d 以后,表面干枯,呈粉末状,褐化现象严重。

2.4 芽的分化

15d 后发现,未分化的愈伤组织随着培养时间的延长变褐死亡。休眠芽诱导的愈伤组织在转接到 3 种分化培养基中,在 1/2LM+NAA(0.5)+6-BA(1.0)+IBA(0.1)能够分化出针叶和芽,分化率为 20%,分化率较低。针叶和茎产生的愈伤组织,直接转到分化培养基上,也很快褐化死亡,不能够进一步分化。

状。针叶破裂,在与培养基接触处出现愈伤(图 2)。

幼嫩茎段在接种后 10 d,嫩茎两端出现少量愈伤组织,黄绿色颗粒状突起,颗粒比针叶与休眠芽产生的愈伤组织小。

培养结果(表 2)表明:休眠芽、针叶与幼嫩茎段在 5 种培养基上,没有明显区别,都能够诱导出愈伤组织。其中休眠芽以 2,4-D(3.0)+6-BA(2.0)愈伤组织诱导率最高,诱导率为 96.7%;针叶以 2,4-D(2.0)+6-BA(1.0)诱导率最高,为 87.5%;茎以 2,4-D(2.0)+6-BA(0.5)诱导率最高,为 87.5%。当 2,4-D 的浓度 0.5、1.0 mg/L 时,愈伤组织的诱导率较低,且愈伤组织块较小,出现较晚。休眠芽、针叶、嫩枝都可以诱导愈伤组织,其中以休眠芽诱导率最高为 77.36%。

BA(0.5~2.0 mg/L)+蔗糖(3%)+琼脂(0.6%)pH(5.7)条件下,能顺利产生愈伤组织。以休眠芽产生的愈伤组织的分化能力最强。

愈伤组织的增殖是影响试验的关键,北美蓝云杉愈伤组织褐化现象严重。添加活性炭并不能够抑制褐化现象,这可能与针叶树的内含大量的酚类物质有关。

休眠芽形成的愈伤组织在合适的培养基上可以分化出芽。由此可以看出,当外植体处于良好的分化发育状态,如获得最佳的培养条件,针叶树的组培是完全可能的。

目前许多针叶树的组培还未用于生产,并不是理论上行不通,主要是由于技术上的困难。如何使成熟植株外植体进行复壮,恢复其分化能力,摸索出一套适宜的外植体预处理技术是非常必要的,试验为其研究提供了重要依据。

参考文献

[1] Hakman I, Arnold V S[J]. Plant Physiol, 1985, 121: 149-158.
[2] Jain S M, Gupta P K, Newton R J. Somatic Embryogenesis in Woody Plant[M]. : Gymnosperms Dordrecht Kluwer Academic Publishers, 1995, 3.
[3] Hakman I, Fowke L C. 1987 Somatic embryogenesis in picea glauca (white spruce) and picea mariana (black spruce) [J]. Can. J. Bot. 65: 656-659.
[4] 李映红, 郭仲琛. 青杉在不同条件下体细胞胚胎发生及苗的形成[J]. 植物学报, 1990, 32(7): 568-570.
[5] 杨金玲, 桂耀林, 杨映根. 等. 白杉体细胞胚胎发生及植株再生[J]. 植物学报, 1997(39): 315-321.
[6] 罗建勋. 西加云杉幼树休眠芽的离体培养[J]. 植物生理学通讯, 1994, 30(6).
[7] 韩素英, 齐力旺, 杨云龙. 等. 几种针叶树离体培养条件的研究[J]. 林业科技通讯, 1995(10): 20-22.

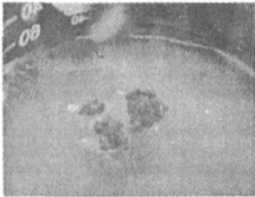


图 1 以休眠芽为外植体诱导产生的愈伤组织

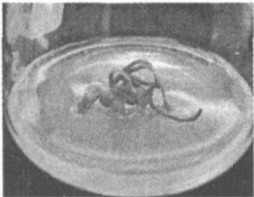


图 2 幼嫩针叶产生的愈伤组织

3 讨论

通过试验研究,以北美蓝云杉的休眠芽、幼嫩针叶和嫩茎为外植体,在 1/2LM+2,4-D(0.5~3.0 mg/L)+6-

丽格海棠高效再生体系的建立及对抗生素敏感性研究

徐美隆¹, 张怀渝^{1,2}, 唐宗祥²

(1. 四川农业大学原子能农业应用研究室 雅安 625014; 2. 四川农业大学植物遗传育种省级重点实验室, 雅安 625014)

摘要:以丽格海棠叶片和叶柄为外植体, 通过离体培养分化成苗以及对卡那霉素和头孢霉素的敏感性实验, 建立了农杆菌介导的稳定、高效的基因转化受体系统。结果表明: 丽格海棠的最适生芽培养基为 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L+KT 0.1 mg/L, 不定芽的最适生根培养基为 1/2MS+IBA 0.2 mg/L+NAA 0.15 mg/L; 75 mg/L 卡那霉素可以完全抑制叶柄的生芽, 100 mg/L 卡那霉素可以完全抑制叶片的生芽, 75 mg/L 卡那霉素完全抑制不定芽的生根, 头孢霉素浓度小于等于 250 mg/L 时对生芽和生根的影响不大。

关键词: 丽格海棠; 农杆菌介导; 卡那霉素; 头孢霉素; 再生体系

中图分类号: S 682.1⁺9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2007)07-0175-04

丽格海棠(*Rieger Begonia*), 又称玫瑰海棠, 属秋海棠科秋海棠属的多年生草本花卉。因其花色艳丽、花型多样、花朵硕大、花期特长, 尤其是在春节开花, 深受市场的欢迎。但由于容易感病、花型种类少、栽培技术和栽培条件要求较高等因素的制约^[1], 其规模化生产实施的难度较大, 生产成本较高。因此丽格海棠的品种改良具有重要的应用价值。利用遗传转化进行花卉的品种改良是目前花卉品种改良的重要手段之一, 而农杆菌介导法以其转化频率高、转基因拷贝数低、导入片段确定

性强、能够转化大片段 DNA、操作简便、费用低廉等一系列优点^[2-8]而深受研究者的青睐。近年来, 丽格海棠的组织培养研究取得了一些进展^[9-11], 但基于基因转化的丽格海棠高频再生体系的建立却鲜有报道。研究以丽格海棠为试材, 研究了不经愈伤组织诱导, 直接由叶片和叶柄产生不定芽的再生体系, 探讨了组织培养过程中各种激素对比对叶片和叶柄生芽和小苗生根的影响, 以及卡那霉素(Kanamycin; Km)和头孢霉素(Cefotaxime; Cef)对丽格海棠生芽和生根的影响, 建立了丽格海棠的高效再生体系, 为丽格海棠的遗传转化改良奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

丽格海棠, 由成都星瑞园艺公司提供。

第一作者简介: 徐美隆(1979-), 男, 四川大竹人, 在读硕士, 主要从事花卉转基因及诱变育种, E-mail: xml1106007@163.com。

通讯作者: 张怀渝, E-mail: zhyu@sicau.edu.cn。

收稿日期: 2007-03-23

[8] Litvay J D, Johnson M A, Verma D C et al. inst paper chem. [D]. Tech paper 114 Appleton, WI 1981.

Callus Induction and Culture of *Picea pungens* ‘*Glauca Globosa*’

SUN Jing-shuang¹, YU Hai², JIA Gui-xia¹

(1. Beijing Forestry University 100083; 2. Forestry Experimental Center of North China China Acedmy of Forestry)

Abstract: The results showed that: (1) Dormant buds, conifers and young stems of *Picea abies* ‘*Glauca Globosa*’ had the best effect sterilized by 0.1% mercuric chloride for 10 ~ 15min; (2) Callus from above three explants induced by 1/2LM +2, 4-D(0.5 ~ 3.0mg/L) + 6-BA(1.0 ~ 2.0mg/L) and dormant buds had the 77.36 percent highest rate induction. (3) Callus induced from dormant buds differentiated little shoots in the medium 1/2LM+NAA(0.5)+6-BA(1.0)+IBA(0.1). Callus from the explants of conifers and stems had some difficulties in multiplietion and died quickly.

Key words: *Picea pungens* ‘*Glauca Globosa*’; Callus; Induction; Differentiation