

北海道黄杨茎尖组织培养初报

马少梅, 麻冬梅, 谢应忠, 许 兴

(宁夏大学 农学院, 宁夏 银川 750021)

摘 要:以北海道黄杨的茎尖为材料,探讨了不同培养条件、生长素浓度等因子对建立茎尖再生体系的影响。结果表明:北海道黄杨茎尖诱导最适培养基为 6-BA+0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L,最适分化培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L,且在前 10 d 采用暗培养,之后采取光照培养。

关键词:北海道黄杨;茎尖;组织培养;再生体系

中图分类号:S 792.119 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-009(2010)03-0141-02

北海道黄杨(*Euonymus japonicus*)属卫矛科卫矛属的常绿阔叶树种,具有极强的耐寒特性,能耐-23.9℃的低温,是我国华北地区抗寒性最好的常绿阔叶乔木。北海道黄杨组织培养的成功,为短时间内快繁苗木、满足市场需求提供了技术基础。同时,也可为今后研究这一树种的植株再生及外源基因导入,培育抗寒、抗旱新品种提供参考。建立北海道黄杨的再生体系是为了将来更好的开展北海道黄杨的遗传转化工作。因为在北海道黄杨遗传转化体系建立的过程中,再生体系的建立起着决定性的作用,而且建立高效离体再生体系是进行基因转化工作的前提。但目前国内外关于北海道黄杨再生体系建立报道较少,为此,这方面的研究工作还有很大的空间,还需要更进一步的深入和摸索。因此,努力探索北海道黄杨再生体系的建立,以期为今后顺利的做好遗传转化工作奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

来源于现有的北海道黄杨试管苗。

1.2 试验方法

将北海道黄杨的茎尖在解剖镜下小心除去 2 片子叶,充分暴露出半透明圆锥状分生组织,并保留约 1 cm 左右的下胚轴,然后接种到相应生长素的 MS 培养基上进行不同程度的分化、增殖及生根培养。试验应用 1 种细胞分裂素(6-BA)和 3 种生长素(NAA、IAA、GA₃)的 4 种浓度梯度的自由组合设计,共有 12 种添加不同激素

种类或浓度的培养基,每种接种 10 皿,每皿 5 株。培养条件:温度(25±5)℃,光强 3 000~4 000 lx 每天光照 8~10 h。在培养过程中观察记录好不定芽的诱导率、芽分化以及生根情况。

2 结果与分析

2.1 激素配比和浓度对芽诱导率及成苗率的影响

将茎尖分生组织接种在 14 种不同激素组合中。结果表明,NAA+6-BA 激素组合较 IAA+6-BA 组合的萌发率和直接成苗率高,分别达 95.3%、87%,最高激素组合为 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L(单位以下同)。由表 1 可知,相同细胞分裂素浓度配比下,NAA 比 IAA 更利于茎尖诱导成苗,当 NAA 浓度为 0.1 时直接成苗率最高;随着 6-BA 浓度的升高,芽的诱导率呈上升趋势,但 6-BA 浓度过高易导致芽点愈伤组织化,不利于成苗,且容易褐化。

表 1 茎尖诱导培养基的筛选

培养基 编号	6-BA	NAA	IAA	接种数量	芽诱导率 /%	直接成苗率 /%	褐化情况
1	0.25			50	20	8	+
2		0.05		50	40	31	-
3		0.1		50	57	48	-
4		0.2		50	51	43	-
5	0.5	0.05		50	80	71	-
6		0.1		50	95.3	87	-
7		0.2		50	63	51	-
8				50	31	5.3	++
9	0.25		0.3	50	33	23.3	+
10			0.5	50	55	26.7	+
11			1.0	50	27	40	++
12	0.5		0.8	50	40	13.3	++
13			1.0	50	45	23	++
14			1.5	50	35	6.7	++++

2.2 不同培养条件对芽诱导率的影响

培养条件是苗正常生长的关键因素,不同的培养方式下,芽的诱导有很大的差异性(见表 2)。

第一作者简介:马少梅(1979-),女,宁夏银川人,硕士,现主要从事植物生态及资源与环境利用研究。E-mail:may007@163.com。

通讯作者:许兴(1959-),男,教授,博士生导师,现主要从事作物逆境生理与生物技术育种研究。E-mail:xuxingscience@126.com。

基金项目:国家“973”计划资助项目(2006CB100106)。

收稿日期:2009-10-10

表 2 不同培养条件下试管苗的生长

培养时间/d	7	15	30
培养条件			
光培养	部分芽点泛白	部分芽出现褐化现象	芽诱导率低于 30%，成苗率低于 10%
暗培养	芽点开始转绿	芽逐渐变黄，部分出现愈伤现象	芽逐渐褐化死亡，成苗率低于 30%
光/暗交替 (先暗后光)	芽点开始转绿	逐渐有小叶片展出	成苗率高于 50%

由表 2 可知,不同培养方式下,苗的生长状况有很大的差异,完全的光培养、暗培养都不利于试管苗茎尖的正常生长。完全的光培养下,大部分芽不易转绿,致使芽的诱导率较低,从而直接影响苗的转化率;然而,完全的暗培养条件下,虽然有部分芽可以转绿,但大部分芽褐化而死,因而苗的成苗率较低;因此,只有光/暗交替相结合的条件,才能弥补光培养下芽诱导率低的弱点,又能弥补暗培养下苗易出现褐化的现象。

2.3 北海道黄杨再生植株的分化培养

将已经诱导成功的不定芽接种到相应的分化培养基上进行试管苗的分化培养,相应的培养基为 MS+6-BA 1.0+NAA 0.2。大约 20 d 左右,在芽的基部逐渐开始出现绿色的芽点,约 30 d 左右便有鲜嫩的新植株形成,芽的分化系数约为 4 左右。

2.4 再生植株的生根及移栽

将经过复壮培养的北海道黄杨试管苗接种到相应的生根培养基 1/2MS+IBA 1.0+NAA 0.02 上进行生根培养,约 20 d 左右便有非常苗壮的不定根生成。练生根率达到 70% 左右,植株具有 2 条以上根系,根长达 1 cm 时,即可将组培苗转移到大环境下进行练苗移栽。经过一个星期后,取出小苗,洗尽根上的培养基,栽于配比为蛭石+珍珠岩(3:1)的基质上。

3 结论

利用北海道黄杨的茎尖作为外植体进行再生体系的建立,既可以快速繁殖,又可以保持遗传性状的稳定性。

不同的培养基配比及激素浓度,对茎尖不定芽的诱导率有很大的影响。激素浓度过高过低都不利于芽的诱导及成苗,经过不同浓度梯度的自由组合筛选发现:MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L 是适合北海道黄

杨茎尖不定芽诱导的最佳培养基配方,既能保证较高的诱导率和成苗率,且褐化程度又不高,苗生长健壮。

茎尖培养对培养条件要求甚高,由此,适当的培养方式可以直接提高苗的诱导率和成活率,并加快繁殖速度。通过验证,光暗交替培养方式是北海道黄杨茎尖培养的最佳培养条件。当然,不同品种间还存在不同程度的种间差异,有的品种适于光培养,有的品种适于暗培养,这都因品种而论。

当然,建立植物的再生体系主要是利用植物细胞的全能性,除了利用它的根、茎、叶外,还可以利用它的花、果实、种子以及其它的组织、细胞和原生质体等作为外植体建立再生体系。国内外关于北海道黄杨再生体系建立的研究较少,尤其是利用其茎尖作为外植体进行再生体系的建立,到目前为止还无相关报道,因此,此项试验的成功为其再生体系的建立以及将来的遗传转化工作做了很好的铺垫。

参考文献

[1] 陈正华. 木本植物组织培养及其应用[M]. 北京:高等教育出版社, 1980,45-45.

[2] 胡尚连,王丹. 植物生物技术[M]. 成都:西南交通大学出版社,2004:54-54.

[3] 李明. 农杆菌法转化棉花茎尖组织的初步研究[J]. 中国棉花,2007 (5):21-23.

[4] 曹孜义,刘国民. 实用组织培养教程[M]. 兰州:甘肃科学技术出版社,1996:78-80.

[5] 翁琴. 海岛棉茎尖再生体系的建立及农杆菌介导抗虫基因转化研究[J]. 新疆农业大学学报,2007,30(4):63-67.

[6] 李云,梁庆丰,赵芳,等. 北海道黄杨的组织培养[J]. 植物生理学通讯,2003,39:352.

[7] 李合生. 现代植物生理学[M]. 北京:高等教育出版社,2006:40-45.

[8] 马杰,郭利勇,崔波,等. 金边北海道黄杨再生体系的建立及其快繁初探[J]. 安徽农业科学,2008,36(6):2245-2246.

[9] 刘晓东,周鑫. 北海道黄杨树的组织培养[J]. 植物生理学通讯,2003, 39:236.

[10] Bonneau L, Beranger-Novat N, Monin J, et al. Stimulation of root and somatic embryo production in *Euonymus europaeus* L. by an inhibitor of polyamine biosynthesis[J]. Plant Growth Regulation, 1995(16):5-10.

[11] Kim M K, Sommer H E, Bongarten B C, et al. High-frequency induction of adventitious shoots from hypocotyl segments of *Liquidambar styraciflua* L. by thidiazuron[J]. Plant Cell Reports, 1997(16):536-540.

[12] Smith C C, Jernstedt J A. In vitro development of adventitious shoots in *Euonymus alatus* (Celastraceae)[J]. Scientia Horticulturae, 1989,41:161-169.

Advances on the Establishment of Shoot-tip of *Euonymus japonicus*

MA Shao-mei, MA Dong-mei, XIE Ying-zhong, XU Xing
(Departement of Agriculture Ningxia University, Yingchuan, Ningxia 750021)

Abstract: This paper used the shoot tips culture of *Euonymus japonica* as the materials, exploring the regeneration system of the shoot-tips culture was effected by the different conditions and their medium combination. The result showed that the most suitable induction medium for shoot-tip of *Euonymus japonicus* was 6-BA+0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L and the the optimal culture medium for culturing the multiplication of adventitious buds was MS+6-BA1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L. The full dark conditions were adopted for about ten days, then gave the enough lights

Key words: *Euonymus japonicus*; shoot tip; tissue culture; regeneration system