

I-45 杨的离体培养

张 瑛¹, 马丽源¹, 张贵学², 崔建国¹

(1. 沈阳农业大学 林学院, 辽宁 沈阳 110866; 2. 沈阳市林业果树科学研究所, 辽宁 沈阳 110136)

摘 要:以 I-45 杨带腋芽的茎段为外植体, 研究其离体培养中的最佳培养基和激素配比, 建立 I-45 杨再生系统。结果表明:最佳诱导培养基为 MS+KT 0.5 mg/L+NAA 0.02 mg/L, 诱导率为 82.2%;最佳继代培养基为 MS+KT 1.0 mg/L+NAA 0.02 mg/L;诱导生根的培养基为 1/2MS+IBA 0.05 mg/L, 生根率达 86.7%。

关键词:I-45 杨;离体培养;幼嫩茎段;植株再生

中图分类号:S 792.11 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)05-0119-03

杨树在我国分布广泛,西起新疆,东到东部沿海,北起黑龙江、内蒙古,南到长江流域的广阔范围内都有分布,是营造防护林和用材林的重要树种^[1]。杨树也是沈阳地区的主要造林树种,主栽品种有 I-45 杨、I-214 杨、中荷 64 杨等^[2]。

I-45 杨(*Populus × euramericana* cv. I-45)原产意大利,属欧美杨杂种无性系。它生长速度快,单株材积大,栽培方法简单,抗旱、抗寒、成活率高,树干通直圆满,树皮光滑,是营造速生丰产林和防护林的首选品种之一^[3]。I-45 杨在沈阳中西部平原区域生长良好,是沈阳的重要造林树种。

沈阳是东北老重工业基地,由于数十年的工业发展和污水灌溉,造成了严重的重金属污染。随着人们生活质量的不断提高和环保意识的不断增强,重金属污染土壤的修复已迫在眉睫。相对于物理、化学修复等重金属污染土壤修复技术而言,植物修复技术具有成本低、安全性高、效果良好、生态协调、资源可回收及环境美化功能等优点而受到高度重视^[4]。

目前重金属污染土壤植物修复试验所使用的植物主要是超富集植物^[5-8],但这些超富集植物都是草本植物,存在个体矮小、生物量低、生长缓慢、修复周期长等问题。杨树、柳树等木本植物虽然富集重金属的能力不如超富集植物,但由于其生长速度快、生物量大、根系分布深,在重金属污染土壤植物修复中表现出巨大的潜力^[9-11]。

树种选择是重金属污染土壤树木修复的前提,重金属污染土壤树木修复树种选择方法有田间试验、盆栽试验、离体选择等。相对于前 2 种方法,离体选择所用的繁

殖材料小,而且是无菌环境,不受病虫害的影响,因此减小了误差,得到的数据更为准确。近些年来,有关离体培养在植物修复中应用的报道也开始增多^[12-14]。I-45 杨是沈阳地区的主栽杨树品种之一,研究其对重金属的富集和吸收能力,可为其用于沈阳地区重金属污染土壤修复提供依据。该试验的目的就是建立 I-45 杨的离体再生体系,为离体条件下研究 I-45 杨植物修复能力提供试材。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2011 年 4 月底于沈阳市国营新民机械林场取沙藏的 1 a 生 I-45 杨带休眠芽的插穗扦插于试验苗圃内,1 个月后休眠芽萌发出嫩枝,取带腋芽的嫩枝茎段为外植体。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的消毒 先用毛笔蘸洗涤剂刷洗茎段,然后在流水下冲洗 3~4 h,剪成长约 3~5 cm 带 1 个腋芽的茎段,再在超净工作台上用 75% 的酒精浸泡 20 s,然后用无菌水清洗 1 遍,再用 0.1% 的 HgCl₂ 浸泡 2 min,最后用无菌水清洗 5 遍后接种到培养基中。

1.2.2 试验培养基及培养条件 各阶段培养基采用 MS 或 1/2MS 培养基,蔗糖浓度为 3%,琼脂 6.5~7.0 g/L, pH 为 5.8,在 121℃ 高压灭菌 20 min。培养室温度为 (24±2)℃,光/暗周期为 16 h/8h,湿度为 60%~70%。

1.3 数据分析

采用 SPSS 12.0.1 for Windows 软件包对试验数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同消毒时间对 I-45 杨腋芽萌发的影响

以 6 月份采取的带腋芽的茎段为外植体,研究不同消毒时间对外植体的污染率、死亡率和成活率的影响。杨树组培常用的消毒剂是 0.1% 的 HgCl₂。设置 4 个消毒时间,每处理 30 个外植体,3 次重复。由表 1 可知,不

第一作者简介:张瑛(1985-),女,在读硕士,现主要从事林木生物技术研究工作。

责任作者:崔建国(1969-),男,博士,教授,现主要从事林木生物技术和林木遗传改良研究工作。E-mail: cjgsau@yahoo.com.cn。

基金项目:沈阳市科学技术计划资助项目(F10-137-9-00)。

收稿日期:2011-11-29

同消毒时间对外植体的成活率、污染率以及死亡率均有显著影响。在 1.5~4.0 min 时间范围内,随着消毒时间的增加,成活率和污染率下降,而外植体死亡率却显著增加,当消毒时间为 4.0 min 时,外植体几乎全部变黑死亡;而消毒时间过低,污染率又显著增加。综上可知,当消毒时间为 2.0 min 时,效果最好。

表 1 消毒时间对外植体成活率、污染率以及死亡率的影响

处理	消毒时间/min	外植体/个	成活率/%	污染率/%	死亡率/%
1	1.5	90	57.8±1.9a	41.1±1.9a	1.1±1.9d
2	2.0	90	53.3±3.3a	36.7±3.3b	8.9±1.9c
3	3.0	90	26.7±3.3b	12.2±1.9c	61.0±4.0b
4	4.0	90	22.2±1.9c	4.4±1.9d	93.2±3.3a

注:表中数据为 3 次重复的均值±标准误;Duncan(D)多重比较,表中同列中不同字母表示 $\alpha=0.05$ 显著水平。下同。

2.2 不同激素配比对 I-45 杨外植体腋芽萌发的影响

将茎段接种到诱导培养基中,每处理接种 30 瓶,3 次重复。采用 MS 培养基,加入 KT(0.5、1.0、1.5 mg/L)和 NAA(0、0.02、0.05、0.10 mg/L),共 12 个处理。可以观察到腋芽的萌发较快,1 周左右腋芽膨大,叶柄断开,2 周就可以现叶。由表 2 可知,不同激素配比对腋芽的萌发有显著影响,当 KT 浓度为 0.5 mg/L, NAA 浓度为 0.02 mg/L,芽的诱导率最高,约为 82.2%(图 1)。

表 2 不同浓度激素对外植体腋芽萌发的影响

处理	KT /mg·L ⁻¹	NAA /mg·L ⁻¹	接种数 /个	不定芽数 /个	萌发率 /%	备注
1	0.5	0	90	12.7±0.3d	42.2±1.9d	
2	1.0	0	90	11.0±1.0e	36.6±3.3e	
3	1.5	0	90	8.0±1.0f	26.7±3.3f	
4	0.5	0.02	90	24.7±0.6a	82.2±1.9a	嫩茎顶端愈
5	1.0	0.02	90	19.0±1.0b	63.3±3.3b	伤化,有些会
6	1.5	0.02	90	9.3±0.6f	31.1±1.9f	生成小叶丛,
7	0.5	0.05	90	6.0±1.0g	20.0±3.3g	NAA 浓度相
8	1.0	0.05	90	15.3±0.6c	51.1±1.9c	同时,KT 浓
9	1.5	0.05	90	8.0±1.0f	26.7±3.3f	度偏小的芽
10	0.5	0.10	90	8.3±0.6f	27.8±1.9f	的长势较好
11	1.0	0.10	90	11.0±1.0e	36.7±3.3e	
12	1.5	0.10	90	5.0±1.0g	16.7±3.3g	

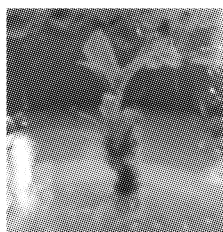


图 1 在添加 KT 0.5 mg/L 和 NAA 0.02 mg/L 的 MS 培养基上腋芽的萌发

2.3 I-45 杨继代培养

把各种外植体诱导出的少量的芽,转入继代培养基中扩大繁殖,每个处理接种 30 瓶。采用 MS 培养基, NAA 的浓度一定,为 0.02 mg/L,加入 KT(0.2、0.5、1.0、2.0 mg/L)。由表 3 可知,不同浓度的 KT 和 NAA 的配比对芽的扩大繁殖有显著影响,当 NAA 浓度一定,

KT 浓度在 0.2~2.0 mg/L 时,随着 KT 浓度的增加,苗高先增加后降低,成抛物线形状变化,当 KT 为 1.0 mg/L,苗的高度最高,长势最好(图 2)。

表 3 不同浓度激素对芽增殖的影响

KT/mg·L ⁻¹	NAA/mg·L ⁻¹	接种数/个	苗高/cm	备注
0.2	0.02	30	3.22±0.4c	
0.5	0.02	30	3.54±0.3b	苗高显著增加,
1.0	0.02	30	4.62±0.5a	但丛生芽较少
2.0	0.02	30	3.58±0.2b	



图 2 在添加 KT 1.0 mg/L 和 NAA 0.02 mg/L 的 MS 培养基上芽的增殖

2.4 I-45 杨诱导生根

继代培养 25 d,将芽转移到生根培养基上生根培养,采用 1/2MS 培养基,添加 IBA(0.02、0.05、0.10 mg/L),培养 28 d 后进行统计。由表 4 可知,当 IBA 浓度在 0.02~0.10 mg/L 之间都可诱导出不定根,但诱导出的根的数量和根长有显著差异。当 IBA 浓度为 0.05 mg/L 时,生根率最高,约为 86.7%,根长最长,约 3.19 cm(图 3);而当 IBA 的浓度增加到 0.10 mg/L 时,基部愈伤组织增加,须根增多,根长也变短。

表 4 不同浓度 IBA 对生根的影响

IBA /mg·L ⁻¹	接种数 /个	生根率 /%	根平均数 /条	根平均长 /cm	备注
0.02	30	84.4±1.9a	3.3±0.5b	2.51±0.17b	
0.05	30	86.7±0.1a	5.3±0.8a	3.19±0.11a	基部稍膨
0.10	30	70.0±1.9b	2.2±0.8c	2.37±0.05c	大,发黄



图 3 在添加 IBA 0.05 mg/L 的 1/2MS 培养基上诱导生根

3 讨论与结论

外植体的消毒是离体培养的基础,外植体消毒效果是否理想直接关系到芽的诱导率高低。在该试验中,当用 HgCl₂ 消毒时间过长时,外植体全部变黑干枯死亡;而时间过短时,污染率又很高,如何找到一个消毒时间的平衡点是提高成活率的关键。该试验中除了用二次消毒法之外,尚未尝试过其它消毒方法,或许尝试其它的消毒试剂会对消毒效果有所改善,有待在以后的相关研究中进一步探索。

在该试验中,不定芽的诱导结果表明,较低浓度的KT有利于不定芽的萌发,高于1.5 mg/L的浓度使不定芽的诱导率急剧下降,已表现出抑制作用,单独使用KT,不定芽的萌发率较低,当同时使用NAA与KT时极大地促进了不定芽的萌发。张建华等^[15]研究欧美速生杨离体培养也表明,较低浓度BA有利于不定芽的诱导,这表明较低浓度的细胞分裂素有利于欧美速生杨不定芽的诱导。在增殖培养时,适当增加细胞分裂素的浓度能显著促进芽的伸长生长,叶片也显著增大,但是未诱导出大量丛生芽,而刘曦珏研究银中杨组织培养结果表明,低浓度BA与NAA的组合更有利于银中杨茎段的继代与增殖培养,这说明由于各种植物的遗传特性、生物学特性和生态学特性不一致,即使同属的不同种植物,它们对植物调节激素的要求可能也不相同。在生根培养基中,添加IBA促进根的形成,试验表明较低浓度的IBA有利于根的形成,较高浓度的IBA不利于根的形成,张建华等^[15]研究欧美速生杨的离体繁殖时也指出,较高浓度的IBA会对根细胞分化产生胁迫,阻碍根的生长。

该研究表明,I-45杨组织培养的最佳培养基和激素配比为:(1)嫩茎腋芽诱导不定芽:MS+KT 0.5 mg/L+NAA 0.02 mg/L+30 g/L蔗糖;(2)不定芽扩繁:MS+KT 1.0 mg/L+NAA 0.02 mg/L+30 g/L蔗糖;(3)诱导生根:1/2MS+IBA 0.05 mg/L。以上所有培养基的pH为5.8。

参考文献

- [1] 于雷,沈威,彭建东,等. 简述辽宁省杨树发展产业[J]. 防护林技, 2009(1):113-115.
- [2] 潘成良,侯维政,李小鹏,等. 对杨树品种在辽宁各地发展的建议[J]. 辽宁林业科技,2003(3):18-19,32.
- [3] 史开奇,张中华,李素琼. 速生优良品种 I-45/51 杨树引种栽培试验[J]. 新疆林业,2003(1):13-15.
- [4] 周涛发,李湘凌,袁峰,等. 金属矿区土壤重金属污染的植物修复研究现状[J]. 地质评论,2008,7(4):514-522.
- [5] 陈俊,王敦球,张学洪,等. 李氏禾修复重金属(Cr、Cu、Ni)污染水体的潜力的研究[J]. 农业环境科学学报,2008,27(4):1514-1518.
- [6] 张若晨,赵华民. 山西省重金属污染与超积累植物修复[J]. 科技经济,2009,28(19):144-146.
- [7] 周琼. 我国超富集·富集植物筛选研究进展[J]. 安徽农业科学, 2005,33(5):910-912,916.
- [8] 鲍桐,廉梅花,孙丽娜,等. 重金属污染土壤植物修复研究进展[J]. 生态环境,2008,17(2):858-865.
- [9] 杨卫东,陈益泰. 不同杞柳品种对镉(Cd)吸收与忍耐的差异[J]. 林业科学研究,2008,21(6):857-861.
- [10] 胡恭任,于瑞莲,吕斌. 桐花树对水体中铬、镍、铜污染的修复实验研究[J]. 中国矿业,2009(1):68-72.
- [11] 薛建永,张文辉,刘新成. 不同能源柳无性系对土壤镉污染的抗性研究[J]. 植物研究,2007,28(4):491-496.
- [12] Gatti E. Micropropagation of *Ailanthus altissima* and *in vitro* heavy metal tolerance[J]. Biologia Plantarum,2008,52(1):146-148.
- [13] Nehnevajova E, Herzig R, Erisman, et al. *In vitro* breeding of *Brassica juncea* L. to enhance metal accumulation and extraction properties[J]. Plant Cell Reports,2007,26:429-437.
- [14] Fernandez R, Bertrand A, Casares A. Cadmium accumulation and its effect on the *in vitro* growth of woody fleabane and mycorrhized white birch[J]. Environmental Pollution,2008,152:522-529.
- [15] 张建华,庄天明,何林,等. 欧美速生杨离体繁殖体系[J]. 上海交通大学学报(农业科学版),2004,12(4):378-340.
- [16] 于志水,金红,尚胜军,等. 黑杨派杨树组织培养再生系统的研究[J]. 辽宁林业科技,2002(6):11-13.
- [17] 刘长莉,沈海东,张羽,等. 新疆杨组织培养技术[J]. 东北林业大学学报,2004,32(1):5-7.
- [18] 郭晓华,那宁馨. 新疆杨组织培养技术的研究[J]. 中国农学通报, 2002,6(3):25-27.
- [19] 胡延生,闫向东. 银中杨的组织培养试验[J]. 吉林农业科技学院学报,2007,6(2):3-5.
- [20] 程贵兰,姜静,蔡智军. 中黑防杨(美洲黑杨×青杨)的组织培养和植株再生[J]. 植物生理学通讯,2004,10(5):585.
- [21] 耿飒,姬生栋,袁金云,等. 青杨组织培养快速繁殖[J]. 河南师范大学学报,2006,5(2):103-109.
- [22] 马同福,马宗生. 杨树叶片高效离体再生系统的建立[J]. 农业生物技术科学,2007(12):88-92.
- [23] 贾小明,樊军锋,王娟娟. 河北杨和新疆杨叶片离体诱导不定芽的研究[J]. 西北农林科技大学学报,2006(12):110-114.
- [24] 何晓兰,王保松,韩杰峰,等. 35 杨微繁殖和不定芽再生的研究[J]. 江苏林业科技,2009,8(4):1-4.
- [25] 沈周高,项艳,蔡诚,等. 3 个杨树品种叶片再生体系的建立[J]. 林业科学,2006(11):90-96.
- [26] 王钰,阮龙,严平. 速生杨 110 的组织快繁技术的研究[J]. 安徽农业科学,2005,33(10):1882.
- [27] 杨丽琴,李瑞,王俊. 植物组织培养的三大难题[J]. 北方园艺,2008(4):104-107.
- [28] 许红梅. 植物组织培养中的污染及防止措施[J]. 北方园艺,2006(6): 148-149.

In vitro Culture of *Populus* × *euramericana* cv. I-45

ZHANG Ying¹, MA Li-yuan¹, ZHANG Gui-xue², CUI Jian-guo¹

(1. College of Forestry, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866; 2. Shenyang Research Institute of Forestry and Pomology, Shenyang, Liaoning 110136)

Abstract: The suitable medium and plant growth regulator of plants were investigated by using popular axillary buds of nodal segments as explants. The results showed that MS medium supplemented with KT 0.5 mg/L and NAA 0.02 mg/L could induce shoots and the induction rate was 82.2%. Subcultured to MS medium added with KT 1.0 mg/L and NAA 0.02 mg/L could promote shoot growth. The rooting medium was 1/2MS medium in addition to IBA 0.05 mg/L, with the rooting rate of 86.7%.

Key words: *Populus* × *euramericana* cv. I-45; *in vitro* culture; tender stem segment; plant regeneration