

## 小美旱杨初代培养研究

代金玲, 乌日罕, 李佳琪, 华佳文, 白玉娥\* (内蒙古农业大学林学院, 内蒙古呼和浩特 010019)

**摘要** 以小美旱杨一年生幼嫩茎段为外植体, 研究了不同消毒时间、不同基本培养基类型、不同生长调节剂配比下小美旱杨初代培养的情况。结果表明: 茎段表面消毒以 75% 乙醇 30 s+0.1% HgCl<sub>2</sub> 12 min 为佳; MS 培养基中腋芽的萌发率高于 1/2MS 和 WPM 培养基; 初代培养最适的生长调节剂为 0.10 mg/L 6-BA+0.10 mg/L NAA, 诱导率为 91.67%。

**关键词** 小美旱杨; 茎段; 腋芽诱导; 初代培养

中图分类号 S723 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2021)05-0125-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2021.05.035

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



### Study on the Primary Culture Technology of *Populus popular's*

DAI Jin-ling, WU Ri-han, LI Jia-qi et al (College of Forestry, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia 010019)

**Abstract** Taking the stems as explants, the disinfection methods, basic medium and different hormone affecting the initial culture of *Populus popular's* were studied. The results showed that the best disinfection method was using 0.1% HgCl<sub>2</sub> for 12 minutes, it had lower contaminated rate and mortality rate. MS medium was the best one for primary culture, the germination time and growth conditions were better than other mediums. The highest percentage of axillary bud induction (91.67%) was obtained on MS medium with 0.10 mg/L 6-BA and 0.10 mg/L NAA.

**Key words** *Populus popular's*; Stem segment; Axillary bud induction; Primary culture

杨树是我国主要的速生造林树种之一, 其蓄积量大、分布范围广, 对解决用材问题和改善生态环境起着十分重要的作用<sup>[1]</sup>。小美旱杨(*Populus popular's*)为杨树的一个杂交种, 属高大乔木, 主干通直圆满、尖削度小、树皮灰褐色、下部纵裂、侧枝基部与主干呈 35°~45°角, 具有耐干旱、耐盐碱、抗寒抗病性强、生长快等优良性状<sup>[2]</sup>, 可用于营造速生丰产林、防护林及四旁植树。小美旱杨是我国北方, 特别是内蒙古河套灌区首选的农田防护林树种, 占当地防护林总面积 60% 以上, 已经形成小美旱杨防护林体系<sup>[3]</sup>。

通过组织培养可缩短苗木生长周期, 提高繁殖率, 有利于苗木的规模化生产和推广<sup>[4]</sup>。而组织培养技术的起始阶段均涉及外植体取材、灭菌、接种等基本过程<sup>[5]</sup>。目前, 对于小美旱杨的研究主要集中在耐盐、抗旱及抗虫等方面<sup>[6-10]</sup>, 组织培养报道仅有数例<sup>[11-12]</sup>。该试验通过对影响小美旱杨初代培养的因素进行探索和分析, 寻求初代培养最适宜的培养条件, 旨在为今后小美旱杨离体快繁和遗传转化体系的建立奠定基础。

## 1 材料与与方法

**1.1 材料** 以内蒙古农业大学东区内的小美旱杨一年生幼嫩茎段为试验材料。

### 1.2 方法

**1.2.1 外植体的处理和消毒。** 选择无病虫害、生长健壮的植株, 取一年生枝条带回实验室, 用流水冲洗去除表面污物, 再用毛刷蘸洗衣粉刷洗表面。将茎段剪为 10 cm 左右的小段, 超净工作台先用 75% 乙醇消毒 30 s, 无菌水冲洗 5 次, 再用 0.1% 生汞(HgCl<sub>2</sub>)消毒, HgCl<sub>2</sub> 处理时间分别为 6、8、

10、12 和 14 min。各处理均用无菌水冲洗 5 次, 然后将茎段两侧与消毒液接触的部位切掉, 切成 2 cm 左右带腋芽的茎段, 接种到培养基中, 每升培养基均添加倍力凝 6 g, 蔗糖 30 g, pH 5.95~6.00, 121 °C 灭菌 20 min (以下培养基的蔗糖含量、pH、灭菌方法均相同)。每个处理接种 20 瓶, 每瓶接种 1 个茎段, 3 次重复。在培养的第 15 天, 统计污染率、死亡率和存活率。

**1.2.2 不同基本培养基对初代培养的影响。** 基本培养基的筛选试验选用 WPM、1/2MS、MS 培养基, 培养基不添加任何生长调节物质。基于“1.2.1”试验结果, 将茎段消毒后进行接种。每个处理 20 瓶, 每瓶接种 1 个茎段, 3 次重复。接种后记录腋芽萌发时间和生长状况, 30 d 后统计腋芽萌发率。

**1.2.3 不同生长调节剂组合对初代培养的影响。** 基于“1.2.2”试验结果, 选择适宜的基本培养基, 植物生长调节剂选择 6-苄基嘌呤(6-BA)和萘乙酸(NAA), 浓度梯度 6-BA 为 0、0.05、0.10 和 0.20 mg/L, NAA 为 0、0.05、0.10 和 0.20 mg/L, 接种 30 d 后统计腋芽萌发时间、生长情况及腋芽萌发率。

**1.2.4 培养条件。** 外植体接种后置于培养室内培养, 培养温度(25±2)°C, 光照强度 2 000 lx, 光照时间 12 h/d。

**1.3 数据分析** 数据采用 Excel 和 SPSS 软件进行分析和分析。生长情况的评价标准分为 3 个等级: 第 1 个等级为芽细弱, 生长缓慢, 叶色发黄(+); 第 2 个等级为芽长势一般, 叶色浅绿(++); 第 3 个等级为芽健壮, 生长较快, 叶色浓绿(+++)。

## 2 结果与分析

**2.1 不同 HgCl<sub>2</sub> 消毒时间对外植体的影响** 外植体消毒是获得无菌苗的关键, 对小美旱杨茎段采用 5 种 HgCl<sub>2</sub> 消毒时间处理。由表 1 可知, 0.1% HgCl<sub>2</sub> 消毒时间为 6 min 时, 外植体污染率为 100%。表明消毒时间过短, 无法消除外植体上的微生物, 导致材料全部感染。随着消毒时间的延长, 污染率大幅降低, 当消毒时间为 12 和 14 min 时, 污染率分别

**基金项目** 西北地区杨树主栽品种高效、安全、规模化遗传转化体系资助项目(2018ZX08020002-005-005)。

**作者简介** 代金玲(1986—), 女, 吉林延边人, 实验师, 硕士, 从事林木生物技术研究。\* 通信作者, 教授, 博士, 从事林木生物技术研究。

**收稿日期** 2020-06-18

为 13.33% 和 18.33%, 而 2 个处理间污染率差异不显著。消毒时间为 12~14 min 均能有效消除外植体上的微生物。但消毒液对外植体有一定的毒害, 处理 5 的死亡率高于处理 4。综合考虑, 当消毒时间为 12 min 时消毒效果最好, 污染率和死亡率较低, 外植体的存活率最高, 为 81.67%。

表 1 0.1%HgCl<sub>2</sub> 不同消毒时间的消毒效果

Table 1 Disinfection effect of 0.1%HgCl<sub>2</sub> with different time

处理 Treatment	消毒时间 Disinfection time//min	污染率 Contamination rate//%	死亡率 Mortality rate//%	存活率 Survival rate//%
1	6	100 a	0 c	0 d
2	8	81.67±7.64 b	13.33±5.77 b	5.00±5.00 d
3	10	48.33±12.58 c	6.67±2.89 bc	45.00±13.23 b
4	12	13.33±2.89 d	5.00±5.00 bc	81.67±5.77 a
5	14	18.33±7.64 d	60.60±8.66 a	21.67±5.77 c

注: 同列数据后不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著

Note: Different small letters within the same column mean significant differences ( $P < 0.05$ )

**2.2 不同基本培养基对初代培养的影响** 在不添加任何生长调节物质的条件下, 3 种培养基上茎段腋芽萌发的情况存在显著差异(表 2)。MS 培养基上培养第 10 天时, 部分腋芽开始慢慢膨大随后萌发, 叶片缓慢展开, 在第 30 天统计萌芽率最高, 为 76.50%; WPM 培养基次之, 萌芽时间为 13 d, 萌芽率为 68.75%; 1/2MS 培养基诱导时间最长, 为 16 d, 萌芽率最低, 为 51.00%。因此, MS 培养基是小美早杨初代培养最适宜的基本培养基。

表 2 基本培养基类型对初代培养的影响

Table 2 Effects of basic medium type on primary culture

处理 Treatment	培养基 Medium	萌芽时间 Germination time//d	萌芽率 Germination rate//%	生长状况 Growth condition
1	WPM	13	68.75±4.79 b	++
2	MS	10	76.50±6.45 a	+++
3	1/2MS	16	51.00±5.77 c	+

注: 同列数据后不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著

Note: Different small letters within the same column mean significant differences ( $P < 0.05$ )

**2.3 不同生长调节剂浓度组合对初代培养的影响** 生长调节剂对带芽茎段的再生起着至关重要的作用。在植物组织培养中, 使用最多的生长调节剂是细胞分裂素和生长素, 通过调节培养基中生长调节物质的含量, 可以提高腋芽的萌发率。从表 3 可以看出, 不同浓度的 6-BA 和 NAA 组合均可诱导小美早杨腋芽萌发, 但是诱导能力存在差异。低浓度组合(6-BA 0.05 mg/L、NAA 0.05~0.20 mg/L)时, 腋芽萌芽时间、萌发率及腋芽生长状况均不如对照。而当 6-BA 和 NAA 浓度为 0.20 mg/L 时, 由于生长调节剂浓度较大, 其对腋芽的诱导产生了抑制作用, 且出现黄化现象。当 6-BA 为 0.10 mg/L、NAA 为 0.05、0.10 mg/L 时, 诱导率分别为 86.33% 和 91.67%, 且 2 个处理间差异不显著, 但是处理 6 腋芽的生长状况更佳, 且萌芽时间更早。因此, 小美早杨最佳的初代培养基为 MS+0.10 mg/L 6-BA+0.10 mg/L NAA。在最适激素浓度培养基上, 培养 8 d 的茎段上腋芽开始膨大伸长(图 1A); 培养 15 d 的茎段基部形成愈伤组织, 腋芽伸长至约 3 cm, 叶片展开(图 1B); 培养 25 d 时腋芽生长成茎段, 生长旺盛, 叶色浓绿, 叶片舒展(图 1C)。

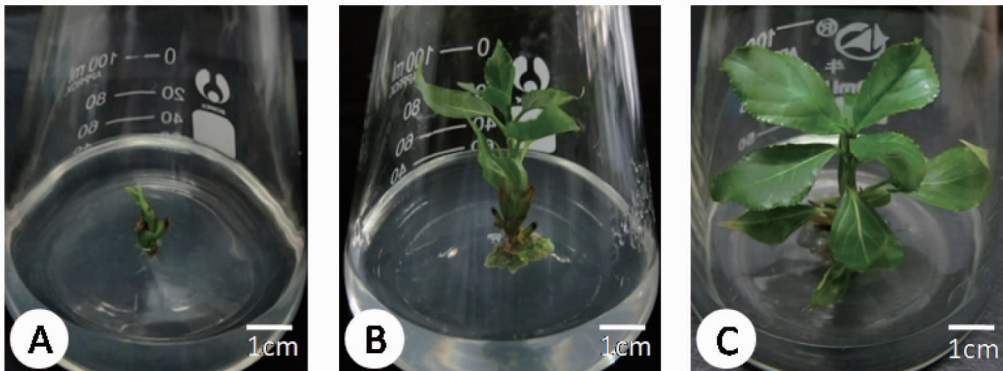
表 3 不同浓度 6-BA 和 NAA 对初代培养的影响

Table 3 Effects of different concentrations of 6-BA and NAA on primary culture

处理 Treatment	6-BA mg/L	NAA mg/L	萌芽时间 Germination time//d	萌芽率 Germination rate//%	生长情况 Growth condition
1	0	0	10	74.67±3.51 b	++
2	0.05	0.05	14	38.67±2.08 e	+
3	0.05	0.10	13	55.33±4.51 d	+
4	0.05	0.20	15	52.00±2.65 d	+
5	0.10	0.05	10	86.33±2.31 a	++
6	0.10	0.10	8	91.67±2.89 a	+++
7	0.10	0.20	11	69.67±4.51 bc	++
8	0.20	0.05	17	64.67±4.51 c	++
9	0.20	0.10	15	72.00±2.65 b	+
10	0.20	0.20	20	37.00±2.65 e	+

注: 同列数据后不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著

Note: Different small letters within the same column mean significant differences ( $P < 0.05$ )



注: A. 培养 8 d 的腋芽; B. 培养 15 d 的腋芽; C. 培养 25 d 的腋芽

Note: A. The axillary buds were cultured for 8 d; B. The axillary buds were cultured for 15 d; C. The axillary buds were cultured for 25 d

图 1 最佳培养基上腋芽的诱导情况

Fig. 1 Induction of axillary buds on the optimal medium

### 3 结论与讨论

外植体消毒是植物组织培养的重要环节之一。杨树初代培养中,乙醇、HgCl<sub>2</sub> 和次氯酸钠 (NaClO) 为最常用的消毒液,也有使用双氧水 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 和次氯酸钙 (Ca(ClO)<sub>2</sub>) 的报道。试验中采用 75% 乙醇 30 s+0.1% HgCl<sub>2</sub> 12 min 获得了较好的消毒效果。黄枝英等<sup>[13]</sup> 以台湾速生杨 (Fast-growing Taiwan Poplar) 嫩茎为材料,用 0.1% 和 0.15% 的 HgCl<sub>2</sub> 溶液分别消毒 10、15 min,最后得出使用 0.1% HgCl<sub>2</sub> 溶液消毒 10 min 时,消毒效果最好,此时污染率为 23.3%、出芽率为 75.3%。木本植物生长周期长,次生代谢物分泌较多,容易滋生细菌,且不易消除;研究中有 3 种消毒剂同时使用的报道,孙立兴等<sup>[14]</sup> 在银中杨 (*P. alba* 'Berolinensis') 组织培养试验中选用 70% 乙醇 30 s+0.1% HgCl<sub>2</sub> 12~15 min+NaClO 5 min 消毒。但消毒剂处理时间过长会对植物组织和细胞有杀伤作用<sup>[5]</sup>,因此要综合考虑各方面因素,选择适合的消毒剂和消毒时间。

MS 是木本植物组织培养中应用最为广泛的培养基,其中钾盐、铵盐及硝酸盐等无机盐含量较高,微量元素种类较全<sup>[15]</sup>。近年来我国在杨树成功离体培养试验中,多数选用 MS 培养基。该研究中 MS 培养基上腋芽萌发及生长状况优于 1/2MS、WPM,所以 MS 培养基为小美早杨初代培养适宜的培养基。李慧等<sup>[16]</sup> 研究了毛白杨 (*P. tomentosa*) 30 号和 02-9-22 号在 MS、1/2MS、1/4MS 培养基上腋芽诱导情况,发现 MS 培养基上腋芽诱导率最高,与该试验研究结果相同。陈淑华等<sup>[17-18]</sup> 在银新杨 (*P. alba* × *P. alba* var. *pyramidalis*) 和南方常绿杨 (*P. deltoides* × *P. nigra* cv. *Chile*) 初代培养中使用了改良的 MS 培养,得到了较好的诱导效果。

初代培养过程中生长调节剂种类和配比的选择至关重要。据报道,6-BA 和 NAA 这 2 种激素配合使用对腋芽诱导及增殖培养效果明显,6-BA 和 NAA 常用浓度为 0.05~1.00 mg/L。该研究中当 6-BA 为 0.10 mg/L、NAA 为 0.10 mg/L 时,初代培养效果最好,腋芽生长健壮、叶色浓绿。程云清等<sup>[19]</sup> 对鞍杂杨 (*P. ×xiaozuanica* cv. *Anza*) 茎段进行初代培养,筛选出以 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L 培养基为最佳。郑艾琴等<sup>[20]</sup> 以河北杨 (*P. hopeiensis*) 幼嫩茎段为外植体,筛选出适合河北杨初代培养的培养基为 1/2MS+6-BA 0.3~0.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L。王桂英等<sup>[21]</sup> 以巨霸杨 (*P. deltoides* 50 × *P. deltoides* 36) 为研究对象,6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L 组合对芽萌发和芽分化生长有较好的促进效果。张瑞芝等<sup>[22]</sup> 筛选出欧美杨 (*P. nigra* × *P. deltoides*) 的最优

初代培养基配方为 MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L。由于树种、取材位置和时间等条件的不同,所以筛选出的基本培养基种类和生长调节剂配也不尽相同。

在接下来的试验中,课题组将对继代培养及再生体系的建立进行进一步研究。该试验优化了小美早杨初代培养的条件,建立了离体培养体系,为其快繁和遗传改良奠定了基础。

### 参考文献

- [1] 王沛雅,杨晖,郭琪,等. 分子遗传改良技术在杨树上的研究与应用进展[J]. 江苏农业科学,2017,45(20):17-24.
- [2] 柴旭光. 阜新小美早杨的良种选育及区域化试验[J]. 防护林科技,2014(2):73-74.
- [3] 朱丽. 河套灌区小美早杨两种造林方式比较[J]. 阴山学刊(自然科学版),2004,18(1):87-89.
- [4] OGITA S. Plant cell, tissue and organ culture: The most flexible foundations for plant metabolic engineering applications[J]. Natural product communications, 2015, 10(5): 815-820.
- [5] 杨凤玲. 沂州木瓜初代培养技术研究[J]. 北方园艺, 2011(17): 144-145.
- [6] 柴宏伟. 小美早杨病虫害及防治措施[J]. 中国林副特产, 2019(4): 54-56.
- [7] 刘明虎, 张景波, 孙非, 等. 干旱区不同供水下杨树水分效应和生态用水量研究[J]. 水土保持研究, 2012, 19(6): 58-63.
- [8] 张芳, 闫琳, 刘静, 等. 小美早杨防护林采伐对灌区减盐作用的研究[J]. 内蒙古农业大学学报(自然科学版), 2005, 26(4): 26-29.
- [9] 高岩, 刘静, 张汝民, 等. 应用热脉冲技术对小美早杨耗水量的研究[J]. 内蒙古农业大学学报(自然科学版), 2001, 22(1): 44-48.
- [10] 陈必胜, 汪晓沙, 黄梅, 等. 杨树耐盐性研究进展[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(35): 17161-17163, 17230.
- [11] 叶冬梅, 华佳文, 于晓倩, 等. 小美早杨再生体系的建立[J]. 分子植物育种, 2020, 18(14): 4734-4739.
- [12] 马丽, 沈昕, 陈少良. 群众杨树组培体系的研究[J]. 河北林果研究, 2005, 20(2): 114-116, 119.
- [13] 黄枝英, 庄卫东, 汤红玲, 等. 台湾速生杨树离体再生体系的建立[J]. 福建农业学报, 2018, 33(4): 386-390.
- [14] 孙立兴, 李永强, 张宝, 等. 不同浓度激素对银中杨组织培养实验的影响[J]. 防护林科技, 2017(21): 38-44.
- [15] HUANG Z, XU C P, LI Y, et al. Induction of somatic embryogenesis by anther-derived callus culture and plantlet ploidy determination in poplar (*Populus × beijingensis*) [J]. Plant cell tissue & organ culture, 2015, 120(3): 949-959.
- [16] 李慧, 樊军锋, 高建社, 等. 毛白杨无性系 30 号组培再生体系的建立[J]. 北方园艺, 2012(3): 110-113.
- [17] 陈淑华, 王彦, 刘晓慧, 等. 银新杨组织培养快繁技术的研究[J]. 吉林林业科技, 2011, 40(4): 4-6.
- [18] 蔡玲, 王以红, 吴幼媚, 等. 南方常绿杨再生体系建立[J]. 广西林业科学, 2002, 31(3): 144-146, 150.
- [19] 程云清, 刘剑峰, 王占武, 等. 鞍杂杨组培快繁技术[J]. 东北林业大学学报, 2011, 39(2): 11-12, 20.
- [20] 郑艾琴, 殷建宝. 河北杨树组培快繁技术研究[J]. 林业实用技术, 2013(1): 28-29.
- [21] 王桂英, 刘晓杰, 李珊珊, 等. 巨霸杨树组培再生体系的建立及潮霉素抗性试验[J]. 北方园艺, 2015(13): 98-102.
- [22] 张瑞芝, 王峰, 李丹蕾, 等. 欧美杨再生体系的建立[J]. 中国农学通报, 2017, 33(4): 48-53.
- [23] 钟雁, 朱立, 储蓉. 贵州省彩色观赏植物发展及应用前景探讨[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(26): 10706-10707, 10710.
- [24] 安欣, 王亚芸, 任建武, 等. 环境因素对彩叶植物色素含量的相关影响[J]. 中国园艺文摘, 2013, 29(11): 19-21.
- [25] 王慎谦. 北京市大兴区景观林改造提升中植物选择与配置方面的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2015.
- [26] 邱玉宾, 郭东环, 杨志莹, 等. 六个北美豆梨品种的生态适应性评价[J]. 林业科技开发, 2015, 29(6): 48-51.
- [27] 徐炜. 试论园林地被植物综合评选标准[J]. 中国园林, 1993, 9(3): 52-55.

(上接第 124 页)

- [2] 何梅, 王华, 胡玉安, 等. 彩叶树种研究与开发利用现状[J]. 江西农业大学学报, 2018, 40(6): 1134-1144.
- [3] 李娜, 安妍, 姜雪琪, 等. 哈尔滨市彩叶树种多样性及引种应用调查[J]. 黑龙江农业科学, 2016(10): 102-105.
- [4] 黄河, 雷兴华, 秦海英, 等. 黄杨叶色特性初步研究[J]. 南方农业, 2012, 6(10): 11-13.
- [5] 邵京. 彩叶植物在城市园林景观中的应用: 以南京市为例[J]. 安徽农业科学, 2020, 48(15): 119-121.