

文章编号:1002-2724(2007)02-0017-03

柳树愈伤组织的诱导研究

张天宇^{1,2}, 燕丽萍^{1*}, 夏 阳^{1*}, 张俊莲², 刘翠兰¹, 李双云¹, 李 丽¹

(1. 山东省林业科学研究院, 济南 250014; 2. 甘肃农业大学农学院)

摘要: 柳树愈伤组织诱导的试验结果表明: 以 MS+6-BA1.0mg/L+NAA 0.5mg/L+3%蔗糖为基本培养基, 茎段为外植体诱导愈伤组织效果较好; 黑暗培养 20 天后转到光下培养, 能提高愈伤组织诱导率。

关键词: 柳树; 组织培养; 愈伤组织; 诱导率

中图分类号: S722.3

文献标识码: A

柳树 *Salix viminalis* L 属于杨柳科, 柳属, 落叶乔木或灌木。生长快, 耐盐碱, 在荒漠地区用途广泛。为了进一步提高柳树的耐盐性和抗旱性, 扩大适生范围, 使其具有更高的生态和经济效益, 我们利用基因工程技术, 将抗旱耐盐基因转化到特定品种, 以提高其抗旱性和耐盐性。关于柳树组织快繁方面国内外有相关报道, 但未见遗传转化受体再生体系建立研究的报道。本研究以不同外植体、基本培养基、激素、培养条件和不同浓度的蔗糖等为影响因子, 进行了柳树愈伤组织诱导的研究, 为柳树再生体系的建立和利用基因工程育种改良性状奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

柳树优良品种 Q106 的无菌苗, 由山东省林科院重点实验室提供。

1.2 试验方法

1.2.1 培养条件 培养温度白天(25±1)℃, 夜晚(18±1)℃; 光周期/暗周期为 16/8h, 光照强度 1000~2000LX, 湿度为 60%。暗培养 20 天, 然后再转到光下培养 10 天后统计结果。

1.2.2 适宜培养基的筛选 采用 MS、WPM、B5 和改良 SH 培养基(N6 大量+SH)进行试验。

1.2.3 适宜外植体的筛选 采用无菌苗的嫩茎段、叶片、叶柄带叶基部和根进行试验。

1.2.4 生长素种类和浓度的确定 NAA、IBA、2,4-D、IAA 分别设置 5 个浓度梯度: 0.1、0.3、0.5、0.7、1.0mg/L, 以 MS 为基本培养基附加 6-BA1.0mg/L 进行试验。

1.2.5 细胞分裂素种类和浓度的确定 BA、KT、TDZ、ZT 分别设置 5 个浓度梯度: 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 mg/L, 以 MS 为基本培养基附加 NAA0.5mg/L 进行试验。

1.2.6 蔗糖浓度的确定 以 MS+BA1.0mg/L+NAA0.5mg/L 为基本培养基, 蔗糖浓度依次为 0.5%、1.5%、3%、4.5%、6%、7.5% 进行筛选试验。

1.2.7 光培养和暗培养的影响 以 MS 为基本培养基, 附加 BA1.0mg/L、NAA0.5mg/L, 6% 的琼脂, 3% 的蔗糖进行试验; 分别设置 3 个处理: 1) 暗培养 30 天; 2) 暗培养 20 天后在光下培

养 10 天; 3) 光培养 30 天。

2 结果与分析

2.1 培养基对愈伤组织诱导的影响

表 1 培养基对愈伤组织诱导率的影响

培养基	愈伤组织大小(mm)	愈伤组织颜色	愈伤组织状态	愈伤组织诱导率(%)
MS	15	黄白、红褐、灰绿	疏松、干燥	92
B5	6	浅红黄、白绿色	松散、湿润	16
WPM	12	浅黄、绿色	松软、湿润	78
改良 SH	14	浅黄、白绿色	疏松、湿润	86

从表 1 可以看出 4 种培养基中都有愈伤组织产生, 但不同的培养基诱导的愈伤组织存在着很大的差异。在 MS 培养基上为“五花肉”状: 黄白、红褐、灰绿等多种颜色混存, 表面松散, 干燥易脆; 在 B5 培养基上为浅黄、白绿色, 表面突起; 在 WPM 培养基上有白色至浅黄色和绿色, 表面松软、无组织结构、生长迅速。在改良 SH 培养基上愈伤组织颜色浅黄, 白绿, 表面较湿润。MS 培养基诱导的愈伤组织直径(15mm)和愈伤组织诱导率(92%)都优于其他 3 种培养基, 改良 SH 培养基次之, B5 培养基较差。

2.2 外植体对愈伤组织诱导的影响

表 2 外植体对愈伤组织诱导率的影响

外植体	愈伤组织大小(mm)	愈伤组织颜色	愈伤组织状态	愈伤组织诱导率(%)
茎段	15	黄、褐红、绿	疏松、微干	96
叶片	12	浅绿、乳白	松软、湿润	89
叶柄	14	浅绿、褐红	疏松、湿润	94
离体根	9	灰白、浅黄	松软、湿润	73

选用的不同外植体在培养后均能诱导出愈伤组织, 并且诱导率均较高(见表 2)。其中茎段与叶柄在 10 天后, 在切伤处有愈伤组织出现, 并随着天数增加体积逐渐扩大, 慢慢地

收稿日期: 2007-02-07

* 通讯作者

形成愈伤组织;叶片是在接种 15 天后在创伤处长出愈伤组织,随着培养时间的延长,颜色逐渐由乳白色变绿色。以嫩茎段为外植体,愈伤组织诱导率达到了 96%,直径 15mm,优于其他 3 种外植体的诱导。叶柄也是愈伤组织诱导较好的材料,同时可以避免茎段芽点切不净的问题。

2.3 激素对愈伤组织诱导的影响

2.3.1 生长素对愈伤组织诱导的影响

当生长素浓度在 0.1~0.5mg/L 区间由低变高时,诱导效果随着提高,浓度在 0.5mg/L 时诱导较适宜,超过 0.5mg/L 时愈伤组织诱导效果差异不明显(见图 1)。NAA 在浓度 0.5mg/L 时愈伤组织诱导率和直径优于其他生长素的诱导。不同生长素不同浓度诱导出的愈伤组织颜色、状态不同,在浓度小于 0.5mg/L 时 NAA、IBA 诱导的愈伤组织愈伤表面较光滑,松软水状,半透明,生长缓慢,颜色由开始白变成淡黄色;当浓度在 0.1~0.5mg/L 时颜色由多种颜色组合(肉花状),有松散绿色内核;当浓度大于 0.5mg/L 时大部分愈伤组织的颜色为暗绿或褐绿色,致密紧实表面有很多突起不透明。2,4-D 诱导的愈伤组织颜色为浅黄色和砖红色,表面光滑。IAA 诱导的愈伤组织颜色呈绿色,愈伤块较小,不适宜作愈伤组织诱导的生长素。说明 6-BA 1.0mg/ml 与一定浓度的生长素配合使用时,可极大提高诱导率,其中 NAA 配合较适宜。加入生长素量过大不利于出芽愈伤组织诱导,而且诱导出的愈伤组织结构松散,再分化能力差。各生长素对茎段有效愈伤组织诱导率依次:NAA > 2,4-D > IBA > IAA。

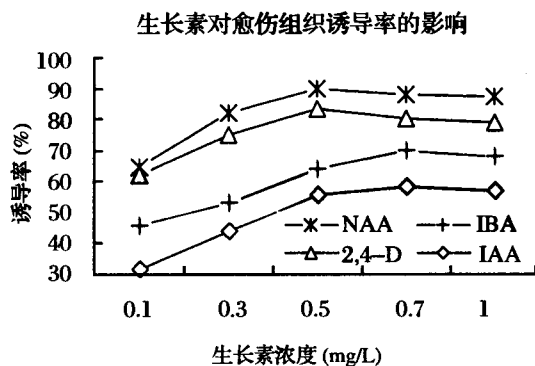
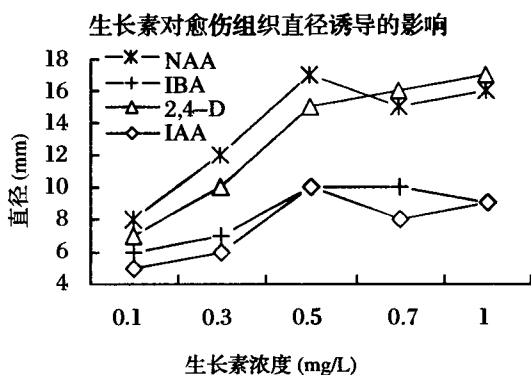


图 1 生长素对愈伤组织诱导的影响



2.3.2 细胞分裂素对愈伤组织诱导的影响

当细胞分裂素浓度为 0.5~1.0 mg/L 时,愈伤组织诱导率和直径逐渐增大,当超过此范围时,随着浓度增大时显著降低(图 2)。6-BA 在 1.0 mg/L 时愈伤组织诱导率和愈伤组织直径优于其他细胞分裂素。当 6-BA 和 TDZ 浓度大于 4.0mg/L 时,几乎不能诱导分化出愈伤组织。TDZ 随着浓度的增加诱导效果会随着降低,诱导的适宜浓度在 0.5 mg/L;TDZ 诱导出的愈伤组织随着时间的延长全部玻璃化后褐化死亡。细胞分裂素超过 3.0mg/L 时就不利于愈伤组织诱导。可见 6-BA 浓度为 1.0mg/L 时,最适宜于诱导愈伤组织。

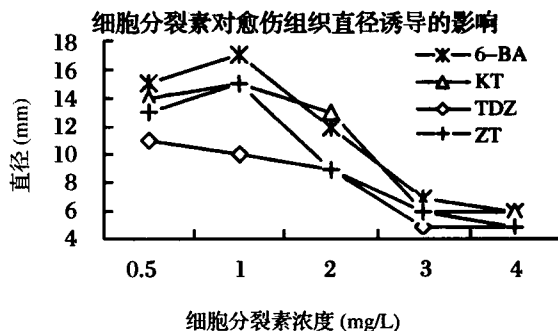
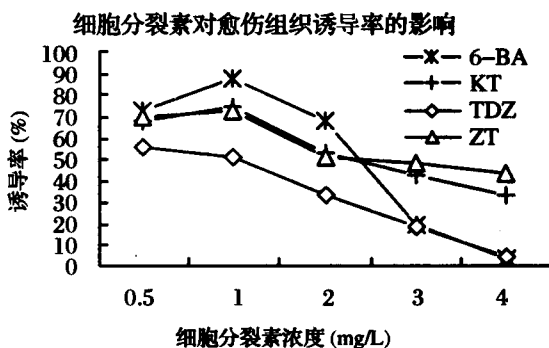


图 2 分裂素对愈伤组织诱导的影响

2.4 蔗糖浓度对愈伤组织诱导的影响

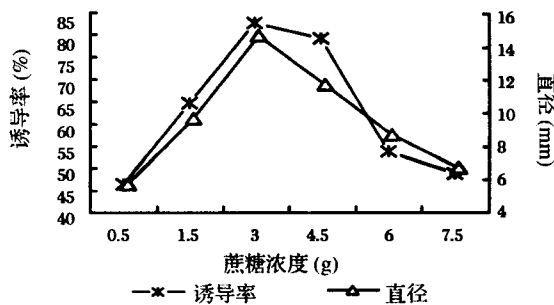


图 3 蔗糖浓度对愈伤组织诱导的影响

蔗糖浓度为 3% 时,愈伤诱导率和愈伤直径优于其他浓度的诱导,当低于或高于 3% 时,由于碳源的不足或过剩,诱导效果均降低(图 3)。

2.5 光照条件对愈伤组织诱导的影响

表3 光照条件对愈伤组织诱导的影响

不同的光照处理	接种外植体数(个)	愈伤组织诱导率(%)	平均愈伤组织块直径(mm)
A	50	74	8.7
B	50	90	13.3
C	50	86	10.5

注:A—完全暗培养;B—暗培养20天后进行光照培养;C—完全光照培养。

无光照条件下,愈伤组织诱导率相对较低(74%),且诱导的愈伤组织小,颜色褪绿,为黄白色,生长势较弱;在完全光照条件下,诱导分化次之,分化愈伤组织颜色正常,深绿色;黑暗培养20天后,分化愈伤失绿,生长势较弱,转至光下再培养10天后,颜色逐渐变为绿色,愈伤组织诱导率和愈伤组织直径都优于其它两处理(见表3)。

3 结论与讨论

3.1 MS基本培养基是诱导柳树愈伤组织的最佳培养基。6-BA, NAA是最适宜诱导愈伤组织的激素,适宜的浓度分别为1.0 mg/L, 0.5 mg/L。Q106愈伤组织诱导的最适蔗糖浓度为3%。

3.2 Q106的嫩茎段具有较强的分化能力,诱导愈伤组织的效果较佳,这与他人的研究结果一致。不过同一品种不同部位间也是有差异的。

3.3 在诱导愈伤组织过程中,早期的暗培养对于诱导分化是很有必要的,诱导柳树愈伤组织时先暗培养20天,再转到

光下培养,愈伤组织受光刺激迅速诱导和分化,能提高诱导率。

3.4 植物外植体离体再生是植物遗传转化的基础,林木遗传转化频率低的主要原因之一是外植体离体再生困难。通过一步法直接诱导出芽很难成功,因此,研究愈伤组织的诱导是很关键的,可为进一步研究诱导芽的分化提供技术参考。如何诱导出分化出芽的愈伤组织还需要更深入的研究。

参考文献:

- [1]姚振,李静等.安祖花愈伤组织诱导和植株再生的研究.吉林农业大学学报.2006,28(1):43~46
- [2]余如刚.甘肃农业大学硕士学位论文.2004
- [3]程磊,周根余.桤柳的组织培养与快速繁殖.上海师范大学学报(自然科学版),2001,30(2):67~71.
- [4]唐效蓉,李午平,黎玉才,左海松,殷元良.杂交柳优良无性系组培快繁技术研究.湖南林业科技,2002,29(4):28~31
- [5]Agrawal-DC, Gebhardt-K. Rapid micropropagation of hybrid willow (*Salix*) established by ovary culture. Journal of Shoot Physiology. 1994, 143: 6, 763~765
- [6]Liskova-D, Zakutna-L, Kakoniova-D. Pigment formation in willow tissue culture. Biologia-Bratislava. 1989, 44: 11, 1039~1045
- [7]黄华艳,吴耀军.柳隆按芽器官离体培养研究.广西林业科学,2003,32(1):26~28

(接第16页)

2.6 代用基质栽培新几内亚凤仙生长指标综合评价

表5显示,玉米芯粉基质栽培条件下的植株形态综合评价指数为0.14,低于泥炭条件下的0.20说明新几内亚凤仙对玉米芯粉基质适应性较差,这与根系蛋白质及SOD、POD活性所测数据基本吻合。椰糠与锯木屑栽培条件下的植株形态指数分别为0.82和0.65,说明其可以作为新几内亚凤仙栽培的良好基质。豆秆粉与花生壳粉基质栽培条件下植株形态综合评价指数亦高于泥炭。

3 讨论

根系是植物体矿质元素吸收的最主要器官,在同样的水肥条件下,根系是否能够获得充足的养分供应并及时输送到地上部分很大程度上取决于基质的理化性状。植株的生长状况也能够证明基质的适应性。

本文研究了代用基质对新几内亚凤仙根系活性、植株形态建成等方面的影响。所选用的代用基质都能创造一个适宜的根际环境,不会影响根系的空间发展尤其是向下生长趋势。各代用基质栽培新几内亚凤仙根系生物量与泥炭基质无显著差异。根系活力、酶活性及可溶性蛋白测定数据显

示,新几内亚凤仙对玉米芯粉基质生长适应性差。所选用的代用基质栽培新几内亚凤仙形态指标均优于泥炭基质或无显著差异,生物量的积累也呈现出类似的规律。但是模糊数学分析结果显示,玉米芯粉基质栽培条件下植株形态综合指数低于泥炭基质,表现出一定的不适应性,该结果基本与酶活性分析结果一致。从试验结果来看,代用基质栽培条件下,植株生长势普遍高于泥炭基质,在生产中完全有可能全部或部分地替代泥炭,但是生产中大规模采用代用基质尚需进一步细致深入研究。

参考文献:

- [1]邹琦.植物生理学实验指导[M].北京:中国农业出版社,2000
- [2]浙江农业大学主编.植物营养与肥料[M],1991年10月第一版
- [3]中国科学院南京土壤研究所.土壤理化分析[M].上海:上海科学技术出版社,1980
- [4]李学垣.土壤化学[M].北京:高等教育出版社,2001.
- [5]陈段芬.无土栽培新几内亚凤仙养分调控及影响机理的初步研究[D].2003,河北农业大学硕士论文