

文章编号:1002-2724(2007)01-0028-03

金丝垂柳组织培养体系建立研究

王善娥¹, 吴德军², 李善文², 王大明², 夏 阳², 郭小燕¹, 杨德奎^{1*}

(1. 山东师范大学生命科学学院, 济南 250014; 2. 山东省林科院)

摘要:对金丝垂柳组织培养技术进行了研究, 结果表明: 取外植体带有侧芽的茎条切段进行组织培养, 以 MS 为基本培养基, 附加不同浓度的 6-BA 和 NAA 进行分化诱导, 可获得无根丛生苗, 以附加不同浓度的 NAA 可获得生根植株。

关键词: 金丝垂柳; 组织培养; 研究

中图分类号: S722.3⁺7

文献标识码: A

Study on Tissue Culture Technique for *Salix alba* var. *tristis* Gand

Wang Shane et al.

(College of Life Science, Shandong Normal University, Jinan, Shandong, 250014)

Abstract: Tissue-culture technique of *Salix alba* var. *tristis* Gand was studied in this papers. The result indicated that rootless clustering plants can be gained by using stem with lateral bud as explants, taking MS as basal medium and adding 6-BA and NAA at proper doses, and rooting plants induced by adding different doses NAA.

Keywords: *Salix alba* var. *tristis* Gand; Tissue culture; Study

金丝垂柳 *Salix alba* var. *tristis* Gand 属杨柳科, 柳属。落叶乔木, 叶披针形, 枝条下垂, 颜色鲜艳(小枝生长季节呈黄绿色, 休眠季节呈金黄色), 树姿优美、抗病性强, 雄株, 春季不飞絮, 不会造成环境污染, 生长快; 喜光, 喜温暖湿润气候和湿润、深厚的土壤, 但对土壤适应性较强, 耐水湿, 在河边生长尤好; 在土层深厚、地势高燥的地区也能正常生长, 萌芽力强, 生长迅速^[1]。

土壤盐渍化是影响农林业生产, 导致农林业生物量减少的主要非生物胁迫因子之一^[2]。世界范围的土地盐渍化、次生盐渍化不断加剧, 能使盐渍化土壤得到改良的一项重要措施就是提高林木覆盖率。利用耐盐植物开发和利用大面积的盐碱荒地, 对于农林业生产具有重要的意义。本研究以金丝垂柳为研究对象, 建立组织培养体系, 目的是为建立一个理想的再生转化体系做准备, 进而转入耐盐基因, 为成功利用盐渍化土壤提供新的耐盐植物材料。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

试验材料来源于济南市银虎苗圃, 从 2 年生健壮的植株上选取当年生半木质的枝条, 切割成带 1~2 个侧芽的茎段作为外植体。

1.2 研究方法

1.2.1 外植体的表面消毒

采回的嫩枝条去掉叶片, 剪成段长 20cm 左右, 放于自来水管下冲洗至少 30min, 去除表面污垢, 然后在超净台上将枝条剪成 2~3cm 长、至少带一个腋芽的茎段。用酒精浸泡 30s~60s, 再用 0.2% 升汞溶液浸泡 12~15min^[3], 期间并不断搅

动, 之后用无菌水漂洗 2~3 次, 以无菌滤纸吸干水分, 进行接种^[4]。

1.2.2 试验用的培养基及培养条件(激素浓度 mg/L)

初代培养阶段: MS

继代培养阶段: (1)MS+6-BA(0.1,0.2)+NAA(0.2)

(2)MS+6-BA(0.5)+NAA(0.1,0.3)

(3)MS+6-BA(0.5)+NAA(0.1)+TDZ(0.1)

生根培养阶段: (1)MS+NAA 0.01,0.02,0.03,0.05 0.1,0.3,0.5,1.0,2.0

(2)1/2MS+NAA0.01,0.02,0.03,0.05,0.1,0.3,0.5,1.0,2.0

上述培养基内均含蔗糖 25g/L, pH5.8~6.0, 高压灭菌 16~18min, 培养室温度 22℃~25℃, 光暗周期 16h/8h, 光强 1200~1500lx。

2 结果与分析

对于外植体消毒, 不同浓度的升汞其消毒效果不同, 结果见表 1。高浓度升汞的消毒效果明显优于低浓度的, 但当浓度达到 0.25% 时, 有 50% 的外植体变黑并最终死亡。

2.1 初代培养阶段

这个阶段的目的是诱导侧芽萌发, 形成无菌苗。以 MS 为基本培养基, 附加细胞分裂素 6-BA 1.0mg/L, 生长素 NAA 的浓度分别为 0.1mg/L、0.5mg/L。发现在含有任何激素的培养基中, 侧芽可以萌发并生长, 但叶色淡黄、簇生矮小, 剪下后继代培养不易成活, 而空白的培养基中, 侧芽颜色深绿、直立, 转入继代培养基中形成大量丛生苗。

收稿日期: 2007-01-04

* 通讯作者

2.2 继代与增殖培养阶段

此阶段的目的是在短期内获得大量适合生根的嫩枝条。将上一阶段培养的无菌苗切割成小段,分别转接到增殖培养基(1)、(2)中。实验表明:最初转入增殖培养基时,嫩枝增殖倍数较低,但经多次继代以后,丛壮苗植株明显增加,而不同浓度激素对继代增殖影响效果是不同的,结果见表2。

表1 不同升汞浓度对外植体污染率的影响

升汞浓度 (mg/L)	萌动时间 (d)	污染率 (%)	生长状况
0.1	7	60	萌发2周后, 苗高1~2cm
0.2	7	10	萌发2周后, 苗高3~4cm

表2 不同浓度激素对继代增值的影响

激素浓度(mg/L)	丛生苗	时间(d)	生长状况
6 - BA0.1 + NAA0.1	有	25	茎条细小,茎高一般,叶小,颜色浅绿
6 - BA0.3 + NAA0.1	有	23	茎条细小,茎高一般,叶小,颜色深绿
6 - BA0.5 + NAA0.1	有	23	茎条细弱,茎高一般,叶子小,颜色浅绿
6 - BA0.5 + NAA0.1 + TDZO.1	有	20	茎条粗壮,茎高较高,叶子宽大,颜色深绿
6 - BA0.5 + NAA0.1 + KTO.1	有	24	茎条粗壮,茎高一般,叶子发黄,有极少量根产生
6 - BA0.1 + NAA0.2	有	22	茎条粗壮,茎高较高,叶子大,颜色深绿

由表2可知不同组合处理的培养基均能产生丛生苗,但产生时间及生长状况不同。当培养基中加入TDZ时,丛生苗产生的时间提前、生长状况也明显优于其它培养基。但继代培养3次后,叶片逐渐变黄并干枯,不利于组织培养及以后的再生。此外,当降低6-BA浓度,即6-BA与NAA的浓度比小于1时,可以产生大量的丛生苗。因此,可以将初代培养的嫩枝,先转接到含有TDZ的培养基中,得到大量的无菌组培植株,然后再转接到组合为6-BA0.1mg/L + NAA0.2mg/L培养基中以利于组培苗的生长,即交替变换使用培养基。

2.3 生根培养阶段

将2~3cm长的嫩枝条剪下分别转入生根培养基(1)、(2)中,10~20d后嫩芽开始生根,25d后形成根系密集的小植株,实验表明MS培养基的无机盐的含量较高,发根率较低,而1/2MS(大量元素减半)发根率较高,且根粗壮,须根较多,结果见表3。

表3 不同培养基对生根的影响

培养基类型	生根率(%)	生根表现
MS	80	根细小,侧根少
1/2MS	100	根粗壮,侧根多

为了研究1/2MS生根培养基中NAA的最适浓度,对NAA设计了9个梯度水平进行试验,结果表明NAA浓度在0.3mg/L时生根效果最佳,并且植株健壮,叶片大、舒展和颜色深绿,见表4。

表4 不同NAA含量对生根影响

NAA含量 (mg/L)	生根率(%)	生根表现
0.01	70	有1~2条,根细小
0.02	85	有2~4条,根细小
0.03	80	有2~3条,根健壮
0.05	90	有3~4条,根健壮
0.1	100	有3~4条,根健壮
0.3	100	有5~8条,根健壮
0.5	71	有2~3条,根细小
1.0	100	有5~6条,根健壮
2.0	92	有5~6条,根健壮

3 结论

3.1 在初代培养时,不添加任何激素的空白MS培养基最有利于外植体的生长,当加入浓度为1.0mg/L 6-BA时,外植体出现激素中毒现象,侧芽黄化,叶片小且弯曲,最终死亡。

3.2 在继代增殖培养阶段,以6-BA0.1mg/L + NAA0.2mg/L这一组合最为理想。6-BA浓度在0.1~0.5mg/L范围有利于组织培养,当6-BA浓度大于0.5mg/L时,叶片弯曲,有的甚至出现玻璃化现象,NAA浓度在0.1~0.2mg/L范围较理想,当NAA浓度小于0.1mg/L时,继代苗开始生根。

3.3 在生根培养阶段,以1/2MS + NAA0.3mg/L生根效果最为理想。MS为基本培养基生成的须根数量较少,且生根所需时间较长,根颜色褐黄色、暗淡。

3.4 利用激素可促进腋芽的快速形成,从而使无菌苗获得增殖,这是组织培养的一条有效途径,该途径繁殖系数较高,遗传性状稳定。

3.5 在无菌苗组培过程中,多次继代后,叶片颜色变为淡黄,叶片弯曲,所以在多次继代后,继代培养基中加入二倍的铁盐,可以延缓此问题的发生。

4 讨论

MS培养基应用范围较广泛,适用于各种植物诱导愈伤组织形成和分化^[5]。此外,可以根据外植体的具体生长情况,改变大量以及微量元素的配比^[6]。

在组织培养阶段,生长素类的主要作用是诱导愈伤组织形成、根的分化和促进细胞分裂、伸长生长。细胞分裂素的作用主要是促进细胞分裂和分化,诱导不定芽的分化,茎、苗的增殖,延迟组织的衰老并影响蛋白质的形成^[7]。在培养基中,生长素与细胞分裂素的比例决定着发育的方向,诱导愈伤组织长根还是长芽。细胞分裂素与生长素相互作用,当组织内细胞分裂素/生长素的比值高时,诱导愈伤组织或器官分化出不定芽;促进细胞分裂与扩大、抑制根的分化。为了

文章编号:1002-2724(2007)01-0030-03

散养与圈养条件下蓝角马的行为观察比较

窦礼正¹, 马 战², 张茂金², 谢绪昌², 党瑞东³, 赛道建¹

(1. 山东师范大学生命科学学院, 济南 250014; 2. 济南动物园管理处; 3. 新疆奇台县动物疾控中心)

摘要:对散养与圈养条件下蓝角马的行为观察与比较表明:散养时的蓝角马在取食上花费的时间最多,而圈养时花费最多的是站立。t检验结果显示,两种条件下的成年雌、雄性蓝角马行为差异多数极显著($P < 0.01$)。

关键词:蓝角马;行为;时间分配

中图分类号:S718.52+1.1

文献标识码:A

蓝角马(*Connochaetes taurinus*)又称黑尾牛羚(以下简称角马),隶属于偶蹄目(*Artiodactyla*)牛科(*Bovidae*)。栖息于撒哈拉大沙漠和半荒漠地带,性好合群,警惕性强,以多汁植物为食^[1,2]。因其具有较高观赏价值,济南动物园于1999年引入2只角马,并开始探索驯化饲养管理。目前,国外已有许多角马的相关报道^[3,4,5],而国内仅有少许生理方面的报道^[6,7]。鉴于这种情况,我们对济南动物园的角马在圈养及散养条件下的行为进行了观察比较,以期从这个角度深入了解该种动物,为角马的驯养管理提供基础资料,以利于该种群的繁荣壮大。

1 材料与方 法

本研究地点在济南动物园。经多次成功繁殖,目前雌性角马:成体3只,幼体1只,雄性成体2只。由于济南气候具季节性差异,从4月到11月,角马在生态展区内进行散养;从12月到来年3月,角马关在供有暖气的圈舍内进行圈养。因此,观察分两个阶段进行。

第一阶段在“走近自然生态展区”内进行,展区三面是围有铁网的深沟,一面是悬挂着模拟“非洲大草原的电脑喷绘图”的墙壁,区内面积约5200m²,地面植被主要是草坪和40余株乔木,场地宽阔,环境优美,适合动物活动。此外,展区内还放养着跳羚(*Antidorcas marsupialis*)、白长角羚(*Oryx dam-*

mah)、普通斑马(*Equus burchelli*)、大羚羊(*Taurotragus oryx*)等非洲有蹄类草食动物。展区内的动物主要采食饲养员投放的饲草及精饲料,也啃食少量的草坪草。饲草分鲜草和干草,鲜草的种类主要有狗尾草(*Setaria viridis*)、无芒稗(*Echinochloa crusgalli var. mitis*)、马唐(*Digitaria sanguinalis*)、牛筋草(*Eleusine indica*)等,一般是上、下午各投喂一次;干草主要是来自新疆的羊草(*Leymus chinensis*)及苜蓿草(*Medicago sativa* L),提供干草可以弥补鲜草的不足,丰富动物的口味。

观察时间为2005年8~10月,在游人停留观赏的地方使用8倍望远镜进行观察,距动物较远,基本不影响动物的日常行为。每天8:00~18:00采用瞬时扫描取样法^[8],每小时记录20次,共计23天。

第2阶段在圈舍内进行,圈舍共10个,每个面积约为6m²,位于同一房间内,房子内留有半米宽的走道以便于饲养员进入各圈舍。与角马相邻的圈舍内同时饲养着也在展区内放养的大羚羊、跳羚、白长角羚、普通斑马等。白天动物会被放到室外的院子内,院子被一道墙隔成两部分,每部分面积约为70m²。为减少动物间的争斗,有3只成年角马被单独隔开,交替轮流两两放出一块场地。饲养员每天上午打扫圈舍,8:30左右将动物放出,然后投喂干饲草、水等,下午4:00左右将动物各自赶入圈内。圈养期间,一般不向游人开放。

收稿日期:2006-09-08

促进芽器官的分化,应除去或降低生长素的浓度,或者调整培养基中生长素与细胞分裂素的比例。

利用激素可促进腋芽的快速形成,从而使无菌苗获得增殖,这是组织培养的一条有效途径,该途径繁殖系数较高,遗传性状稳定。在无菌苗组培过程中,多次继代后,叶片颜色变为淡黄,叶片弯曲,所以在多次继代后,继代培养基中加入二倍的铁盐,可以延缓此问题的发生。

在金丝垂柳组培中,当无菌苗生长健壮后,可以适当降低细胞分裂素的浓度,从而让无菌苗的叶片生长地更厚,为下一步的再生转化作好准备。

参考文献:

[1]王宗符. 金丝垂柳. 河南科技, 2002, 6

[2]孙仲序, 杨红花, 崔得才等. 转抗盐基因八里庄杨组培苗快繁研究[J]. 植物技术通报, 2002, 4

[3]M. Liesebach, G. Naujoks. Approaches on vegetative propagation of difficult-to-root *Salix caprea*[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2004, 79: 239~247

[4]王蒂. 植物组织培养[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004

[5]阮少宁, 杨华, 梁一池等. 香水百合组织培养的试验研究[J]. 福建林学院学报, 2001, 21(2): 142~145

[6]王金发, 何小玲, 何延明. 大花飞燕草的组织培养及再生体系建立[J]. 热带亚热带植物学报, 2000, 8(4): 315~318

[7] Sant S. BHOJWANI. Micropropagation method for a hybrid willow [J]. New Zealand Journal of Bant, 1980, 18: 209~14