

王莹,张健,李敏,等. 2 种观赏柳愈伤诱导外植体与最佳激素筛选试验[J]. 江苏农业科学,2014,42(4):66-68.

2 种观赏柳愈伤诱导外植体与最佳激素筛选试验

王莹,张健,李敏,李玉娟,谈锋

(江苏沿江地区农业科学研究所,江苏如皋 226541)

摘要:对 2 种观赏柳旱柳(*Salix matsudana*)、龙爪柳(*Salix matsudana*)进行愈伤组织诱导培养研究。结果表明:利用茎尖诱导培养愈伤组织的诱导效果明显优于叶片;选用乙醇与 HgCl₂ 溶液组合作为消毒剂,灭菌效果较好;3 个因素对旱柳、龙爪柳愈伤组织诱导影响由大到小依次为 NAA 浓度、6-BA 浓度、2,4-D 浓度,对 2 种柳树而言,最优组合均为 6-BA 0.2 mg/L + NAA 0.4 mg/L + 2,4-D 0.3 mg/L。

关键词:柳树;外植体;愈伤组织;诱导培养;新品系;诱变选育

中图分类号: S687.043;Q943.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)04-0066-03

柳树为杨柳科(Salicaceae)柳属(*Salix*)落叶乔木、灌木或亚灌木,分布广泛,品种丰富,适应性强。由于其具有速生、抗盐碱、耐瘠薄、抗风沙等优良特性,越来越受到育种工作者的青睐^[1]。很多学者在柳树综合开发及遗传改良方面作了大量工作^[2]。受传统方法的限制,柳树育种研究存在技术瓶颈,如传统的人工杂交方法耗时耗力、育种周期长^[3]。转基因技术虽然在柳树新品种选育方面已得到应用,但是因其转导效率低且成本高等问题,效果并不显著^[4]。利用 EMS 化学诱变技术,可以有效解决诱变率低、成本高、育种周期长等问题,目前该技术已经在农作物及果树中得到广泛应用^[5]。旱柳(*Salix matsudana*)枝条柔软,树冠丰满,是我国北方常用的行道树。龙爪柳(*Salix matsudana*)小枝绿色且呈不规则扭曲,在我国各地多作为庭院绿化树种。这 2 种柳树都具有很高的观赏价值,深受人们的喜爱,但是其耐盐碱性均不强。笔者以旱柳、龙爪柳为研究对象,建立愈伤组织培养体系,旨在为柳树新品系的诱变选育提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为旱柳与龙爪柳幼嫩的茎段与叶片,均采自江苏沿江地区农业科学研究所柳树种质资源圃。采集 2 种柳树当年生木质化茎段,截成长约 10~15 cm 的小段,扦插在装有基质的育苗容器中,恒温光照培养箱培养,光照时间为 16 h/d,控制温度为(25±1)℃。

1.2 方法

1.2.1 适宜外植体的筛选 外植体有 2 种。(1)幼嫩茎段:每个茎段留 1~2 个腋芽,每个茎段长 1.5~2.0 cm;(2)幼嫩叶片:用解剖刀将叶片切成 1 cm×1 cm 的小块。培养基为:MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L。

1.2.2 消毒灭菌 将合适的外植体置于洗洁精溶液中浸泡

30 min,再用流动的自来水冲洗 1.5~2 h,置于超净台上。先用 75% 乙醇浸泡外植体 30 s,然后用无菌水冲洗 3~4 次,再用 0.1% HgCl₂ 溶液浸泡 10~20 min,其间不断搅动使外植体与溶液充分接触,之后用无菌水冲洗 6~7 次,用无菌滤纸吸干水分进行接种。

1.2.3 激素种类与浓度的确定 选用 6-BA、NAA、2,4-D 3 种激素,设计正交试验(表 1),以 MS 为基本培养基,蔗糖浓度为 30 g/L,琼脂 7 g/L,调节 pH 值为 5.8,每瓶培养基接种 2 个外植体。

表 1 柳树愈伤组织诱导的激素正交试验因素水平

水平	因素		
	A:6-BA(mg/L)	B:NAA(mg/L)	C:2,4-D(mg/L)
1	0.2	0.2	0.1
2	0.2	0.4	0.3
3	0.2	0.8	0.5
4	0.6	0.2	0.3
5	0.6	0.4	0.5
6	0.6	0.8	0.1
7	1.0	0.2	0.5
8	1.0	0.4	0.1
9	1.0	0.8	0.3

1.2.4 培养条件 培养温度为(25±1)℃,每处理重复 3 次,黑暗培养 30 d 后统计结果。

2 结果与分析

2.1 不同类型外植体对愈伤组织诱导的影响

由表 2 可知,不同外植体对愈伤组织诱导效果差异显著。茎尖的诱导效果较好,一般 7 d 内便开始启动,诱导出的愈伤组织质地紧密,呈颗粒状,诱导率较高(图 1 至图 4)。以嫩叶为外植体时,旱柳叶片在第 15 天开始启动,30 d 愈伤组织诱导率仅达 16.6%,只在叶脉处出现少量愈伤。龙爪柳叶片的诱导效果较差,前期观察到叶片卷曲,后期叶片逐渐褐化枯死,无愈伤组织(图 5)。

2.2 不同消毒方式对愈伤组织诱导的影响

以茎尖为外植体,选用乙醇与 HgCl₂ 组合作为消毒剂,在 HgCl₂ 中分别浸泡 10、15、20 min。由表 3 可知,灭菌时间越

收稿日期:2013-07-31

基金项目:江苏沿江地区农业科学研究所青年科技基金(编号:G122601)。

作者简介:王莹(1986—),女,硕士研究生,研究实习员,主要从事耐盐植物育种研究。E-mail:huakaihualuowyyw@163.com。

表 2 不同柳树不同类型外植体愈伤组织诱导效果

柳树	外植体类型	接种数 (个)	启动时长 (d)	愈伤 组织量	愈伤组织 诱导率(%)	愈伤组织颜色与状态
旱柳	茎尖	30	7	+++	83.3	绿、淡黄、褐色、致密、颗粒状
旱柳	嫩叶	30	15	+	16.6	淡黄、疏松、颗粒状
	茎尖	30	5	++	73.3	绿、淡黄、致密、颗粒状
龙爪柳	嫩叶	30			0	前期叶片卷曲,后期叶片逐渐褐化枯死,无愈伤组织

注:“+”“++”“+++”分别表示愈伤组织量较少、一般、较多。下表同。



图1 旱柳茎尖培养 0 d

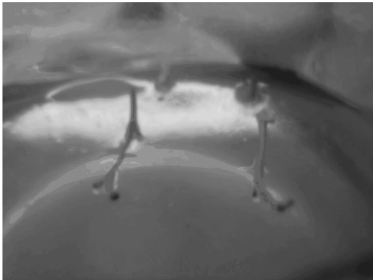


图2 龙爪柳茎尖培养 0 d



图3 旱柳茎尖培养 7 d



图4 龙爪柳茎尖培养 7 d



图5 龙爪柳叶片培养 15 d

表 3 不同柳树消毒灭菌条件比较

柳树	浸泡时间 (min)	接种数 (个)	成活数 (个)	褐化数 (个)	污染数 (个)	诱导率 (%)
旱柳	10	30	16	2	12	40.0
旱柳	15	30	24	3	3	66.7
旱柳	20	30	18	8	4	46.6
龙爪柳	10	30	16	5	9	33.3
龙爪柳	20	30	20	4	6	60.0
龙爪柳	30	30	15	9	6	33.3

NAA 浓度、6 - BA 浓度、2,4 - D 浓度,对 2 种柳树的最优组合都为 6 - BA 0.2 mg/L + NAA 0.4 mg/L + 2,4 - D 0.3 mg/L。

3 结论与讨论

植物表面携带大量的微生物,尤其是内生菌较多的外植体,在接种前要进行彻底的消毒处理,但是消毒过度也会造成植物褐化及细胞死亡。本研究选用乙醇与 HgCl₂ 溶液组合作为消毒剂,灭菌效果较好。选取外植体时,生长活跃的器官一般能获得较好的诱导效果^[6]。研究表明,利用茎尖诱导培养愈伤组织的诱导效果明显优于叶片。植物生长调节物的配比及浓度可以极大地影响愈伤组织的诱导效率、质地、生长量等^[7]。研究表明,3 个因素对旱柳、龙爪柳愈伤组织诱导影响由大到小依次为 NAA 浓度、6 - BA 浓度、2,4 - D 浓度,对 2 种柳树而言,最优组合都为 6 - BA 0.2 mg/L + NAA 0.4 mg/L + 2,4 - D 0.3 mg/L。中浓度的 NAA 与 6 - BA 配合使用,可以显著促进愈伤组织的发生与生长;高浓度的 2,4 - D 不利于龙爪柳愈伤组织的生长,培养后期会出现玻璃化现象,这可能与激素配比不当有关。

参考文献:

[1] 孙兆祜,张玉霞,梁群宝. 几种柳树抗逆性调查初报[J]. 甘肃林业科技,1999,24(1):21 - 22,34.

长,植物褐化率越高。在 0.1% HgCl₂ 中浸泡 10 min,2 种柳树外植体的污染数均为最高;在 HgCl₂ 中浸泡 15 min,2 种柳树外植体的污染数最低,诱导率能达到 60% 以上,且愈伤组织生长较快、长势较好。因此,采用 0.1% HgCl₂ 消毒外植体 15 min,可以快速获得大量无菌材料。

2.3 不同激素对愈伤组织诱导增殖效果影响

从表 4 可见,不同激素种类及配比对愈伤组织诱导的效果差异较大。通常 7 d 左右开始启动,最早 4 d 后便出现愈伤组织。当 NAA 浓度为 0.2 ~ 0.4 mg/L 时,2 种柳树的愈伤诱导效果较好,均超过 50%,且愈伤质地紧密,长势良好(图 6、图 7)。当 2,4 - D 浓度较高时,诱导龙爪柳茎尖所产生的愈伤组织边缘开始出现玻璃化现象(图 8)。由表 5、表 6 可知,3 个因素对旱柳、龙爪柳愈伤组织诱导影响由大到小依次为

表 4 不同激素组合对柳树愈伤组织诱导的影响

柳树	组别	接种数 (个)	启动时长 (d)	愈伤 组织量	愈伤诱导率 (%)	愈伤组织颜色与状态
旱柳	1	30	6	+++	76.6	绿色或轻微褐色,颗粒状或部分水浸状
	2	30	5	+++	100.0	黄绿色,颗粒状
	3	30	8	++	43.3	透明,玻璃化,松散
	4	30	7	+++	76.7	淡黄色,轻微褐色,颗粒状
	5	30	7	+++	76.6	绿色,淡黄色,轻微褐色,颗粒状,水浸状
	6	30	7	+++	53.3	褐色,少绿色,水浸状
	7	30	5	+++	90.0	透明或者淡黄色,颗粒状或水浸状
	8	30	6	+++	70.0	黄绿色,褐色,颗粒状
	9	30	9	++	33.3	灰色,透明,水浸状
龙爪柳	1	30	6	+++	73.3	绿色,淡黄色,褐色,颗粒状
	2	30	4	+++	93.3	绿色,淡黄色,颗粒状
	3	30	8	++	43.3	淡黄色,透明,部分玻璃化,松散
	4	30	5	+++	76.7	绿色,颗粒状
	5	30	5	++	86.7	淡黄色,水浸状,松散
	6	30	7	++	43.3	淡黄色,褐色,颗粒状
	7	30	6	++	50.0	透明,玻璃化,松散
	8	30	6	+++	66.7	绿色,淡黄色,褐色,松散,水浸状
	9	30	8	+	40.0	淡黄色,褐色,透明较多,松散

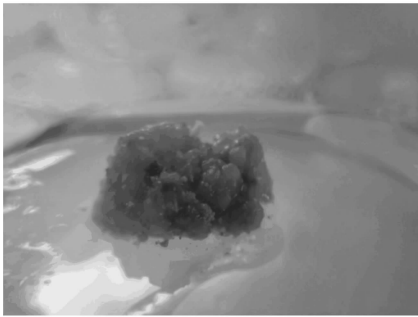


图6 旱柳健壮愈伤组织培养30 d



图7 龙爪柳健壮愈伤组织培养30 d

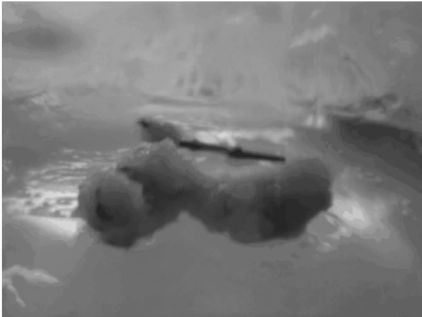


图8 龙爪柳玻璃化愈伤组织培养30 d

表 5 旱柳愈伤组织诱导正交试验结果与极差分析

序号	因素水平			诱导率 (%)
	A:6-BA	B:NAA	C:2,4-D	
1	1	1	1	0.766
2	1	2	2	1.000
3	1	3	3	0.433
4	2	1	2	0.767
5	2	2	3	0.766
6	2	3	1	0.533
7	3	1	3	0.900
8	3	2	1	0.700
9	3	3	2	0.333
k_1	0.733	0.811	0.666	
k_2	0.689	0.822	0.700	
k_3	0.644	0.433	0.699	
R	0.089	0.389	0.034	

表 6 龙爪柳愈伤组织诱导正交试验结果与极差分析

序号	因素水平			诱导率 (%)
	A:6-BA	B:NAA	C:2,4-D	
1	1	1	1	0.733
2	1	2	2	0.933
3	1	3	3	0.433
4	2	1	2	0.767
5	2	2	3	0.867
6	2	3	1	0.433
7	3	1	3	0.500
8	3	2	1	0.667
9	3	3	2	0.400
k_1	0.700	0.667	0.611	
k_2	0.689	0.822	0.700	
k_3	0.522	0.422	0.600	
R	0.178	0.400	0.100	

[2]刘 巍,蔺胜军. 柳树遗传改良研究进展[J]. 辽宁林业科技, 2012(1):45-48.

[3]张继明,张彩军,郭 俊. 柳树杂交育种研究[J]. 内蒙古林业科技,2001(2):9-13.

[4]王源秀,徐立安,黄敏仁. 柳树遗传学研究现状与前景[J]. 植物学通报,2008,25(2):240-247.

[5]吴伟刚,刘桂茹,杨学举. 诱变与组织培养相结合在植物育种中的应用[J]. 中国农学通报,2005,21(11):197-201.

[6]黄华艳,吴耀军. 柳窿桉芽器官离体培养研究[J]. 广西林业科学,2003,32(1):27-28.

[7]梁慧敏,黄 剑,夏 阳,等. 苜蓿组织培养高频率再生体系的建立[J]. 农业生物技术学报,2003,11(3):321-322.