

文章编号:1007-4961(2006)03-0269-03

# 垂柳组织培养初步研究

朱美秋,李燕玲,杜克久

(河北农业大学 林学院,河北 保定 071000)

**摘要:**以垂柳嫩枝条为外植体进行茎段组织培养试验研究。结果表明:垂柳茎段最适启动培养基及激素配比为 1/2MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.05 mg/L + 1.5% 蔗糖;最适不定芽诱导培养基及激素配比为 WPM + 6-BA 0.1 mg/L + NAA 0.2 mg/L + 3% 蔗糖;不定根最适诱导培养基为 1/2MS + NAA 0.05 mg/L + 1.5% 蔗糖。

**关键词:**垂柳;茎段;组织培养

**中图分类号:**S 192.12;Q 943.1

**文献标识码:**A

## The preliminary study on tissue culture of *Salix babylonica*

ZHU Mei-qi, LI Yan-ling, DU Ke-jiu

(Forestry College of Agricultural University of Hebei, Baoding 071000, China)

**Abstract:** Induction of stem of *Salix babylonica* Linn was study. The result indicated that 1/2MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.05 mg/L + 1.5% sucrose was the best basic medium in initiated culture; the optimal medium of adventitious buds differentiation was WPM + 6-BA 0.1 mg/L + NAA 0.2 mg/L + 3% sucrose; and the optimal medium of adventitious roots was 1/2MS + NAA 0.05 mg/L + 1.5% sucrose.

**Key words:** *Salix babylonica* Linn; stem; tissue culture

垂柳(*Salix babylonica* Linn)是杨柳科(Salicaceae)柳属植物,分布广泛,全国各地均有栽培<sup>[1]</sup>。其枝条下垂,树姿优美,多作庭院绿化树种。此外,垂柳耐盐碱、极耐水湿、抗涝性强,尤其可以吸收 SO<sub>2</sub>、HF 等对人类健康有害的气体<sup>[1]</sup>,所以,它又是一种环保树种。由于垂柳用种子和枝条繁殖极易成活,因此,前人们对垂柳组织培养方面的研究非常少,而利用垂柳进行相关毒理学及其生物修复机制方面的研究更未见报道。目前,国内仅有对怪柳和雪柳离体培养成功的报道<sup>[2,3]</sup>。因此,建立和完善垂柳植株的再生体系,并利用实验室人工控制环境条件下的植株再生体系进行相关环境研究将具有重要的理论意义和实际应用价值。

## 1 材料与方 法

1.1 供试材料为 8 a 生垂柳优株上靠近主干部位的多年生枝条,采集地点是河北农业大学原林学楼

后小花园内。

### 1.2 材料处理

于春末夏初晴天的中午,剪取带芽的多年生枝条,带回室内水培,48 h 更换 1 次水。待芽萌发长出嫩茎后,将叶片及新发出的嫩茎作为外植体进行组织培养。

### 1.3 试验方法

将叶片及新发出嫩茎剪成的 2~3 cm 左右带腋芽或顶芽的茎段,用 75% 的乙醇进行表面消毒 30 s,无菌水冲洗 1 次,再用 0.1% 的升汞分别浸泡 5 min, 7 min, 9 min(外植体要与消毒液充分接触),然后用无菌水冲洗 5~6 次,切除茎段与消毒液接触的伤口部位,叶片用剪刀剪 3~4 道伤口,深达主脉,将它们分别接种在诱导培养基上,待其不定芽发出 3~4 片小叶时,剪取茎尖接种在分化培养基上进行增殖培养,获得一定数量的不定芽后将其转入生根培养基进行生根培养。

收稿日期:2006-02-27;修改稿收期:2006-05-27

基金项目:河北农业大学博士启动资金资助项目。

作者简介:朱美秋(1981-),女,河北抚宁人,河北农业大学在读硕士研究生。

通讯作者:杜克久(1956-),男,教授,博导,研究方向:林木生物技术,Email: dukejiu@yahoo.com.cn。

### 1.4 培养条件及培养基

本试验培养温度为  $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ , 光照强度 1 500 ~ 3 000 lx, 光照时间 14 h/d; 诱导、生根培养基均为 1/2 MS 培养基, 芽增值培养基为 WPM 培养基; 所用外源激素的浓度单位为 mg/L; 诱导、生根培养基均附加蔗糖 15 g/L 和琼脂 7 g/L, 继代培养基附加蔗糖 30 g/L 和琼脂 7 g/L。使用的培养基的种类见表 1。

表 1 培养基的类型

Table 1 The type of the medium

|                                                          |                                        |
|----------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| 诱导培养基<br>Medium for<br>initiated culture                 | 1/2 MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.05 mg/L |
|                                                          | 1/2 MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.05 mg/L |
|                                                          | 1/2 MS + 6-BA 1.5 mg/L + NAA 0.05 mg/L |
|                                                          | 1/2 MS + TDZ 0.2 mg/L + NAA 0.05 mg/L  |
|                                                          | 1/2 MS + 6-BA 0.5 mg/L + IBA 0.1 mg/L  |
|                                                          | 1/2 MS + 6-BA 1.0 mg/L + IBA 0.1 mg/L  |
| 继代培养基<br>Medium for adventitious<br>buds differentiation | 1/2 MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.05 mg/L |
|                                                          | WPM + 6-BA 0.1 mg/L + NAA 0.05 mg/L    |
| 生根培养基<br>Medium for<br>adventitious roots                | 1/2 MS + NAA 0.02 mg/L                 |
|                                                          | 1/2 MS + NAA 0.05 mg/L                 |

## 2 结果与分析

### 2.1 无菌体系的建立

外植体体表灭菌中筛选适当的灭菌剂以及确定合适的灭菌处理时间是建立无菌体系的重要环节<sup>[4]</sup>。首先将水培枝条长出的嫩茎、叶片, 用 75%

的酒精表面消毒 30 ~ 40 s, 然后用 0.1%  $\text{HgCl}_2$  进一步体表灭菌, 再用无菌水冲洗 5 ~ 6 次, 接入不定芽诱导培养基中<sup>[5]</sup>, 其体表灭菌效果见表 2。

表 2 0.1%  $\text{HgCl}_2$  不同灭菌时间体表灭菌效果

Table 2 Effects of different time with 0.1%  $\text{HgCl}_2$  treatment

| 消毒时间/<br>min<br>Sterilizing<br>time/min | 接种数量/<br>个<br>Inoculation<br>number | 污染数/<br>个<br>Contaminated<br>number | 污染率/<br>%<br>Contamination<br>rate | 褐化及枯<br>死率/%<br>Brown and death<br>rate |
|-----------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------------|
| 6                                       | 25                                  | 22                                  | 88                                 | 0                                       |
| 7                                       | 25                                  | 2                                   | 8                                  | 0                                       |
| 9                                       | 25                                  | 0                                   | 0                                  | 100                                     |

注: 污染率 = 污染外植体数量/接种外植体总数量  $\times 100\%$ ; 枯死率 = 枯死外植体数量/接种外植体数量  $\times 100\%$ 。

由表 2 可知, 用 0.1%  $\text{HgCl}_2$  体表灭菌 7 min 效果最好, 其污染率仅为 8%。消毒时间太短不能彻底消毒, 致使材料污染; 消毒时间过长容易将组织细胞杀死, 使材料干枯死亡, 培养基褐化。

### 2.2 初始诱导

将垂柳茎尖、茎段、叶片分别接种于 1/2 MS 培养基, 每 5 d 观察 1 次, 观察到第 30 天。结果表明: 用垂柳茎段做外植体进行不定芽诱导时外植体成活率较高, 生长健壮, 不定芽分化频率高; 茎尖作为外植体处理中仅有少部分能够分化, 大部分生长一段时间后叶片脱落, 试管苗干枯死亡; 叶片在第 10 天左右形成疏松的愈伤组织, 然后不再继续分化, 最后变褐枯死。不同激素组合及浓度的对比对茎段启动培养的影响见表 3。

表 3 不同激素组合及浓度的对比对茎段启动的影响

Table 3 Effects of different hormone concentration on initiation culture

| BA/<br>$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ | NAA/<br>$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ | IBA/<br>$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ | TDZ/<br>$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ | 接种数/瓶<br>Inoculation number | 形成愈伤/%<br>Callus rate | 备注<br>Notes   |
|----------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------|-----------------------|---------------|
| 0.5                                    | 0.05                                    |                                         |                                         | 15                          | 0                     |               |
| 1.0                                    | 0.05                                    |                                         |                                         | 15                          | 95                    | 形成丛状芽         |
| 1.5                                    | 0.05                                    |                                         |                                         | 17                          | 20                    |               |
|                                        | 0.5                                     | 0.1                                     |                                         | 15                          | 0                     |               |
| 1.0                                    |                                         | 0.1                                     |                                         | 16                          | 10                    |               |
| 1.2                                    |                                         | 0.1                                     |                                         | 16                          | 15                    |               |
|                                        |                                         | 0.05                                    | 0.2                                     | 15                          | 30                    | 疏松的愈伤组织最后干枯死亡 |

从表 3 中可以看出, 激素 6-BA + NAA 组合比 6-BA + IBA, TDZ + NAA 组合更有利于垂柳外植体不定芽的诱导分化, 而且 6-BA + NAA 的浓度比非常关键, 其中 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L 为最佳配比浓度。垂柳在离体培养过程中易生根, 据推测这是由于外植体体内含有较高水平的内源生长

素, 这些内源生长素在根原基的形成中起了一定的作用, 最终发根率较高。施用生长调节物质可以影响和改变内源激素水平<sup>[2,6]</sup>, 只有加入大量外源的细胞分裂素, 使其活化分子与钝化分子达到平衡, 才能使垂柳外植体达到增殖。

## 2.3 继代培养

将诱导的愈伤组织与丛状芽接入以上3种培养基中,结果表明:2号培养基为最佳培养条件,外植体形成愈伤组织后有不定芽形成,但不形成丛状芽,芽萌发后植株高生长正常;在1号培养基上,愈伤形成较多的丛生芽,高生长缓慢,植株矮小,叶片和茎

部发红;3号培养基中有75%的外植体生根。本试验表明:WPM+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L是垂柳增殖的最佳培养条件。6-BA的增加可以促进丛状芽的形成,但是不利于垂柳抽茎,不容易成苗。同时6-BA浓度也不宜太低,否则会使垂柳极易生根,而不形成愈伤组织。

表4 不同继代培养基对芽分化影响效果

Table 4 Effects of different medium to adventitious buds differentiation

| 编号<br>Number | 激素配比及浓度/mg L <sup>-1</sup><br>Different hormone concentration | 接种数/瓶<br>Inoculation number | 苗高/cm<br>Height | 芽分化数<br>Differentiated bud |
|--------------|---------------------------------------------------------------|-----------------------------|-----------------|----------------------------|
| 1            | 1/2MS+6-BA 1.0+NAA 0.05                                       | 15                          | 0.52            | 10.12                      |
| 2            | WPM+6-BA 0.5+NAA 0.05                                         | 18                          | 1.2             | 83.15                      |
| 3            | WPM+6-BA 0.1+NAA 0.05                                         | 16                          | 1.56            | 1.02                       |

## 2.4 诱导生根

柳树体内生长素含量相对较高,极易生根,生根率近100%。当分化产生的不定芽长到2~3 cm时,将其转入1/2 MS培养基中进行生根诱导,观察发现大部分材料5 d时即可长出根原基,10 d时可以长成移栽的完整植株,其生根情况见表5。

表5 不同浓度NAA对垂柳生根的影响

Table 5 Effects of different NAA concentration on rooting of *Salix babylonica* Linn

| 培养基<br>编号<br>Number | 激素配比及<br>浓度/mg L <sup>-1</sup><br>Different hormone<br>concentration | 生根率/%<br>Rooting<br>rate | 不定根的<br>生长情况<br>Growth condition<br>of root |
|---------------------|----------------------------------------------------------------------|--------------------------|---------------------------------------------|
| 1                   | 1/2MS+NAA 0.2                                                        | 100                      | 根量多,根粗壮,<br>发生次生根                           |
| 2                   | 1/2MS+NAA 0.5                                                        | 95                       | 根量多,根粗壮                                     |

注:生根率=生根外植体数量/接种外植体数量×100%

由表5可知:NAA的浓度在0.2 mg/L时最适合垂柳不定根的诱导,诱导率高达100%,且植株生长健壮,发根数量多,根系粗壮并能形成较多的次生根。

## 3 小结与讨论

在垂柳再生体系的建立过程中,通过多次比较试验提出以下最适培养基及激素配比:诱导培养基为1/2 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.05 mg/L;分化及继代培养基为WPM+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L;生根培养基,1/2 MS+NAA 0.02 mg/L。

在垂柳的离体培养过程中,高浓度的6-BA在前期容易促进丛状芽的形成,有利于组培苗的大量繁殖,但后期高生长缓慢,这与文献[2,7]所述相近,

其原因可能是由于细胞分裂素与生长素的比例过大,抑制了高生长,通过更换培养基种类,由1/2MS改用WPM,降低6-BA的浓度,在很大程度上抑制了丛状芽的形成,促进了植株的高生长,其具体原因还在试验中。

褐化现象是植物诱导愈伤组织过程中普遍出现的现象,它是植物体内的酚类物质在多酚氧化酶的作用下转变醌类物质所致。一般研究均表明BA不仅能促进酚类化合物的合成,而且还能刺激多酚氧化酶的活性<sup>[2]</sup>,在本试验中外植体接入BA(0.5~2.0 mg/L)和NAA(0.05~0.1 mg/L)的组合培养基中,培养10 d后在茎基部切口处逐渐出现了黑色分泌物,由于活性炭可以吸附褐变产生的有害物质<sup>[9]</sup>,在培养基中加入0.01%活性炭,从而减轻了褐变的发生。

## 参考文献:

- [1] 任宪威. 树木学[M]. 北京:中国林业出版社,2000.256-257.
- [2] 李杰. 雪柳的组织培养初探[J]. 山东农业大学学报,2003,(3):71-81.
- [3] 程磊,周根余. 桤柳的组织培养与快速繁殖[J]. 上海师范大学学报(自然科学版),2001,(6):67-71.
- [4] 颜昌敬. 植物组织培养手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1989.35-36.
- [5] 裘文达,曹政义. 植物组织培养实用技术[M]. 北京:高等教育出版社,1989.96-98.
- [6] 谷瑞升,蒋湘宁,郭仲琛. 植物离体培养中器官发生调控机制的研究进展[J]. 植物学通报,1999,16(3):238-244.
- [7] 沈熙环,王瑞玲,朱湘渝. 组织培养法在树木育种中的应用[J]. 林业科技通讯,1979,(2):1-4.
- [8] 郑文静,赵海岩,杨立国. 植物组织培养操作过程中的常见问题及其解决办法[J]. 辽宁农业科技,2001,(2):49-51.

(编辑 刘彦琴)