

用组织培养技术筛选杨树耐盐种质*

张立钦

郑勇平

金佩英

(浙江林学院, 临安 311300)

(浙江省林业厅)

(浙江省余杭市林水局)

摘要 ①在质量浓度为 $5.0\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的氯化钠胁迫条件下,杨树外植体嫩茎的芽分化能力比嫩叶和根的强。嫩茎作为组培耐盐种质筛选的外植体是最适宜的。②在 $5.0\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐胁迫条件下,无性系NL-80105和NL-80106的芽分化能力比无性系NL-80303的强,以无性系NL-80105为最强。③采用MS为基本培养基,附加6-BA $0.40\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、NAA $0.02\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度组合筛选耐盐再生小植株较为适宜。④经过逐渐提高盐浓度的分阶段筛选法,获得了能耐质量浓度为 $10.0\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠的愈伤组织系,耐 $10.0\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠和 $10.0\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 海水盐的无性系NL-80105和NL-80106不定芽若干以及耐 $7.5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠的无性系NL-80105再生小植株21株和无性系NL-80106再生小植株2株。

关键词 杨属; 无性系; 组织培养; 耐盐性; 种质资源

中图分类号 S792.110.4; S722.37

近几十年来,国内外对植物的耐盐性从生理、遗传、育种等各个角度进行了大量的研究,积累了丰富的资料。随着组织培养技术的发展,人们利用植物细胞的全能性原理,研究和筛选耐盐性品系,取得了可喜的进展。Nabors等选择到能抗质量浓度 $8.8\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠的水稻细胞系,然后再生植株,经测定其 F_1 和 F_2 代都能保持抗性^[1]。Tyagi等从毛曼陀罗(*Datura innoxia*)单倍体愈伤组织选出了能在 $10.0\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠下正常生长的愈伤组织,并再生植株。这些植株稳定地保持着耐盐性^[2]。Yasuda采用氯化钠培养基分化出耐盐水稻植株^[2]。大野清春在 $10.0\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠浓度下得到且耐盐水稻愈伤组织,并得到再生植株^[2]。刘克斌等用 γ 射线诱变茄子(*Solanum melongena*)愈伤组织,筛选出抗 $10.0\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠的愈伤组织系和无根试管苗^[3]。

杨树(*Populus*)是重要的速生丰产用材树种,已在我国广泛栽培。南方沿海海涂上也不断引种杨树,其品种主要是黑杨派,如I-69杨、I-72杨和I-63杨等。这些品种的耐盐能力一般小于 $1.0\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,成为海涂栽培的一个主要限制性因素。因此,提高杨树的耐盐性具有重要的现实意义。

本研究采用南京林业大学从美洲黑杨I-69 \times 小叶杨的 F_1 代选育出的优良无性系作为研究对象,用组织培养方法进行耐盐种质筛选。现将试验结果作一报道。

收稿日期: 1996-01-25; 修回日期: 1996-06-05

*浙江省自然科学基金资助项目

1 材料与方 法

1.1 供试材料

从杨树无性系 NL-80105、NL-80117和 NL-80303的健壮枝条上剪取约 20 cm 长枝条。每一枝条具 2~4 个休眠芽,将其浸于 Hongland-Sngder 营养液中,并置于温室(20℃左右)中光照水培。待抽出新梢后,取其嫩茎、嫩叶和根作为外植体。

1.2 培养方法

以 MS (Murashige 和 Skoog 培养基)为基本培养基,附加生长调节剂,氯化钠或海水盐,蔗糖 300.0 g·L⁻¹,琼脂 1.0~10.0 g·L⁻¹,pH 5.8。将培养基分装于 100 ml 的三角烧瓶中,每瓶 40 mL,在 6.8 Pa 压力下灭菌 20 min 待用。

外植体根、茎、叶经 700.0 g·L⁻¹ 的乙醇消毒 30 s,再用 1.0 g·L⁻¹ 的升汞溶液消毒 3~4 min(茎为 4 min,根、叶为 3 min),用无菌水冲洗 4 次。将根、茎切成 0.5 cm 长小段,叶子切成 0.5 cm×0.5 cm 的小块,接种到培养基上,每瓶两块,置于温度(25±2)℃下,光照 12 h·d⁻¹ 培养。以后每 5 d 观察 1 次,30 d 进行继代培养。

1.3 在含氯化钠或海水盐的培养基上不同器官外植体芽分化能力比较

将无性系 NL-80105的根、嫩茎和嫩叶外植体分别接种在 MS+ 苄基腺嘌呤(6-BA) 0.40 mg·L⁻¹+ 萘乙酸(NAA)0.02 mg·L⁻¹ 添加 5.0 g·L⁻¹ 氯化钠或 1.5 g·L⁻¹ 海水盐的分化培养基上进行培养。每隔 5 d 观察外植体的愈伤组织形成和不定芽分化情况,30 d 后统计存活率和芽分化率,以选择最适宜盐胁迫下组织培养的外植体。

1.4 在含氯化钠或海水盐的培养基上不同杨树无性系芽分化能力比较

将无性系 NL-80105、NL-80106和 NL-80303的外植体茎和叶分别接种在 MS+ 6-BA 0.40 mg·L⁻¹+ NAA 0.02 mg·L⁻¹ 添加 5.0 g·L⁻¹ 氯化钠或海水盐的分化培养基上进行培养。以后每隔 5 d 观察 1 次,记录分化情况,30 d 后统计分化率及存活率,选择出适合于组培耐盐种质筛选的杨树无性系。

1.5 在含氯化钠的培养基上不同激素浓度组合对芽分化能力的影响

以无性系 NL-80106嫩茎为外植体,MS+ 5.0 g·L⁻¹ 氯化钠为基本培养基,附加不同激素及浓度(表 1)。接种方法和培养条件与 1.4 所述相同。以后每 5 d 观察 1 次,记录分化情况,30 d 和 60 d 后统计存活率和芽分化率,从中选择出最适宜的激素组合。

表 1 不同培养基代号及主要成分

Table 1 Code name of media and their chief composition

代 号	基本成分	氯化钠/g·L ⁻¹	苄基腺嘌呤/mg·L ⁻¹	萘乙酸/mg·L ⁻¹	激动素/mg·L ⁻¹
M ₁	MS	5.0	0.0	0.02	0
M ₂	MS	5.0	0.4	0.04	0
M ₃	MS	5.0	0.4	0.40	0
M ₄	MS	5.0	0.5	1.00	0
M ₅	MS	5.0	0.5	0.50	2.0
M ₆	MS (大量元素减半)	5.0	1.3	0.10	0

1.6 诱变处理外植体在含氯化钠培养基上芽分化情况

甲基磺酸乙酯(EMS)处理：以无性系 NL-80105 外植体茎为材料，切成 0.5 cm 大小，用 $3.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ EMS 液 (pH 为 6.8) 处理 30 min 后，用无菌水漂洗 3 次，接种在 M_1 (含 $5.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠) 分化培养基上，进行培养，每隔 5 d 观察 1 次，50 d 后统计分析。

γ 射线处理：将水培杨树无性系 NL-80105 外植体茎或叶接种到 M_1 (不含氯化钠) 分化培养基上培养，约 15 d 后直接分化出不定芽，进而继代在降低 BA 浓度 ($0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 的培养基上，促进不定芽的伸长，约 40 d 左右获得无根苗。以无根苗茎为材料，分别经 $1.29 \text{ C}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 $2.32 \text{ C}\cdot\text{kg}^{-1}$ 射线照射后，接种到 M_1 (含 $7.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $10.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠) 上进行培养，以后每 5 d 观察 1 次，50 d 后统计分析。

1.7 在含氯化钠或海水盐分化培养基上直接筛选耐盐再生小植株

采用无性系 NL-80105、NL-80106 的嫩茎为外植体，分别接种在含 $5.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $7.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $8.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠和 $5.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 海水盐的 M_1 分化培养基上进行培养。并将分化出来的不定芽，用逐渐加大含盐量 ($5.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \rightarrow 7.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ， $7.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \rightarrow 10.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) 分阶段培养法进行继代培养淘汰筛选。

2 试验结果

2.1 不同器官外植体在含氯化钠或海水盐培养基上芽分化能力

杨树无性系 NL-80105 的外植体嫩根、嫩茎和嫩叶在含两种不同盐的分化培养基上芽分化能力见表 2。从表 2 可知，3 种器官外植体芽分化能力差异极为显著，其中嫩茎外植体分化率最高，其次是嫩叶，根无分化能力。同一器官外植体在含不同盐的分化培养基上，分化率相差不显著，但含氯化钠的分化培养基上的分化芽总个数显然多于含海水盐培养基上的。原因可能是海水盐是多盐成分，比单盐氯化钠有更强的抑制能力。

茎外植体在分化培养基上，在第 2 天和第 3 天两端开始膨大，随之整段茎肿大，色变深绿。4 d 后两端出现白色松软的胚性愈伤组织，18 d 左右开始分化出不定芽。外植体叶 4 d 后开始扭曲肿大，10 d 左右切口出现淡褐色的胚性愈伤组织，23~25 d 左右分化出不定芽。相反，外植体根在含质量浓度为 $5.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的盐培养基上几乎不诱导愈伤组织，始终未能分化出不定芽，最后外植体枯死。

因此，在筛选杨树组培耐盐小植株时，采用嫩茎为外植体最适宜。同时用海水盐作选择

表 2 不同器官外植体芽分化率比较

Table 2 The ratio of bud formation on different organ explants

盐种类	外植体	接种数/块	芽分化数/块	分化率/%	不定芽总数/个
氯化钠 $5.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$	嫩 茎	66	15	22.7	63
	嫩 叶	24	3	12.5	9
	嫩 根	30	0	0	0
海水盐 $5.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$	嫩 茎	25	6	24.0	14
	嫩 叶	24	3	12.5	3
	嫩 根	30	0	0	0

压力比单盐氯化钠可能会更好些,筛选出的耐盐小植株可能会有广泛的耐性。

2.2 不同杨树无性系在含盐培养基上芽分化能力比较

杨树无性系 NL-80105、NL-80106和 NL-80303的外植体茎在含 $5.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的两种盐的分化培养基上, 2~3 d 后两端开始膨大。4 d 后无性系 NL-80105和 NL-80106 外植体茎两端开始诱导白色透明松软的胚性愈伤组织, 18 d 左右分化出不定芽, 外植体均存活。而 NL-80303在培养 7 d 后, 外植体茎两端诱导少量白色透明松软愈伤组织, 但 10 d 后开始出现枯死现象, 未能分化出不定芽。

从表 3 可知, 杨树无性系 NL-80105和 NL-80106在质量浓度均为 $5.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的两种盐分化培养基上外植体茎均存活, 芽分化能力较强, 其中 NL-80105更强些。无性系 NL-80303 外植体茎没有分化出不定芽, 表明耐盐性较差, 不宜作为筛选材料。因此, 选用杨树无性系 NL-80105和 NL-80106作为筛选耐盐组培小植株苗较为适宜。

表 3 不同杨树无性系芽分化比较

Table 3 The ratio of bud formation from different poplar clones

无性系	盐种类	外植体数/块	枯死数/块	芽分化数/块	芽分化率/%	分化起始天数/d
NL-80105	氯化钠	81	0	20	24.7	19
	海水盐	22	0	5	22.7	19
NL-80106	氯化钠	66	1	14	21.2	18
	海水盐	17	0	2	11.8	19
NL-80303	氯化钠	20	6	0	0	—
	海水盐	19	7	0	0	—

2.3 含氯化钠培养基上不同激素浓度组合对芽分化能力的影响

杨树无性系 NL-80106外植体茎在 6 种不同激素浓度组合的分化培养基(含氯化钠)上培养 30 d 和 60 d 后, 统计结果见表 4。试验表明采用 6-BA 和 NAA 作为分化培养的激素是适合的, 有利于胚性愈伤组织的产生。不同 6-BA 和 NAA 浓度对芽的分化影响十分显著。当 6-BA 浓度一定时 ($0.40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 改变 NAA 的浓度 ($0.02 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $0.04 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $0.40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 可使芽分化率差异十分显著。试验表明 6-BA $0.40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 NAA $0.02 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组合较为适合。以此培养 30 d 时分化率达 21.21%, 培养 60 d 时分化率达 50.00%, 且不定芽总

表 4 不同激素浓度组合对芽分化的影响

Table 4 Influence of plant hormone density on bud formation in tissues culture

激素组合	外植体数/块	培养 30 d				培养 60 d				分化起始时间/d
		枯死数/块	分化数/块	分化率/%	不定芽总数/个	枯死数/块	分化数/块	分化率/%	不定芽总数/个	
M ₁	66	0	14	21.21	47	0	33	50.0	179	18
M ₂	50	0	0	0	0	16	2	4	2	45
M ₃	52	2	2	4	4	17	6	11.5	13	19
M ₄	51	0	6	11.8	8	0	19	38.7	59	23
M ₅	12	0	2	16.7	2	0	3	25	4	30
M ₆	12	0	4	33.3	4	0	5	41.7	11	20

数不断增多。当提高 NAA 浓度的同时适当提高 6-BA 的浓度, 也有利于芽的分化。如以 NAA $1.00 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 6-BA $0.50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组合培养 30 d, 芽分化率为 11.80%, 培养 60 d 时芽分化率达 38.70%。此外, 减半 MS 基本培养基中的大量元素量, 也有利于提高芽的分化能力。

从芽分化的起始天数来看, 不同激素组合间相差也较大。在 M_1 培养基上分化最快, 4 d 后开始诱导胚性愈伤组织, 18 d 后分化出不定芽, 以后逐渐增多。在 M_2 培养基上分化最慢, 11 d 后才诱导出少量的愈伤组织, 30 d 后还有 60% 外植体块未能诱导出愈伤组织, 且开始出现变褐枯死现象, 45 d 后才分化出不定芽。其他组合的芽分化能力介于以上两组之间。

因此, 从芽分化率、分化起始天数和不定芽总个数等来看, 采用 6-BA $0.40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 NAA $0.02 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 激素浓度组合作为盐胁迫耐盐组培小植株筛选是最适宜的。

2.4 外植体经诱变处理后在含氯化钠分化培养基上芽的分化情况

经诱变处理的外植体在含氯化钠分化培养基上培养 50 d, 结果如表 5。经过 EMS 诱变剂处理后, 外植体茎在质量浓度为 $5.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠的分化培养基上分化率仍较高, 达 60%。试验获得了 31 个分化芽, 且长势较好, 并继代在含 $7.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠的分化培养基上进一步筛选。因此, 用 EMS 诱变处理能提高耐盐种质筛选的机率。

表 5 外植体诱变处理后芽分化情况

Table 5 Buds formed on explants treated with mutagenesis

诱变处理方法	培养基氯化钠浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	外植体数/块	枯死数/块	芽分化数/块	芽分化率/%
甲基磺酸乙酯(EMS)	5.0	10	0	6	60
$1.29 \text{ C}\cdot\text{kg}^{-1}$	7.5	96	5	0	0
γ 射线	10.0	72	37	0	0
$2.32 \text{ C}\cdot\text{kg}^{-1}$	7.5	18	18	0	0
γ 射线	10.0	18	18	0	0

经 $2.32 \text{ C}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的 γ 射线照射后, 外植体无一存活, 说明此剂量太大, 杀死了外植体。经 $1.29 \text{ C}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的 γ 射线照射的外植体在 $7.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $10.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠分化培养基上存活率分别高达 94.8% 和 48.6%。含 $7.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠的培养基上还诱导产生了愈伤组织, 诱导率为 7.3%。这些愈伤组织都呈浅黄色, 质地松软。初步认为这是耐盐的愈伤组织系, 但经 γ 射线处理后, 未能获得分化芽, 原因是含 $7.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的氯化钠培养基起始选择压力太大, 以后可以降低氯化钠浓度。

2.5 在含盐培养基上筛选耐盐组培再生小植株

2.5.1 耐盐愈伤组织筛选及分化 许多研究证明通过组织和细胞培养, 在含盐选择压力下筛选耐盐的愈伤组织系, 然后再生耐盐的小植株是有效、可行的方法。这在水稻、甘蔗、燕麦等植物中已获得成功^[2]。本研究以杨树无性系 NL-80106 嫩茎为外植体, 分别接种在含 $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $5.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $10.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠的培养基(激素组合: 2.4-D $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 激动素 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)上, 培养 30 d 后结果见表 6。由表 6 可知, 氯化钠浓度的提高对愈伤组织诱导和生长产生显著的影响。从每级氯化钠浓度上均获得了耐盐愈伤组织, 但生长差异极大。在含 $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠的培养基上愈伤组织质地硬, 生长差, 部分组织后来出现褐变。在 5.0

表 6 氯化钠对 NL-80106 愈伤组织诱导生长影响

Table 6 Influence of NaCl density on growth of culture calli from clone NL-80106

氯化钠质量浓度 /g·L ⁻¹	外植体数 /块	诱导率/%	平均愈伤组织质量 /mg	相对增长率/%
CK	20	100	126.6	100
1.0	20	100	87.2	68.9
5.0	20	93.8	53.8	42.5
10.0	20	46.2	1.2	0.9

结果愈伤组织失去分化能力, 最终未能分化出芽和根, 没有获得再生小植株。

上述试验表明, 通过逐渐提高盐浓度的分阶段方法, 可以筛选到耐盐的愈伤组织系。本试验已获得耐质量浓度10.0 g·L⁻¹氯化钠的愈伤组织, 但杨树愈伤组织继代数增多, 会失去分化能力, 最终不能再生小植体。这个关键性技术有待进一步研究解决。

2.5.2 在含氯化钠分化培养基上筛选耐盐再生小植株 分化培养基的氯化钠起始选择压力质量浓度设5.0 g·L⁻¹, 7.5 g·L⁻¹和8.5 g·L⁻¹, 直接分化耐盐不定芽, 结果见表7。由表7可知, 氯化钠起始质量浓度为5.0 g·L⁻¹和7.5 g·L⁻¹的均获得了耐盐的不定芽, 在5.0 g·L⁻¹氯化钠上培养60 d, 芽分化率达77.29%, 并获得大量的耐性不定芽。在7.5 g·L⁻¹氯化钠上芽分化率达54.30%, 但不定芽数量极显著减少。在起始质量浓度8.5 g·L⁻¹上未能获得不定芽。该浓度的起始选择压力是不适宜的。

表 7 含氯化钠分化培养基上芽分化情况

Table 7 Bud formation on differential medium with NaCl

无性系	氯化钠质量浓度 /%	外植体数 (嫩茎)	培 养 40 d			培 养 60 d		
			芽分化数 /块	分 化 率 /%	不定芽总数 /个	芽分化数 /块	分 化 率 /%	不定芽总数 /个
NL-80105	0.50	295	168	56.94	990	228	77.29	1394
	0.75	124	30	24.19	55	67	54.03	81
	0.85	30	0	0	0	0	0	0
NL-80106	0.50	66	27	40.91	127	33	50.00	179
	0.75	28	6	21.43	13	8	28.57	18
	0.85	30	0	0	0	0	0	0

将获得的不定芽转接到更高一级氯化钠质量浓度(从5.0 g·L⁻¹到7.5 g·L⁻¹, 从7.5 g·L⁻¹到10.0 g·L⁻¹)的分化培养基上进行筛选。在7.5 g·L⁻¹氯化钠的培养基上培养10 d左右, 部分不定芽开始逐渐变褐死亡, 有些变黄变白, 出现了明显的盐害, 而另一部分不定芽继续存活生长。有个别饱满的芽生长较快。30 d后统计, 杨树无性系 NL-80105 淘汰率达41.2%, NL-80106为47.6%。但两个无性系部分外植体上还能分化出不定芽。在10.0 g·L⁻¹上培养30 d后统计, 无性系 NL-80105淘汰率为34.6%, NL-80106为50.0%, 但存活的不定芽长

g·L⁻¹上的愈伤组织生长正常, 不褐变。

为了筛选比较耐盐的愈伤组织, 把上述获得的愈伤组织继代到更高级氯化钠质量浓度(从5.0 g·L⁻¹到10.0 g·L⁻¹, 从10.0 g·L⁻¹到15.0 g·L⁻¹)的培养基上进行培养。结果在10.0 g·L⁻¹质量浓度上全部存活, 但生长很慢, 新长出的愈伤组织质地硬, 色较绿, 同时部分老组织出现褐变。而在15.0 g·L⁻¹质量浓度上全部枯死。从10.0 g·L⁻¹质量浓度上获得的耐性愈伤组织继代培养60 d, 然后转接到分化培养基上, 培养60 d。

势差。

把筛选到的耐盐不定芽继代在降低6-BA($0.20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 氯化钠浓度不变)的培养基上培养, 促进不定芽的伸长并继续保持一定的分化能力。培养30 d后, 在含氯化钠的培养基上, 个别不定芽伸长较快, 高达3~4 cm, 但大部分不定芽较致密, 几不伸长。在 $10.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠的培养基上, 生长极慢, 几不伸长。把生长快的无根苗继代到不加激素和氯化钠的MS生根培养基上, 约15 d后生根。

最后, 试验获得了耐 $7.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠质量浓度的无性系NL-80105组培再生小植株21株, 无性系NL-80106组培再生小植株2株。而耐 $10.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠质量浓度的不定芽最终未能培育出再生小植株。

2.5.3 在含海水盐分化培养基上筛选结果 以海水浓缩盐作为选择压力, 逐渐提高盐浓度, 分阶段筛选耐盐小植株, 本研究也作了尝试。采用 $5.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 海水盐为起始选择压力, M_1 为分化培养基, 结果见表8。由表8可知, 培养30 d统计, 无性系NL-80105和NL-80106都能分化出耐盐不定芽, 分化率分别为23.40%和14.29%。又继代培养30 d, 获得较多的不定芽。将这些不定芽转接至 $7.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 海水盐的分化培养基上培养30 d, 然后再转接至 $10.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 海水盐的分化培养基上培养, 进行分阶段逐渐筛选, 筛选结果见表9。

表8 $5.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 海水盐分化培养基上培养30d后芽分化情况

Table 8 Bud formation on differential medium with 0.5 percent of sea salt

无性系	外植体数/块	芽分化数/块	枯死数/块	芽分化率/%	不定芽总数/个
NL-80105	47	11	0	23.40	35
NL-80106	35	5	0	14.29	18

表9 提高盐浓度不定芽淘汰情况

Table 9 Selection of buds by higher salt density

无性系	$7.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 海水盐			$10.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 海水盐		
	移植芽数/个	枯死(垂死)芽数/个	淘汰率/%	移植芽数/个	枯死(垂死)芽数/个	淘汰率/%
NL-80105	69	31	44.93	28	9	32.14
NL-80106	29	12	41.38	18	9	50.00

经过逐渐淘汰筛选, 无性系NL-80105和NL-80106分别获得1.00质量浓度为 $10.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 海水盐的不定芽19个和9个。把不定芽继代到降低6-BA($0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)的培养基上培养一代, 后继代到无激素的MS生根培养基上, 但最终未能培养出再生小植株。无论如何, 以海水盐作为选择压力来筛选耐盐的再生小植株是可行的。

参 考 文 献

- 1 奚元龄, 颜昌敬. 植物细胞培养手册. 北京: 农业出版社, 1932. 220~257
- 2 翟凤林, 曹鸣庆. 植物的耐盐性及其改良, 北京: 农业出版社, 1989, 1~254
- 3 刘光斌, 李曙轩, 裘文达. 用离体培养技术筛选茄子抗盐性突变体研究. 科技通报, 1990, 6(5), 271~275
- 4 王影, 黄敏仁, 陈道明. 杨树细胞悬浮培养及体细胞胚胎发生的研究. 南京林业大学学报, 1991, 15(3), 30~36

5 上海植物生理学会. 植物生理学实验手册. 上海, 上海科学技术出版社, 1985. 61~63

Zhang Liqin (Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300, PRC), Zheng Yongping, and Jin Peiying. **Selection of Salt Tolerance Poplar Regenerated Plantlets in Tissues Culture.** *J Zhejiang For Coll*, 1996, 13(4): 397~404

Abstract: The Selection of salt tolerance plantlet regeneration of three poplar clones, namely poplar NL-80105, poplar NL-80106, and poplar NL-80303, in tissues was studied. The results were as follows: (1) On MS medium with $5.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, the most shoots formed on young stem explants among three explants, and more shoots developed from clone NL-80105 and NL-80106 than from clone NL-80303. (2) More salt tolerance shoots formed from the explants treated with EMS or γ ray than from those untreated. (3) MS medium with 6-BA $0.40 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ and NAA $0.02 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ was suitable for selection of salt tolerance poplar regenerated plantlet. (4) By elimination series under higher salt density, after all, the calli tolerance to $10.0 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ NaCl, the shoots tolerance to $10.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl or sea salt and 23 regenerated plantlets resistant $7.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, 21 from clone NL-80105 and 2 from clone NL-80106, were obtained.

Key words: poplar (*Populus*); clones; tissues culture; salt tolerance; germ plasm resources