

杨树湿地松组织培养愈伤组织耐盐性*

张立钦

郑勇平

(浙江林学院林学系, 临安 311300) (浙江省林业厅种苗站)

罗士元 胡加共

(浙江省台州地区林业特产局)

摘要 对杨树无性系 NL-80105, NL-80106, NL-80117和湿地松组织培养愈伤组织的耐盐性进行了研究。结果表明:以 MS为基本培养基,添加 2, 4-D $2.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 KT $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 诱导这些树种愈伤组织效果好;在含氯化钠的培养基上,杨树不同器官外植体的愈伤组织诱导能力和耐盐程度有差异,外植体茎、叶比根强;杨树继代愈伤组织的耐盐能力显著高于湿地松,这与植株水平的耐盐性相一致,表明用愈伤组织鉴别这些植物耐盐性的方法是可行的。

关键词 杨属;无性系;湿地松;组织培养;愈伤组织;耐盐性

中图分类号 S722.36

研究和改良植物的抗盐性,一般都是通过常规的育种程序来实现。然而,组织培养技术为研究和改良植物的抗盐性提供了一种新的良好的方法。利用植物组织培养产生的愈伤组织进行耐盐突变体选择和鉴别植物耐盐程度,在不少植物中取得了可喜的进展^[1]。本文以杨树(南方型)、湿地松为对象,对其组织培养愈伤组织耐盐性进行测定,并探讨组织与植株之间的耐盐性的关系以及为选择耐盐突变体提供基础。

1 材料与方法

1.1 供试树种

本试验以杨树无性系 NL-80105, NL-80106, NL-80117和湿地松 (*Pinus elliottii*) 为材料,其中 3个杨树无性系是由南京林业大学从 *Populus deltoides* cv. "LUX" 1 (ex-I-69/55) × *P. simonii* 的 F₁ 代中筛选出来的速生优良无性系。

收稿日期: 1996-01-25; 修回日期: 1996-04-08

* 浙江省自然科学基金资助项目

第 1 作者简介: 张立钦, 男, 1961年生, 副教授, 硕士

1.2 愈伤组织诱导

以 MS (Murashige 和 Skoog 培养基) 为基本培养基, 添加 2, 4-D $2.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, KT (激动素) $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, pH 为 5.8, 琼脂 0.7%~0.8%。培养基分装于 125 mL 的三角烧瓶中, 灭菌后待用。

取去芽的茎段, 洗净, 经 $700.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙醇 30s 和 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 升汞 6~8 min 消毒, 用无菌水冲洗 4 次。去皮及两头, 取韧皮部切成 $1.0 \text{ mm} \times 2.0 \text{ mm}$ 的小块接种。嫩茎、嫩叶柄升汞消毒时间减为 3~4 min, 嫩叶、嫩根升汞消毒时间为 2~3 min。其他过程与上述相似, 不去皮切成 0.2 mm 小段, 每瓶接入 3~4 块组织。置于 24~26°C 下, 光照 $10 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 培养。

1.3 氯化钠对不同器官外植体愈伤组织诱导和生长的影响

以无性系 NL-80117 的嫩根、嫩茎及嫩叶为外植体。根和茎切成 0.5 cm 长, 叶为 $0.5 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm}$ 分别接种在含不同氯化钠浓度 ($0, 5.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}, 7.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 的培养基上。每处理 4 瓶, 每瓶接 4 块外植体。培养条件同上。以后每隔 5 d 观察 1 次, 记录愈伤组织诱导和生长情况。

1.4 愈伤组织对氯化钠的耐受性测定

经诱导的愈伤组织, 继代 2 次后扩大成一定量的愈伤组织。将其切成 $0.3 \sim 0.5 \text{ cm}$ 大小的小块, 称出其质量, 分别接种在不同氯化钠浓度 ($0, 1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}, 5.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}, 10.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 的培养基上, 每瓶接 2 块, 每处理 5 瓶。在同上的条件下培养。4 周后, 再称出愈伤组织质量, 计算出质量的绝对增加量和生长率。之后将愈伤组织分别转移到更高级氯化钠浓度的培养基上进行继代培养, 观察愈伤组织的生长情况。

1.5 紫外线、甲基黄酸乙酯诱变处理后愈伤组织的耐盐性

以无性系 NL-80117 的继代愈伤组织为材料切成 0.5 cm 大小, 经紫外线处理 1 h 后, 或用 $3.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ EMS 液中浸 30 min, 用无菌水洗 3 次, 分别接种在含不同氯化钠浓度 ($0, 5.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}, 10.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}, 15.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}, 20.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 的培养基上。每处理 3 瓶, 每瓶 4 块愈伤组织。以后每隔 5 d 观察 1 次, 4 周后进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的诱导

表 1 不同外植体的愈伤组织诱导和生长情况

Table 1 Tissue culture calli from stems, petioles and buds

树种	外植体	脱分化所需天数 /d	诱导率 /%	外植体数	愈伤组织质地、颜色	愈伤组织生长情况
NL-80106	老茎	6	100	25	中偏软、乳黄 表面粉红色	开始生长较慢, 后期生长快, 继代后生长迅速
	嫩茎	6	100	40		
	嫩叶柄	13	100	18		
	嫩叶	20	100	30		
湿地松	嫩茎	8	100	18	中偏软 米黄色	开始愈伤组织紧贴培养基生长较慢, 后期生长快, 继代后更快
	嫩叶柄	15	100	10		
	芽	15	100	10		

从表 1 可知, 添加 $2.4\text{-D } 2.0\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, $\text{KT } 0.5\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 MS 培养基适合于这些树种的愈伤组织诱导和生长。不同器官外植体 (杨树老茎、嫩茎、嫩叶柄、嫩叶, 湿地松嫩茎、嫩叶柄、芽) 均能诱导愈伤组织, 且诱导率高达 100%。从诱导过程来看, 2 个树种的茎外植体脱分化较快, 7 d 左右开始产生愈伤组织; 嫩叶柄、嫩叶和芽脱分化所需时间长些, 约需 15 d 之久。但同一树种不同器官外植体诱导的愈伤组织, 其生长、质地和颜色均一致。另外, 一旦愈伤组织继代后, 生长非常迅速, 且质地中等偏软, 易分散, 这有利于细胞系筛选。

2.2 氯化钠对不同器官外植体愈伤组织诱导生长的影响

无性系 NL-80117 不同器官外植体在含不同浓度氯化钠培养基上诱导培养, 结果见表 2。从诱导结果看, 茎和叶在 3 种不同氯化钠浓度培养基上诱导率均达 100%; 而根的诱导率较低, 随着氯化钠浓度的提高, 诱导率降低, 在 $7.5\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠上为零。这表明茎、叶对氯化钠的耐性较强, 同时也有较强的脱分化能力。相反, 根对氯化钠较敏感, 且脱分化能力较弱。茎外植体在 7 d 后就开始诱导出愈伤组织。叶外植体在 3 d 后, 肿胀伸长, 卷曲, 10 d 左右开始诱导出愈伤组织, 但在 $7.5\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠上部分叶组织变色枯死。根外植体在不含氯化钠培养基上 10 d 开始诱导出愈伤组织, 在 $5.0\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠上 15 d 后才诱导出愈伤组织, 在 $7.5\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠上不诱导愈伤组织, 但也没变褐现象。由此可见, 在同一氯化钠浓度下, 不同器官外植体的愈伤组织诱导能力和耐盐程度有差异。对杨树来说, 茎、叶愈伤组织诱导能力和耐盐性较强。此外, 不同氯化钠浓度对愈伤组织诱导也有显著影响。因此, 在鉴别和筛选愈伤组织耐盐性时, 应注意选择合适的外植体, 也要确定适宜的选择压力。

表 2 氯化钠对不同器官外植体的愈伤组织诱导影响

Table 2 Influence of NaCl on growth of culture calli from petioles and roots

外植体	对 照			$5.0\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠			$7.5\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠		
	接种外植体块数	诱导愈伤组织块数	诱导率 %	接种外植体块数	诱导愈伤组织块数	诱导率 %	接种外植体块数	诱导愈伤组织块数	诱导率 %
根	16	4	25	16	2	12.5	16	0	0
茎	16	16	100	16	16	100	16	16	100
叶	16	16	100	16	16	100	16	16	100

2.3 愈伤组织的耐盐性

以无性系 NL-80106 和湿地松的茎为外植体诱导的愈伤组织, 在不同氯化钠浓度条件下培养 4 周后, 所得结果见表 3。由于分析的数据是百分率, 常常不按正态分布, 先进行对数变换, 然后对每一树种不同浓度间进行差异显著性检验。结果湿地松愈伤组织, 在对照与 $1.0\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠之间无显著性差异, 而其他各组浓度间愈伤组织生长都存在显著差异。说明低浓度 $1.0\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠对湿地松愈伤组织的生长抑制作用弱; $5.0\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠对湿地松愈伤组织就产生显著抑制作用。随着氯化钠浓度的提高对其愈伤组织的生长抑制作用越强。

无性系 NL-80106 愈伤组织的生长, 除对照与 $10.0\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠浓度间有显著差异外, 其他各浓度间无显著差异。说明无性系 NL-80106 的愈伤组织比较耐盐, $5.0\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠对愈伤组织生长不产生严重的抑制作用。如果筛选耐氯化钠愈伤组织或细胞系的话, 要选择 5.0

$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠浓度以上为起始浓度较宜。

表 3 不同氯化钠浓度对不同树种继代愈伤组织生长的影响

Table 3 Influence of NaCl densities on growth of subculture calli

树种	复接	CK			1.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠			5.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠			10.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠		
		接种体质量 /mg	培养增量 /mg	增长率 %	接种体质量 /mg	培养增量 /mg	增长率 %	接种体质量 /mg	培养增量 /mg	增长率 %	接种体质量 /mg	培养增量 /mg	增长率 %
湿地松	I	94	3 472	3 693.6	121	2 840	2 347.1	68	125	183.8	78	31	39.7
	II	58	3 354	5 782.7	96	1 502	1 564.6	76	284	373.7	94	100	106.4
	III	117	5 289	4 520.5	76	1 725	2 269.7	70	236	337.1	44	55	125.0
	IV	89	3 067	3 446.1	70	1 951	2 787.1	66	97	147.0	110	14	12.7
NL-80106	I	112	183	163.4	198	658	332.3	126			142	65	45
	II	184	506	275.0	168	479	284.5	156	305	195.5	160	155	96
	III	58	471	812.1	158	404	255.7	112	259	231.3	190	128	62
	IV	142	443	312.0	198	521	263.1	160	318	198.3	102	41	40

如将 2 种树种的愈伤组织相对生长率对氯化钠浓度作图 (图 1), 可见随着氯化钠浓度的提高, 对愈伤组织的生长会产生强烈的抑制作用, 但对 2 种树种的抑制作用程度不一致。NL-80106 愈伤组织耐盐性明显大于湿地松。一般来说, 在田间, 杨树较湿地松耐盐, 湿地松是盐敏感的树种。在海涂 (含盐量为 0.20%) 田间试验, NL-80106 生长正常, 而湿地松则不能生长。由此说明, 2 种树种的愈伤组织耐盐性与植株水平是一致的, 能反映出植株间的耐盐能力的差异。这暗示我们用愈伤组织来鉴别这些树种的耐盐性是可取的。

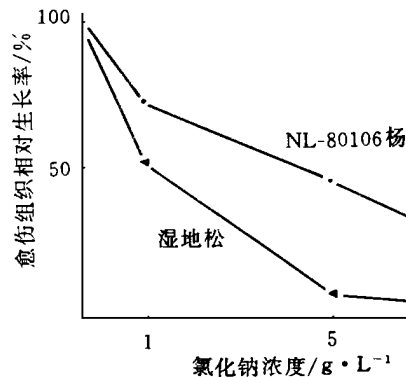


图 1 杨树、湿地松愈伤组织相对生长率与氯化钠浓度的关系

Fig. 1 Relationships between the relative growth rate of subculture calli and NaCl densities

愈伤组织比湿地松愈伤组织耐盐程度高

2.4 无性系 NL-80105 和 NL-80117 愈伤组织对氯化钠耐性测定

用相同方法扩大测定了无性系 NL-80105 和 NL-80117 的愈伤组织耐盐性, 结果见表 4

将在各个氯化钠浓度培养基上获得的愈伤组织 (直径 0.5 cm) 继代到更高级氯化钠浓度培养基上, 即从 CK 继代到 1.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 从 1.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 继代到 5.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 从 5.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 继代到 10.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 从 10.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 继代到 15.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 上进行培养。经过 40 d 培养观察, NL-80106 湿地松在 10.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠上存活率达 100%; 但在 15.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠上均不存活。从生长情况来看, NL-80106 愈伤组织在 5.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠浓度以下生长正常, 但在 10.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠上生长慢, 组织质地变硬。湿地松愈伤组织在 1.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠上生长正常, 在 5.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠上生长稍差些, 而在 10.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠上部分愈伤组织出现变褐现象。这进一步说明 NL-80106

表 4 NL-80105和 NL-80117愈伤组织耐盐程度

Table 4 Tolerance to NaCl of calli of two *Populus* clones

无性系	氯化钠浓度 /g° L ⁻¹											
	对照		2.5		5.0		7.5		10.0		15.0	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
NL-80105	2074.9	100	1688.0	81.35	81.6	3.93	143.1	6.92	36.2	1.74	0	0
NL-80117	4020.0	100	2418.2	53.44	246.8	6.14	380.0	9.45	64.6	1.61	12.3	0.31

A: 愈伤组织平均生长量 /mg; B: 愈伤组织相对生长率 %

经统计分析,两个无性系愈伤组织,在对照和 2.5 g° L⁻¹氯化钠水平分别同 5.0 g° L⁻¹, 7.5 g° L⁻¹, 10.0 g° L⁻¹和 15.0 g° L⁻¹氯化钠水平之间存在着极显著性差异,而 5.0 g° L⁻¹, 7.5 g° L⁻¹, 10.0 g° L⁻¹氯化钠之间无显著性差异。无性系 NL-80105愈伤组织在对照与 2.5 g° L⁻¹氯化钠水平之间无显著性差异,但无性系 NL-80117愈伤组织在对照与 2.5 g° L⁻¹氯化钠水平之间存在着显著性差异。从愈伤组织生长情况来看,2个无性系在对照和 2.5 g° L⁻¹氯化钠浓度上生长良好,无变色,无死亡;而在大于 5.0 g° L⁻¹氯化钠浓度上愈伤组织生长不良,部分或大部分组织变褐死亡。综上所述,无性系 NL-80105和 NL-80117愈伤组织能忍耐 2.5 g° L⁻¹的氯化钠浓度,其中无性系 NL-80105比 NL-80117耐盐性更强些。5.0 g° L⁻¹氯化钠浓度以上会对 2个无性系愈伤组织产生盐害作用。

2.5 诱变处理后愈伤组织的耐盐性

无性系 NL-80117愈伤组织分别经 2种诱变处理后在不含氯化钠的培养基上长势良好,3周后愈伤组织明显增大,质地稍变硬;在 5.0 g° L⁻¹氯化钠培养基上长势一般,有个别愈伤组织块的部分组织出现变褐现象,质地偏硬,存活率也达 100% (表 5);而在 1.0 g° L⁻¹氯化钠浓度以上的培养基上,其存活率明显大于对照,尤其是 EMS处理。观察发现,虽然愈伤组织在高氯化钠浓度上逐渐变褐死亡,但在其周围缓慢地生长出一些新的组织。我们认为这可

表 5 诱变处理后愈伤组织的耐盐性

Table 5 Salt tolerance levels of calli treated with ultraviolet ray and EMS

处理方法	氯化钠浓度 /g° L ⁻¹	接种块数 /块	存活块数 /块	存活率 %
紫外线	0	9	9	100
	5.0	12	12	100
	10.0	12	9	75
	20.0	12	0	0
EMS	0	12	12	100
	5.0	8	8	100
	10.0	12	10	83.3
	15.0	7	3	42.9
对照	0	8	8	100
	5.0	8	8	100
	10.0	8	5	62.5
	15.0	8	0	0

能是耐盐突变体组织,有待于进一步培养测定。因此,经过物理或化学的诱变处理,将能提高筛选耐盐愈伤组织的机率。

应该指出,本文没有做过不同培养条件对愈伤组织耐盐性影响的研究,如愈伤组织继代数、质地、培养光照和不同激素浓度,等等。在一定范围内,一般2,4-D浓度越高,愈伤组织生长越快,质地也变软,可能会影响耐盐程度。在我们用组织培养方法研究植物抗病性时,往往不同激素浓度配比所诱导的愈伤组织,其抗病有差异,是否耐盐性方面也有类似情况,还不清楚,有待研究。

无论如何,用组织培养愈伤组织鉴别和筛选树木的耐盐种质,有许多优点。如可以在细胞和组织水平上进行研究;培养基组成严格限定,培养条件受控,适宜进行精确的试验研究;缩短抗盐性育种周期等等,所以是一种新的良好的方法。

致谢 朱明产、项金敏、蒋灵华和王志良等同志参加部分工作,在此表示感谢

参 考 文 献

- 1 翟凤林,曹鸣庆.植物的耐盐性及其改良.北京:农业出版社,1989.149~237
- 2 陈正华.木本植物组织培养及其应用.北京:高等教育出版社,1986.1~195
- 3 胡含,王恒立.植物细胞工程与育种.北京:北京工业大学出版社,1990.209~213
- 4 黄敏仁,陈道明.杨树叶组织培养和幼苗形成的研究.植物生理学通讯,1980,(3):47~49
- 5 张立钦,李传道,黄敏仁.杨树组织培养愈伤组织对水泡型溃疡病的抗性.南京林业大学学报,1989,13(4):9~15

Zhang Liqin (Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300, PRC), Zheng Yongping, Luo Shiyuan, and Hu Jagong. **Salt Tolerance of Calli of *Populus* Clones and *Pinus elliottii* in Tissue Cultures.** *J Zhejiang For Coll*, 1997, 14 (1): 16~21

Abstract The tolerance to NaCl of tissues culture calli of *Populus* clones (NL-80105, NL-80106, and NL-80117) and *Pinus elliottii* was studied. The results were as follows: (1) MS medium with $2.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ of 2, 4-D and $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ KT was suitable for tree calli in tissue cultures; (2) the salt tolerances of calli from roots, stems and petioles were different on MS containing NaCl. The calli with the highest salt tolerance was from stems; (3) the salt tolerance of subculture calli of *Populus* clones was higher than that of *Pinus elliottii*, which was in keeping with the salt tolerance of *Populus* and *Pinus elliottii* trees.

Key words *Populus*; clones; *Pinus elliottii*; tissue cultures; callus; salt tolerance