

Effect of Tissue Culture Conditions on Organogenesis and Replant of *Salix psammophila*

Lijun He¹, Haijun Chen², Xianwei Wu¹, Jiawei Liu¹, Kebin Mu¹, Jie Hou²

¹Agricultural College, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot Inner Mongolia

²Inner Mongolia Institute of Biotechnology, Huhhot Inner Mongolia

Email: helijun111@sina.com, chenhaijun2004@163.com

Received: Aug. 20th, 2017; accepted: Sep. 4th, 2017; published: Sep. 8th, 2017

Abstract

Salix psammophila is one of the important eco-economic plants in northern arid and desert region. In this experiment, on the basis of the strong tender stem segments, the key skills of how regenerated plant forms in different *Salix psammophila* tissue culture conditions were explored, by means of tissue culture to get the organs formed and differentiated and to induce regeneration plants formed in succession. Research results show that *Salix psammophila* gets better bud differentiation effect in MS medium, the suitable differentiation and proliferation medium is MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA; the subculture medium is MS + 0.2 mg/L 6-BA + 0.2mg/L KT + 0.1 mg/L NAA, with shifting the culture with the medium MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA, a medium with little higher hormone, to achieve the best effect; the rooting medium is 1/2MS + 0.3 mg/L IBA + 0.05 mg/L NAA, all the results establish the regeneration system. This method not only provides the materials source for *Salix psammophila* stable genetic transformation studies, but also offers theoretical and technical support for *Salix psammophila* industrialized seeding production in the future.

Keywords

Salix psammophila, Tissue Culture, Organogenesis, Replant

组织培养对沙柳器官形成与植株再生的影响研究

何丽君¹, 陈海军², 吴显威¹, 刘嘉伟¹, 穆可彬¹, 侯杰²

¹内蒙古农业大学农学院, 内蒙古 呼和浩特

²内蒙古自治区生物技术研究院, 内蒙古 呼和浩特
Email: helijun111@sina.com, chenhaijun2004@163.com

收稿日期: 2017年8月20日; 录用日期: 2017年9月4日; 发布日期: 2017年9月8日

摘要

沙柳(*Salix psammophila*)是北方干旱和沙漠地区重要的生态经济植物之一。本研究以采自沙柳当年生健壮嫩枝茎段为研究对象, 通过组织培养手段使其器官形成并分化, 继而诱导继代形成再生植株, 以探索其在不同组织培养条件下形成再生植株的关键技术。结果表明, 沙柳在MS培养基上芽分化效果较好, 适宜分化增殖培养基为MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA; 继代培养基为MS + 0.2 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L KT + 0.1 mg/L NAA, 并与激素稍高浓度的培养基MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA交替培养达到效果更佳; 生根培养基为1/2MS + 0.3 mg/L IBA + 0.05 mg/L NAA, 可获得到沙柳再生体系的建立, 该方法不仅为沙柳稳定性遗传转化研究提供材料来源, 也为今后实现沙柳工厂化育苗提供理论与技术依据。

关键词

沙柳, 组织培养, 器官发生, 再生植株

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

沙柳又称黄柳, 别名西北沙柳, 属杨柳科柳属植物, 它是西北干旱、草原地带典型的优良沙生和旱生落叶灌木或小乔木, 其抗逆性强, 较耐旱, 喜水湿, 生长快, 抗风沙, 耐定盐碱, 耐严寒和酷热, 喜适度沙压(埋), 也是防风固沙的优良树种之一[1], 主要分布在我国的内蒙古、新疆及陕甘宁等地沙区[2]。沙柳生长迅速, 枝叶茂密, 枝条细柔, 姿态婆娑, 也可做北方市政景观植物。由于其根系繁大, 固沙保土力强[3], 成片成串的沙柳形成的植物带绿地。沙柳是可以生长在荒漠、河滩或盐碱地等恶劣环境中的顽强植物, 还是中国沙荒地区造林面积最大的树种之一[3]。沙柳材料可做纸板和造纸, 枝叶含较高的蛋白质和脂肪, 属于较好的青贮饲料; 树皮取鞣制草, 又是良好编织材料; 花为蜜源; 皮根均可入药, 具有清热、泻火、消肿等疗效[4], 沙柳引发的沙产业已成为新一轮的经济增长点[5]。

近年来, 用植物组织培养的方法快速繁殖各种植物资源已得到了普遍重视和广泛应用[6]。人们越来越重视对沙柳这种旱生植物的研究和开发利用, 开展许多研究工作, 为今后沙柳遗传转化和基因的提取提供了有利的研究基础[7] [8]。其中利用组织培养技术繁育沙柳资源, 可有效缩短其增殖周期以达到快速繁育优良品种的目的。在具体繁育实践操作过程中, 所采取的组织培养方法均行之有效[9] [10] [11], 但与研究采用组织培养技术(或培养过程)存在明显区别: 首先, 本研究所采用供试的材料是以沙柳当年生长幼嫩枝条为外植体, 将外植体消毒灭菌选择适宜灭菌条件。其次, 将外植体接种在不同激素浓度配比中, 将外植体催芽生长; 再次, 将催芽剪切接种到不同激素浓度培养基中产生器官发生, 由器官发生生长形成小植株; 最后, 将器官发生生长形成的小植株进行继续培养产生完整植株, 建立再生体系。在此背景

下, 本研究将为沙柳植物快繁优选出适宜于外植体各生长阶段培养基组分及其处理条件, 并探究培养基对沙柳茎段再生诱导的影响, 不仅为沙柳稳定性遗传转化研究提供材料来源, 也为今后实现沙柳工厂化育苗生产和西北造林绿化提供基础理论技术依据。

2. 材料和方法

2.1. 外植体采集与处理

供试沙柳材料采自于内蒙古鄂尔多斯达拉特旗, 其经度为 E110.03°, 纬度 N 40.40°。分不同的季节春季、夏季和秋季枝条外植体均有采集。为减小试验系统误差, 所采集沙柳茎段均取自同一植株附近的枝条。沙柳茎段主要选取一年生春季、秋季嫩枝(表 1、表 2)。将野外采回的一年生枝条剪去大部分叶片, 用洗衣粉液漂洗表面泥土持续 10 min, 然后用自来水活水冲洗 2~4 h (茎枝皮色一般呈现偏黄绿色或嫩红色)。然后将洗净的枝条装在量筒并用封口膜密封, 做好标记, 避光于 4℃~5℃温度条件下冷藏处理 48 h 以上(图 1, 表 1)。在超净工作台上操作时, 首先将处理好的枝条剪成长度约 2.5~3.0 cm, 并且带有 1~2 个侧芽的茎段, 用 70% 的乙醇消毒 35~40 s 进行充分消毒后, 然后转用无菌水洗 3~5 次。再用 8% 的次氯酸钠溶液消毒 8~15 min, 再次用无菌水冲洗 5~6 次, 最后置于无菌滤纸上吸干水分, 接种于 MS 和 WPM 培养基上进行培养。统计消毒灭菌成活率。成活率(%) = 成活数/接种总数 × 100%。



Figure 1. Explant
图 1. 外植体

Table 1. Effects of different explants and corresponding disinfection methods on disinfection efficiency

表 1. 不同类型外植体及相应消毒方法对消毒效果的影响

外植体类型	8%次氯酸钠(min)	接种数(瓶)	污染数(瓶)	污染率(%)	未出芽率(%)
新生嫩枝	8	40	6	15.0	5.0
	12	40	3	7.5	12.5
休眠枝	8	40	25	62.5	12.5
	12	40	20	50.0	20.0

注: 污染率(%) = 污染总数/接种总数 × 100%; 未出芽率(%) = 未出芽总数/接种总数 × 100%。

Table 2. Effects of different temperature treatment on disinfection efficiency of the new and tender explant in spring
表 2. 不同温度处理对春季新生嫩枝外植体消毒效果的影响

试验处理	污染株率(%)	出芽株率(%)
常温 12 h	25	75
冷藏一周	10	90

注: 出芽率(%) = 出芽总数/接种总数 × 100%。

2.2. 培养基制备

本试验所用培养基为 MS 固体培养基, 以 WPM、1/2MS 培养基作为对照, 并在培养基中添加蔗糖 3%, 琼脂 0.7%, 调节 pH 范围为 5.8~6.0 之间; 本试验共分为外植体消毒初代培养、芽分化培养、继代培养、生根培养四个阶段, 不同阶段所用培养基及添加不同浓度的 IBA、NAA、6-BA 和 KT 等激素。

2.3. 培养环境控制

保持每天光照时间 12~16 h, 调整光照强度范围为 20,000~22,000 $\mu\text{mol}/\text{s}\cdot\text{m}^2$, 培养温度控制在 25°C ~28°C \pm 2°C 区间。

2.4. 外植体分化培养

将上述消毒好的外植体接种于不同浓度激素配比的培养基中进行催芽培养(表 3)。

2.5. 外植体继代培养

培养一个月以后, 可观察到沙柳外植体催生出小芽(图 2), 待小芽生长到一定高度时, 将新生长的小芽剪下, 接种在预先配制好的分化培养基进行继代培养扩大繁殖(表 4), 在不同激素的配比下筛选获取大量生长的带茎的小植株, 并对小植株进行成苗培养, 以期达到一定量扩繁的小植株。同时, 根据茎上芽的分化情况, 定期更换调整培养, 适时剪取新生无菌芽, 并接种继代培养, 以期尽快最大限度获取健康增殖繁殖的苗生长。

2.6. 生根诱导培养

扩大繁殖得到的大量无菌芽生长(或苗生长), 一部分继续继代繁殖, 另一部分则转移到壮苗培养后用于后期生根培养。在继代培养基中生长的扩大繁殖的器官形成的小植株进行生根培养(表 5)。

3. 结果与分析

3.1. 无菌外植体获取

接种大约一周后, 外植体的茎段侧芽开始萌动, 四周左右长成 1.5 cm 左右的嫩梢。不同时期所采集的外植体催芽萌发生长情况差距较大, 春季所萌发的嫩枝作为外植体, 可以快速大量的获得无菌材料(图 2)。

由表 1 可见, 主要是次氯酸钠消毒时间对外植体处理效果的影响, 外植体采集时间不同, 其消毒外植体时进行初期培养时的污染率有显著差异, 即一年生春季嫩枝, 茎段长度约 2.5 cm 左右, 茎上枝条外表皮的颜色呈现偏黄绿色最好, 其消毒时间短, 接种污染率低, 且对其后期生长影响较小。若外植体直径过粗或皮色呈红褐色带蜡质的茎段则消毒效果最差, 消毒时间过长易致使外植体本身被污染, 影响芽的生长速度与催芽率。同时, 春季(4 月中旬, 污染率约 20%)和秋季(9 月下旬, 污染率约 35%)所采集外植体比夏季(7 月中旬, 污染率达 50% 以上)接种污染率要低许多。



Figure 2. Adventitious bud growth
图 2. 不定芽生长

Table 3. Effects of different kinds of culture medium on germination

表 3. 不同培养基对外植体催芽效果的影响

培养基类型	催芽率(%)	增殖倍数	生长情况
空白 MS	57	2.85	叶色绿, 生长较快叶偏黄、弯曲, 生长快, 芽簇多
空白 WPM	35	1.75	芽和叶发黄, 生长慢
MS + 激素①	77	3.6	叶色绿, 生长较快

注: 表中①将外植体接种在 MS 培养基, 附加成分为 0.5 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA 的激素, 蔗糖 30 g/L, 琼脂 7 g/L。空白 MS 培养基(不含附加成分), 空白 WPM (不含附加成分)。催芽数(%) = 出芽数/接种外植体的芽数 × 100%。

Table 4. Effects of different hormone concentrations on secondary culture

表 4. 不同浓度激素对比对继代培养的影响

培养基种类	6-BA + KT (mg/L)	6-BA + KT (mg/L)	6-BA + KT (mg/L)	6-BA + KT (mg/L)
NAA 0.05	0.2 + 0.2	0.5 + 0.0	1.0 + 0.0	1.5 + 0.0
NAA 0.1	0.2 + 0.2	0.5 + 0.0	1.0 + 0.0	1.5 + 0.0
NAA 0.2	0.2 + 0.2	0.5 + 0.0	1.0 + 0.0	1.5 + 0.0

Table 5. Effects of different kinds of secondary culture on propagation efficiency

表 5. 不同继代培养对扩繁效果的影响

继代培养方案	新芽生长状况	无根苗增殖倍数	芽分化速度
单一培养基 A	叶易泡状畸形, 发红褐色, 后期生长缓慢	3.0	初期较快, 后期停滞
单一培养基 B	生长缓慢, 芽叶小	1.5	缓慢而少
培养基 A 和 B 交替使用(隔 10 d)	生长较快, 叶色正常	5.5	持续较快分化成芽数量多

污染率(%) = 污染总数/接种总数 × 100%; 未出芽率(%) = 未出芽总数/接种总数 × 100%

同时,外植体经过适当的低温外理可提高消毒灭菌效果(表 2)。常温 12 h, 污染率 25%, 出芽率 75%。外植体洗净放于 4℃~5℃恒温低温冷藏 1 周后, 再进行消毒, 污染率 10%, 出芽率 90%, 可见外植体低温冷藏有利于可以降低污染率, 且不影响催芽的效果, 催芽数量多, 更有利于进行培养。

出芽率(%) = 出芽总数/接种总数 × 100%

3.2. 外植体催芽

在 3 种培养基上外植体的腋芽均可萌发, 但效果迥异(表 3)。接种在 MS 培养基上的每个外植体均在腋芽处可催芽 1~2 个芽并生长, 叶色绿, 生长较快, 出芽率与增殖倍数分别为 57% 和 2.85, 但叶色绿, 生长较快叶偏黄、弯曲, 生长快, 芽簇多; 接种在 WPM 培养基上外植体的腋芽萌发和生长缓慢, 出芽率与增殖倍数分别为 35% 和 1.75, 芽和叶颜色成淡黄色。在加 MS + 激素①的培养基中, 催芽率和增殖倍数均为最大, 分别为 77% 和 3.6。因此, 可以选用 MS + 激素①的培养基进行催芽适合芽生长(图 2)。

3.3. 继代培养与器官发生

将外植体催化的芽剪下接种在不同浓度激素配比的培养基中进行分化培养, 不同种类、不同浓度激素对外植体催化产生的芽, 通过继代培养最终分化生长和增殖系数的影响较大(表 4)。在 NAA 与 6-BA、KT 的组合中, 在 NAA 浓度相同的情况下, 当 6-BA 在 1.0 mg/L 以上时, 植株生长缓慢, 分化芽生长数明显减少; 当 6-BA 与 NAA 浓度配比分别为 1.0 mg/L 和 0.1 mg/L, 和 0.5 与 0.05 时, 苗分化系数增殖较大, 增殖倍数大约达 6.5 倍(图 3 和图 4)。可见 6-BA 的浓度和生长素的种类及浓度对沙柳试管苗的生长影响较大, 但高激素浓度下当 6-BA 浓度在 1.0 mg/L 以上时, 沙柳无菌芽(或苗)生长虽然变化快而明显, 但生长不够自然健康, 基部有愈伤组织生长过多, 分化器官系数在下降。同时发现, 继代增殖培养中若长期使用一种配方的培养基, 沙柳无菌苗分化生长不够自然, 叶色异常, 容易出现褐化、出现愈伤组织生长, 而且愈伤组织形态畸形, 有的生长停滞甚至坏死。在培养基中加入少量的 KT, 在部分培养基中可以促进无菌芽生长, 使叶色更形成正常绿色, 说明沙柳在 NAA 与 KT 配比不适其分化生长。



Figure 3. Organogenesis in single culture medium
图 3. 单一培养基生长的器官形成



Figure 4. Organ differentiation and reproduction
图 4. 器官分化繁殖

同时在继代培养时，从表 5 中得出，所采用的培养基 A: MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L 和培养基 B: MS + 6-BA 0.2 mg PL + KT 0.2 mg PL + NAA 0.1 mg/L 培养，两种 6-BA 与 NAA 不同配比的培养基交替使用效果较好，即 A 和 B 每隔 10d 左右交替使用，能使沙柳无菌苗生长健壮，叶色较绿，叶面舒展，很少畸形，还能保持较高的繁殖系数。说明沙柳在混合激素配比中更有利于器官发生并形成小植株生长。本研究与王善娥[12]等选用高/低和低/高浓度的生长素与细胞分裂素配比，对一年生柳树多次继代，仍然保持较高的分化率、苗生长健壮的研究结果基本吻合。这可能是柳树所具有的特征。继代 3~4 周后培养形成器官发生并可以分化进行高生长，将分化出的幼芽从基部切下，在培养过程中芽接种在新配制单一培养基 A 上，新芽生长为叶易泡状畸形，发红褐色，后期生长缓慢，此时无根苗增殖倍数是 3.0，芽分化速度为继代初期较快，继代后期停。当再将分化芽接种在新配培养基 B 上，新芽生长状况生长缓慢，芽叶小，无根苗增殖倍数 1.5，芽分化速度缓慢而少。试验中采用 A 和 B 混合培养基进行壮苗培养，经 1 个月左右培养生长，苗生长成带有 4~5 个叶健壮的无根小苗。将小苗进行切割成带有叶的茎，再次分别接种 A 和 B 混合的分化培养基中，如此反复循环即可获得大批的无根苗的小植株，这些小植株均是由器官发生生长形成大量植株。这时将这些无根苗分别插入生根培养基中就进行准备生根繁殖。

3.4. 生根的培养

3.4.1. 生根植株的选择

选择用于生根的苗进行继代生根培养，生根培养对苗的质量对生根有很大的影响。用作生根的苗的

小植株壮苗培养时间不宜太长。一般选择高度在 1.5 cm 以上的健壮器官发生形成的小植株，叶色深绿的小植株进行生根培养(图 5)。

3.4.2. 生根培养再生体系的建立

将生根培养的小植株壮苗生长至 2~3 cm 的器官发生生长的苗从基部剪下，去掉下部叶片，接种到生根培养基上。培养 20 d 后，统计结果，以确定适合诱导生根的基本培养基(表 6)。根据实验发现，在 MS 培养基包括 1/2MS，空白培养基，除了用于小植株分化及扩繁的培养基下，沙柳经过 20 d 的培养小植株基部生长出主根，生长一段时间生长成多的须根，此时沙柳生长成完整的再生植株。实验表明，继代生根培养基中，苗在不同浓度激素配比如 0.3 mg/L IBA 浓度下的 1/2 MS 培养基根生长良好，因此确定主要培养基为在 0.3 mg/L IBA 浓度下的 1/2 MS 培养基里，沙柳无菌苗生根效果相对较好，生根生长快且生根较粗壮，须根多。进而完成再生体系的建立。

实验中我们将器官发生形成的小植株接种在 1/2MS 培养基中(表 7)得出影响生根培养还有其它因素。本试验沙柳器官发生形成的生长并生长成完整小植株主要培养基比较，在 MS 培养基和 1/2 MS 培养基下均可以生根，但在 1/2 MS 培养基须根生长时间明显的早于 MS 培养基，且 1/2 MS 培养基生根率略高；同时 1/2MS 培养基形成的根系发达，均匀，侧根多。因此，沙柳生根培养选用 1/2MS + 0.3 mg/L IBA 培养基生根培养最佳。同时培养条件在每天用 12 h 的光照与黑暗交替；光照强度可以降低 20,000 $\mu\text{mol}/\text{s}\cdot\text{m}^2$ 以下有利于生根生长，经 1 个月左右培养，即可长成带有 6~7 个叶片健壮完整植株，从而建立沙柳再生植株体系，完成沙柳再生植株的形成培养(图 6)。另外还发现在以 1/2MS + 0.15 mg/L NAA 为生根培养基时，生根效果接近 1/2MS + 0.3 mg/L IBA，生根率可达 90% 以上，可以作为后期继续工厂化育苗的探索



Figure 5. Rooting culture
图 5. 生根培养

Table 6. The effect of different concentrations of IBA on primary roots

表 6. 不同浓度的 IBA 对无菌芽生根的影响

IBA 浓度(mg/L)	接种小苗数	生根数(20d)	生根率(%)	生根状况
0	40	12	30	生根非常缓慢
0.3	40	38	95	生根较快，须根较多
0.6	40	28	70	根粗壮均匀，须根多
1.0	40	24	60	根细长，须根数量少；起瘤

注：生根率(%) = 生根苗数/所接种苗数 × 100%。



Figure 6. Regeneration plant
图 6. 再生植株

Table 7. The comprehensive effects of hormone concentration and culture medium on the rooting rate
表 7. 激素浓度与培养基对生根率的综合影响

IBA 浓度对生根率的影响(mg/L)	0	0.3	0.6	1.0	生根情况	
					生根速度	根须状态
1/2MS 培养基	30	95	70	60	快, 约 12 天	根系发达、分布均匀
MS 培养基	26	90	50	-	慢, 约 20 天	根系纤细、须根较少

比较的依据。这与蔡国军等组培旱生植物三倍体白毛杨[13]所用生根培养基及效果接近。而在 1/2MS + 0.3 mg/L IBA + 0.05 mg/L NAA 培养基培养时, 生根时间更接近, 根须更加整齐一致。

3.4.3. 再生植株移栽

当生根苗生长达到 5~6 cm 左右时, 将已经生根的健壮完整植株在温室内打开瓶口, 炼苗培养 3~4 d 后使其染菌, 逐渐降低湿度, 并间歇增强光照, 洗净根部琼脂, 将其移栽到通气无菌的基质中进行继续炼苗培养的口杯中。本试验选取经高温灭菌后的细沙土作为基质, 保存适宜的水分, 间歇日光照处理, 适当提高温度(27°C ± 2°C)。经过驯化培养 15~20 d 后栽入温室苗床上, 成活率可达 70%~80%。沙柳在定植后不需要特殊管理, 栽培极易成活, 对土质要求不严, 疏松的沙壤土、碱性土、中性土均可, 移栽后适当加以浇水、追肥。

4. 小结与讨论

4.1. 供试材料采集与处理对外植体消毒效果的影响

沙柳茎段组织培养最好剪取一年生春季嫩枝, 长度应大约 2.5 cm 左右, 茎枝皮色一般偏黄绿色或嫩红色, 角质蜡质较少的, 表皮破损少的。新采集回来的枝条洗净, 放在 4°C~5°C 冰箱中低温处理 1 周后再进行消毒, 可以降低污染率, 并且不影响催芽的生长。最佳消毒时间为 70%酒精 30~40 s, 8%次氯酸钠 8~12 min, 这是外植体消毒处理时最基础而重要的环节, 需要细心尝试。培养过程使用适宜的植物激素可高效地诱导沙柳外植体催芽生长成功。但浓度比激素浓度比不能过高并会影响催芽成功芽生长的质量及遗传性状的稳定。根据培养情况和需求及时调整培养基对整个培养过程很重要。消毒完毕后, 要剪去切口处再接入 MS 培养基, 以免影响外植体的催芽萌发和生长。根据需要可加适量激素(如 0.5 mg/L 6-BA + 0.1mg/L NAA)。

4.2. 继代培养对沙柳器官发生与形成植株的影响

本试验选用高/低和低/高浓度的生长素与细胞分裂素配比, 交替使用比使用单一配比培养基效果更好, 即 MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA (或 MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.05 mg/L NAA 和 MS + 0.2 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA + 0.1 mg/L 交替使用, 能使沙柳保持较高的繁殖系数, 又可促使小植株芽的分化生长, 小芽伸展为深绿色, 形成沙柳的器官发生形成大量的小植株生长。总之, 在一定培养基范围内, 培养在适宜不同激素配比中的培养基下生长更自然, 生长更快, 植株高生长质量更好, 从而建立稳定的再生体系。在培养过程中还发现沙柳芽的继代培养繁殖形成器官发生时, 也可以直接取当年生长的幼嫩芽尖中的组织进行离体培养并诱导成芽, 培养基为 MS + 0.1 mg/L NAA + 1.0 mg/L 6-BA 与 MS + 0.05 mg/L NAA + 0.5 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L 交替培养成功率高。试验中若用 2, 4-D 代替 NAA 的两种培养基交替培养, 则产生不生长成芽生长的劣质愈伤组织(图 7), 不利器官发生形成小植株生长, 并且芽生长分化很弱, 并不能产生很好完整植株的繁殖(图 8)。但由于离体茎尖培养周期较长且效率较低, 因此在本试验沙柳组织培养以当年生长的幼芽扩繁为主, 并且培养基是 MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA (或 MS + 0.5 mg/L 6-BA + 0.05 mg/L NAA)下培养, 沙柳器官发生生长繁殖再生植株数量多。



Figure 7. Callus
图 7. 愈伤组织



Figure 8. Weak bud differentiation
图 8. 分化弱芽

4.3. 生根培养影响

根据试验发现,在MS培养基(包括1/2MS,空白培养基,除了用于芽分化及扩繁的培养基)下,沙柳无根苗生长均有可能生根。但不同培养基配方下,沙柳小苗植株的生根状况如生根速度、根须健壮度等差异较大。在生根诱导上选用高生长苗的高度5~6 cm,接种于0.3 mg/L IBA + 0.05 mg/L NAA的1/2MS培养基上,可使生根率达75%以上,并且形成的根系发达、生根均匀和生根比较整齐一致,移栽成活率可达近80%~90%以上。而IBA和NAA组合搭配更适合沙柳生根的实验结果,此结果与Sants. B [14]的相关组织培养生根实验结论相似。根据试验表明,很多培养基下沙柳苗生长均可能生根。但不同培养基配方下,沙柳苗的生根状况、生根速度、生根率、须根健壮度等差异较大。本试验通过一系列探索试验,找到了更适合更高效的沙柳生根培养条件和培养基。

综上所述,植物组织培养及工厂化育苗技术,是研究和筛选木本植物优质苗木和新品种选育,可以利用基因工程育种等是林业面向21世纪的新型产业关键基础技术。沙柳组织培养快繁是提高其苗木繁殖速度和质量的重要途径之一[15]。本试验研究结果表明,在组织培养下,沙柳培养先由外植体消毒灭菌催芽,然后由催芽的芽继代分化培养分化产生器官发生形成无根苗,再由器官发生形成无根苗高生长进行生根培养产生完整植株过程,并建立再生体系。经过反复不继培养从而建立沙柳稳定的再生体系。与此同时,在培养过程中,繁殖体的增殖与生根可同步进行。本试验的方法操作简便,繁殖的再生植株生长健壮,生根正常,移栽成活率高,年增殖倍数可高达数十倍,该方法可为今后培养沙柳旱生植物以得到稳定的工厂化育苗提供了一项切实可行的组织培养技术。

基金项目

内蒙古自治区科技计划项目(201602083)。

参考文献 (References)

- [1] 米志英,张宏俊,高永.沙柳有性繁殖与关键环境因素的关系研究[J].中国沙漠,2011,31(5):38-41.
- [2] 内蒙古植物志编委会.内蒙古植物志[M].呼和浩特:内蒙古人民出版社,1991.
- [3] 何志.沙柳种质特性与何质技术的研究[D]:[硕士学位论文].呼和浩特:内蒙古农业大学,2009.
- [4] 徐丽.库布齐沙漠沙柳扦插技术研究[D]:[硕士学位论文].呼和浩特:内蒙古农业大学,2013.
- [5] 江泽平,孟平,李慧卿.李清河沙区木植物繁殖技术[M].北京:科学出版社,2015.
- [6] 何丽君,慈忠玲,李建军.沙柳茎叶结构的比较解剖学观察[J].内蒙古农业大学学报,2000,21(4):128-132.
- [7] 刘海燕,李吉跃,李吉跃,赵燕,黄看看.干旱胁迫5个种源沙柳(*Salix psammophila*)气体交换及水分利用效率的影响[J].干旱区研究,2007(6):6-15.
- [8] 安保,白永祥,田志.沙柳生物学特性与造林技术研究[J].内蒙古林业科技,2003(1):24-26.
- [9] 敖敦,杨海峰,王雷,马月林.沙柳组培技术的初探[J].福建林业科,2016,43(1):80-83.
- [10] 杜喜梅,燕丽萍,王天明,夏阳,张俊莲.沙柳组织培养快繁技术研究[J].山东林业科技,2006(6):2-7.
- [11] 杨海峰,张国盛,明海军.沙柳组织培养的初步研究[J].内蒙古林业科技,2014,41(1):12-16.
- [12] 王善娥.观赏柳树再生体系的建立及遗传转化的研究[D]:[硕士学位论文].济南:山东师范大学,2007.
- [13] 蔡国军,朱红斌,陈晓妮,魏晓兰,刘鸿源.三倍体毛白杨组培快繁和工厂化育苗技术研究[J].2003,23(12):2188-2191.
- [14] Bhojwani, S. (1980) Micropagation Method for a hybrid willow (*Salix matsudana alba* NZ-1002). *New Zealand Journal of Botany*, **18**, 209-221.
- [15] 陈耀峰.植物组织与细胞培养[M].北京:中国农业出版社,2007.