

# 榔榆组织培养再生体系构建及其 移栽苗耐盐耐镉性试验

周 洁<sup>1</sup>,郭佳惠<sup>2</sup>

(1. 江苏省林业科学研究院,江苏 南京 211153; 2. 南京林业大学,江苏 南京 210037)

**摘要:**以榔榆优良无性系的嫩茎段为外植体,研究了榔榆的外植体灭菌方法以及试管苗的诱导、增殖、伸长、生根的培养基配方,构建了榔榆的组织培养再生体系,同时对移栽苗的耐盐性和耐镉性进行试验。结果表明,榔榆的最适增殖培养基为 MS+0.50 mg/L 6-BA + 0.10 mg/L NAA+0.01 mg/L TDZ,最适生根培养基为 WPM+0.50 mg/L NAA。榔榆移栽苗在 100 mM NaCl 溶液和 20 mg/kg 的 CdCl<sub>2</sub> 溶液处理下,能继续生长,叶片中 SOD 和 CAT 活性增加,说明榔榆在盐胁迫下能够清除过多的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,提高抗性;在重金属 Cd 处理条件下,抗氧化系统通过提高 CAT 活性,降解 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,提高抗性。

**关键词:**榔榆;组织培养;耐盐;耐镉;重金属;胁迫

**中图分类号:**Q943.1;Q945.78;S792.19

**文献标志码:**A

**doi:**10.3969/j.issn.1001-7380.2021.04.006

榔榆(*Ulmus parvifolia* Jacq.)为榆科(Ulmaceae)榆属的落叶乔木,别名蚊榔树、脱皮榆、小叶榆等,是珍贵硬阔用材树种,其树高达 25 m,胸径可达 1.2 m<sup>[1-2]</sup>。榔榆适应性较强,喜光,喜温暖湿润气候,耐干旱瘠薄,对土壤的酸碱度要求较低,在不同土质下均能正常生长<sup>[3-5]</sup>,以气候温暖,土壤肥沃、排水良好的中性土壤为最适宜的生境。

榔榆为适合江苏发展的乡土优质珍贵用材树种和我国杂木类盆景中岭南派盆景的重要树种之一<sup>[6]</sup>。作为榆科中抗榆树荷兰病重要的种质资源,其也是矿区的重要绿化树种<sup>[7]</sup>和盐碱地生态修复树种。目前榔榆的繁殖方法主要为扦插、播种、嫁接,育苗周期长,不利于新品种的快速推广和应用。建立榔榆组织培养快繁技术体系对于榔榆新品种的快速推广具有重要的意义。

近年来,在榔榆的抗性方面开展了抗旱<sup>[8-9]</sup>、干湿交替<sup>[10]</sup>、耐热等研究。2005年,韦小丽在贵州喀斯特地貌区进行青檀、朴树、榔榆的水分胁迫试验,发现榔榆抗旱能力更强。吴晓宇<sup>[6]</sup>研究了榔榆的低温胁迫生理变化,发现榔榆是通过体内膜透性的改变以及渗透物质积累来抵抗低温造成的伤害。但在耐重金属和耐盐方面研究还较少。为此,本文

利用组培养技术对榔榆进行扩大繁殖,对其移栽苗进行了耐盐和耐重金属镉的抗性试验。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

选取生长健壮的榔榆优良无性系,采用未木质化或半木质化的1年生带芽茎段作为外植体,进行脱毒、诱导丛生苗,进而增殖培养,最后进行壮苗生根培养。本试验包括芽诱导培养基、增殖培养基和生根培养基。培养室温度为22—25℃,光照度2000—3000 lx,16 h/d光照培养。

### 1.2 外植体脱毒

从植株上剪取嫩梢及半木质化茎段,用自来水冲洗10 min,再用洗衣粉溶液漂洗5—10 min,放入70%酒精中浸泡30 s,然后用2%和5%的次氯酸钠溶液分别浸泡1—2,2—5,5—8,8—10 min,最后用无菌水冲洗5次。将冲洗后的芽置于无菌滤纸上,吸干表面水分,用剪刀剪去基部伤口部分,将茎段接种于已灭菌的初代培养基上。

### 1.3 试管苗的诱导、增殖和生根培养

切去茎段2端,将带芽茎段接种于添加了不同质量浓度植物生长调节剂的诱导培养基中。待茎

收稿日期:2021-06-02;修回日期:2021-06-27

基金项目:江苏省林业科技创新与推广项目“榔榆优良无性系规模化繁育技术研究示范”(LYKJ[2019]42)

作者简介:周 洁(1986—),女,江苏宜兴人,副研究员,博士。从事林木遗传育种研究。

段长出幼苗,将诱导得到的无菌苗进行继代、增殖和生根培养。培养基中含有不同质量浓度的 6-BA (0.05, 0.20, 0.50, 1.00 mg/L) 与 IBA (0.025, 0.005, 0.002 mg/L) 或 NAA (0.01, 0.05, 0.10, 0.50, 1.00 mg/L), TDZ (0.01, 0.02, 0.10 mg/L) 组合的 MS 和 WP 培养基中,所用诱导、增殖和生根培养基如表 1,根据出苗和出芽状态筛选培养基配方。蔗糖为 30 g/L,琼脂 8 g/L,pH5.8。

表 1 参试培养基生长调节剂配方

编号	6-BA/ (mg/L)	NAA/ (mg/L)	IBA/ (mg/L)	TDZ/ (mg/L)	KT/ (mg/L)	GA/ (mg/L)	基本 培养基
S1	0.05		0.005				MS
S2	1.00		0.002				MS
S3	0.05		0.025				MS
S4	0.50	0.05		0.02			MS
S5	0.20	0.01		0.02			MS
S6	0.20	0.10		0.02			MS
S7	1.00	0.05					MS
S8	0	0.05					MS
S9	0.10			0.01			MS
1	0.50	0.10		0.10			MS
2	0.50	0.10		0.10			MS
3	0.50	0.10		0.10			MS
4	0.50	0.10		0.10			MS
5	0.50	0.10		0.01			MS
R1		0.50					MS
R2		1.00					MS
R3		0.50					WPM
R4		1.00					WPM

1.4 炼苗及移栽

用于抗性试验的组织培养幼苗移栽在光照培养室内进行,温度保持在 22—25 ℃,光照强度为 20 000 lx,光照周期为 16 h/8 h。选用 1 L 的塑料罐,装入泥炭土,将带根的整株组织培养苗移栽到塑料罐中,用喷壶喷施罐子四周有水珠但不滴水,用保鲜膜进行封口,7 d 后将保鲜膜周边和中间扎洞,待植株新长出 2—3 片新的嫩叶后揭开一半保鲜膜,14—21 d 后完全揭开,2—3 d 用喷壶喷水保湿,防止强光照导致嫩叶失水。炼苗 28 d 后,将组织培养苗移栽至温室大棚,进行容器育苗。容器选用直径为 12 cm 的黑色塑料袋,基质配方为泥炭:蛭石:珍珠岩=7:2:1(容积比),每 7 d 浇水 1 次,浇水溶肥 1 次,水溶肥为 1 000 倍的花多多 1 号。

1.5 移栽苗抗性试验

将移栽到育苗袋中的组织培养苗进行盐胁迫和镉胁迫试验,盐胁迫采用 100 mM 的 NaCl 溶液,镉胁迫采用 20 mg/kg 的 CdCl<sub>2</sub>溶液(pH 5.5),试验处理苗各 15 株,3 组重复,胁迫处理 21 d,取叶样各 0.5 g,放 4 ℃冰箱备用,测取各生理指标。

1.6 生理指标的测定

取出叶片,按照组织质量(g):提取液体积(mL)为 1:(5—10)的比例(本试验称取组织约 0.1 g,加入提取液 1 mL),进行冰浴匀浆。4 ℃下以 8 000 g 离心 10 min,取上清液,置冰上待测。各指标采用试剂盒法测定(苏州科铭生物技术有限公司):超氧化物歧化酶 SOD(货号 SOD-2-Y)、过氧化物酶 POD(货号 POD-2-Y)、过氧化氢酶 CAT(货号 CAT-2-Y)、丙二醛 MDA(货号 MDA-2-Y)。

2 结果与分析

2.1 外植体的灭菌试验

椰榆优良无性系茎段外植体用不同质量分数的次氯酸钠溶液进行灭菌处理,结果发现新萌出的绿色嫩梢在 2% NaClO 溶液中灭菌 2—5 min 效果最好,可以获得无菌茎段。NaClO 质量分数高,嫩梢会产生毒害,发黑死亡;处理时间超过 5 min 新梢茎段褐化,叶片发黑。半木质化的茎段在 5% 的 NaClO 溶液 5—8 min 效果较好,时间延长后容易产生毒害,茎段褐化,不利于萌出新芽(如图 1)。

2.2 外植体的诱导培养

剪取长约 3—5 cm 的无菌茎段接种到配制的培养基上诱导嫩芽(见图 2),可以看出 S2,S3,S7,S8,S9 均能诱导出嫩芽。S2 诱导的幼苗生长速度较快,20 d 能进行继代培养;S3 则长出较多愈伤组织,S7 的苗生长较慢,长势弱,没有显著的高生长;S8 诱导的苗较小;其余培养基均未诱导出健康的幼苗。认为椰榆较适诱导培养基为 S2:MS+1.00 mg/L 6-BA + 0.002 mg/L IBA,蔗糖 30 g/L,pH 5.8。

2.3 试管苗的增殖培养

将初代培养诱导的嫩苗剪成 3 cm 左右的茎段放置在表 1 的培养基上,以期诱导椰榆的丛生芽(见图 3)。由图 3 可以看出,在培养基 1 上生长,3 d 后侧芽开始萌动,7 d 左右生成幼苗;在培养基 2—5 中均能产生丛生芽。在培养基 3,4 中产生较多愈伤组织,芽浅

绿,愈伤组织发黄成块,容易褐化,在培养基 5 上增殖系数较高,能长出芽 8—10 个,芽绿色健壮,认为 5 号为适宜增殖培养基,配方为 MS+0.50 mg/L 6-BA + 0.10 mg/L NAA +0.01 mg/L TDZ。

2.4 试管苗的芽伸长培养

诱导丛芽后,芽经过高生长长成植株(见图 4)。从图 4 中可以看出,S1,S4 和 5 号可以诱导芽的生长,S5,S6 芽粗壮,但是高没有生长。S1,S4 为嫩苗生长,5 号为在增殖培养基上继续生长,可以省去换培养基的步骤,但是容易木质化,幼嫩的芽容易褐化。所以可以选择 S4 作为生长培养基,配方为 S4: MS+ 0.50 mg/L 6-BA + 0.05 mg/L NAA + 0.02 mg/L TDZ。

2.5 试管苗的生根培养

在瓶内生根形成完整植株,可以提高移栽成活率。在生根培养基表 1 的配方中,R1,R2 培养基生

长的根较细,R3 的生根速度最快,7—10 d 就能生根,根较为健壮,且根系发达,R4 生根粗壮,但是根部愈伤组织容易褐化,影响植株的生长(见图 5)。所以 R3: WPM + 0.50 mg/L NAA 为最适生根培养基。

2.6 移栽苗的盐胁迫和镉胁迫试验

在盐胁迫下,榔榆移栽苗的 SOD 活性升高,达 938.21 U/g;CAT 的活性有所降低,为 112.59 nmol/(min·g);POD 活性降低最多,由未处理的 5 548.58 U/g,降至为 1 859.23 U/g;MDA 含量升高,为 80.50 nmol/g(见图 6)。在酸性的重金属 Cd 胁迫 21 d,榔榆移栽苗 SOD 活性降至 650.93 U/g;CAT 的活性升高至 182.44 nmol/(min·g);POD 活性降低最多,由未处理的 5 548.58 U/g 降至 1 550.63 U/g;而 MDA 含量升高,为 86.29 nmol/g(见图 6)。



图 1 不同质量分数的 NaClO 溶液对茎段灭菌试验

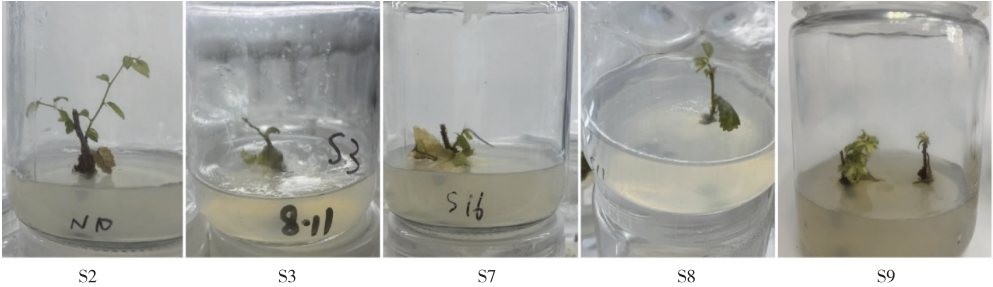


图 2 诱导培养基筛选

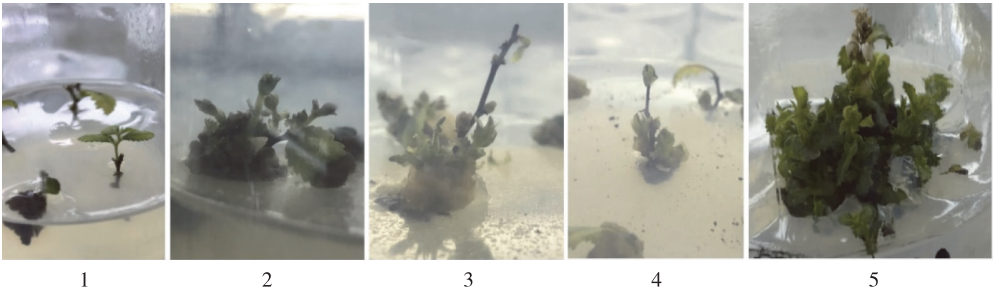


图 3 丛芽增殖培养



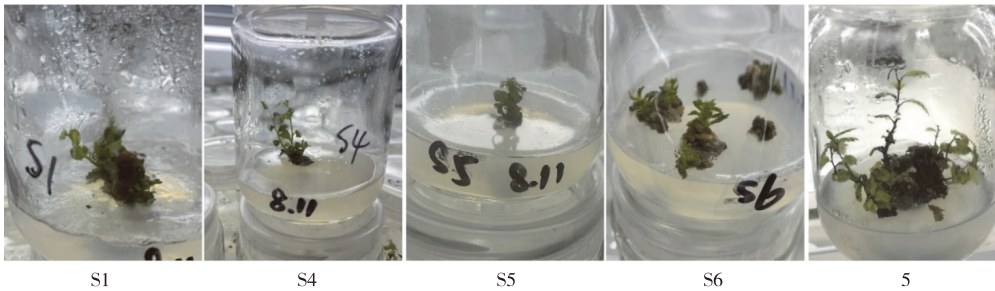


图 4 芽伸长培养

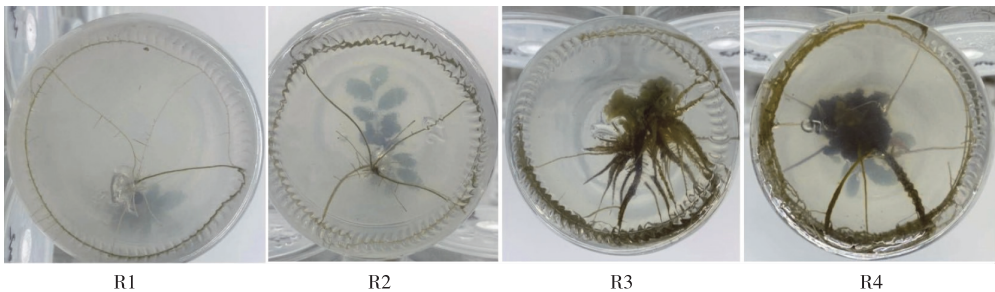


图 5 生根培养

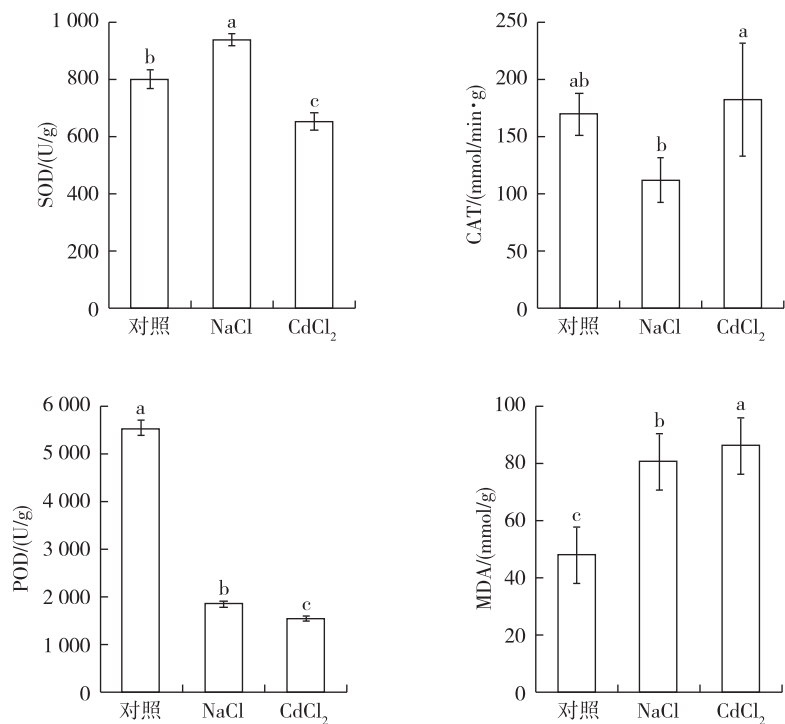


图 6 榔榆耐盐和耐镉胁迫的生理变化

3 讨论与结论

榆属常见树种组织培养工作在国内外已经取得了一些成果。Dorion, Bolyard, Fenning 等<sup>[11-13]</sup>利

用美国榆嫩枝的形成层组织作为外植体, 获得了愈伤组织, 但是没有分化。Thakur 等人获得愈伤组织并进行 2 次继代培养, 使其分化出丛生芽得到了植株<sup>[14]</sup>。国内相继建立了白榆<sup>[15]</sup>、黄榆<sup>[16]</sup>、家榆<sup>[17]</sup>、

金叶榆<sup>[18]</sup>等组织培养体系,但是榔榆的组织培养还未见研究。本研究获得了榔榆的诱导、增殖、伸长和生根的培养基配方,建立了榔榆的工厂化育苗快繁体系。

当植物在遭受高盐和重金属胁迫时,最直接的反应就是质膜的结构发生变化,MDA 是反映细胞膜过氧化程度的重要指标之一。随着胁迫时间延长,细胞内产生大量的活性氧(ROS),过量的活性氧会使植物产生伤害。SOD、POD 和 CAT 共同组成了植物体内的酶保护系统,清除植物体内的活性氧,对维持植物体内的膜系统平衡起着重要的作用,酶活性的高低与植物的抗逆性关系密切<sup>[19]</sup>。SOD 主要通过歧化过氧化物自由基  $O_2^-$  转化为  $H_2O_2$ ,并传递给下游酶;POD 与 SOD 联合清除产生过多的  $H_2O_2$ ;CAT 是 SOD 的下游保护酶,能够进一步催化  $H_2O_2$  转化为  $H_2O$ <sup>[20]</sup>。榔榆在酸性镉胁迫处理下,SOD 和 POD 活性降低,CAT 活性升高,MDA 含量增加,而在盐胁迫时,POD 和 CAT 活性降低,SOD 活性升高,MDA 含量增加,说明在不同的胁迫条件下,榔榆的抗性响应机制有差异。在高盐胁迫时,SOD 活性升高,说明榔榆主要通过歧化过氧根离子生产  $H_2O_2$  提高耐盐性。在高酸性 Cd 污染的环境下,CAT 活性升高,说明重金属 Cd 也参与了榔榆的抗氧化代谢途径,过多的 Cd 离子使 CAT 酶活性升高,从而分解  $H_2O_2$  产生为  $H_2O$  和  $O_2$  来缓解重金属离子的毒害。

本研究成功建立了珍贵彩色乡土树种榔榆优良无性系的组织培养再生体系,探究了移栽苗对盐胁迫和重金属镉胁迫的应答反应,说明榔榆组织培养移栽苗对于高盐和重金属镉土壤具有一定的适应性,为榔榆种苗繁育和推广应用提供了技术参考,对生态环境绿化和修复具有一定意义。

#### 参考文献:

- [1] 臧德奎,徐晖春.中国景观植物应用大全(木本卷)[M].北京:中国林业出版社,2015.
- [2] 程雪梅,林富平,刘济祥,等.榔榆播种育苗技术[J].现代园艺,2014(3):39-40.
- [3] 续九如,宋 婉,邹受益,等.榆属树种遗传改良研究现状及思考[J].北京林业大学学报,2000,22(6):95-99.
- [4] 涂忠虞,黄敏仁.主要速生丰产树种良种选育文集:阔叶树遗传改良[M].北京:科学技术文献出版社,1991:271-275.
- [5] 汤庚国.风景园林树木学[M].重庆:重庆大学出版社,2019.
- [6] 邢升清,徐海东.榔榆盆景的制作与养护[J].花木盆景(盆景赏石),2019(9):48-51.
- [7] 张 畅,姜卫兵,韩 健.论榆树及其在园林绿化中的应用[J].中国农学通报,2010,26(10):202-206.
- [8] 韦小丽,徐锡增,朱守谦.水分胁迫下榆科 3 种幼苗生理生化指标的变化[J].南京林业大学学报(自然科学版),2005,29(2):47-50.
- [9] 韦小丽,朱守谦,徐锡增.4 个榆科树种水分参数随季节和年龄的变化规律[J].山地农业生物学报,2005,24(1):17-21,47.
- [10] 吴晓宇.不同温度处理对榔榆种子萌发及幼苗生理生化指标的影响[D].泰安:山东农业大学,2018.
- [11] DORION N, GODIN B, BIGOT C. Physiological state and clonal variability effects on low temperature storage of in vitro shoot cultures of elms (*Ulmus* sp.) [J]. Scientia Horticulturae, 1993, 56(1): 51-59.
- [12] BOLDYARD M G, STICKLEN M B. Expression in *E. coli* of a modified Dutch elm disease toxin[J]. Molecular plant-Microbe Interactions, 1992, 5(6): 520-524.
- [13] FENNING T M, GARTLAND K M A, BRASIER C M. Micropropagation and regeneration of English elm, *Ulmus procera* Salisbury [J]. Journal of Experimental Botany, 1993, 44(264): 1211-1217.
- [14] THAKUR R C, KARNOSKY D F. Micropropagation and germplasm conservation of Central Park Splendor Chinese elm (*Ulmus parvifolia* Jacq.) trees [J]. Plant Cell Reports, 2007, 26: 1171-1177.
- [15] 张瑞姿.白榆组培快繁体系的建立[J].山西林业科技, 2020(2):34-36.
- [16] 吕伟伟,孙 勇,王永勘,等.黄榆组织培养再生体系建立[J].吉林林业科技, 2016, 45(6):14-18.
- [17] 李 雯.家榆组织培养离体再生体系建立的初步研究[D].哈尔滨:东北林业大学,2013.
- [18] 李 静,高思禹,张福利,等.金叶榆组培快繁技术体系的建立[J].北方农业学报, 2017, 45(6): 107-111.
- [19] 张翠梅.不同抗旱性紫花苜蓿响应干旱的生理及分子机制研究[D].兰州:甘肃农业大学,2019.
- [20] 张 贺.交替氧化酶(AOX)参与调控采后甘薯抗冷性及酚类代谢研究[D].杭州:浙江农林大学,2021.