

良种沙棘“实优1号”组织培养研究

周松坤¹, 宋西德^{1*}, 张宗勤¹, 翟巧绒², 张永¹, 周锋利¹

(1. 西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨陵 712100; 2. 陕西省林业勘察设计院, 陕西 西安 710082)

摘要:以良种沙棘“实优1号”的水培茎尖和叶片为外植体进行了不定芽及愈伤组织诱导试验。结果表明,水培茎尖在 $1/2\text{ MS} + 6\text{-BA } 1.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{IAA } 0.5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 上可诱导出大量愈伤组织及不定芽,继代转接可获得丛生芽。幼苗茎段在 $1/2\text{ MS} + 6\text{-BA } 2.5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{IAA } 0.2\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 上可诱导腋芽增殖,但倍数较低;水培叶在 $1/2\text{ MS} + 6\text{-BA } 0.5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{KT } 0.2\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.02\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 上诱导效果好,不定芽多,分化速度快,30 d 平均分化不定芽 9.1 个,分化率达 94.1%。继代苗在 $1/2\text{ B}_5 + 6\text{-BA } 0.3\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{IBA } 0.4\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 上有较高的生根率,达到 87.5%。

关键词: 沙棘; 水培; 组织培养; 不定芽

中图分类号: S793.6; S722.37

文献标识码: A

文章编号: 1001-7461(2006)03-0067-05

A Study on Tissue Culture of Fine Variety “Shiyou 1” of *Hippophae rhamnoides*ZHOU Song-kun¹, SONG Xi-de¹, ZHANG Zong-qin¹, ZHAI Qiao-rong²,
ZHANG Yong¹, ZHOU Feng-li¹

(1. College of Forestry, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2. Forestry Institute of Surveying and Design of Shaanxi Province, Xi'an, Shaanxi 710082, China)

Abstract: The hydroponics stem apexes and leaves of “Shiyou 1” (*Hippophae rhamnoides*) were used as explants to induce adventitious buds and callus. The results showed that adventitious buds and callus could be obtained from stem apexes on $1/2\text{ MS} + 6\text{-BA } 1.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{IAA } 0.5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, and cluster shoots were got by subculture. Axillary buds could be induced on $1/2\text{ MS} + 6\text{-BA } 2.5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{IAA } 0.2\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ from juvenile stems, but the propagation rate was low. On $1/2\text{ MS} + 6\text{-BA } 0.5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{KT } 0.2\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.02\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, an average of 9.1 adventitious buds per explant were induced effectively and easily from hydroponics leaves after thirty days, the differentiation rate was up to 94.1%. On $1/2\text{ B}_5 + 6\text{-BA } 0.3\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{IBA } 0.4\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, roots were induced with a high inducing rate of 87.5% on the subcultured plantlets.

Key words: *Hippophae rhamnoides*; hydroponics; tissue culture; adventitious bud

沙棘(*Hippophae rhamnoides*)为胡颓子科沙棘属植物,雌雄异株,广泛分布于欧亚大陆的温带和寒温带,因其具有很强的抵御风沙、耐旱涝、盐碱等能力,是我国北方生态环境脆弱区绿化造林的优良树种;同时沙棘叶、果等部位含有医疗保健价值高的沙棘油、总黄酮等成分,果实可用于生产各种饮品,其深度开发利用潜力巨大^[1]。繁育沙棘的途径很多,常规方法都可以采用,但各有不足,如实生苗虽然

生长快、适应性强,但分化严重,雄株比例大,栽后不易丰产;扦插繁殖苗的成活率与生长量不能兼顾,且有年龄效应和受材料数量限制^[1];根蘖繁殖效率更低。组织培养作为快速育苗的有效途径,可以避免实际生产中的不少问题,在沙棘育苗试验中已有报道^[2~10],但截至目前,沙棘通过组织培养进行工厂化生产的体系尚未建立起来,快繁技术仍停留在试验水平^[2]。作者用实生选育的生长速度快、性状优良

收稿日期:2005-09-06 修回日期:2005-11-03

基金项目:国家林业局“黄土高原抗性良种推广”项目(2001-天保-02号)

作者简介:周松坤(1979-),男,河南南阳人,在读硕士,主要从事林木育苗研究。

的“实优1号”(系从芬兰引进沙棘中选育)作材料,对其进行了组织培养试验研究,为沙棘优良品种的推广应用及遗传转化奠定研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料为2004年从辽宁阜新沙棘良种选育研究所邮购并定植于本校教学试验苗圃的“实优1号”幼树的1~2 a生休眠枝条。

1.2 方法

1.2.1 材料处理 室外采集的1~2 a生休眠枝条浸泡在加有洗洁净的自来水中0.5 h,刷掉枝条表层尘垢,再用硫磺皂水刷洗后自来水冲洗4次,截成20~25 cm长的枝条,在培养室水培5~6 d,休眠芽萌发0.5~1.0 cm长时即可用于接种试验。

1.2.2 茎尖培养 将水培芽用70%酒精浸泡40 s,无菌水冲洗3次后,用0.1% HgCl_2 浸泡5 min,无菌水再冲洗3~4次,于超净工作台上剥去基部小叶,切取0.3~0.5 cm长的茎尖,选择1/4 MS(仅调整大量元素,下同)、1/2 MS、MS添加不同种类与浓度组合的多种激素进行接种试验。40 d统计不定芽诱导率及平均分化不定芽数。不定芽诱导率(%)=(分化不定芽的茎尖/接种茎尖总数) $\times 100\%$;平均分化不定芽数=分化不定芽总数/接种茎尖总数。

1.2.3 水培叶培养 用消毒(和茎尖同步消毒或单独消毒)的水培芽叶片作外植体,切成0.3 cm $\times$ 0.4 cm的小块,接种在1/4 MS、1/3 MS、1/2 MS及6-BA、NAA、KT分别3个浓度梯度构成的 $L_9(3^4)$ 正交设计培养配方上,共9个处理,每个处理2次重复,30 d统计诱导结果。不定芽诱导率(%)=(分化不定芽的叶块数/接种叶块总数) $\times 100\%$;平均分化不定芽数=分化不定芽总数/接种叶块总数。

1.2.4 生根诱导 以继代增殖的高1.5~4.0 cm的无菌苗为材料,选择1/4 MS、1/2 MS、1/2 B₅作基本培养基,添加6-BA、NAA、KT、IBA等生长调节剂诱导生根,每个处理8瓶,每瓶接种3~4个无根苗,30 d统计生根率。

1.2.5 培养条件 蔗糖25 g $\cdot$ L⁻¹,琼脂5 g $\cdot$ L⁻¹及各种激素,pH 5.8,培养室温度24~26 $^{\circ}\text{C}$,相对湿度50%~60%,光照强度2 000 lx,光照时间16 h $\cdot$ d⁻¹。

2 结果与分析

2.1 茎尖培养

MS、MS各处理(设3次重复)试验结果表明(表1),不同培养基对茎尖培养效果存在差异。对3个处理茎尖平均分化率的方差分析表明,不同培养基对茎尖分化率的影响差异极显著($F=15.07 > F_{0.01}(2, 6)=10.9$),由多重比较($LSD_{0.05}=21.68$, $LSD_{0.01}=32.84$)知,1/2 MS与1/4 MS差异极显著,与MS差异显著;对3个处理平均分化芽数所作方差分析表明,不同培养基对不定芽分化的影响达到极显著水平($F=18.07 > F_{0.01}(2, 6)=10.9$),根据多重比较($LSD_{0.01}=2.19$),1/2 MS与1/4 MS、MS差异均极显著。试验中发现1/4 MS处理茎尖伸长生长慢,愈伤组织和不定芽诱导少;1/2 MS处理茎尖伸长生长快,基部愈伤组织诱导多,分化不定芽也快,20 d即见芽点出现,且发育较旺盛;MS处理茎尖长势较1/2 MS稍差,芽点分化慢且少。综合比较认为,1/2 MS优于其他两种基本培养基。

表1 不同基本培养基对茎尖培养的影响

Table 1 Effect of different basic media on the culture of stem apices

基本培养基	总茎尖数/个	茎尖平均分化率/%	平均分化不定芽数/个
1/4 MS	48	20.9	0.56
1/2 MS	48	68.8	3.98
MS	50	38.0	1.48

2.1.2 不同激素及浓度对茎尖生长分化的影响

表2表明,在1/2 MS培养基添加不同浓度6-BA、KT、NAA和IAA的各处理诱导分化结果差异显著,其中以1/2 MS+6-BA 1.0 mg $\cdot$ L⁻¹+IAA 0.5 mg $\cdot$ L⁻¹效果最好,不定芽诱导分化率高且平均分化芽点数多,达到5.3个,明显优于其他处理。在1/2 MS+6-BA 0.5 mg $\cdot$ L⁻¹+IAA 0.5 mg $\cdot$ L⁻¹上也有较好效果,继代转接后可获得丛生苗(图1);6-BA与NAA组合的①、④号培养基对比结果



图1 不定芽继代培养形成的丛生苗

Fig. 1 Adventitious buds grew into bushy shoots by subculture

有不定芽分化,表明 KT 诱导作用不如 6-BA 明显。试验表明,当茎尖基部诱导出大量愈伤组织且分化出不定芽时,部分茎尖上部长势减弱,其上部长势减弱,最终干枯,茎尖分化不定芽的部位除基部愈伤组织外,在接触培养基的叶缘或中脉甚至整个叶片都

有出现,但数量均较少,且成苗速度慢。另外,茎尖在不加激素的 1/4 MS、1/2 MS、MS 培养基上无明显反应,叶片变黄脱落,顶芽萎缩,死亡率在 90%以上,表明不加外源激素时,茎尖难以萌动发育。

表 2 不同激素及浓度对茎尖生长分化的影响

Table 2 Effect of different hormones and concentrations on stem apex growth and differentiation

培养基编号	不同激素及浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$				茎尖数/个	平均分化率/%	平均分化不定芽数/个
	6-BA	KT	NAA	IAA			
①	0.5	0	0.2	0	40	5.0	0.1
②	0.5	0	0	0.5	81	75.3	5.1
③	1.0	0	0	0	29	0	0
④	1.0	0	0.2	0	48	68.8	4.0
⑤	1.0	0	0	0.5	32	87.5	5.3
⑥	0	1.0	0	0.2	29	0	0
⑦	0	1.0	0	0.5	30	3.3	0.4

2.2 水培叶培养

供试的 9 种处理诱导结果表明(表 3),叶片在 1/3 MS + 6-BA 0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + KT 0.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA 0.1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基上的诱导分化结果优于其它 8 个处理,不定芽诱导率 92.6%,平均分化不定芽数 8.6 个,且分化速度较快,但据正交设计统计分析和 9 个处理的试验结果推知,适宜叶片不定芽诱导的最好组合是 1/2 MS + 6-BA 0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + KT 0.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA 0.02 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,这一组合在试验中没有出现,经补充试验证明在这一处理上叶片的不定芽诱导率 94.1%,平均分化不定芽

数 9.1 个,结果优于 1/3 MS + 6-BA 0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + KT 0.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA 0.1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,说明在选定的培养基及激素相应浓度组合下 1/2 MS + 6-BA 0.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + KT 0.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA 0.02 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 更适合水培叶的诱导分化。极差计算表明,各因素对叶片不定芽诱导起作用的大小顺序是:6-BA>KT>基本培养基>NAA,为进一步选择激素组合提供了依据。水培叶片在不同处理上诱导效果有定差异,一些组合上不定芽分化多(图 2),另一些则诱导的愈伤组织多(图 3),部分愈伤组织上长出白色毛状根。

表 3 不同培养基和激素组合对叶片诱导不定芽的影响^①

Table 3 Effect of different media and hormones on adventitious bud formation from leaves

编号	基本培养基	6-BA/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	NAA/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	KT/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	水培叶数/个	不定芽平均诱导率/%	平均分化不定芽数/个
①	1/4MS	0.3	0.02	0.2	30	60.0	2.9
②	1/4MS	0.5	0.05	0.4	26	53.8	1.3
③	1/4MS	1.0	0.10	0.8	29	3.5	0.1
④	1/3MS	0.3	0.05	0.8	32	31.3	1.8
⑤	1/3MS	0.5	0.10	0.2	27	92.6	8.6
⑥	1/3MS	1.0	0.02	0.4	30	50.0	2.1
⑦	1/2MS	0.3	0.10	0.4	30	41.2	1.7
⑧	1/2MS	0.5	0.02	0.8	36	77.8	3.7
⑨	1/2MS	1.0	0.05	0.2	34	70.6	2.9
K ₁	39.1	44.2	62.6	74.4			
K ₂	58.0	74.7	51.9	45.0			
K ₃	63.2	31.6	45.8	37.5			
R	24.1	43.1	16.8	36.9			

① K 为各处理对应的平均诱导率; R 为极差。

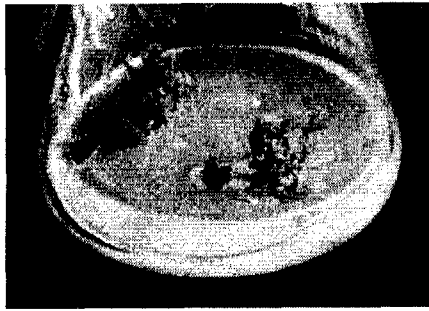


图2 由水培叶块直接诱导分化出的不定芽

Fig. 2 Adventitious buds induced from hydroponics leaves directly



图3 由水培叶块诱导出的愈伤组织

Fig. 3 Calluses induced from hydroponics leaves

把茎尖和水培叶诱导分化出的 0.3~0.5 cm 长的不定芽切下转入不同培养基继代培养,不定芽在 $1/2 \text{ MS} + 6\text{-BA } 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理上生长健壮,30 d 伸长生长 2.5 cm,基部出现直径 0.3~0.5 cm 的浅黄色愈伤组织,有再分化不定芽的趋势,可作为继代培养基使用;在 $1/2 \text{ B}_5 + 6\text{-BA } 0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{IAA } 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基上不定芽生长也较迅速,15 d 可伸长 1.0 cm 以上,长势较旺盛,基部切口有少量致密的愈伤组织,部分愈伤组织表面长出锥状白根,长 0.2~0.3 cm,在其他培养基上不定芽长势均较差。

2.3 增殖培养

将继代形成的高 3.0~5.0 cm 的无菌苗截成带腋芽茎段诱导增殖,基本培养基为 $1/2 \text{ MS}$ 。由表 4 可知,在不加 IAA 的①号培养基上腋芽诱导率和增殖倍数较低,而加 IAA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的②~⑤号培养基中,②、③号处理稍好,表现在有较高诱导率和较多腋芽数,随 6-BA 浓度继续加大,④、⑤号培养基上茎段及叶柄有玻璃化趋势,茎段基部出现少量致密的愈伤组织,腋芽诱导作用不明显。在试验的其他培养基如 $1/2 \text{ MS} + 6\text{-BA } 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} +$

$\text{NAA } 0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $1/2 \text{ MS} + \text{KT } 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.04 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $1/2 \text{ MS} + 6\text{-BA } 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $1/2 \text{ MS} + 6\text{-BA } 4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 上腋芽诱导率和增殖倍数都很低。

表4 6-BA 和 IAA 不同组合对腋芽增殖的影响

Table 4 Effect of different combinations of 6-BA and IAA on axillary bud propagation

培养基编号	6-BA/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	IAA/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	外植体数/个	腋芽诱导率/%	平均诱导腋芽数/个
①	1.5	0	43	16.2	0.16
②	2.0	0.2	26	30.8	0.65
③	2.5	0.2	38	52.6	2.42
④	3.0	0.2	29	20.7	0.45
⑤	4.0	0.2	33	18.2	0.24

2.4 生根诱导

从试验的 9 种配方诱导结果(表 5)可知,无根苗在 $1/2 \text{ B}_5 + \text{IBA } 0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $1/2 \text{ B}_5 + 6\text{-BA } 0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{IBA } 0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 上均以皮部生根为主,但后者在生根数量和质量上更好一些,根系平均长 2.5 cm,每株生根 6~8 条(图 4),可选作生根诱导培养基使用。其他培养基上存在无根苗、生根率低或因出现愈伤组织过多导致生根质量不高的问题,不适宜根的生诱导。

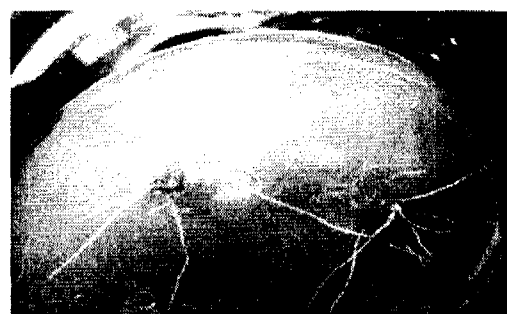


图4 继代苗诱导生根

Fig. 4 Roots induced from fertile buds

此外,在建立初代无性系的试验中发现,水培茎尖在 $1/2 \text{ MS} + \text{KT } 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{NAA } 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 中边伸长边生根,1 周即见根原基突出,生根方式有皮部生根和愈伤组织生根 2 种,皮部生根占 60%左右,根数多,黄白色,生有大量侧根及根毛。不足的是苗上部较弱,生根的同时基部有愈伤组织出现,致使生根质量较差。

表5 不同基本培养基和激素组合对诱导无根苗生根的影响

Table 5 Effect of different basic media and hormones on fertile buds rooting induction

培养基 编号	6-BA/ mg · L ⁻¹	NAA/ mg · L ⁻¹	IBA/ mg · L ⁻¹	无根苗数/个	生根 率/%	生根情况
①	0	0	0	28	0	基部切口无明显反应
②	0.15	0.18	0	28	0	基部切口稍微膨大
③	0	0	0.2	26	0	切口出现少量致密愈伤组织
④	0	0	0.2	24	33.3	主根少,但粗壮,直接从皮部生出,愈伤组织少
⑤	0	0	0.4	24	66.7	皮部生根为主,根系分布均匀,有少量愈伤组织
⑥	0.1	0	0.2	28	53.5	以愈伤组织生根为主,侧根较多,根系短
⑦	0.1	0	0.4	29	75.8	皮部和愈伤组织生根各占50%,根较粗壮,侧根多
⑧	0.3	0	0.4	24	87.5	皮部生根,根系长,侧根多,质量好,愈伤组织少
⑨	0.5	0	0.2	28	57.1	以愈伤组织生根为主,根锥状白色,较短,数量多

注:①、②号处理的基本培养基是1/4 MS,③号处理的基本培养基是1/2 MS,④~⑨号处理的基本培养基是1/2 B₅。

3 结论与讨论

适宜良种沙棘“实优1号”水培茎尖培养的初始培养基为1/2 MS+6-BA 1.0 mg · L⁻¹+ IAA 0.5 mg · L⁻¹,不定芽继代转接可用原培养基或1/2 MS+6-BA 0.5 mg · L⁻¹+ NAA 0.2 mg · L⁻¹;诱导腋芽增殖培养基初选1/2 MS+6-BA 2.5 mg · L⁻¹+ IAA 0.2 mg · L⁻¹;适宜水培叶诱导分化的培养基以1/2 MS+6-BA 0.5 mg · L⁻¹+ KT 0.2 mg · L⁻¹+ NAA 0.02 mg · L⁻¹为宜,生根诱导选用1/2 B₅+6-BA 0.3 mg · L⁻¹+ IBA 0.4 mg · L⁻¹。

茎尖作外植体培养时1/2 MS明显优于MS、1/4 MS等基本培养基,这与李师翁、孙兰英等认为1/2 MS更适宜茎尖生长的观点一致^[3,4]。此外,茎尖作外植体较木质化茎段易消毒,污染少,褐化率低。

叶片在诱导分化不定芽过程中可通过叶缘切口处直接分化成芽,也可经过瘤状愈伤组织再分化不定芽,但以前者分化速度快,所成芽比例大,在继代转接时新培养基中可加入一定量AgNO₃、PVP以降低材料的褐化死亡率。试验中发现水培叶较田间植株萌发叶诱导速度快,褐化程度轻,可能是前者较幼嫩的原因。

在选择腋芽增殖、生根培养基时,作者曾尝试了一些前人试验成功的培养基配方,如康冰的增殖培养基^[5]、赵国林的生根培养基等^[6],未获预期结果,

在相同条件下所做另外三个沙棘品种的培养试验结果也存在明显差异,这与孙兰英、康冰、郭春华、吕月玲等人认为不同品种离体培养差异较大的观点类似^[4,5,7,8],和杨丽萍等人的结论相反^[9],分析原因可能与不同品种生理特性及内源激素控制生长分化的差异等因素有关,也可能是尚未找到普遍适用的培养基。从目前沙棘组织培养研究现状看,作者认为单纯地论述沙棘组织培养技术而不提及相关品种还缺乏实际意义。

参考文献:

- [1] 王俊峰,梁宗锁.沙棘生物学特性与利用[M].西安:陕西科学技术出版社,1999.
- [2] 徐虹,王俊峰,梁宗锁.沙棘组织培养技术研究现状及存在问题[J].沙棘,1999,12(1):11-13.
- [3] 李师翁,范小峰,卢东平.大果良种沙棘愈伤组织诱导及植株再生的研究[J].西北植物学报,2001,21(2):262-266.
- [4] 孙兰英,单金友,王春艳,等.沙棘组织培养培养基筛选试验[J].沙棘,1998,11(3):14-15.
- [5] 康冰,张广军,吕月玲,等.俄罗斯大果沙棘组织培养技术研究[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2002,30(6):162-165.
- [6] 赵国林,刘金郎,朱滨.沙棘的组织培养和植株再生[J].植物生理学通讯,1989,25(1):42.
- [7] 郭春华,徐玉霞.沙棘优良品系茎尖组织培养技术初探[J].沙棘,2000,13(1):26-27.
- [8] 吕月玲,张广军,康冰.俄罗斯大果沙棘离体快繁研究[J].湖南农业大学学报(自然科学版),2002,28(5):405-407.
- [9] 杨丽萍,张虎林,赵秀梅.沙棘离体快速繁育技术研究[J].国际沙棘研究与开发,2004,2(1):12-16.
- [10] 徐虹,梁宗锁.沙棘组织培养技术研究[J].西北植物学报,2001,21(2):267-272.