

## 沙棘优良抗旱品种不定芽诱导及再生体系的建立

于亚军<sup>1,2</sup>, 夏新莉<sup>1</sup>, 尹伟伦<sup>1</sup>

(1. 北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083; 2. 大连大学生物工程学院, 辽宁 大连 116622)

**摘 要:**系统研究了沙棘(*Hippophae rhamnoides* L.)优良杂交品种(“乌兰沙林”*H. rhamnoides* L. ssp. *Mongolica* Rousi)×“丰宁”*H. rhamnoides* L. ssp. *Sinensis* Rousi),通过不定芽发生途径建立离体培养再生体系所需的条件,成功地筛选出了适宜的外植体种类和培养基,获得了完整的小植株。

**关键词:**沙棘;再生;组织培养**中图分类号:** S793.6.05**文献标识码:** A**文章编号:** 1003-8809(2008)01-0030-02

近年来,我国不断选育出生态效益和经济效益兼备的沙棘良种<sup>[1,2]</sup>,良种繁育和进一步优化是今后工作任务的重点之一。植物组织培养技术是良种繁育的有效手段,采用良种田间苗的营养器官作为外植体进行无性繁殖,具有繁殖系数高、速度快、苗木整齐、保持种源特性、不易发生变异等特点。不定芽的大量诱导产生及再生体系的建立,一方面有利于良种快速繁育技术的研究,另一方面也为基因转化及良种的进一步优化打下基础。本实验室在中国沙棘、蒙古沙棘、俄罗斯沙棘以及杂交品种共计 4 种类型 10 个品种当中,通过抗旱适应性的综合评价得出该杂交品种抗旱性最强的结论<sup>[3]</sup>,因此,该杂交品种的组织培养工作是有意义的。

## 1 试验材料和方法

### 1.1 试验材料

本试验采用的杂交品种为一二年生实生苗植株,其母本“乌兰沙林”是从蒙古沙棘(*H. rhamnoides* L. ssp. *Mongolica* Rousi)“乌兰格木”中选育出的优良实生后代;父本为中国沙棘(*H. rhamnoides* L. ssp. *Sinensis* Rousi)优良类型“丰宁”,均含有优良的基因类型<sup>[1]</sup>。

### 1.2 试验方法

于 2006 年及 2007 年春季采集无病虫害盆栽沙棘带新梢的枝条,用喷壶冲洗掉灰尘,基部剪出新茬,放入实验室水培 2~3 d。取枝条顶端幼嫩部分,流水冲洗 30 min,用 70%乙醇浸泡 30 s,不断搅动;再用 20%次氯酸钠灭菌 20 min;无菌水冲洗 10 次以上。在超净工作台上将基部剪出新茬,接种于启

动培养基上。初代培养 5~7 d 后,将外植体转接到增殖培养基上扩繁;剪取腋芽萌发后产生的新梢(0.5cm 以上)接种在生根培养基上;将不带节间的无菌茎段接种在愈伤组织诱导培养基上培养 20d 后转移至分化培养基上;将不带节间的无菌茎段和叶片划伤,接种在分化培养基上培养 20 d。将产生的不定芽转入壮苗培养基中壮苗后进行生根培养。

初代培养以 MS、1/2MS(大量元素减半)和 WPM 为基本培养基,在预试验的基础上添加激素 BA0.2+NAA0.1。继代培养均以 WPM 为基本培养基,添加不同浓度的 BA 和 IBA(表 1);壮苗培养基为 WPM+BA0.2+IBA0.05;生根培养基为 1/2WPM(大量元素减半,蔗糖减半)+IBA0.5+NAA0.5。

蔗糖浓度为 2.0%(生根培养基为 1.0%),琼脂浓度为 0.7%。培养温度为 25℃±2℃,光照强度 2000Lx,光照时间 14h/d。

## 2 试验结果和分析

初代培养 13~14 d 后,外植体在瓶内长高,并伴有腋芽萌发(图 1),30 d 后腋芽萌发至 0.5~1 cm。茎段接种 14 d 后,切口处开始出现愈伤组织,继续培养 6~7 d,再转到分化培养基上 3~4 d 后,愈伤组织上产生少量绿色芽点。切取带有绿色芽点的愈伤组织块,在新鲜的继代培养基上培养 30~45 d,得到大量不定芽形成的绿色芽丛(图 2)。采用 SAS 统计程序分析的结果显示,沙棘初代培养以 WPM 为最佳的基本培养基,基本培养基之间差异显著(表 1)。在基本培养基为 WPM,添加不同植物生长调节剂的培养基上,平均每个无菌不带节的茎段经过脱分化形成愈伤组织后,再分化形成不定芽

的百分率有所不同,采用 WPM+BA0.4~0.6+IBA0.02~0.03,茎段上不定芽产生的百分率可以稳定在 60%以上,与其它几种培养基相比较,差异性显著。试验中还发现,将不带节间的无菌茎段和叶片划伤在直接接种在分化培养基上均未分化出不

定芽。此外,继代培养时应注意将长势弱的组培苗进行壮苗培养(图 3),然后切取高度为 0.5 cm 以上新梢,接种在生根培养基中 6~7 d 后,白色粗壮的不定根开始形成,20 d 后每株组培苗可产生不定根 6~15 条(图 4)。

表 1 基本培养基和植物生长调节剂对沙棘萌芽以及茎段上再生不定芽的影响

培养基	接种的新梢/茎段数目(6次重复试验总和)	每个新梢上萌发的侧芽数目(6次重复试验平均值)	无菌茎段上不定芽萌发率(%) (6次重复试验平均值)
MS+BA0.2+NAA0.1(I)*	42	2.05±0.26 <sup>c</sup>	
1/2MS+BA0.2+NAA0.1(I)	40	2.68±0.28 <sup>b</sup>	
WPM+BA0.2+NAA0.1(I)	42	3.79±0.22 <sup>a</sup>	
WPM+BA0.2+IBA0.01(II)	40		25.0±0.61 <sup>b</sup>
WPM+BA0.4+IBA0.02(II)	40		60.0±0.82 <sup>a</sup>
WPM+BA0.5+IBA0.025(II)	40		75.5±0.88 <sup>a</sup>
WPM+BA0.6+IBA0.03(II)	40		62.5±0.75 <sup>a</sup>
WPM+BA0.8+IBA0.04(II)	40		32.5±0.43 <sup>b</sup>

注: I 表示组织培养的第一个阶段, II 表示第二个阶段,采用第一阶段培养形成的无菌茎段;培养基中所添加植物生长调节剂的单位是 mg/L;培养基之间差异显著性采用最小显著差数法(LSD法), $p=0.05$



图 1:腋芽萌发 图 2:愈伤组织块上不定芽大量产生 图 3:不定芽伸长和壮苗 图 4:组培苗生根

### 3 讨论

通过器官发生途径产生大量不定芽,进而发育成完整的小植株,一方面实现了优良植物品种的快速繁殖;另一方面也是植物基因工程中基因转化的基础工作,只有建立有效的受体系统,保证较高的、稳定的再生率,才能进一步开展基因转化,不断优化

种质资源。植物基因转化的受体系统类型各有利弊,本文在器官发生途径的研究基础上,仅就愈伤组织再生系统和直接分化再生系统进行试验(直接分化再生系统采用无菌苗茎段和叶片均为分化出不定芽,其适宜的培养基和培养条件有待于继续优化),沙棘基因转化的受体系统通过其它途径的建立尚有待于进一步研究。

### 参 考 文 献

- [1] 黄铨. 沙棘的杂种优势及其利用[J]. 国际沙棘研究与开发, 2004, 2(3): 27~32
- [2] 黄铨. 中国沙棘育种研究进展[J]. 国际沙棘研究与开发, 2006, 4(4): 25~29
- [3] 李亮, 夏新莉, 尹伟伦. 用隶属函数法对 10 个沙棘品种抗旱性的综合评价[J]. 山东林业科技, 2001, (1): 59~60