

沙棘生物技术研究进展

马才寿¹ 江可珍² 吴斌³ 谭镜根¹

(¹广东省广州市白云区农业科学试验中心,广东广州 510425; ²扬州大学园艺与植物保护学院; ³辽宁省果树科学研究所)

摘要 综述了近年来国内外沙棘生物技术研究进展,主要涉及组织培养、原生质体操作与基因工程,以及分子标记技术在沙棘遗传多样性检测、亲缘关系分析、性别鉴定的应用等方面内容。

关键词 沙棘;组织培养;原生质体操作;基因工程;分子标记

中图分类号 Q819 **文献标识码** A **文章编号** 1007-5739(2008)12-0023-01

沙棘(*Hippophae rhamnoides* L.)又名醋柳,是胡颓子科沙棘属落叶乔木或灌木,其果实营养价值和药用价值极高,共有 7 种 11 亚种。我国产 7 种 7 亚种,是沙棘分布面积最大、种类最多的国家,也是沙棘资源蕴藏最丰富的地区。近 10 年来,生物技术已被应用于沙棘育种改良,本文主要对组织培养、原生质体操作、基因工程、分子标记等方面研究进展进行综述。

1 组织培养

沙棘组织培养技术在种苗快速繁殖、种质资源离体保存、遗传转化等方面都有极其重要的应用价值。20 世纪 90 年代以来,沙棘组织培养研究报道不断增多,并取得了一定的进展。建立快速、稳定、高效的繁殖体系仍然是当今沙棘组织培养研究的主要目的。Liu 等(2007)通过优化培养基、植物生长调节物质和碳源等措施,以子叶、下胚轴、叶片为外植体,采用直接体细胞胚发生途径获得了再生植株,最高成活率达到 55%;该试验中形成的体细胞胚与其合子胚具有相似的组织结构。沙棘组织培养过程中愈伤组织易发生褐化,从而影响无性系的诱导和增殖,杜研等(2007)对外植体取材类型、光照和培养温度、无机盐浓度、不同的 6-BA 浓度、转接周期、培养基硬度以及活性炭等 7 种影响外植体褐化的因子进行了研究,为解决褐化问题提供了重要的参考。

2 原生质体操作与基因工程

原生质体分离、培养及融合技术是生物技术领域中的一个重要组成部分,为作物遗传育种工作开辟了一条新思路,它已成为烟草、小麦、马铃薯、柑橘等作物和果树改良的重要手段。原生质体操作首先要建立在成熟的原生质体分离和培养再生体系基础上。迄今,沙棘原生质体研究仅有 1 篇报道。北京林业大学朱俊英等(2005)为了开展沙棘属木本植物细胞的电生理特性及其耐盐性机制关系的研究,以中国沙棘子叶为材料分离原生质体,探索了适合膜片钳封接的原生质体的游离条件。结果表明,中国沙棘子叶原生质体高产量、高活力的最佳游离条件是 SE 为酶基液、渗透浓度为 0.88mol/L, pH 为 5.8,温度为 26℃、黑暗条件下,静置 4h。由于他们的研究目的是建立耐盐木本植物中国沙棘的膜片钳实验技术,并没有对分离的沙棘原生质体进行培养,虽然分离的原生质体瞬间活力较高,但是对于他们建立沙棘原生质体分离体系是否满足其再生要求有待今后探究。

20 世纪 70 年代后期发展起来的植物基因工程已成为植物遗传改良、创造种质的有利途径。目前沙棘仅有个别基因得到克隆,遗传转化技术尚未起步。从公共数据库已公布的沙棘分子数据分析可知:共有 101 条相关的核苷酸序列,其中 83 条来自各种沙棘单倍型的查耳酮合成酶基因内含子序列(Bartish et al, 2006)。我国也开展了一些工作,孙燕琳等(2007)运用 RT-PCR 和反向 PCR 技术,首次克隆出沙棘类型 III 和类型 I 几丁质酶基因,该研究为将来通过基因工程培育抗病转基因沙棘品种提供了一定的基础。总之,沙棘转基因技术尚未建立,还有待从事沙棘研究工作的人员将来开拓此一领域。

3 分子标记技术

分子标记是以生物大分子,尤其是生物体的遗传物质(核酸)的多态性为基础的遗传标记,它直接以 DNA 的形式表现,不受组织类别、发育时期、环境条件等干扰,与传统遗传育种研究使用的形态性状相比,具有明显的优越性。目前,在沙棘上应用较为广泛的分子标记有同工酶(Yao and Tigerstedt, 1993)、RAPD(Persson and Nybom, 1998)、ISSR(Tian et al, 2004)、RFLP(陈立红等, 2006)和 SSR(Wang et al, 2008)等。这些分子标记在沙棘上的应用主要集中于以下 3 个方面:遗传多样性研究、亲缘关系分析和性别鉴定。

3.1 遗传多样性研究

目前有关沙棘属植物的物种形成和进化机制的研究工作仍很有限,关于沙棘属内的分类和进化关系问题仍有很大争议(康永善, 2000)。由于该属植物在居群间、居群内、种间乃至亚种等不同水平均表现了丰富的遗传变异和分化现象(陈约, 2004),国内外许多研究人员应用各种分子标记对沙棘遗传多样性进行了研究,我国学者在该问题中积累了相当多资料,成果显著。迄今该问题的研究包含 2 个方面,一是沙棘种间、种内以及不同品种间的遗传多样性分析;二是国内外有代表性、不同的沙棘居群间遗传多样性研究。例如, Yao 和 Tigerstedt(1993)最早使用分子标记(同工酶)分析了来自中国、芬兰及俄罗斯 25 个居群种子样品的遗传变异和进化,聚类分析的结果与沙棘的种间、种内的植物学分类及地理分布非常吻合。刘雨娜等(2007)对 24 个大果沙棘品种开展了 RAPD 分析,在大果沙棘品种间检测到丰富的遗传多样性,并将供试的 24 份大果沙棘种质分为 4 类。张

表3 不同品种不同采制方式的经济效益分析

品种	开采时间 月/日	产量 kg/hm ²	产值 万元/hm ²	成本 万元/hm ²	利润 万元/hm ²	利润率 %
嘉茗一号	2/27	195	5.40	2.63	2.78	51.5
白叶一号	3/19	180	4.65	2.63	2.02	43.4
铁观音	4/21	1200	4.80	2.48	2.32	48.3

加工成高中档的乌牛早茶,其经济效益非常显著。后期采摘1芽1~2叶的鲜叶加工成低档乌牛早茶,一是立体树冠不能采取机械采摘,采摘成本居高不下;二是后期鲜叶原料品质较差,销售价格只有100~150元/kg,采摘加工的劳力成本与销售价格持平甚至大于销售价格,因此大部分茶农不愿意采摘加工后期乌牛早茶。但利用后期粗老的鲜叶加工成中低档的乌龙茶,具有绿茶特有的清香,色泽鲜活,有一定的市场竞争能力,而且粗老鲜叶的采摘成本低,产量高,利润率较高。利用后期的鲜叶采摘单芽,加工成高档的针形芽茶的原因,一是后期的鲜叶内含物质十分丰富,二是芽茶属高档茶叶,鲜叶价格达到160元/kg。因此,后期鲜叶采摘单芽加工高档茶的经济效益和市场前景更加广阔。

4.2 不同品种同一采制方式

嘉茗一号属特早生茶树良种,每年2月25日左右即可开采上市,以早抢占早茶市场,也可提高茶农的经济效益。龙井43品质好、发芽率高,属国家良种,但开采期在3月20日左右,此时全省各县的茶叶均已上市,对只出售鲜叶不自

己加工茶叶的茶农来说,其经济效益明显下降。因此,对种植少量茶园并出售鲜叶的茶农来说,只能选择嘉茗一号茶树品种,以提高经济效益;对集生产、加工、销售于一体的龙头企业来说,为了有效调整茶叶生产的“洪峰期”、避免茶叶采制劳动力过度紧缺,要种植多个茶树品种,对茶园进行早、中、晚生品种合理搭配。

4.3 不同品种不同采制方式

种植嘉茗一号加工乌牛早茶,产值达到5.4万元/hm²,利润率达到51.5%。白叶一号是绿茶类的茶树变种,在永嘉3月中旬即可开采上市,以其鲜爽滋味在茶叶市场占有一席之地,而其原产地安吉在浙江的最北,茶叶开采时间在3月下旬以后,因此与安吉联合种植、经营安吉白茶,产值达到4.65万元/hm²,利润率达到43.4%,其经济效益也非常显著。近几年来,铁观音越来越受到消费者的青睐,其市场份额也越来越大,种植铁观音加工乌龙茶,产值达到4.80万元/hm²,利润率达到48.3%。

因此,种植嘉茗一号、龙井43、白叶一号、铁观音等茶树品种,加工成不同的茶类,经济效益都非常显著。可达到有效调整茶叶生产的“洪峰期”、避免茶叶采制劳动力过度紧缺、充分利用茶厂设施及机械设备、减少茶园病虫害暴发和“倒春寒”对茶叶造成的损失和开展多茶类生产、增加抗市场风险能力的目的。

(上接第23页)

辉等(2006)采用分子标记RAPD对祁连山中段中国沙棘(*Hippophae rhamnoides* ssp. *sinensis*) 4个居群和甘肃榆中兴隆山的1个对照居群进行了遗传多样性研究,结果表明,祁连山的隔离在一定程度上限制了4个居群间的基因交流,造成了祁连山中段中国沙棘边缘居群间较高的遗传分化。此外,陈立红等(2006)应用RFLP对内蒙古东、西部8个地点采集的24个沙棘根瘤样品进行了沙棘共生菌Frankia遗传多样性水平的研究。聚类分析结果表明,所有根瘤样品内的Frankia菌株间均存在遗传多样性, Frankia菌株遗传多样性的分布与采样地点无相关性。

3.2 亲缘关系分析

棱果沙棘是近年来发现的新分类群,主要分布于四川松潘、若尔盖、红原以及青海祁连。为了鉴定二倍体棱果沙棘的双亲来源, Sun等(2003)通过比较棱果沙棘以及可能的亲本(中国沙棘和肋果沙棘)的核rDNA ITS序列,发现在测试的4个棱果沙棘中,91.4%的变异位点显示为中国沙棘和肋果沙棘对应核苷酸碱基的叠加。该结果证实了棱果沙棘由中国沙棘和肋果沙棘杂交而来。之后, Wang等(2008)通过分析棱果沙棘、中国沙棘和肋果沙棘的叶绿体DNA trnL-F区域序列,其结果也支持棱果沙棘的杂种起源。同时,作者还指出,棱果沙棘可作为一个模式系统用于研究林木二倍体杂种的物种起源。

3.3 性别鉴定

沙棘属植物为雌雄异株,早期性别鉴定难以进行,只有

在花果期才能准确鉴定。近年来, DNA分子标记技术已成功地应用于雌雄异株植物的早期性别鉴定研究中,如苏铁(景建洲等, 2007)、杜仲(Xu et al, 2004)、番木瓜(Parasnis et al, 2000)、大麻(Mandolino et al, 1999)等。Persson和Nybm(1998)采用RAPD结合混合分组分析方法筛选与沙棘性别相关的分子标记,在78条随机引物中有4条引物能够在杂交后得到雌雄植株建立的DNA反应池间形成多态性带,其中只有引物OPD15-600扩增得到1个与雄性相关的RAPD标记。董莉娜等(2007)也使用相同的技术从棱果沙棘中扩增得到1个约为1030bp的与雌性相关的RAPD标记。获得的这2个标记如能转化为专一性、稳定性和重复性更好的SCAR标记,可望用于沙棘幼苗的早期性别鉴别。

4 结语

综上所述,沙棘生物技术尤其是组织培养和分子标记等方面在近几年中取得了较大的进展,研究已具有一定的基础。相信随着研究的不断深入,生物技术将在沙棘业发展中逐渐起到不可替代的重要作用,成为沙棘育种不可缺少的手段之一。

5 参考文献

- [1] 陈学林,马瑞君,孙坤,等.中国沙棘属种质资源及其生境类型的研究[J].西北植物学报,2003,23(3):451-455.
- [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] 刘丽颖.沙棘苗木繁殖技术研究综述与展望[J].国际沙棘研究与开发,2006,4(2):37-48.
- [4] 宋西德,周松坤,张宗勤,等.近5年沙棘组织培养研究进展[J].西北林学院学报,2006,21(6):118-122.