

沙棘组织培养研究进展

秦晶晶, 陈 纹, 孙 坤

(西北师范大学 生命科学学院, 甘肃 兰州 730070)

摘 要: 从外植体、培养基、生长激素、褐变的预防等几方面对沙棘组织培养的研究进展进行简要回顾, 并探讨其存在的主要问题及发展趋势, 以期今后的深入研究提供参考。

关键词: 沙棘; 组织培养; 研究现状; 研究前景

中图分类号: S 793.604⁺.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2011)01-0212-04

沙棘(*Hippophae rhamnoides* L.)为胡颓子科的落叶灌木或小乔木, 广泛分布于我国干旱、半干旱地区^[1]和青藏高原等地。由于其耐瘠薄、耐干旱、果实富含VC和沙棘油、枝叶含高蛋白、根系有根瘤等特点, 具有很高的经济效益和生态效益, 并已成为重要的水土保持和经济植物^[2], 被誉为“绿色黄金”、“水土保持先锋植物”和“神奇的保健植物”。

随着沙棘资源开发力度加大及生态环境建设对苗木需求量的增长^[3], 如何快速育苗成为亟待解决的问题。目前, 沙棘主要通过种子和枝条扦插进行繁殖^[4], 但是利用种子繁殖难以保持种性, 用枝条扦插繁殖成苗率较低, 且扦插多代后年龄效应明显, 易受病毒侵染。这些都成为沙棘良种繁育推广的障碍^[5]。实践证明, 组织培养是实现苗木规模化生产的高效途径之一, 也是开展基因遗传育种、保存种质资源研究的重要前提。该技术不受季节和地域限制, 既能达到快速繁育的目的, 又能很好保持原种性优势, 尤其可对雌雄异株的沙棘作定性繁育^[6], 还可通过生物技术手段直接获得遗传变异, 培养出生产中急需的具有抗寒旱、抗盐碱、抗沙埋、抗病虫害、产量高、大果无刺沙棘等特殊用途的新品系。此外, 利用沙棘组织培养物或细胞培养物作为生产沙棘药物的原料, 将会为沙棘工业带来新的开发途径^[7]。由此可见, 沙棘组织培养快繁体系的建立具有广阔的发展前景。

沙棘组织培养研究始于20世纪80年代初期^[8-9], 1998年以来国内已有多个大果沙棘的组织培养获得成

功, 但沙棘的快繁体系仍不够健全, 多处于试验阶段, 还不能进行工厂化生产。现就沙棘组织培养研究的主要进展进行简要回顾, 并分析其存在的主要问题, 以期今后的深入研究提供参考。

1 外植体的选取

1.1 取材时间

研究表明, 选择不同的时间取材接种对沙棘外植体的诱导效果并不相同, 一般以3月前接种外植体成活率较高。郑子成等^[10]以腋芽为外植体研究发现, 3月初至4月中旬采的材料接种后发芽率可达100%及95%, 是最佳接种时间; 5月采的材料接种后污染率高, 玻璃化苗多; 7~9月采的材料褐化现象严重, 9~12月及1~2月采的材料接种后极易污染, 且很难萌发。张广军^[11]和康冰等^[12]也得出类似的结论, 认为最适接种时间为3月。吕月玲等^[13]研究发现俄罗斯大果沙棘组织培养的适宜外植体为2月末至3月下旬的休眠枝。也有研究认为5月末、6月初是最佳接种时间^[3]。由于生长环境等的影响, 适宜的取材时间会有差异, 但从上述研究可见, 沙棘组培中外植体的取材时间应选择萌动和发育早期为好。

1.2 外植体的种类

适宜的外植体对植物组织培养至关重要, 不同的外植体诱导效果不同, 发育阶段、生理状态、外植体的类型、大小和幼嫩程度及其在树体和枝条上的位置等均能影响外植体细胞全能性和组织器官再生性的表达。在沙棘的组培中, 以茎尖和幼嫩枝条、成年植株茎段及休眠枝条的腋芽为外植体诱导再生苗的居多^[11-13, 18-19], 并且都获得了再生苗。吕月玲等^[13]诱导腋芽生长获得了无性系材料, 诱导率达90%以上, 且芽生长良好, 将嫩茎剪下, 可获得无菌苗。康冰等^[12]以休眠枝茎段的腋芽为外植体诱导出的不定芽数量多, 易获得无性系植株。孙兰英^[2]用茎尖分生组织为外植体接种10~15d后有初始叶片生成, 并且最终获得了再生植株。将茎尖及休眠

第一作者简介: 秦晶晶(1983-), 女, 硕士, 研究方向为植物组织培养。

通讯作者: 陈纹(1978-), 女, 硕士, 讲师, 研究方向为系统与进化植物学和分子生态学。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30960029); 西北师范大学创新团队资助项目(nwnu-kjxgc-03-49)。

收稿日期: 2010-10-25

枝条经水培萌发后进行接种也取得了良好的诱导效果^[10, 12, 14]。郭春华等^[15]将茎尖于室内水培至芽萌动开始试验,茎尖的诱导成活率达到81.9%。周松坤等^[16]以1~2 a生休眠枝条为材料水培至休眠芽萌发,以水培芽茎尖为外植体进行培养,发现茎尖作为外植体较木质化茎段易消毒、污染少、褐化率低,且能诱导出大量愈伤组织及不定芽,继代转接可获得丛生芽。

鉴于茎段、茎尖等外植体消毒难、培养效果受接种时间影响等因素的限制,近年来直接用种子培养出无菌苗,再以无菌苗的各器官作为外植体进行培养日益显示出其优越性。首先,沙棘种子不受接种时间限制,易于诱导;其次,种子由果实包被,与外界环境接触较少,相对茎段、根等外植体更容易消毒,加上种皮坚硬,消毒时对植物组织伤害较小,植株容易成活并可减少褐化。种子萌发出的无菌苗可分别选取上下胚轴、腋芽、子叶及胚根为外植体诱导分化,建立快繁体系。徐虹等^[17]分别以中国沙棘种子所获得无菌苗的子叶、下胚轴、胚根和茎尖作为外植体进行诱导,观察到生长15~20 d后开始出现分化,接种30 d后长出绿色芽点,生长40 d后可以明显看到再生芽。

近期研究表明以叶片为外植体可获得较好的诱导效果,Sriskandarajah^[27]用叶片做外植体诱导芽,平均每个幼嫩叶片可诱导出18个芽,每个成熟叶片可诱导出12个芽;幼嫩叶片的胚状体诱导率为65%,成熟叶片的胚状体诱导率为78%。

此外,由于不同沙棘品种具有不同的自然习性,在启动培养过程中,品种间存在着明显的差异。如孙兰英^[3]、郭春华等^[15]分别将卡图尼礼品等5个品种的沙棘和大果沙棘的6个品系接种在同一培养基上,在相同条件下进行培养,发现不同品种的离体培养和再生能力差异很大;周松坤等^[16]曾尝试了一些前人试验成功的培养基配方,在相同条件下3个沙棘品种的培养试验结果存在明显差异,显示出不同品种离体培养存在较大差异。

2 基本培养基

沙棘组织培养使用较为广泛的培养基为MS培养基和B5培养基。研究表明,适当降低培养基中大量元素的含量对沙棘器官分化有利。孙兰英^[3]对外植体诱导时发现若用完全MS培养基外植体容易变褐死亡,而当培养基中大量元素的总量由MS的4530 mg/L降至1300 mg/L时能较好地改善外植体生存条件。启动培养基以1/2MS效果较好,1/2MS和1/3MS可用于继代培养和诱导愈伤组织^[12-13, 20],生根培养一般用1/2MS、1/4MS和1/2B₅^[12, 21]。徐虹等^[17]认为1/4MS是沙棘组培的适宜培养基。还有研究表明,诱导与扩增的最适培养基为木本植物培养基(WPM)^[9]。

由于外植体及诱导目的的不同,培养基会使诱导效

果产生差异,但由上述研究可看出,较低盐浓度的培养基适用于沙棘的组织培养。

3 生长调节物质的影响

植物激素最显著的特征之一是增殖效应,其取决于激素的种类、浓度和激素之间的合理搭配等。在沙棘组织培养中,常用的生长素有吲哚乙酸(IAA)、吲哚丁酸(IBA)和萘乙酸(NAA);常用的细胞分裂素有6-苄氨基嘌呤(6-BA、BA)和激动素(KT)。

3.1 对诱导外植体出芽的影响

以茎尖为外植体对沙棘进行培养时,在不加任何激素的培养基中外植体100%死亡^[2],在只加BA的培养基中,芽诱导率低,只有25%^[19]。通常认为,细胞分裂素和生长素之间存在协同效应,即细胞分裂素促进细胞分裂的效应只有在生长素存在的前提下表现。将BA和IAA配合使用时芽生长快,长势良好,繁殖倍数高。BA的浓度范围一般在0.5~1.0 mg/L,IAA的浓度在0.3~0.5 mg/L^[11-13, 18]。如吕月玲等^[13]在BA 0.5~1.0 mg/L+IAA 0.3~0.5 mg/L的培养基上茎尖出芽率均达到90%以上。KT和NAA配合使用也有较好的诱导效果^[2, 13]。孙兰英^[3]将KT 0.3~0.5 mg/L和NAA 0.03~0.05 mg/L配合使用,芽诱导率达85%,用同等浓度BA代替KT诱导率则有所降低,并同时得出顶端分生组织的生长需要较低水平激素物质的结论。这与郭春华等^[15]的研究结果一致,即BA 0.2 mg/L+IBA 0.01 mg/L有利于沙棘芽的生活及生长,而激素浓度更高的培养基上茎尖基部发生愈伤组织并褐变死亡。YAO Y M^[9]研究也发现,BA在0.10~0.25 mg/L时外植体分化率高。以水培叶为外植体培养时可将BA、KT和共同使用进行诱导^[19],当KT浓度大于0.2 mg/L时,芽诱导率低;KT浓度为0.2 mg/L时,BA浓度在0.3~1.0 mg/L时诱导率达60%以上;NAA则在0.02~0.1 mg/L之间,特别是BA 0.5 mg/L和NAA 0.02 mg/L时诱导效果最好,30 d平均分化不定芽数9.1个,分化率达94.1%。徐虹等^[17]用中国沙棘无菌苗的子叶为外植体诱导芽分化时发现,BA 0.3 mg/L和NAA 0.002 mg/L混合使用的培养基适宜诱导子叶分化,且芽生长良好。Sriskandarajah^[27]研究发现,TDZ对芽的诱导有很大促进作用,TDZ 4.5 μM结合NAA 0.53 μM可使幼嫩叶片的芽诱导率提高到18个/外植体。

3.2 对芽增殖的影响

芽的增殖速度是离体快速繁殖中最为重要的一个问题,第2阶段中繁殖速度快在生产实践中才有应用价值。在沙棘芽增殖的培养基中,细胞分裂素仍是不可缺少的,而以BA对芽的大量增殖最为有效。生长素在多数情况下用IAA,偶有使用NAA的,但生长素浓度不可过高,否则对芽的增殖反而有抑制作用,并容易形成愈

伤组织。在只使用 BA 的情况下,芽的增殖倍数低^[19],而将 BA 和 IAA 或 NAA 2 种生长素配合使用时不定芽的增殖效果较好^[11-13,18]。BA 所需浓度一般较低,范围在 0.1~0.5 mg/L,IAA 在 0.2~0.5 mg/L,NAA 在 0.004~0.2 mg/L。如杨丽萍等^[18]在 BA 0.5 mg/L+IAA 0.5 mg/L 的培养基上诱导芽增殖 5.6 倍,并且长势良好,褐化苗少;徐虹等^[17]发现在 BA 0.1 mg/L+NAA 0.004 mg/L 的培养基上,分化出的芽可多次继代增殖,每个芽每代新增 3~4 个丛生芽,再生芽伸长快(2~3 cm/30d),幼苗叶片伸展,叶色深绿。周松坤等^[16]对细胞分裂素和生长素的使用量则持有不同观点,认为 BA 2.0~2.5 mg/L、IAA 0.2 mg/L 时可诱导腋芽增殖;此外,含有 NAA 的培养基中芽的增殖倍数低,认为 NAA 不适于芽的增殖诱导。

3.3 对愈伤组织诱导的影响

激素对愈伤组织的诱导与分化具有较明显的影响。目前对诱导沙棘愈伤组织所使用激素的种类及搭配主要有以下观点:一是认为 BA 对愈伤组织的生长和分化是必需的^[20],当 BA 0.5~1.5 mg/L、NAA 0.05~0.5 mg/L 混合使用时,愈伤组织的诱导率均为 100%,高浓度的 BA 和 NAA 对愈伤组织的生长不利,易使愈伤组织褐化死亡,适宜于愈伤组织生长和分化的最佳 BA 浓度为 0.3~0.5 mg/L、NAA 浓度为 0.05 mg/L;周洁等^[21]将初代培养获得的无菌苗剪切成茎段后,在含 BA 0.5~1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L 的培养基中愈伤组织诱导率为 90%以上,平均每块愈伤组织分化不定芽 6.9~10.8 个。二是康冰等^[12]和吕月玲等^[13]研究发现,BA 0.5~1.0 mg/L、NAA 0.1 mg/L 或 IAA 0.2 mg/L 混用时,愈伤组织诱导率虽然高,但 20 d 后均褐变死亡;KT 0.2~0.3 mg/L+NAA 0.02~0.03 mg/L 时,愈伤组织的诱导率可达 80%,死亡率低,生长较快。三是徐虹等^[17]用 0.3 mg/L 的 2,4-D 对愈伤组织诱导,诱导率可达 90.3%,而李师翁等^[20]则认为 2,4-D 只能诱导无性系芽的幼叶产生少量愈伤组织,并容易褐化。

3.4 对生根诱导的影响

研究表明沙棘组培苗的生根形式主要有 2 种,一是苗的茎基部通过皮层直接分化出根,此类组培苗较易成活;二是在苗基部愈伤组织上分化出根,这种组培苗较难成活^[12,21]。单独使用生长素 IAA 或 NAA 和 IBA 配合使用均能促使组培苗基部分化出不定根,但分化率不超过 50%^[11,18,20];将细胞分裂素 KT 和 NAA 混合使用,苗基部的生根率只有 25%^[2];康冰等^[12]将 BA 和 NAA 组合,只在苗基部的愈伤组织上诱导出不定根;周松坤等^[16]研究发现,浓度为 0.4 mg/L 时有利于由皮层直接生根,根蘖均匀,生根率达 66.7%,如与浓度为 0.3 mg/L 的 BA 混合使用则可将生根率提高到 87.5%,根系平均

长 2.5 cm,每株生根 6~8 条。可见,IBA 对沙棘生根效果具有较大影响。一些木本植物如松树、杨树等再生植株的生根诱导过程中,生根剂的效果显著^[22],在沙棘的生根诱导中生根剂同样表现出较好生根的效果^[15,17]。如郭春华等^[15]将再生植株用 50 mg/kg IBA 浸根 18 h 后长出的根长 2 cm 左右,根粗壮。徐虹等^[17]将再生幼苗的基部在生根剂中浸蘸 15 min,然后将其接种在生根培养基上能明显缩短生根的诱导时间并提高幼苗基部的发生率。

4 褐变的预防

褐变是植物组织培养中较普遍的一种现象,而在沙棘外植体培养中尤为严重^[24],它受到外植体的种类和生理状态、培养基种类和激素浓度、培养温度以及光照等多种因素的影响^[25]。沙棘组织培养中预防褐变的方法有:一是选择适宜的外植体。外植体有较强的分生能力,处于旺盛的生长状态,可大大减轻褐变。周松坤等^[16]在试验中发现茎尖作外植体较木质化茎段褐化率低;较幼嫩的水培叶比田间植株萌发叶诱导速度快,褐化程度轻。二是降低矿物质盐的浓度。培养基中无机盐浓度过高可致使酚类物质的大量产生,导致细胞褐变,通过降低盐浓度可以减少酚类物质外溢,减轻褐变。试验表明适当降低大量元素的浓度至 1/3MS 时外植体生长良好^[2]。杨丽萍等^[18]也发现高盐培养基会加剧褐化物的渗出;对桑树组织培养的研究还显示培养基的硬度对褐变也有一定的影响:在一定范围内,琼脂用量大,培养基硬度大则褐变率降低^[22]。这可能是培养基的硬度影响了酚类物质扩散速度的缘故。三是低温暗处理可减缓植物的代谢速度,从而减少醌类物质的形成。据报道,将外植体采后密封置于 4~6℃环境中 5~8 d 后接种,且在弱光下(500 lx)培养,褐变现象受到明显抑制,休眠芽在接种后 3 d 即迅速萌发^[10-11]。康冰等^[12]将 6~9 月接种的材料低温(5℃)处理 5 d 后褐变明显减轻,外植体芽很快萌发。四是在培养基中加入抗氧化剂或活性炭,或用抗氧化剂进行材料的预处理或预培养。李诗翁等^[20]在培养基中加入抗坏血酸和活性炭抑制了褐化的发生,但同时也使愈伤组织和芽的生长减缓并逐渐死亡。而杨丽萍等^[18]研究发现,活性炭并不能抑制沙棘体内褐化物质的渗出,反而使褐化现象更趋严重,并认为抑制沙棘外植体褐化的有效方法是用 200 mg/kg VC 浸泡材料 5 h,这样既不影响正常生长又能抑制褐色物质的产生。五是采用无菌苗各器官进行培养,培养过程中无褐变现象^[11,17]。六是连续转移外植体。对于易褐变的材料,接种后转瓶时间长,伤口周围积累醌类物质增多,褐变加重,而缩短转瓶周期可减轻褐变。

5 问题及展望

迄今沙棘的组织培养已取得了阶段性的成果,获得

了完整的小植株,但还存在一些问题,使得繁殖倍数低,达不到快繁的目的,不能应用于实际生产中。

首先,到目前为止,沙棘的组织培养主要是通过间接的器官发生途径,即由外植体诱导出愈伤组织,再由愈伤组织诱导不定芽或不定根最终形成完整植株,少有通过胚状体诱导完整植株的。而胚状体具有成苗数目多,速度快,可在无激素培养基上独立萌发成苗,形成芽和根是一致的等特点,可减少不定芽发育途径中很多困难。同时,外植体选择比较单一,多数选择用茎尖、腋芽进行培养,而以花粉、花药等为外植体的培养研究未见报道。其次,芽继代增殖的倍数较低,对最适培养基及激素的种类和配比还有待进一步探讨。此外,目前虽然已诱导出沙棘愈伤组织,但普遍存在生长缓慢,容易变褐死亡的现象,通过愈伤组织分化获得再生植株或构建悬浮细胞系及为遗传转化等研究提供材料都无法实现,进一步的研究仍显迫切。再次,生根诱导率低,并且在愈伤组织上生根,降低了组培苗的成活率。可见如何诱导有利于植株成活的根系分化将是今后沙棘生根培养要解决的一个关键问题。最后,虽然预防沙棘褐化的方法已有较多研究,但效果仍不够显著,褐化现象仍是限制沙棘离体快繁的一个重要因素。找到预防褐化快速有效,操作简单的方法仍是今后沙棘组培研究的方向之一。

参考文献

- [1] 赵汉章. 俄罗斯沙棘育种与我国沙棘育种现状和展望[J]. 世界林业研究 1997(2): 65-70.
- [2] 孙兰英. 沙棘组织培养与植株再生研究[J]. 国际沙棘研究与开发 2004 2(2): 28-30.
- [3] 王琳, 冯建菊, 蒋学玮. 沙棘植物资源的综合利用[J]. 北方园艺, 2002(6): 24-25.
- [4] 朱健. 经济林基地技术手册[M]. 西安: 陕西科学技术出版社 1990: 350.
- [5] 单金有. 良种沙棘以苗繁苗扦插试验简报[J]. 林业科技通讯 1996(12): 24-25.
- [6] Vasil. Perspectives in plant cell and tissue culture Int. Rev[M]. Cytology, Supl. 11B. New York: Academic Press, 1980.
- [7] 徐虹, 王俊峰. 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.

- [8] Montpetit D. *In vitro* propagation and subsequent nodulation of the actinorhizal *Hippophae rhamnoides* L. [J] Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 1998 53(1): 189-199.
- [9] Yao Ying-mou. Micropropagation of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) [J]. Agricultural Science in Finland 1995(4): 5-6 503-512.
- [10] 郑子成, 何淑勤. 大果沙棘组织培养技术[J]. 中南林业学院报 2003, 23(4): 42-45.
- [11] 张广军, 康冰, 吕月珍, 等. 引进俄罗斯良种沙棘的组培系统研究与构建[J]. 沙棘, 2002(1): 8-9.
- [12] 康冰, 张广军, 吕月珍, 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, 2002(6): 162-165.
- [13] 吕月玲, 张广军, 康冰, 等. 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(5): 405-407.
- [14] 刘杰. 沙棘组织培养与扦插繁殖技术的研究[D]. 北京: 北京林业大学 2004.
- [15] 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.
- [16] 周松坤, 宋西德, 张宗勤, 等. 良种沙棘“实优一号”组织培养研究[J]. 西北林学院学报, 2006, 21(3): 67-71.
- [17] 徐虹, 梁宗锁. 沙棘组织培养技术的研究[J]. 西北植物学报 2002, 21(2): 267-272.
- [18] 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(1): 12-16.
- [19] 朱万芹, 杨泽涛, 张莉, 等. 利用组织培养技术快速繁育沙棘苗的研究[J]. 沙棘 2002(3): 39-40.
- [20] 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(2): 262-266.
- [21] 周洁, 岳冬梅, 陈贵, 等. 沙棘组培快繁技术研究[J]. 安徽农业科学, 2005 3(32): 236-237.
- [22] 陈正华. 木本植物组织培养及其应用[M]. 北京: 高等教育出版社 1986.
- [23] 曹孜义, 刘国民. 实用植物组织培养技术教程[M]. 兰州: 甘肃科学技术出版社, 2002.
- [24] 叶梅, 王伯初, 段传人. 植物组织培养外植体褐变的研究进展[J]. 生物技术通讯, 2004, 15(4): 426-428.
- [25] 邱璐, 陈善娜. 桑树组织培养中褐化问题的研究[J]. 云南大学学报(自然科学版), 2000, 22(1): 76-78.
- [26] 张立功, 张永华, 王凤勤, 等. 杨树体细胞胚状体的诱导发生[J]. 林业科学, 1981, 19(4): 426-427.
- [27] Sriskandarajah S, Lundquist PO. High frequency shoot organogenesis and somatic embryogenesis in juvenile and adult tissue of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). [J] Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2009, 93(99): 259-268.

Research Progress on Tissue Culture of *Hippophae rhamnoides* L.

QIN Jing-jing, CHEN Wen, SUN Kun

(College of Life Science, Northwest Normal University, Lanzhou, Gansu 730070)

Abstract: In the present study, research progress on tissue culture of *Hippophae rhamnoides* L. was reviewed, including the explants, medium, hormone, and the prediction of browning. Meanwhile, the problem and prospect for tissue culture and regeneration of *Hippophae rhamnoides* L. were discussed, which would provide references for establishing the regeneration system of *Hippophae rhamnoides* L.

Key Words: *Hippophae rhamnoides* L.; tissue culture; research progress