

沙棘品种“实优 1 号”的组织培养技术

董敬超

(辽宁省风沙地改良利用研究所, 辽宁 阜新 123000)

摘要:以沙棘品种“实优 1 号”的 1~2 a 生带休眠芽茎段(腋芽未萌发)为外植体,采用不同培养方式、不同类型基本培养基和不同激素浓度组合对沙棘组织培养过程中的影响进行系统的研究。结果表明:茎段分化培养采用 1/3MS+6-BA 0.5 mg/L+IAA 0.3 mg/L,诱导率可达 85% 以上;最佳增殖和诱导愈伤培养基为 1/3MS+6-BA 0.75 mg/L+IAA 0.5 mg/L,愈伤诱导率在 90% 以上,增殖系数达到 4~6;最佳生根培养基均为 1/4MS+NAA 0.3 mg/L+IBA 0.5 mg/L,平均生根率 85% 以上。接种后进行暗培养 7 d,向培养基中添加 6.5 g/L 琼脂,1.5 g/L 活性炭,可有效防治褐化。

关键词:沙棘;“实优 1 号”;茎段;组织培养

中图分类号:S 793.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)19-0127-04

沙棘 (*Hippophae rhamnoides* L.) 属胡颓子科 (Elaeagnaceae) 沙棘属 (*Hippophae*) 多年生落叶灌木或小乔木,也是一种新兴的小浆果类树种,果实中维生素 C 含量较高,沙棘油具有药用价值^[1],沙棘耐干旱、生长迅速、侧根发达,还具有固氮能力,防风固沙,是优良的水土保持树种,在生态环境治理,尤其在辽西地区生态建设过程中发挥着巨大作用。

沙棘雌雄异株,靠种子繁殖在生产上很难保持优良

品种的优势,根蘖繁殖系数较低,目前生产上采用的扦插繁殖成活率也不高,还易受病害侵染。利用组织培养繁育种苗能大大提高繁殖速度,还可保持原种优势,是加快苗木规模化繁育的主要办法。但时常出现初代培养困难、组培苗褐化、玻璃化、污染、增殖系数低、生根率低等问题,导致不能工厂化生产优良沙棘种苗,周洁等^[2]以“实优 1 号”沙棘为试材,以 B5 为基本培养基进行了研究。现采用 MS 为基本培养基对沙棘品种“实优 1 号”组培苗生产中存在的问题进行进一步分析和研究,为今后的生产提供更多的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以阜新国家科技园区大棚内的沙棘品种“实优

作者简介:董敬超(1979-),女,本科,助理研究员,现主要从事植物组织培养与生态农业实验室常规化验工作。E-mail: djchlt@163.com.

收稿日期:2012-06-13

Analysis of Genetic Relationship for *Punica granatum* L. Germplasm Based on Peroxidase Isozyme

MA Li, WANG Yu-hai, MING Dong-feng

(College of Life Science, Zaozhuang University, Zaozhuang, Shandong 277160)

Abstract: The peroxidase (POD) isozyme of 19 pomegranates germplasm cultivars were determined by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and the genetic relationship were studied with clustering analysis method. The results showed that a better polymorphism was observed in POD enzyme. The number, the activity and *R_f* of POD enzyme were difference among 19 pomegranates. 12 enzyme bands were detected and there was a common locus for total experiment material in the zymogram patterns; the two specific locuses that *R_f* was 0.216 and 0.113 were obtained for ‘Daqingpisan’ cultivar and ‘Damayatan’ cultivar respectively. Furthermore, the clustering analysis indicated 19 pomegranates were divided into five groups based on 0.60 of similarity coefficient, which indicated that the genetic difference between groups was significant.

Key words: *Punica granatum* L. (pomegranates); germplasm; POD isozyme; cluster analysis; genetic relationship

1号”为试材,该品种是阜新当地主栽品种之一,成活率高。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体消毒 2010年春季进行取材,选取1~2a生的“实优1号”带1~2个休眠芽的茎段(腋芽未萌发),用洗衣粉浸泡10min,剪成10cm左右的茎段,流水冲洗2~3h后,在1%84消毒液或0.3% H_2O_2 中预灭菌20min,再用自来水冲洗干净。在无菌条件下将材料剪成2cm长带腋芽的茎段(腋芽未萌发)。先将材料放入70%酒精中浸润30s后将带芽茎段外植体装入已灭菌的烧杯中,消毒时倒进0.1% $HgCl_2$ 溶液和2滴吐温灭菌4~5min,期间不断摇动烧杯,至第1次倒出后记录时间。最后用无菌水冲洗4~6遍。用灭菌滤纸吸干外植体表面水分,备用。

1.2.2 基本培养基的筛选 以带休眠芽的茎段为外植体,以MS、1/2MS、1/3MS、1/4MS为基本培养基,设计单因素试验,4种培养基中均添加0.25mg/L 6-BA+0.1mg/L IAA,每个处理接种10瓶,每瓶接种1个茎段,3次重复,培养条件温度24~26℃,光强1500~2000lx,光周期12~14h/d。20d后调查萌发情况。

1.2.3 初代培养基的筛选 以1/3MS培养基为基本培养基,添加不同浓度的细胞分裂素6-苄基腺嘌呤(6-BA)、激动素(KT)和不同浓度的生长素吲哚乙酸(IAA)、萘乙酸(NAA)。初代培养基设14个处理,每个处理接种10瓶,每瓶接种1个茎段,3次重复,20d后调查萌发情况。

1.2.4 培养基硬度筛选 向1/3MS+6-BA 0.5mg/L+IAA 0.3mg/L(pH 5.8)为基本培养基,琼脂浓度分别为5.5、6、6.5、7g/L,每个处理接种10瓶,每瓶接种1个茎段,3次重复,20d后调查外植体萌发情况。

1.2.5 抗褐变剂的筛选 将幼嫩茎段接种在1/3MS+6-BA 0.5mg/L+IAA 0.3mg/L(pH 5.8)培养基中。分别添加0.15g/L抗坏血酸(VC)、1.5g/L活性炭、6g/L聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、0.15g/L半胱氨酸。对照不加任何抗褐变剂,30d后观察其褐变情况,3次重复。

1.2.6 暗培养时间的筛选 为了获得较高的萌芽率,将外植体接种在1/3MS+6-BA 0.5mg/L+IAA 0.3mg/L(pH 5.8)培养基中,进行不同时间暗培养,①暗培养3d;②暗培养5d;③暗培养7d;④CK不进行暗培养,直接放于正常光照下再转到正常光照条件下,接种第10天转瓶1次,每瓶接种1个茎段,3次重复,30d后调查暗培养过程对外植体萌芽生长情况的影响。

1.2.7 继代和愈伤组织诱导培养基筛选 在初代培养基中由腋芽获得的3cm左右的无菌苗从基部轻轻掰下分别放于培养基中进行试验。以MS、1/2MS、1/3MS、

1/4MS为基本培养基,设计单因素试验,4种培养基中均添加6-BA 0.5mg/L+0.3mg/L IAA 每处理接种10瓶,每瓶接种1个茎段,3次重复,20d后调查增殖情况。以1/3MS为基本培养基,添加2种不同浓度的细胞分裂素6-BA、KT,2种不同生长素IAA、NAA。继代和诱导愈伤培养基共设12个处理,每个处理接种10瓶,每瓶接种1个茎段,3次重复,20d后观察不同配比激素水平对增殖和愈伤组织诱导的影响。

1.2.8 生根培养基筛选 将继代培养的丛生苗取叶片展开、生长健壮,苗高2~4cm的单株轻轻掰下,接种于生根诱导培养基中。以MS、1/2MS、1/3MS、1/4MS为基本培养基,设计单因素试验,4种培养基中均添加0.3mg/L NAA+0.3mg/L IAA 每处理接种10瓶,每瓶接种1个茎段,3次重复,20d后调查增殖情况。以1/4MS为基本培养基,附加不同浓度的IBA、NAA。生根培养基配方共13个处理,每个处理接种10瓶,每瓶1株。3次重复,30d后统计生根率。

2 结果与分析

2.1 基本培养基筛选

由表1可知,4种培养基对芽外植体培养结果表明,接种1/3MS培养基后10d芽开始萌发,萌芽率最高达86.7%。萌发30d后,苗高3~4cm,生长最迅速,平均每株分蘖最多,而且长势最好,而在MS、1/2MS、1/4MS培养基上芽生长慢,甚至后期茎尖变褐死亡。

表1 基本培养基对芽的生长影响

培养基	接种芽数/个	萌芽数/个	萌芽率/%	长势
MS	30	12	40.0	前期长势好,后期死亡
1/2MS	30	17	56.7	前期长势好,后期死亡
1/3MS	30	26	86.7	长势最好
1/4MS	30	23	76.7	长势慢

2.2 初代培养基筛选

以1/3MS培养基为基本培养基,配合使用细胞分裂素和生长素可大幅度提高诱导率,单独使用细胞分裂素或生长素诱导率很低,长势不好。以该试验14个组合对腋芽进行诱导获得了无菌苗。由表2可知,培养基6、13萌发率高、萌发早、长势旺盛,培养基1、2、3、4、5、11、14上萌发率低或生长较慢,其它培养基长势一般。6-BA、KT浓度为0.25、0.5mg/L,IAA、NAA浓度为0.1mg/L时诱导率均较低,当6-BA达到0.5mg/L、KT达到0.75mg/L时IAA和NAA3个浓度10d后即可见萌发,且诱导率较高。但添加KT的培养基中外植体逐渐褐化死亡,相同浓度6-BA和KT,6-BA的诱导率显著高于KT的诱导率。生长素中IAA分化效果较好,NAA较差。IAA浓度为0.1时生长缓慢,而IAA浓度是0.3mg/L时长势好于0.5mg/L,所以细胞分裂素6-BA,生长素IAA对分化最有效。其中培养基6即

表 2

不同浓度激素对沙棘初代培养的影响

培养基编号	培养基	接种外植体个数	20 d 后平均苗高/cm	萌发率/%	长势
1	1/3MS+6-BA 0.25 mg/L+IAA 0.1mg/L	30	0.7	65.2	长势慢
2	1/3MS+KT 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L	30	芽无分化	30.3	芽畸形
3	1/3MS+6-BA 0.25 mg/L+NAA 0.1 mg/L	30	0.8	65.5	长势慢
4	1/3MS+6-BA 0.5 mg/L+IAA 0.1 mg/L	30	0.6	68.4	长势慢
5	1/3MS+KT 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L	30	0.6	67.6	长势慢
6	1/3MS+6-BA 0.5 mg/L+IAA 0.3 mg/L	30	2.4	87.8	萌发早,长势旺盛
7	1/3MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.3 mg/L	30	1.9	76.8	长势良好
8	1/3MS+KT 0.5 mg/L+NAA 0.3 mg/L	30	1.8	73.3	长势良好
9	1/3MS+6-BA 0.5 mg/L+IAA 0.5 mg/L	30	1.7	81.3	长势良好
10	1/3MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.5 mg/L	30	1.5	79.2	长势良好
11	1/3MS+6-BA 0.75 mg/L+NAA 0.5 mg/L	30	芽无分化	39.1	芽畸形
12	1/3MS+KT 0.75 mg/L+IAA 0.3 mg/L	30	1.8	74.7	长势良好
13	1/3MS+KT 0.75 mg/L+NAA 0.3 mg/L	30	2.2	86.6	长势旺,但后期易褐化
14	1/3MS+KT 0.5 mg/L+IAA 0.3 mg/L	30	0.4	64.9	长势慢

1/3MS+0.5 mg/L 6-BA+0.3 mg/L IAA 激素组合萌芽率最高,为最佳初代培养基。

2.3 培养基硬度的筛选

培养 20 d 后发现,随着琼脂含量的加大,硬度逐渐增加,褐化率逐渐降低。7 g/L 处理硬度最大,褐化率最低,但芽萌发缓慢,不利于基部吸收营养成分,因此 6.5 g/L 是最佳琼脂浓度。

2.4 抗褐变剂的筛选

培养 30 d 后发现,活性炭>抗坏血酸(VC)>半胱氨酸>聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。其中后 3 种褐化率均低于对照,添加活性炭 1.5 g/L 与对照相比差异显著,是其中最有效的抗褐化剂。

2.5 培养方式的筛选

将外植体接种在 1/3MS+6-BA 0.5 mg/L+IAA 0.3 mg/L(pH 5.8)培养基中,进行不同时间暗培养发现,随着暗培养时间的延长褐化率有降低的趋势。暗培养 7 d 再转到正常光照条件下的褐化率最低,仅 18.5%,比 CK 41.1%明显降低。说明暗处理 7 d 可以明显抑制褐化,是解决外植体褐化的有效方法。

2.6 继代培养和愈伤组织诱导培养基筛选

将初培养中由腋芽获得的 3 cm 左右的无菌苗接种到继代培养基中后,当细胞分裂素浓度适宜时,愈伤组织生长迅速。组培苗 15 d 左右根部膨大,有绿色愈伤组织生成,继续培养 25 d 左右,愈伤组织直径达到 2 cm 左

右,并出现无数个绿色芽点,继续培养芽点即可分化成苗。再将丛生苗从根部轻轻掰下,接种到相同培养基上继续重复此生长过程来实现增殖。在继代培养过程中在 MS、1/2MS 培养基中的组培苗 5 d 左右叶尖顶端逐渐变黄而后慢慢死亡,而 1/4MS 培养基中组培苗也有此现象发生,且愈伤组织形成较慢,但 1/3MS 中的组培苗生长迅速。

由表 3 可知,在培养基中加入 2 种不同的细胞分裂素,当 6-BA 浓度达到 0.75 mg/L、KT 浓度达到 1.0 mg/L 时,对愈伤组织的诱导无影响,浓度再大会使后期愈伤组织的褐化加重,从而影响成苗率。6-BA、KT 的增殖系数均很高,但添加 KT 培养基中的腋芽生长不正常,出现玻璃化。而添加 6-BA 的培养基中的增殖效果好,而且叶色深绿正常,生长状态好。在培养基中加入 3 种不同的生长素,加 IAA 后从分枝数和增殖倍数方面都比加 IBA、NAA 效果好。当生长素 IAA 浓度在 0.3 mg/L 时和 0.5 mg/L 时诱导率差异不显著,但苗长得细弱。浓度在 0.5 mg/L 时愈伤组织诱导率高,达到 90%以上,成苗率达到 85%以上,且苗长得粗壮。从而确定 IAA 浓度在 0.5 mg/L 最好。综上所述与初代培养结论一致,6-BA 和 IAA 搭配增殖效果最好,浓度控制在 1/3MS+0.75 mg/L 6-BA+0.5 mg/L IAA 中增殖较快,增殖系数达到 4~6,效果最好。

表 3

不同浓度激素对沙棘继代培养和愈伤组织诱导的影响

培养基编号	培养基	诱导率/%	每块愈伤组织上芽点数/个	增殖系数	长势
1	1/3MS+6-BA 0.5 mg/L+IAA 0.3 mg/L	67	8.8	4.1	长势良好
2	1/3MS+6-BA 0.5 mg/L+IAA 0.5 mg/L	73	9.2	4.8	长势良好
3	1/3MS+6-BA 0.75 mg/L+NAA 0.5 mg/L	63	7.9	3.7	长势慢
4	1/3MS+KT 0.75 mg/L+NAA 0.3 mg/L	57	7.1	3.2	长势慢
5	1/3MS+6-BA 0.75 mg/L+NAA 0.3 mg/L	67	8.3	4.3	长势良好
6	1/3MS+6-BA 0.75 mg/L+IAA 0.3 mg/L	77	9.6	5.4	长势良好
7	1/3MS+6-BA 0.75 mg/L+IAA 0.5 mg/L	91	10.3	5.9	长势旺盛
8	1/3MS+6BA 1.0 mg/L+IAA 0.3 mg/L	47	5.8	1.4	叶尖黄化慢慢枯死
9	1/3MS+6BA 1.0 mg/L+IAA 0.5 mg/L	33	4.2	0.9	叶尖黄化慢慢枯死
10	1/3MS+KT 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L	80	9.3	5.7	长势旺但后期褐化
11	1/3MS+KT 1.5 mg/L+IAA 0.5 mg/L	30	3.8	1.2	叶尖黄化慢慢枯死
12	1/3MS+KT 1.5 mg/L+NAA 0.3 mg/L	17	2.1	0.6	叶尖黄化慢慢枯死

2.7 生根培养基筛选

将继代培养的丛生苗取叶片展开、生长健壮,苗高2~4 cm的单株轻轻掰下,接种于生根诱导培养基中。15~20 d左右便可见茎底部有根生成,30~35 d可生成3~5条根。生根效果最好的是1/4MS,生根率较高,且生根质量好,移栽易成活,而1/3MS生根率也较高,但生根质量差,移栽不易成活。与郑子成等^[3]低盐的培养基对生根效果相一致。

由表4可知,在培养基中单独加入0.5 mg/L NAA和单独加入0.5 mg/L IBA生根效果都不理想,而在1/4MS+0.3 mg/L NAA+0.5 mg/L IBA培养基中生根率最高,可达85.4%以上,且平均根系长、生根数多,植株生长良好。在1/4MS+0.5 mg/L NAA+0.5 mg/L IBA上根粗壮,平均生根数最多,但根系短,植株矮,植株生长差。综上所述,最佳生根培养基为1/4MS+0.3 mg/L NAA+0.5 mg/L IBA。

表4 不同浓度激素对沙棘生根培养的影响

培养基编号	培养基	生根率/%	平均根长/cm	每株生根条数/条
1	1/4MS+NAA 0.1 mg/L+IBA 0.5 mg/L	75.7	1.2	3.8
2	1/4MS+NAA 0.5 mg/L+IBA 0.1 mg/L	69.8	1.2	3.6
3	1/4MS+NAA 0.5 mg/L+IBA 0.5 mg/L	85.1	1.6	7.4
4	1/4MS+NAA 0.3 mg/L+IBA 0.3 mg/L	81.7	1.5	6.0
5	1/4MS+IBA 0.5 mg/L	74.3	1.1	3.5
6	1/4MS+NAA 0.5 mg/L	68.9	1.0	3.3
7	1/4MS+NAA 0.3 mg/L	55.6	0.8	1.9
8	1/4MS+IBA 0.3 mg/L	45.4	1.1	3.4
9	1/4MS+NAA 0.3 mg/L+IBA 0.5 mg/L	85.4	2.0	6.8
10	1/4MS+NAA 0.5 mg/L+IBA 0.3 mg/L	80.3	1.4	5.7
11	1/4MS+NAA 0.3 mg/L+IBA 0.1 mg/L	64.6	0.9	2.1
12	1/4MS+NAA 0.1 mg/L+IBA 0.3 mg/L	63.2	0.6	1.5
13	1/4MS+NAA 0.1 mg/L+IBA 0.1 mg/L	23.5	0.5	1.3

3 结论与讨论

在沙棘初培中,因为沙棘本身容易褐化,适当加大培养基硬度可减少褐化,但因“实优1号”品种诱导时间较长,所以在后期也要定期转瓶,否则会出现从茎尖开始黄化后慢慢死亡的现象。在沙棘继代培养中通过诱导茎基部愈伤,再分化成苗,虽然增殖率也很高,但此过程过于复杂,可能是在培养基中添加较高的生长素造成的,对继代增殖培养基配方还有待进一步筛选。

参考文献

- [1] 秦晶晶,陈纹,孙坤. 沙棘组织培养研究进展[J]. 北方园艺, 2011(1): 220-224.
- [2] 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, 33(2): 57-58, 70.
- [3] 郑子成,何淑勤. 大果沙棘组织培养技术[J]. 中南林学院学报, 2003, 23(4): 42-45.

Study on Tissue Culture of *Hippophae rhamnoides* ‘Real gifted one’

DONG Jing-chao

(Liaoning Institute of Sandyland Improvement and Utilization, Fuxin, Liaoning 123000)

Abstract: Through the ‘Real gifted one’ of *Hippophae rhamnoides* varieties with 1~2 years old and dormant buds stems (axillary bud of unerupted) as explants, different culture, different types of basic culture medium and different concentration of hormone combination on *Hippophae rhamnoides* tissue culture influence in the process of systematic were studied. The results showed that the stem segment culture medium for differentiation was 1/3MS+6-BA 0.5 mg/L+IAA 0.3 mg/L; and the induction rate could reach more than 85%; the best of proliferation and induction of callus culture medium was 1/3MS+6-BA 0.75 mg/L+IAA 0.5 mg/L; callus induction rate in 90% above, and proliferation coefficient reached 4~6; the optimum rooting medium was 1/4MS+NAA 0.3 mg/L+IBA 0.5 mg/L; average rooting rate above 85%. After inoculation dark culture was added into the culture medium 7 d, 6.5 g/L agar, 1.5 g/L activated carbon, more training method could effectively prevent the browning.

Key words: *Hippophae rhamnoides*; ‘Real gifted one’; stem segments; tissue culture