

珍稀濒危植物新疆沙冬青胚根愈伤组织诱导及植株再生

焦培培¹, 王彦芹^{1,2}, 祁正伟², 张莉², 康少峰², 严建龙²

(1. 新疆生产建设兵团塔里木盆地生物资源保护利用重点实验室, 新疆阿拉尔 843300; 2. 塔里木大学生命科学院, 新疆阿拉尔 843300)

摘要:以珍稀濒危植物新疆沙冬青种子无菌苗为试材, MS 为基本培养基, 研究了不同的激素配比对新疆沙冬青胚根愈伤组织和丛芽诱导的影响, 以期筛选最佳生根诱导培养基, 建立植株再生体系。结果表明: 诱导新疆沙冬青胚根形成愈伤组织的最佳培养基为 MS+2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA, 同时发现该培养基能够高效诱导丛芽的发生; 在利用丛芽诱导生根时, 筛选出诱导生根的最佳培养基为 1/3MS+0.2 mg/L IBA。

关键词:新疆沙冬青; 胚根愈伤组织; 丛芽诱导; 植株再生

中图分类号:S 651 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)20-0101-04

新疆沙冬青 [*Ammopiptanthus nanus* (M. Pop.) Cheng f.] 为豆科 (Leguminosae) 蝶形花亚科 (Papilionoideae) 沙冬青属 (*Ammopiptanthus*) 植物, 又名矮沙冬青、小沙冬青、矮黄花木, 系第三纪古亚热带绿阔叶林的残遗成分^[1]。新疆沙冬青 (*A. nanus*) 的分布区范围十分狭窄, 主要分布在新疆西天山和昆仑山的结合部, 克孜勒苏柯尔克孜自治州的乌恰县境内, 少量还延伸到原苏联^[2]。它不仅超旱生、耐寒、耐土壤瘠薄、抗逆性强, 是理想的沙区造林树种, 而且阔叶常绿, 树形美观, 花色鲜艳, 也可作为优良的庭院绿化树种。枝叶均可入药, 能祛风、抗炎、活血、止痛, 主治冻疮、慢性风湿性关节炎等, 具有很高的生态和药用价值。近年来, 由于新疆沙冬青 (*A. nanus*) 种子虫食率高、落地种子不易萌发、随意樵采破坏等自然及人为因素的影响, 其分布区面积正逐年减小, 天然个体数量也日益减少, 已被列为国家Ⅱ级濒危保护植物^[3]。

目前对新疆沙冬青 (*A. nanus*) 的研究仅局限于开花物候^[4-5]、繁育特性^[6-7]、抗性生理^[8-9] 等方面, 对其组织培养方面的研究报道较少^[10-11]。新疆沙冬青主要靠种子繁殖, 但种子授粉率低、成熟种子虫害严重、种子不易扩

散等因素大大地限制了该物种的种群更新, 而种子不易获得、实生繁殖困难和移栽成活率低等因素更加限制了对该物种资源的开发利用, 将植物组织培养技术应用于珍稀濒危植物新疆沙冬青的快速扩繁, 无疑是在种质资源保护的同时进行开发利用的一条行之有效的途径。现利用植物组织培养技术, 研究不同激素对新疆沙冬青种子苗的胚根愈伤诱导以及丛芽形成的影响, 以期新疆沙冬青植株再生体系的建立提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试的新疆沙冬青 (*A. nanus*) 种子于 2008 年 8 月采自新疆乌恰县膘尔托阔依乡 (E 74°52.661', N 39°30.212', 海拔 2 400~2 500 m)。选取颗粒饱满、无病虫害的健康种子为试验材料。

1.2 试验方法

1.2.1 种子处理及无菌苗的获得 选取籽粒饱满、无病虫害的新疆沙冬青种子用自来水冲洗 0.5 h, 再用蒸馏水冲洗 1 次, 用灭过菌的无菌水在无菌条件下冲洗 1 次, 用 75% 的酒精处理 1 min 左右, 用无菌水冲洗 3~4 次, 然后用 0.2% 的 NaClO 消毒 10 min, 用无菌水冲洗 3~5 次, 然后用灭过菌的滤纸将种子上的残留水迹吸干。灭菌过程中要经常搅动种子以保证所有材料的所有部位都能够充分灭菌。将种子接种到不含任何激素的 MS 培养基上, 获得无菌苗。

1.2.2 胚根愈伤组织的诱导及丛芽的形成 种子在 MS 培养基上培养 20 d 后, 切取 1 cm 左右胚根和含 2 片子叶的茎段分别接种于 A1~A12 培养基上进行愈伤组织和丛芽的诱导。基本培养基为 MS 培养基, 激素采用

第一作者简介:焦培培(1982-), 女, 河南汝州人, 硕士, 助理研究员, 现主要从事干旱区生物多样性保护方面的研究工作。E-mail: jiaopei2000@126.com.

基金项目:新疆生产建设兵团青年科技创新资助项目(2010JC48); 新疆生产建设兵团塔里木盆地生物资源保护利用重点实验室开放课题资助项目(BR0811); 塔里木大学大学生课外创新资助项目(TDKWZKCX08005)。

收稿日期:2012-05-18

6-BA 和 NAA 的不同的组合,培养基配比见表 1。每个处理 5 瓶,每瓶接 5 粒种子,每隔 7 d 观察 1 次胚根愈伤组织诱导和丛芽生长情况,并计算愈伤组织的诱导率及丛芽诱导率。其中,愈伤组织诱导率(%)=有愈伤组织形成的材料数/接种的材料数 $\times 100\%$,丛芽诱导率(%)=有丛芽发生的材料数/接种的材料数 $\times 100\%$,材料的平均丛芽数=丛芽的总数/有丛芽发生的材料数。

表 1 胚根愈伤组织及丛芽诱导培养基成分组成

Table 1 The medium composition of radicle callus and crowd shoots inducing

编号 No.	基本培养基 Basic medium	6-BA/mg \cdot L $^{-1}$	NAA/mg \cdot L $^{-1}$
A1	MS	0.5	0.25
A2	MS	0.5	0.5
A3	MS	0.5	1.0
A4	MS	1.0	0.25
A5	MS	1.0	0.5
A6	MS	1.0	1.0
A7	MS	1.5	0.25
A8	MS	1.5	0.5
A9	MS	1.5	1.0
A10	MS	2.0	0.25
A11	MS	2.0	0.5
A12	MS	2.0	1.0

1.2.3 胚根愈伤组织的分化培养 将在 A1~A12 培养基上获得的胚根愈伤组织切成蚕豆大小的块,接种到 A13~A15 培养基上,诱导不定芽的形成。基本培养基采用 MS,激素采用 NAA 和 6-BA 的不同组合(表 2),附加 GA₃ 0.05 mg/L,蔗糖 3%,琼脂 0.7%,pH 5.8~6.2,高压灭菌。每个处理 20 瓶,每瓶 3 个材料,定期观察并记录不定芽的诱导情况。

表 2 胚根愈伤组织的分化培养基成分

Table 2 The medium composition of radicle callus differentiation

编号 No.	基本培养基 Basic medium	6-BA /mg \cdot L $^{-1}$	NAA /mg \cdot L $^{-1}$	GA ₃ /mg \cdot L $^{-1}$
A13	MS	0.5	0.1	0.05
A14	MS	1.5	0.1	0.05
A15	MS	0.5	0.5	0.05

1.2.4 丛芽的生根诱导及植株再生 以改良的 1/3MS 培养基为基本培养基,以 MS 培养基为对照,添加不同浓度的 IBA(表 3)。将诱导出的丛芽分别接种到 A16~A20 培养基上,每个处理 20 瓶,每瓶 3 个材料,定期观察结果并计算生根率诱导和平均根长。其中,生根率(%)=生根的材料数/接种的材料总数 $\times 100\%$,平均生根条数=根的总条数/生根的材料数,平均根长(cm)=根的总长/根的总条数。

表 3 生根培养基类型及成分组成

Table 3 The medium composition of rooting

编号 No.	基本培养基 Basic medium	IBA/mg \cdot L $^{-1}$	参考文献 References
A16	1/3MS	0.5	[10]
A17	1/3MS	0.2	[12]
A18	1/3MS	1.0	[10]
A19	MS	0.2	对照 1
A20	MS	0.5	对照 2

2 结果与分析

2.1 不同的激素配比对种子胚根愈伤组织及丛芽诱导的影响

由图 1 可知,各处理愈伤组织生长过程大致相同,均在接种 30 d 后出现淡黄色愈伤组织(图 1A),60 d 后黄色愈伤组织块增大,颜色由刚开始的淡黄色逐渐变为黄色(图 1B),继代后愈伤组织呈黄绿色颗粒状(图 1C)。不同配比的 6-BA 和 NAA 均能诱导种子的胚根形成愈伤组织,且诱导率均在 40%以上,其中在 A11 培养基上的胚根愈伤组织诱导率最高,达到了 80%(表 4),观察其愈伤组织的面积发现,A11 培养基中产生的愈伤相对于其它培养基中产生的愈伤组织块较大,质地紧密,颜色淡黄(图 1B)。在相同培养基上,在形成愈伤组织的同时,种子苗 2 片子叶间均能抽生出丛生芽,60 d 以后对种子苗上丛生芽(图 1D)诱导情况统计见表 4。由表 4 可以看出,在 A11 培养基上丛生芽的诱导率最高,平均可达到 3.52 个,是诱导丛芽生成的最适培养基。综合考虑,诱导种子胚根形成愈伤组织诱导和丛芽形成的最佳培养基为 MS+2 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA。

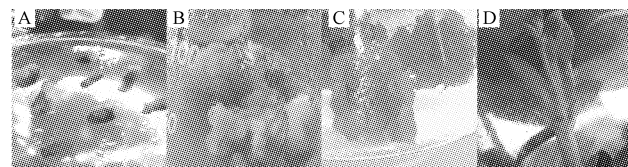


图 1 胚根形成的愈伤和茎尖形成的丛芽

注:A. 30 d 以后胚根形成的愈伤;B. 胚根形成的愈伤;C. 继代后的愈伤组织;D. 种子苗茎尖形成的丛芽。

Fig. 1 Callus from radicle and crowd shoots from shoot tip

Note: A. Callus from radicle after inoculation 30 d; B. Callus from radicle after inoculation 50 d; C. Callus after subculture; D. Crowd shoots from seedling shoot tip.

表 4 不同激素配比对愈伤组织及丛芽诱导的影响

Table 4 The effect of different hormone combinations on the radicle callus and crowd shoots inducing

编号 No.	接种数 Number of inoculation /个	愈伤组织诱导数 Number of radicle callus inducing /个	愈伤组织诱导率 Callus induction rate/%	总芽数 Total buds /个	平均芽数 Average bud /个
A1	25	14	56	25	1.00
A2	25	16	64	26	1.04
A3	25	15	60	26	1.04
A4	25	10	40	28	1.12
A5	25	16	64	27	1.08
A6	25	17	68	29	1.16
A7	25	16	64	39	1.56
A8	25	19	76	48	1.92
A9	25	14	56	52	2.08
A10	25	12	48	50	2.00
A11	25	20	80	88	3.52
A12	25	12	48	63	2.52

2.2 胚根愈伤组织的分化培养

将胚根产生的愈伤组织继代于 A13~A15 培养基上,每 15 d 继代 1 次,连续继代 2 次,生长 1 个月 after 观察,愈伤组织上均有绿色芽点生成(图 2A),将这些绿色芽点继代在相同的培养基上,3 个月 after 仅有一小部分芽点可形成不定芽(图 2B),诱导率较低(3.33%~6.67%),一部分形成了畸形胚或玻璃化苗(25.00%~31.67%)(图 2C 和 D),其余的全部褐化死亡(表 5)。

表 5 胚根愈伤组织的分化培养情况

Table 5 The differentiation culture of radicle callus

编号 No.	接种数 Number of inoculation /个	不定芽诱导率 Adventitious buds induction rate/%	畸形胚或玻璃化苗诱导率 Abnormal embryo and vitrified shoots induction rate/%
A13	60	5.00	25.00
A14	60	6.67	31.67
A15	60	3.33	26.67

表 6

不同培养基类型及 IBA 含量对丛芽诱导生根的影响

Table 6 The effect of different medium and IBA content on the rooting inducing of crowd shoots

编号 No.	接种数 Number of inoculation/个	生根数 Number of rooting/条	生根率 Rooting rate/%	生根总条数 Total roots/条	平均条数 Average root/条	平均根长 Average root length/cm
A16	60	35	58.33	70	3.04	1.83
A17	60	18	30.00	45	3.75	1.23
A18	60	26	43.33	68	4.02	1.01
A19	60	2	3.30	2	2.00	1.63
A20	60	5	8.33	7	1.40	0.96

由表 6 可以看出,1/3MS 培养基生根诱导率均高于 MS 培养基,可能与培养基中营养元素水平有关,说明新疆沙冬青生根诱导对营养元素的要求不高,这与其自然生境中贫瘠的土壤条件相符。相同的培养基类型下,IBA 浓度在 0.2 mg/L 时根的生诱导率最高(58.33%),随培养基中 IBA 浓度的增加,生根率和平均根长有所降低,但平均条数有稍微的上升。说明高浓度的 IBA 抑制了根的生成和伸长生长。综合考虑,诱导新疆沙冬青苗生根的最佳培养基应为 1/3MS+0.2 mg/L IBA。

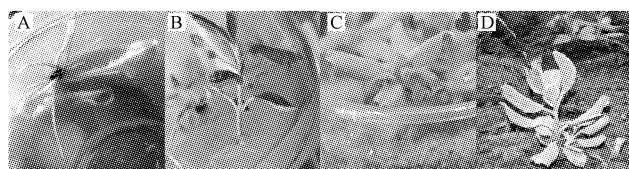


图 3 丛芽的生根诱导及植株再生

注:A. 丛芽的生根情况;B. 培养基上的再生苗;C. 移栽前再生苗;D. 再生苗田间生长情况。

Fig. 3 Rooting inducing of crowd shoots and plant regeneration

Note: A. The rooting of crowd shoots; B. The regeneration plants on the medium; C. The regeneration plants before transplanting; D. Field growing of the regeneration plant.

待单苗生长到 4~5 片真叶时(至少有 3 条根,图 3B),在培养基打开封口膜,培养基表面注入少量水,室

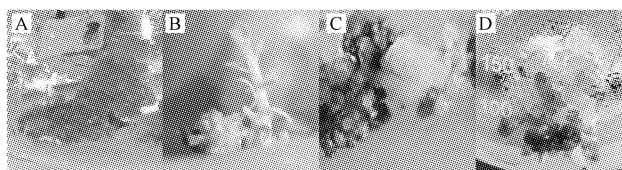


图 2 胚根愈伤组织的分化培养形成的不定芽情况

注:A. 胚根愈伤组织的分化培养形成的绿色芽点;B. 胚根愈伤组织分化形成的正常不定芽;C. 畸形胚;D. 玻璃化丛芽。

Fig. 2 Adventitious buds from the differentiation of radicle

Note: A. Green buds from the differentiation of radicle; B. Normal adventitious buds from the differentiation of radicle; C. Abnormal embryo; D. Vitrified shoots.

2.3 丛芽的生根诱导及植株再生

将愈伤分化形成的不定芽和种子苗茎尖形成的丛芽接种到生根培养基 A16~A20 上以后,表现一致,均在接种 7 d 后材料的下端切口处变黑并开始膨胀,15 d 后在切口处出现小白点,60 d 后长出 3~7 条根,根长大约 1~2 cm(表 6),呈辐射状(图 3A)。

内自然光条件下练苗 2 d,然后用镊子小心取出试管苗,洗净根上沾有的培养基,移栽到高压灭菌过的沙土中,每天适量定时补充水分,每周喷施 1~2 次稀释 10 倍的 MS 大量元素的营养液,并保证基质中没有积水,否则容易烂根。弱光下生长 10 d 后移至自然条件下生长。经练苗后幼苗在大田中可以正常生长(图 3C 和 D),移栽成活率 60%以上。

3 讨论与结论

对沙冬青属植物,尤其是蒙古沙冬青(*Ammopiptanthus mongolicus*)的组织培养和再生途径的探索,许多学者开展过相关方面的研究,也获得了一些成功的经验,蒋志荣等^[12-14]以无菌苗茎段为外植体,研究了不同激素对沙冬青组织培养生芽和生根的影响,认为培养基中 6-BA 含量越高,愈伤组织生长越快,且芽的分化率越高,但芽的伸长生长缓慢,GA(1.0 mg/L)对芽的伸长生长效果显著,含 0.2 mg/L IBA 的 1/3MS 改良培养基生根效果最好,从而产生完整植株,完成了植株再生。徐子勤等^[15]通过对沙冬青(*A. mongolicus*)未成熟的子叶进行离体培养,获得了愈伤组织,但未能诱导出植株分化。何丽君等^[16]采用无菌苗的子叶和胚轴接种于含不同激素成分的 MS 培养基上,经过 1 次诱导获得了再生

植株。这些研究为沙冬青属植物的组织培养和再生体系的建立提供了很好的借鉴。蔡超^[10]研究了影响新疆沙冬青(*A. nanus*)胚轴愈伤组织诱导的主要因素和不同激素对组培苗生根的影响,认为2,4-D是诱导新疆沙冬青(*A. nanus*)胚轴愈伤组织形成的关键因素,且2,4-D浓度为1.0 mg/L时效果最佳,而生根培养基以1/3MS+IBA 1.0 mg/L、1/3MS+IBA 0.5 mg/L效果最佳。

不同种的植物因其植物学特性和环境异质性等因素的影响,其组织培养需要的条件可能不尽相同,该研究以新疆沙冬青种子苗的胚根为材料研究愈伤组织诱导,结果表明,种子苗的胚根愈伤组织的诱导对激素的配比要求不严格,在各种激素配比的培养基上均有愈伤组织发生,仅在愈伤组织的诱导率上有一定差异,从而筛选出胚根愈伤组织诱导的最佳培养基MS+2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA,同时发现这个培养基上丛生芽的诱导率也最高,平均每棵苗上的丛生芽数为3.52个。对于新疆沙冬青的植株再生,可以通过胚根愈伤组织的脱分化以后的再分化获得,也可以由茎尖诱导的芽丛诱导生根后形成完整植株,从而在提高诱导效率的同时完成植株再生。在利用丛生芽来诱导生根时,筛选出诱导生根的最佳培养基为1/3MS+0.2 mg/L IBA,这个结果和蒋志荣等^[12-14]对沙冬青(*A. mongolicus*)诱导生根的最佳培养基相一致,而与蔡超^[10]的结果略有不同。在对胚根形成的愈伤组织进行分化诱导培养时,能够形成正常不定芽的诱导率极低,畸形胚和玻璃化现象严重,可能与培养基中激素的配比有关。

试验研究表明,新疆沙冬青这种生长于沙漠中的常绿珍稀濒危灌木是有希望通过离体培养方式获得完整再生植株的,这对于保存和保护这一珍稀濒危植物的种质资源,并在保护的基础上进行开发利用具有重要的参考价值 and 实践意义。

参考文献

- [1] 汪智军. 珍稀植物矮沙冬青的资源调查及其保护[J]. 中国野生植物资源, 2005, 5(4): 41-42.
- [2] 潘伯荣, 余其立, 严成. 新疆沙冬青生态环境及渐危原因的研究[J]. 植物生态学与地植物学学报, 1992, 16(3): 276-282.
- [3] 国家环境保护局, 中国科学院植物研究所, 中国珍稀濒危保护植物名录(第一册)[M]. 北京: 科学出版社, 1987: 1.
- [4] 李新蓉, 谭敦炎, 郭江. 迁地保护条件下两种沙冬青的开花物候比较研究[J]. 生物多样性, 2006, 14(3): 241-249.
- [5] 焦培培, 李志军. 濒危植物矮沙冬青开花物候研究[J]. 西北植物学报, 2007, 27(8): 1683-1689.
- [6] 杨期和, 葛学军, 叶万辉, 等. 矮沙冬青种子特性和萌发影响因素的研究[J]. 植物生态学报, 2004, 28(5): 651-656.
- [7] 于军, 焦培培. 聚乙二醇(PEG6000)模拟干旱胁迫抑制矮沙冬青种子的萌发[J]. 基因组学与应用生物学, 2010, 29(2): 355-360.
- [8] 鲁春芳, 尹林克, 牟书勇, 等. 新疆沙冬青叶片氨基酸和蛋白质的测试与分离以及抗冻蛋白的鉴定结果分析[J]. 武汉植物学研究, 2007, 25(5): 531-534.
- [9] 赵峰侠, 尹林克, 牟书勇. 新疆沙冬青(*Ammopiptanthus nanus*)渗透调节物质的季节变化与环境因子的关系[J]. 干旱区地理, 2008, 31(5): 665-672.
- [10] 蔡超. 濒危植物新疆沙冬青组织培养与植株再生[D]. 石河子: 石河子大学, 2008.
- [11] 王彦芹, 焦培培, 李彬, 等. 珍稀濒危植物新疆沙冬青的组织培养和植株再生[J]. 植物生理学通讯, 2010, 46(4): 375-376.
- [12] 蒋志荣, 王立, 金芳, 等. 沙冬青茎段组织培养技术[J]. 甘肃林业科技, 1996, 18(1): 70-71.
- [13] 蒋志荣, 安力, 王立, 等. 不同激素对沙冬青组织培养生根的影响[J]. 中国沙漠, 1997, 17(2): 209-211.
- [14] 蒋志荣, 金芳, 安力, 等. 沙冬青生根组织培养的研究[J]. 甘肃农业大学学报, 1997, 32(3): 244-246.
- [15] 徐子勤, 贾敬芬. 沙冬青愈伤组织对培养基的特殊要求和球形胚状分化结构的诱导[J]. 西北植物学报, 1997, 17(3): 259-263.
- [16] 何丽君, 慈忠玲, 孙旺. 珍稀濒危植物沙冬青 *Ammopiptanthus mongolicus* (Maxim.) (Cheng f.) 组织培养再生植株的研究[J]. 内蒙古农业大学学报, 2000, 21(4): 28-30.

(该文作者还有李彬, 单位为塔里木大学生命科学学院。)

Radicle Callus Culture and Plant Regeneration of Rare Endangered Plant *Ammopiptanthus nanus* (M. Pop.) Cheng f.

JIAO Pei-pei¹, WANG Yan-qin^{1,2}, QI Zheng-wei², ZHANG Li², KANG Shao-feng², YAN Jian-long², LI Bin²

(1. Xinjiang Production and Construction Corps, Key Laboratory of Protection and Utilization of Biological Resources in Tarim Basin, Alar, Xinjiang 843300; 2. College of Life Science, Tarim University, Alar, Xinjiang 843300)

Abstract: Taking aseptic seedling of rare endangered plant *Ammopiptanthus nanus* (M. Pop.) Cheng f. as the material, MS as the basic medium, effect of different hormones on the radicle callus and the crowd shoots formation were studied, and the best root induction medium was selected. The results showed that the best culture medium for callus inducing from radicle was MS+2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA, and it also can inducing the crowd shoots efficiently. The best culture medium for root inducing was 1/3MS+0.2 mg/L IBA.

Key words: *Ammopiptanthus nanus*; radicle callus; crowd shoots inducing; plant regeneration