

北海道黄杨再生体系建立研究进展

马少梅

(宁夏大学 农学院, 宁夏 银川 750021)

摘 要:参考国内外有关北海道黄杨再生体系建立的相关文献,对北海道黄杨下胚轴、叶片、茎段、茎尖等再生体系建立的方法和途径进行了综述;分析了北海道黄杨再生苗分化及增殖、生根及移栽所需要的适宜环境条件,指出了为建立高效再生体系应注意掌握外植体培养的激素种类、培养基成分及配比等关键技术。

关键词:北海道黄杨;愈伤组织;遗传转化;再生体系

中图分类号:S 687.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)13-0208-04

北海道黄杨(*Euonymus japonicus*)属卫矛科卫矛属常绿阔叶树种,原引自日本,引种后经过多年的栽植、驯化,已成为适合中国北方气候条件的优良树种。它具有极强的耐寒特性,能耐-23.9℃的低温,是我国华北地区抗寒性最好的常绿阔叶乔木;另外,入秋后成串红色的果实与绿叶相伴,观赏价值极高。但受到我国北方气候的影响,尤其在冬春季节,由于气候寒冷干燥且风沙大,植株干旱能力较差,在春季,北海道黄杨因抽干而叶片发黄,有些甚至出现死亡现象。利用转基因技术可以培育抗寒、抗旱新品种,为解决北海道黄杨的上述问题提供了有效途径。北海道黄杨组织培养的成功,为短时间内快繁苗木以满足市场需求提供了技术基础;同时,也可作为今后研究此类树种的植株再生及外源基因导入提供参考。同样,建立北海道黄杨的再生体系也是为了将来更好的开展北海道黄杨的遗传转化工作。因为在北海道黄杨遗传转化体系建立的过程中,再生体系的建立起着决定性的作用,而且建立高效离体再生体系是进行基因转化工作的前提。但目前国内外关于北海道黄杨再生体系建立报道较少,为此,这方面的研究工作还有很大的空间,仍需进一步深入研究和摸索。因此,努力探索北海道黄杨再生体系建立的几种途径,可以为今后顺利做好遗传转化工作奠定基础。

1 北海道黄杨再生体系的研究进展

1.1 不同外植体对北海道黄杨再生体系建立的影响

北海道黄杨再生体系的建立主要以种子、叶片、茎段以及它的茎尖作为外植体,通过愈伤组织诱导不定

芽,最后形成完整植株。

1.1.1 北海道黄杨下胚轴再生体系的建立 选取籽粒饱满的北海道黄杨种子(子叶期)作为接种材料,先用饱和洗衣粉水进行表面消毒,再用消毒液进行渗透消毒,然后用无菌水冲洗,最后在无菌条件下接种到相应的培养基上进行培养。当下胚轴长到2~3 cm时,切取下胚轴进行不定芽诱导。其基础培养基为MS培养基,同时附加不同的激素、蔗糖(30 g/L)、琼脂(6 g/L),调节pH到5.8。当前,有关利用北海道黄杨下胚轴建立再生体系而取得成功的报道很少,尚爱芹等^[1]研究结果表明,在诱导北海道黄杨下胚轴不定芽分化的过程中,6-BA和NAA的效果优于KT和IBA;下胚轴的不同部位不定芽的分化能力差异显著,最佳外植体为靠近子叶端的下胚轴部分,其分化率最高达63.64%;而且适宜不定芽分化的最佳培养基为MS+6-BA 1.5 mg/L+NAA 0.05 mg/L。不定芽未经过愈伤组织而直接产生于下胚轴的表皮或近表皮等表层细胞,这对于以下胚轴为外植体进行遗传转化工作非常有利。由此可以看出,不定芽的分化不仅与细胞分裂素和生长素的浓度有关,同时也与激素种类以及材料的诱导部位有很大关系。虽然北海道黄杨下胚轴再生体系的建立取得了一定的成功,但试验对于种子的发芽率、发芽时间、种子的前期相关处理、相关的培养条件以及试验的具体进展情况却没有指出。因为北海道黄杨的种子属于执拗型种子,不易发芽,在试验中如何选种,如何对种子进行预处理,如何使种子达到子叶期,以及相关的培养条件等应是利用下胚轴建立再生体系的关键所在,也是试验的前提工作。如果这些问题解决不了,后序工作将无法展开。因此,如何利用北海道黄杨的种子作为外植体建立再生体系,进而顺利的进行遗传转化,以期达到最佳的转化率,还需要更进一步的研究和探讨。

作者简介:马少梅(1977-),女,宁夏银川人,硕士,现主要从事植物生态资源与环境研究等工作。E-mail:may007@163.com.

收稿日期:2013-03-06

1.1.2 北海道黄杨叶片再生体系的建立 叶片主要来源于现有的无菌试管苗,将无菌叶片剪切成 $0.5\text{ cm}\times 0.5\text{ cm}$ 的小块接种到预先配置好的愈伤组织诱导培养基上进行培养。选用MS培养基添加不同浓度的6-BA或2,4-D,观察愈伤组织长势状况,确定最佳激素浓度。培养10 d后叶片边缘开始卷曲,呈现肉瘤状;20 d左右叶周围开始出现白色的愈伤组织,而且叶脉处愈伤生长最快,培养30 d后,愈伤组织逐渐褐化并停滞生长。当有大量颗粒状球形胚产生时可将其转移到芽诱导培养基上进行不定芽的诱导,此时由于愈伤组织正处于分化旺盛期,应适当降低激素用量或者去除细胞分裂素^[2]。李波等^[3]利用日本北海道黄杨的叶片作为外植体,通过不同浓度的2,4-D对其进行愈伤组织诱导,结果表明,2.0 mg/L 2,4-D对日本北海道黄杨叶片愈伤组织的诱导起关键作用,愈伤组织胚性细胞最多。但试验没有提到通过此种途径诱导的愈伤组织是否能够形成不定芽,需要多长时间能够建立再生体系,而且此种处理需要继代培养多少次,能够达到最佳效果的继代培养周期是多长,以及培养条件是光培养、暗培养还是光暗交替培养等一系列问题还没有解释清楚。然而在对于金边北海道黄杨再生体系建立的研究中,就已经成功的利用它的叶片进行了不定芽的诱导,虽然诱导率不高仅为4.67%,但可以为今后建立北海道黄杨的再生体系工作提供一个很好的借鉴。由于金边北海道黄杨和日本北海道黄杨是同科同属的,由此可以说明利用叶片作为外植体进行日本北海道黄杨建立再生体系,进而达到遗传转化的目的还是可行的,因此,如何顺利的完成转化工作,还有待于更进一步的摸索和探讨。

1.1.3 北海道黄杨茎段再生体系的建立 培养材料主要来源于现有的无菌试管苗,将不带腋芽的茎段切成约0.8~1.0 cm长的切段,然后接种于愈伤组织诱导培养基上进行培养,经过1周后注意观察愈伤组织的诱导和不定芽的形成情况。同时对照不同浓度的6-BA与不同浓度的2,4-D对茎段愈伤组织的诱导率及愈伤组织的形成时间、愈伤的疏密程度、色泽等有没有直接的影响;而且注意不同培养环境对愈伤组织的诱导率有没有影响;以及进行光、暗和光、暗交替培养对愈伤组织的诱导率及愈伤组织的质量有没有直接的影响。待有不定芽诱导出来后即可转入光培养,光照强度1 500~3 000 lx,每天光照12 h即可,等小苗长到一定程度就可以进行生根培养。对于利用茎段作为外植体进行愈伤组织诱导,进而建立再生体系的研究,国内还鲜见相关报道。虽然利用北海道黄杨的腋芽可以诱导成苗,建立无性系,但对于单纯的利用茎段建立再生体系却还存在一定的难度,如何攻克这一技术还需要更深入的研究,还需要在技术、方法、培养条件及选材上多下功夫。

1.1.4 北海道黄杨茎尖再生体系的建立 可以利用现有的无菌苗为作外植体,剥取带有下胚轴的茎尖约0.5 cm接种在相应的培养基上进行培养。前期先进行暗培养,然后再进行光培养。暗培养可以在培养室内用布或其它遮盖物挡住强光,光培养的光照时间为12 h/d,光照强度为1 500~2 500 lx。其基本培养基为MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.02 mg/L+CH 100 mg/L+蔗糖30 g/L+琼脂6 g/L,培养基pH为5.8。植物组织和器官的培养包括成熟胚及未成熟胚的离体培养、离体器官的培养。其中离体器官的培养包括根尖、茎尖、叶原基、花器官各部分原基或未成熟的花器官各部分以及未成熟的果实的培养^[4]。在培养器官范围内,应用茎尖培养技术加速植物无性繁殖已经取得了一定的成功,而且利用茎尖进行遗传转化工作也已经有了一些进展。有人曾利用棉花、小麦的茎尖作为外植体建立再生体系,进而进行遗传转化,并取得了成功。翁琴^[5]就通过对茎尖分生组织状态、培养基成分、激素配比、基因型等影响因素的研究,建立了海岛棉茎尖再生体系,并得到较高的成苗率。李明^[6]也曾利用农杆菌法转化棉花茎尖组织,并取得了成功。同时,利用植物的茎尖建立再生体系并进行遗传转化的方法在小麦茎尖组织遗传转化试验上也有报道,且都取得了成功。尽管如此,是否可以将此种方法运用在木本植物再生体系的建立以及遗传转化工作上,至今还没有大量的相关报道。但某些木本植物如桃、银杏、枇杷、核桃以及火炬树等已经可以运用它们的茎尖建立再生体系,而且遗传转化工作也已经取得了一定的成绩。因此可以证明,木本植物利用茎尖作为外植体建立再生体系,进而进行遗传转化的工作是可行的,而且这项技术也可以运用在北海道黄杨再生体系建立及遗传转化的试验上。因为木本植物利用茎尖建立再生体系进行遗传转化的成功实例不是很多,尤其在北海道黄杨的研究上更是少之又少。因此,今后利用茎尖技术建立北海道黄杨的再生体系及遗传转化工作还需要更深入的研究。

1.2 北海道黄杨再生苗的分化及增殖

当不定芽长到2~3 cm时转接到相应的分化培养基上进行分化培养,培养1周以后腋芽便开始萌动,并有小的丛生芽形成;培养10~15 d后,在基部切口处开始有愈伤组织形成;培养20 d后,每个接种茎段所形成的丛生状嫩梢都会明显抽长,然后将这些抽长的嫩芽切成长约1~2 cm的带腋芽的茎段,转接于芽增殖培养基进行增殖培养。其分化培养基为MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L+蔗糖30 g/L+琼脂6 g/L。培养周期为30 d;室内培养温度为 $(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$;光照时间12 h/d,光照强度为1 500~3 000 lx。

1.3 北海道黄杨再生苗的生根及移栽

将经过复壮的北海道黄杨再生苗接种到生根培养基上进行生根培养,相应的生根培养基为 $1/2MS+IBA$ $0.5\text{ mg/L}+NAA$ $0.1\text{ mg/L}+$ 蔗糖 $15\text{ g/L}+$ 琼脂 6 g/L ,约 1 周后根源基开始显露。当生根率达到 70% 以上,根长 1 cm,根数达到 3 条以上时则开始练苗。练苗时间为 7~10 d,之后便可以移栽到已配置好的移栽基质上进行培养,其相应的栽培基质为蛭石:珍珠岩:泥炭土=3:1:2。在进行试管苗移栽的过程中一定要注意其小环境温、湿度的控制,栽后初期 1~2 周内应遮光并保持高湿(80%~90%),但切记高温、高湿易感病害^[6]。后期逐渐降低湿度(70%~80%),增强光照,加强通风,温度一般保持在 20℃ 左右,中午温度高时用遮阳网遮光。

2 影响北海道黄杨再生体系的因素

目前,国内外关于北海道黄杨遗传转化的研究还没有更完善、更详尽的报道,因此,这项工作的进行还需要更深入的摸索和探讨。遗传转化的前提工作是建立再生体系,然而如何建立高效的离体再生体系却受到外植体的选择、激素种类和培养基成分及配比、培养条件、培养周期等因素的制约。

2.1 外植体的影响

对于外植体的选择,既要考虑选材时间,又要考虑选材部位。无论对于叶片还是茎段,材料越嫩、越新鲜、木质化程度越低、长势越旺盛,其愈伤组织诱导率越高,进而形成不定芽的可能性就越大。同时,选材部位也很重要,如利用下胚轴建立再生体系的过程中,越靠近子叶端的下胚轴,其形成不定芽的诱导率就越高,同时对材料的规格也有一定的要求,并不是材料越大越好。此外,对于叶片诱导来说,材料的放置方式及大小对再生体系的建立也有着一定的影响,其叶背向上和叶面向上产生愈伤组织的结果也不一样,这要依据材料而定。

2.2 培养基的影响

对于培养基而言,再生体系的建立与否,培养基起了至关重要的作用。如果没有合适的基础培养基,以及没有合适的激素配比就诱导出不定芽,从而便不能建立高效的离体再生体系。比如许多材料中都提到用 2,4-D 易诱导愈伤组织,而且易形成不定芽,但 2,4-D 浓度过高、过低都不会达到理想的效果。但是,在北海道黄杨愈伤组织诱导试验中,如果 6-BA 的浓度使用适当,其诱导愈伤组织要比同深度的 2,4-D 诱导的效果要好,而且形成不定芽的可能性会更大。由此可以看出,激素的种类及其浓度对比对不定芽的诱导起了相当重要的影响。除了基础培养基、生长调节剂的影响外,其附加成分如糖分的浓度、pH 值的高低都会影响到再生体系建立的成功与否。

2.3 培养条件及培养周期的影响

培养条件和培养周期则是影响再生体系建立的关键因素。愈伤组织诱导和增殖的最适温度为 $(25\pm 2)^\circ\text{C}$,不同物种愈伤组织诱导和增殖所要求的温度不同,一般品种要求在 20~30℃ 之间,但其分化的最适温度为 24~28℃,过高或高低对器官发生的数量和质量均有影响^[7]。在愈伤组织的诱导过程中,光对愈伤组织的诱导和增殖及分化既有促进作用,又有抑制作用。光的作用反应在光照时间、方式、强度及波长上。一般光照强度为 1 500~2 500 lx^[8]。然而,对于北海道黄杨再生体系的建立来说,前期愈伤诱导应该进行暗培养,对于后期继代可以进行适度光照培养,当然也要依照愈伤的质量情况来定。

3 结语

由于北海道黄杨四季常青,且具有极强的耐寒、耐旱特性,特别适合于我国北方冬季寒冷、干旱的地区栽植。但由于受到春季气候寒冷干燥的影响,北海道黄杨易出现叶黄、抽干现象,从而对北海道黄杨的正常生长造成了一定影响。为了解决此现象,需要利用遗传转化手段培育一种极具抗寒、抗旱特性的新品种。北海道黄杨新品种的培育成功,将会为园林绿化增添一种优势树种,从而成为园林景观中的一个亮点。同时,为城市的美化、绿化带来不可比拟的生态效应。但由于目前国内外关于北海道黄杨遗传转化的研究几乎没有多少相关的报道,而且此方面的进展还只是处于萌动状态,其离体高效再生体系建立的技术还不够成熟。在利用下胚轴作为外植体进行遗传转化的过程中,虽然可以产生再生芽,但是下胚轴在应用时存在着数量有限、切口小、再生芽数量少以及转化效率低等局限性,而且试验的最终转化率仅为 0.08%^[1]。因此该方面的研究还有很大的空间,对于今后如何提高北海道黄杨的遗传转化效率,将来还有待于更深入的研究。

参考文献

- [1] 尚爱芹,蔡汉,闫晓洁,等.北海道黄杨下胚轴的离体培养及植株再生[J].中国农业科学,2005,38(12):2502-2507.
- [2] 曹夜义,刘国民.实用组织培养教程[M].兰州:甘肃科学技术出版社,1996:78-80.
- [3] 李波,董云波,熊德志.北海道黄杨叶片愈伤组织形成及细胞学研究[J].种子,2007,26(11):45.
- [4] 韦三立.花卉组织培养[M].北京:中国林业出版社,2001:79-81.
- [5] 翁琴.海岛棉茎尖再生体系的建立及农杆菌介导抗虫基因转化研究[J].新疆农业大学学报,2007,30(4):63-67.
- [6] 李明.农杆菌法转化棉花茎尖组织的初步研究[J].中国棉花,2007(5):21-23.
- [7] 李合生.现代植物生理学[M].北京:高等教育出版社,2006:40-45.
- [8] 胡尚连,王丹.植物生物技术[M].成都:西南交通大学出版社,2004:54.

野韭菜的植物学特性及其栽培技术

刘朝安¹, 曾文丹², 武鹏¹, 李立志¹, 邓俭英¹, 万正林¹

(1. 广西农业科学院, 广西南宁 530007; 2. 广西农业科学院 经济作物研究所, 广西南宁 530007)

中图分类号: S 633.3 文献标识码: B 文章编号: 1001-0009(2013)13-0211-01

野韭菜属百合科葱属多年生草本植物, 别名山韭菜、宽叶韭、观音菜等, 主要分布于海拔 800 m 以上的山区。野韭菜富含多种营养元素, 同时富含粗纤维, 此外, 野韭菜还有温中行气、散血解毒、保暖、健胃整肠等功效。但野韭菜种植长期局限于小农经营模式, 野韭菜开发利用的力度不够, 且与其相关的研究十分缺乏。为此, 作者在前人研究的基础上, 对广西及周边地区的野韭菜种质资源进行了实地调研, 收集了部分野韭菜种质资源并进行驯化栽培, 旨在为野韭菜的开发利用提供技术参考。

1 野韭菜的植物学特性

野韭菜根系以肉质根为主, 主根长约 20 cm 左右, 上附有纤细的吸收根, 分布浅。具有根状茎, 鳞茎, 外皮膜质、白色。叶片基生, 条形至宽条形, 根据其叶宽可分为: 巨宽叶野韭菜, 叶宽 > 3.0 cm; 宽叶野韭菜, 叶宽 2.0~3.0 cm; 窄叶野韭菜, 叶宽 < 2.0 cm; 叶长 30~100 cm, 叶片绿色, 具明显中脉, 在叶背突起。四季均可抽出花苔, 圆柱形而稍扁, 两侧有微棱, 高 10~50 cm。

第一作者简介: 刘朝安(1986-), 男, 广西浦北人, 助理农艺师, 现主要从事蔬菜新品种引进和选育及示范推广工作。E-mail: lcalmy369@sina.com.

责任作者: 万正林(1983-), 男, 湖北荆州人, 硕士, 助理研究员, 现主要从事南方蔬菜设施园艺及蔬菜新品种选育与示范推广工作。E-mail: wanzhenglin0700227@163.com.

基金项目: 广西自然科学基金资助项目(2011GXNSFB018033); 广西农业科学院科技发展基金资助项目(201001)。

收稿日期: 2013-05-17

伞形花序, 近圆球形, 多数花密集, 花白色。子房能膨大, 调研发现, 在广西、云南地区不能正常形成种子。

2 野韭菜的栽培技术

整地与施肥: 野韭菜根系分布较浅, 主要分布在距地表 10~20 cm 处, 地上部长势旺盛, 宜选择疏松、肥沃、保水能力强的田块。种植前, 深翻田地, 并全田撒施腐熟有机肥 1 500~2 000 kg、复合肥(15%-15%-15%) 50 kg, 用旋耕机将肥料和泥土充分搅拌均匀。

繁殖: 由于野韭菜种子不能正常形成, 所以主要采用分株繁殖。当植株具有 2~3 个以上分蘖时即可分株。在广西地区四季均可进行, 分株后及时淋水。定植的株行距为(20~30) cm×(20~30) cm。

田间管理: 野韭菜性喜荫, 较强光照直射会使植株长势减弱、产量下降, 长时间强光照直射会导致野韭菜死亡。因此, 定植后一定要覆盖 50% 折光率的遮阳网遮荫, 同时常淋水保持土壤湿润, 保持田间持水量在 70% 以上。结合淋水分次追肥, 多为速效性氮肥, 一般每收割 1 次, 追施尿素 10 kg 或复合肥 10~15 kg。为保证产品质量, 提高产量, 一般每季每 667 m² 还追施 500~1 000 kg 的腐熟有机肥。

采收: 以采收嫩叶为主的野韭菜, 当植株大部分叶片长至正常大小时应及时采收, 以保证嫩叶质量。一般每隔 20~30 d 采收 1 次, 采收时离地面 1~2 cm 处的叶片基部割取, 一般 667 m² 产嫩叶 2 000~3 000 kg。以收获花苔为主的野韭菜, 当花苞尚未开放之前及时采收, 一般 667 m² 产花苔 800~1 000 kg。

Research Advances on the Establishment of Regeneration System of *Euonymus japonicus*

MA Shao-mei

(School of Agronomy, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021)

Abstract: Based on the published papers about the establishment of regeneration system of *Euonymus japonicus* in the world, the methods and ways of the regeneration system of *Euonymus japonicus* from hypocotyl, leaves, stems and stem tip were reviewed, and the suitable conditions for differentiation, proliferation, rooting and transplanting were analyzed. The key technologies including hormone kinds, medium components and ratios for efficient regeneration system were put forward.

Key words: *Euonymus japonicus*; callus; genetic transformation; regeneration system