

天津野生白刺再生体系的建立

何斌琼¹, 杨海萍², 朱文碧², 杨静慧², 刘艳军², 穆俊丽³

(1. 西南大学 园艺学院, 重庆 400716; 2. 天津农学院 园艺系 天津 300384 3. 西北农林科技大学 园艺学院, 杨凌 陕西 712100)

摘要:以天津野生白刺为材料,通过不同激素、不同外植体、不同含量的MS培养基和赤霉素的筛选试验建立了白刺再生体系。结果表明:以初春时节白刺幼嫩茎段为外植体建立无菌系,以破坏生长点的茎尖为外植体进行再生;最适芽增殖培养基为MS+BA 3.0 mg/L+NAA 0.4 mg/L,最适增粗培养基为1/2MS+BA 1.0 mg/L+0.2 mg/L IAA,最适芽再生培养基是MS+BA 3.0 mg/L+NAA 0.4 mg/L+GA 3.0 mg/L,再生率为94%。最适伸长培养基为MS+BA 1.0 mg/L+IAA 0.3 mg/L,最适生根培养基为1/2MS+IBA 0.5 mg/L。

关键词:白刺;组织培养;再生

中图分类号:S 793.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)10-0159-03

全世界盐碱地面积近10亿hm²,约占世界陆地面积的7.6%^[1]。目前我国各类盐碱地面积约0.346亿hm²,是世界盐碱地大国之一^[2]。天津市共有盐渍化土壤422 038.7 hm²,占全市总面积的38.9%;盐渍化耕地面积为20.73万hm²,几乎占全市耕地面积的一半,为全国各省市盐碱地比例最高的一个地区^[3],因此成为影响本市农业生产的最大障碍因素。大面积盐渍荒地的开发利用和灌区土壤盐渍化的防治是解决21世纪解决人口、粮食、资源和环境压力等问题的一条重要途径,具有重要的现实意义。然而通过排盐工程改良盐碱地耗资巨大,且“三北”地区严重缺水,无法进行引淡排盐或借雨洗盐。因此,筛选和培育抗盐植物品种,提高作物本身的耐盐能力,是利用盐碱地经济而有效的方法^[4]。

白刺(*Nitraria tangutorum*)为蒺藜科(Zygophyllaceae)白刺属(*Nitraria*)落叶矮生小灌木,亦称地枣、沙樱桃等。全世界有12个种,我国有8种,大部分分布在西北干旱、高寒地区及北方沿海盐渍地带。其适应性极强,极耐盐碱,可在土壤含盐量达2%的地域正常生长。白刺根系发达,生长较快,覆盖能力极强,是固土护坡的优

良地被植物^[5]。根据在山东省滨州市沿海地区栽培试验测定,在土壤含盐量1%的地片上,栽植白刺3a后,地表(0~20 cm)土层含盐量降到了0.4%,降盐效果十分明显^[6]。此外,白刺的果实含多种营养成分和丰富的微量元素,具有极高的营养和药用价值^[7]。近年来随着人为的开荒造地,超载放牧,原已十分脆弱的生态环境遭到破坏,加剧了白刺自然更新的难度,白刺资源量减少,生长衰退,结果量减少,防风固沙保土能力降低,这种掠夺式的利用对白刺资源的建设和发展利用十分不利。因此,进行白刺离体繁育技术研究,对野生白刺资源良种选育及资源开发具有十分重要的现实意义。

目前有关白刺组织培养的报道比较少,再生和转基因方面还是一片空白,试验通过组培技术,建立白刺的高效再生体系,为今后的基因转化和多倍体诱导奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

所用白刺取自天津市大港区野外,将植株整株挖出后,带土移栽于天津农学院温室,成活后备用。

1.2 试验方法

1.2.1 无菌苗体系的建立和增殖培养基的筛选 取初春新萌发的带腋芽茎段作外植体,经流水冲洗4h后,用75%乙醇浸泡30s,0.1% HgCl₂溶液表面灭菌10~12min,无菌水冲洗浸泡4~5次后接种在MS+IAA 1.0 mg/L的启动培养基上萌发,获得无菌苗。取在启动上培养15d后的无菌苗,分别接种到含有不同激素浓度的MS分化培养基上。经过30d后统计分析。外植体的增殖系数的计算为:总芽数/总接种数。

1.2.2 增粗培养基的筛选 取萌发15d后的白刺无菌苗分别接种到含有不同激素浓度的MS和1/2MS分化培

第一作者简介:何斌琼(1983-),女,在读硕士,现主要从事园林植物生理生态研究工作。

通讯作者:杨静慧(1961-),女,甘肃兰州人,教授,硕士生导师,现主要从事园艺植物栽培育种与生物技术工作。E-mail: jinghuiyang2@yahoo.com.cn

基金项目:天津市自然科学基金资助项目(05YFJMJC14400);天津市科委科技支撑计划资助项目(07ZCKFNC01100, 08ZCKFNC01200);天津市农业科技成果转化与推广资助项目(0504018)。

收稿日期:2010-01-31

培养基上。再生苗粗壮程度的计算是以每块外植体上随机测得 1 个再生芽的茎粗和的平均数, 计作平均茎粗。每组取 40 个芽, 培养 15 d 后统计分析。

1.2.3 不同组织再生 分别取在增粗培养基(1/2MS+BA 1.0 mg/L+IAA0.2 mg/L)上培养 15 d 后的无菌苗幼嫩叶片、茎段和长度为 2~3 mm 的茎尖为外植体, 茎尖生长点用解剖针破坏, 得到破坏生长点的茎尖组织, 分别接种到再生培养基上。附加 3%蔗糖、0.7%琼脂, pH 5.8。培养温度控制在(25±2)℃, 光照时间 12 h/d, 光照强度 2 000 lx。培养 30 d 后统计再生率。

1.2.4 再生培养基的筛选 取在增粗培养基(1/2MS+BA 1.0 mg/L+IAA 0.2 mg/L)上培养 15 d 后的无菌苗茎尖, 破坏生长点后分别接种于不同浓度的赤霉素(1.0、2.0、3.0、4.0 mg/L)的再生培养基上。观察培养 30 d 后统计再生率。

1.2.5 生根培养基的筛选 将再生芽转入伸长培养基(MS+BA 1.0 mg/L+IAA 0.3 mg/L)中, 待芽长到 2~3 cm 时, 转入不同浓度的生根培养基中培养生根, 观察 30 d 后统计分析。

2 结果与分析

2.1 取材时间和部位与无菌苗和快繁体系的建立

由于秋冬季节白刺进入休眠期, 老枝体内衍生出大量内生菌, 一般的表面杀菌程序很难处理, 污染程度比较严重, 无菌体系的建立存在很大问题。因此取初春刚萌发的新生芽作外植体, 很大程度上避免的内生菌的污染。通过对较老茎段和幼嫩茎段萌芽率的比较, 幼嫩茎段明显高于较老茎段, 所以初春刚萌芽的幼嫩带芽茎段是最理想的外植体材料。

表 1 白刺增殖培养基的筛选				
取样时间	不同培养基配方	接种芽数/个	芽生长状况	增殖系数
春季 3 月	MS+BA 2.0 mg/L+NAA 0.4 mg/L	40	芽少	2.8
	MS+BA 3.0 mg/L+NAA 0.4 mg/L	40	芽长得较健壮	4.9
	MS+BA 2.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L	40	芽少且长势较弱	3.0
	MS+BA 3.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L	40	芽多, 但长得较弱	4.6
秋季 9 月	MS+BA 2.0 mg/L+NAA 0.4 mg/L	40	芽较少, 且长势很弱	1.4
	MS+BA 3.0 mg/L+NAA 0.4 mg/L	40	芽多, 但黄化现象较严重	2.1
	MS+BA 2.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L	40	芽较少, 叶枯黄, 长势很弱	1.2
	MS+BA 3.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L	40	长势极弱	2.0

从表 1 可以看出, 秋季过后取的外植体在培养基中的长势明显低于春季的组培苗。随着 BA 浓度的增加白刺芽的增殖系数也增大, 但以 BA 2.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L 激素组合的芽质量最好。在 NAA 浓度 0.3 mg/L

时, 芽生长势较弱, 不利于成活。所以, 该试验最佳的激素配方是 MS+BA 2.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L。

2.2 MS 培养基与芽的增殖和茎的增粗生长

由于白刺的无菌苗茎段比较纤细, 生长势极弱, 在继代培养中, 不容易成活, 因此, 对其进行增粗培养, 使其茎段粗壮, 有利于无菌苗的成活。

从表 2 可以看出, 采用全量 MS 培养基比 1/2MS 培养基的芽分化系数高; 但 1/2MS 培养基的再生苗的茎粗明显高于全量 MS 培养基。同时, 经观察发现采用 1/2MS 培养基的再生苗的生长速度明显快于使用 MS 培养基。因此, 较理想的增粗培养基的配方为 1/2MS+BA 1.0 mg/L+IAA 0.2 mg/L。

表 2 MS 培养基与芽的分化和茎的增粗生长				
不同培养基配方	接种芽数	分化系数	平均株高/cm	平均茎粗/mm
1/2MS+BA 1.0 mg/L+IAA 0.2 mg/L	40	8.3	3.25	0.63
1/2MS+BA 0.5 mg/L+IAA 0.2 mg/L	40	5.8	2.80	0.52
MS+BA 1.0 mg/L+IAA 0.2 mg/L	40	9.6	2.15	0.47
MS+BA 0.5 mg/L+IAA 0.2 mg/L	40	8.9	1.70	0.31

2.3 不同外植体与芽的再生

外植体的选择对组织培养至关重要, 不同外植体的芽诱导率明显不同。从表 3 可以看出, 在以白刺的破坏生长点的茎尖、茎段和叶片为外植体接种于 MS+BA 3.0 mg/L+NAA 0.4 mg/L+GA 3.0 mg/L 的培养基上经 30 d 后观察发现, 以破坏生长点的茎尖的再生芽数最高, 达 92.5%; 茎段次之, 为 37.5%; 叶片最低为 5%。

表 3 不同外植体与芽的再生			
不同组织部位	接种数/个	再生芽数/个	再生率/%
叶片	40	2	5
茎段	40	15	37.5
破坏生长点的茎尖	40	33	82.5

2.4 赤霉素与芽的再生

以破坏生长点的茎尖为外植体, 通过在 MS+BA 3.0 mg/L+NAA 0.4 mg/L 的培养基中添加不同浓度的赤霉素(1.0、2.0、3.0、4.0 mg/L), 观察发现茎段切口处均能再生出小芽, 且随着赤霉素浓度的增高, 再生率也增高。但以赤霉素浓度为 3.0 mg/L 时, 芽的质量最好。在赤霉素浓度为 4.0 mg/L 时, 芽出现不同程度的玻璃化。因此, 最适再生培养基为 MS+BA 3.0 mg/L+NAA 0.4 mg/L+GA 3.0 mg/L, 其再生率为 94%。

表 4 赤霉素与芽的再生			
不同培养基配方	接种再生芽数/个	再生芽状况	再生率/%
MS+BA 3.0 mg/L+NAA 0.4 mg/L+GA 1.0 mg/L	40	再生芽相比较少	81
MS+BA 3.0 mg/L+NAA 0.4 mg/L+GA 2.0 mg/L	40	再生芽质量一般	87
MS+BA 3.0 mg/L+NAA 0.4 mg/L+GA 3.0 mg/L	40	再生芽较多且芽质量较好	94
MS+BA 3.0 mg/L+NAA 0.4 mg/L+GA 4.0 mg/L	40	再生芽最多, 但出现不同程度的玻璃化	100

2.5 生根培养基的筛选

将再生芽转入伸长培养基: MS+BA 1.0 mg/L+IAA 0.3 mg/L 中,待芽长到 2~3 cm 时,转入不同浓度的生根培养中生根。从表 5 中可以看出,当生根培养基为1/2MS+0.5 mg/L IBA 时,平均每株苗生 5 条根,且每条根都比较健壮,有利于移栽成活。



图 1 增殖培养基



图 2 增粗培养基

表 5 生根培养基的筛选

不同培养基配方	接种再生芽数/ 个	生根状况	平均生根条数/ 条
MS+IBA 0.5 mg/ L	40	根条数少	1.5
MS+IBA 1.0 mg/ L	40	根条数少且不健壮	2.0
1/2MS+IBA 0.5 mg/ L	40	根系发达且健壮	5.0
1/2MS+IBA 1.0 mg/ L	40	须根多但不健壮	6.0

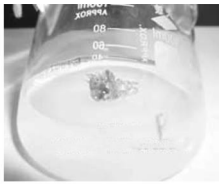


图 3 再生培养基

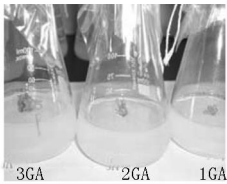


图 4 赤霉素含量对芽再生的影响

3 讨论

3.1 不同外植体与再生率

外植体的选择对组织培养至关重要,不同外植体的芽诱导率明显不同。该试验中以破坏生长点的茎尖的再生芽率最高,与该组织中分生组织较多有关。茎尖大量的分生组织,有利于芽的再生。刘玉冬,杨静慧等^[12]的研究中采用破坏生长点的茎尖,也得到了较高的再生。

3.2 激素对白刺组培苗生长势的影响

表2 中全量MS 培养基上培养白刺比1/2MS培养基的芽分化系数高,但1/2MS培养基的再生苗的茎粗和伸长生长明显高于全量 MS 培养基,这主要与低盐有利于植物细胞生长有关^[9]。

3.3 赤霉素在组织培养中的作用机理

赤霉素能促进细胞的生长与分裂,促进茎伸长生长,在张红晓的研究中提到赤霉素能提高增殖倍数和不定芽的生长量,促进试管苗生长健壮^[11]。该试验中,调节不同浓度的赤霉素,不仅增殖倍数有了很明显的提高,而且在切口处再生出了新芽,说明赤霉素对植物组织的再生有一定的作用。

3.4 增殖培养基的差异

何正伦^[7-8]等和张红晓^[11]所筛选出的增殖培养基的

配方与该试验结果相差较远,分析原因可能是所选白刺的品种不同和外植体材料不同所至。在后期的试验中,需对不同的外植体做进一步的对比试验。

参考文献

[1] Epstein E. Better crops for food [M] . London: Pit man, 1983: 61.
[2] 张建锋, 张旭东. 世界盐碱地资源及其改良利用的基本措施[J] . 水土保持研究, 2005, 12(6): 28-30.
[3] 武庆树, 郭云峰. 天津市盐碱地改良思路[J] . 农业环境与发展, 2004, 21(2): 32-33.
[4] 谢承陶. 盐渍土改良原理与作物抗性[M] . 北京: 中国农业出版社, 1993: 184-185.
[5] 王宁. 白刺资源及开发前景[J] . 陕西林业科技, 2001(1): 17-18, 31.
[6] 高志海, 崔建国, 刘胜龙, 等. 民勤沙区白刺果实性状的变异性研究[J] . 中国沙漠, 1998, 18(3): 224-248.
[7] 何正伦. 白刺的离体繁殖[J] . 甘肃林业科技, 1989(2): 52-53.
[8] 何正伦. 白刺的离体培养技术的研究[J] . 甘肃林业科技, 1998(3): 6-9.
[9] 植物组织培养教材[M] . 李俊明, 译. 北京: 中国农业大学出版社, 1998: 20-24.
[10] 张晓静, 牛伟志, 刘春杰. 野生白刺人工栽培技术及开发利用[J] . 中国野生植物资源, 2008(3): 64-68.
[11] 张红晓, 康向阳, 沈燕, 等. 白刺的组培技术的研究[J] . 经济林研究, 2003, 21(4): 60-63.
[12] 刘玉冬, 杨静慧, 刘艳军, 等. 提高八楞海棠遗传转化植株再生率技术的研究[J] . 西北农林科技大学学报, 2005, 33(2): 99-102.

Regeneration System of Tianjin Wide *N. tangutorum*

HE Bin-qiong¹, YANG Hai-ping², ZHU Wen-bi², YANG Jing-hui², LIU Yang-jun², MU Jun-li³

(1. College of Horticulture and Landscape Southwest University, Chongqing 400716; 2. Department of Horticulture, Tianjin Agricultural College, Tianjin 300884; 3. College of Horticulture, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract: The wild *N. tangutorum* of Tianjin was selected as the material of this experiment. According to the selection experiments of different concentrations of hormone, different explants, contents of MS culture media and gibberellin, the regeneration system was built up. The results showed that the early spring tender stems were the best explants for the asepsis system, and the damaged caudex tip were used as the explant to regenerate. The best multiplication culture medium was MS+BA 3.0 mg/L+NAA 0.4 mg/L, the best culture medium for aggrandizement was 1/2MS+BA 1.0 mg/L+0.2 mg/L IAA, the best culture medium for regeneration was MS+BA 3.0 mg/L+NAA 0.4 mg/L+GA 3.0 mg/L, the regeneration rate was 94%. The best culture medium for elongation was MS+BA 1.0 mg/L+IAA 0.3 mg/L, and the best culture medium for rooting was 1/2MS+IBA 0.5 mg/L.

Key words: *N. tangutorum*; tissue culture; regeneration