

文章编号:1000-8551(2005)06-441-04

梭梭(*Haloxylon ammodendron*)愈伤组织诱导及植株再生

施茜¹ 孙振元² 卢琦³

(1. 甘肃省治沙研究所,甘肃 武威 733000;2. 中国林业科学研究院林业研究所/国家林业局林木培育重点实验室,北京 100091;
3. 中国防治荒漠化研究与发展中心/中国林业科学研究院,北京 100091)

摘要:以梭梭(*Haloxylon ammodendron*)无菌苗的茎尖、子叶、下胚轴为材料进行愈伤组织诱导,培养基中单独添加1~3mg/L的2,4-D或与0.5mg/L的6-BA配合使用,均能成功诱导出愈伤组织,但在愈伤组织诱导起始阶段,用含2,4-D 2.0mg/L、BA 0.5mg/L的培养基效果较好;在2,4-D 1.0mg/L、BA 0.5mg/L的分化培养基上经过两次连续继代培养后,在含BA 0.5mg/L、IAA 1.0mg/L的培养基上愈伤组织生长状态最好,并从茎尖诱导的愈伤组织上获得了再生植株。

关键词:梭梭;组织培养;胚性愈伤;植株再生

CALLUS INDUCTION AND PLANT REGENERATION IN *Haloxylon ammodendron*

SHI Qian¹ SUN Zhen-Yuan² LU Qi³

(1. Gansu Desert Control Research Institute, Wuwei, Gansu, 733000;
2. Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry/Key Laboratory of Forest Cultivation, State Forestry Administration, Beijing, 100091;
3. China National Research and Development Center for Combatting Desertification / Chinese Academy of Forestry, Beijing, 100091)

Abstract: Protocols for *in vitro* plant regeneration via callus devised from shoot tip were established in an important desert plant, *Haloxylon ammodendron*. Callus induction has been achieved from cotyledons, hypocotyls and shoot tip explants. The highest frequency of callus induction and greatest amount of callus proliferation occurred on MS medium supplemented with 2.0mg/L 2,4-D combined with 0.5mg/L BA. Followed two generations of subcultures on MS medium supplemented with 1.0mg/L 2,4-D and 0.5mg/L BA. The highest frequency of embryogenic callus induction was achieved on MS medium supplemented with 1.0mg/L IAA combined with 0.5mg/L BA. At the same time, *in vitro* plant regeneration occurred from callus devised via shoot tip explants.

Key words: *Haloxylon ammodendron*; tissue culture; embryogenic callus; plant regeneration

梭梭(*Haloxylon spp.*)是中亚荒漠中分布最广的荒漠植被类型,是戈壁沙漠最优良的防风固沙植被之一。多年来由于人们对其根部寄生的肉苁蓉(*Cistanche deserticola*)的盲目采挖,造成梭梭的自然更新困难、区域性发展滞缓濒危,已被列为国家三级濒危保护植物^[1,2]。梭梭主要靠种子繁殖,自花结实率低,种子发芽保存期短,去掉果翅的种子1年后发芽率降到40%,两年后会降到10%,因而开展梭梭无性繁殖方法研究十分必要^[3,4]。目前,梭梭枝条扦插尚未有成功的报道,梭梭属植物组培方面的研究也很少,仅限于Ramirez对无叶梭梭(*H. aphyllum*)胚性细胞的初步诱导;Paveen以*H. aphyllum*无菌苗带芽茎尖为试材进行离体培养,但均处于实验室阶段^[5,6]。本研究以梭梭(*H. ammodendron*)为材料,通过愈伤组织诱导获得再生植株,为保护和繁衍这一珍稀濒危植物种,加速其在植物细胞工程、基因工程等相

收稿日期:2005-07-11

基金项目:国家“948”项目(No. 2001-03)、“十五”攻关(No. 2000BA517A09),国家转基因植物研究与产业化专项(JY03-B-28-02),甘肃省科学事业费(QS031-C31-03)

作者简介:施茜(1964-),女,浙江永康人,高级工程师,从事荒漠植物生理生态学研究。孙振元为通讯作者,Email: sunzy@caf.ac.cn

关学科上的应用提供依据。

1 材料和方法

1.1 无菌材料的获得

试验用种子于 2003 年 11 月采自甘肃省民勤治沙综合试验站。挑选成熟度好、饱满的种子,用流水冲洗干净后,用 70 %乙醇浸泡 3min,0.1 %升汞溶液灭菌 8 ~ 10min,无菌蒸馏水清洗 4 ~ 5 次。灭菌以后的种子接种到垫有潮湿滤纸的培养皿上。黑暗条件下培养 8h 后便可以观察到芽的萌动,3 ~ 6d 后,无菌苗长至 3 ~ 5cm 备用。

1.2 愈伤组织培养

试验所采用的基本培养基是 MS 培养基,根据实验设计的不同附加各种激素成分,每升培养基加蔗糖 30g,琼脂 7g,各种培养基的 pH 值高压灭菌前均调为 5.8。培养室温度为 25 ± 2 ,光照强度 2000lx,光照时间 $16\text{h} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

1.2.1 不同外植体的脱分化差异 将上述无菌苗茎尖、子叶和下胚轴切成 2 ~ 3mm 长的小段,接种到附加 1mg/L 2,4-D 的 MS 培养基上,定期观察愈伤组织产生的时间、生长速度、颜色、质地等,25d 后统计愈伤组织诱导率,记录愈伤组织生长情况。

1.2.2 不同生长素对梭梭愈伤组织诱导的影响 以无菌苗子叶为试材接种到附加不同浓度 2,4-D、NAA、IBA 的 MS 培养基上,观察方式同上。

1.2.3 不同浓度配比的 2,4-D 和 6-BA 对愈伤组织诱导的影响 以上述试验结果为基础,选择愈伤组织诱导效果好的生长调节物质 2,4-D 和 6-BA 进行不同浓度配比试验,观察方式同上。

1.3 愈伤组织的选择性继代和植株分化

采用正交试验设计,取生长稳定、继代培养 25 ~ 30d,不同外植体来源的愈伤组织接种到 MS 附加 IAA (0.2、0.5 和 1.0mg/L); 6-BA (0.2、0.5 和 1.0mg/L); 2,4-D (0.5 和 1.0mg/L) 的培养基上。定期观察愈伤组织诱导和分化情况,25d 后统计植株再生率。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的诱导

2.1.1 不同外植体的脱分化差异

根据初步试验并参考前人的研究结果^[6],本试验选择 MS 为基本培养基并附加 1.0mg/L 2,4-D,对不同外植体的脱分化差异进行比较(表 1)。结果表明,不同外植体开始产生愈伤组织的时间和形成愈伤组织的形态有所不同,接种 5d 后,所接种的子叶外植体切段两端开始透明,逐渐膨大,7d 后肉眼可见愈伤组织,培养 20d 后外植体可完全被浅绿色愈伤组织所包围。茎尖外植体开始产生愈伤组织的时间较子叶外植体晚且持续时间长,8 ~ 10d 后可看见较紧密的绿色或浅绿色愈伤组织。下胚轴 8 ~ 10d 后开始在切段两端形成愈伤组织,但愈伤疏松,白色或浅黄色,生长速度也较慢。三者相比,以子叶为外植体产生的愈伤组织生长速度最快。但不论是从子叶、下胚轴还是茎尖上,接种 20d 后愈伤组织诱导率都达到了 100 %。

表 1 不同外植体的脱分化差异比较

Table 1 Differentiation of callus induction from different explants

外植体来源 source of explants	出愈时间 callus initiation (d)	愈伤组织诱导率 callus inducing rate (%)	愈伤组织质地 callus quality
子叶 cotyledon	5 ~ 7	100	浅绿色、紧密 light green; compact
茎尖 shoot tip	8 ~ 10	100	绿色、浅绿,较紧密 green, light green; relatively compact
下胚轴 hypocotyl	8 ~ 10	100	白色、淡黄,疏松 white, yellowy; incompact

2.1.2 不同生长素对愈伤组织诱导的影响 从外植体诱导和建立愈伤组织都需要植物生长调节剂,多数情况下通过加入 2,4-D 获得愈伤组织^[7]。由表 2 可见,生长刺激素种类和浓度对梭梭愈伤组织的产

生有较大的影响。所试的 3 种生长素都可以促进梭梭愈伤组织的产生,但是作用程度有所不同。其中 IBA 诱导愈伤组织所需的时间最短,诱导率也较高,但接种于 IBA 培养基中的愈伤组织液泡化程度较重,坏死现象严重。NAA 诱导愈伤组织的时间较 IBA 稍长,但出愈率低,部分愈伤组织块发褐死亡。2,4-D 诱导愈伤组织所需的时间较其他两者长,出愈率间于二者之间,但从形态上看,愈伤组织质地较密,质量较好。25d 后将愈伤组织块转接到相同的培养基上继续观察,再继续培养 25d 后 NAA 诱导的愈伤组织变化不大,部分愈伤逐渐褐化死亡;IBA 诱导的愈伤组织量有明显增加,部分从愈伤组织上分化出不定根;2,4-D 诱导的愈伤组织生长速度适中,质量较好。

表 2 不同激素对梭梭愈伤组织诱导的影响

植物生长调节剂 plant growth regulators (mg/L)			出愈时间 time of callus initiation (d)	出愈率 callus inducing rate (%)	愈伤组织质地 callus quality
2,4-D	NAA	IBA			
0.1	-	-	12	44.0	白色,生长慢 white; slow growth
0.5	-	-	9	61.4	黄绿,生长较快 light green; relatively fast growth
1.0	-	-	11	90.0	浅绿,较紧密,生长较快 light green; relatively compact; relatively fast growth
-	0.1	-	9	43.0	白色,褐化,无生长 white; brownish; no growth
-	0.5	-	9	25.0	浅绿,致密,生长慢 light green; compact; slow growth
-	1.0	-	8	32.0	白色,发褐,生长慢 white; brownish; slow growth
-	-	0.1	9	85.3	绿色,疏松,生长快 green; incompact; fast growth
-	-	0.5	9	62.0	绿色,液泡化,生长快 green; vacuole-like; fast growth
-	-	1.0	7	89.0	绿色,液泡化,生长快 green; vacuole-like; fast growth

2.1.3 不同浓度配比 2,4-D 和 6-BA 对愈伤组织诱导的影响 在上述研究基础上,选择 2,4-D 和 6-BA 配合,进行愈伤组织诱导培养(表 3)。结果显示:生长素在梭梭愈伤组织诱导中的刺激作用是显而易见的,当培养基中只有 6-BA 而缺少 2,4-D 时,所有的组合均无愈伤组织产生。

表 3 2,4-D 和 6-BA 对梭梭愈伤组织诱导的影响

实验号 experimental No.	植物生长调节剂 plant growth regulators (mg/L)		接种数 No. of explants	形成愈伤组织的 外植体数 No. of cultures with callus	出愈率 callus inducing rate (%)	愈伤组织鲜重 fresh weight (g)
	2,4-D	6-BA				
1	0	0.1	40	0	-	-
2	2	0.5	40	40	100	0.045
3	1	0.5	40	40	100	0.055
4	3	0.1	40	40	100	0.036
5	0	0.25	40	0	-	-
6	2	0	40	36	90	0.087
7	1	0	40	36	90	0.066
8	3	0.25	40	40	100	0.063
9	0	0	40	0	-	-
10	2	0.25	40	40	100	0.08
11	1	0.25	40	40	100	0.072
12	3	0	40	34	84	0.051
13	0	0.5	40	0	-	-
14	2	0.1	40	40	100	0.069
15	1	0.1	40	40	100	0.053
20	3	0.5	40	40	100	0.069

方差分析结果表明,2,4-D 和 BA 对愈伤组织鲜重的影响不显著,但对愈伤组织诱导均有极其显著的影响。经多重比较,Tukey-Kramer 0.05 检验,BA 浓度低于 0.5mg/L 对愈伤组织诱导的影响不大,但当培养基中添加 0.5mg/L 的 BA 时,可显著提高梭梭愈伤组织诱导率。比较所选的几个浓度处理,愈伤组

织诱导率和愈伤组织鲜重没有明显差异。

2.2 愈伤组织的选择性继代和植株再生

多种组合的愈伤组织选择性继代和分化培养基筛选试验结果表明(表4):降低培养基中的2,4-D含量有利于颗粒状愈伤组织的发生,激素及其组成是影响梭梭外植体通过愈伤组织分化成苗的主要因素,和6-BA配合使用能进一步加速愈伤组织发育,但其浓度之间也有所差别,其中以0.5mg/L的用量继代效果最佳。

表4 不同激素配合对愈伤组织再生能力的影响

Table 4 Combination of different plant growth regulators on regeneration ability of callus

植物生长调节剂 plant growth regulators (mg/L)			愈伤组织质地 callus quality	植株再生率 plant regeneration rate (%)
IAA	6-BA	2,4-D		
0.2	0.2	0	浅绿,致密,生长慢 light green; compact; slow growth	0
0.2	0.5	0.5	绿色,疏松,生长适中 green incompact; intermediate growth;	0
0.2	1.0	1.0	绿色,疏松,生长快 green incompact; fast growth	0
0.5	0.2	0.5	绿色,松散,生长适中 green incompact, intermediate growth;	0
0.5	0.5	1.0	浅绿,致密,生长慢 light green; compact; slow growth	0
0.5	1.0	0	浅绿色,疏松,颗粒状 light green; incompact granule;	0
1.0	0.2	1.0	绿色,致密,生长快 green; compact; fast growth	0
1.0	0.5	0	浅绿色,疏松,颗粒状 light green; incompact; granule	33.3
1.0	1.0	0.5	浅绿,致密,被白霜 light green; compact; white frosty	0

从试验结果还观察到,外植体类型是影响梭梭愈伤组织分化的关键因素(数据未显示)。虽然下胚轴和子叶均能诱导出愈伤组织,并且以子叶的诱导频率最高,但愈伤组织结构松散,不能分化出苗。而从茎尖外植体得到的愈伤组织上,当2,4-D浓度降低到0,并添加1.0mg/L的IAA和0.5mg/L的6-BA时,分化出了少量的芽和芽丛(封3图版(1))。

将从愈伤组织上分化得到的芽或芽丛连同少量愈伤组织转移到生根培养基上,芽生长速度慢且芽的数量没有增加,20d后个别芽丛从愈伤组织基部分化出根(封3图版(2))。

3 讨论

植物生理活动极其复杂,激素间的相互作用对形态发生起着关键的作用,与大多数植物种一样,梭梭愈伤组织的诱导必需有生长素的存在,同浓度的2,4-D效果优于IBA和NAA。但却抑制胚性愈伤的形成和分化。为了提高胚性愈伤产生率及不定芽的发生,在继代培养过程中,需逐渐降低培养基中的2,4-D含量。另外,外源细胞分裂素6-BA和生长素IAA对梭梭愈伤组织不定芽发生的刺激作用也是不容忽视的。

愈伤组织再生植株在一定程度上受到器官或组织类型的影响,本试验产生不定芽的愈伤组织都来源于茎尖外植体,可以进一步说明同一植物不同器官不同部位的再生差异是普遍存在的,造成这种差异的主要原因可能是因为不同部位内源激素的不同,通过施用生长调节物质可以影响和改变内源激素水平,由此改变其内源激素原始状态,以达到器官再生的目的^[7,8]。

本研究证明通过“成熟细胞 愈伤组织 出根出芽 完整植株”建立梭梭再生体系是可能的,但愈伤组织分化率低是梭梭组织培养中存在的主要问题,如何保持和提高梭梭愈伤组织的再生能力和分化率还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 国家环境保护局自然保护司保护区与物种管理处. 珍稀濒危植物保护与研究. 北京:中国环境科学出版社,1991,157~170
- [2] 郭泉水,谭德远,等. 梭梭对干旱的适应及抗旱机理研究进展. 林业科学研究,2004,17(6):796~803
- [3] 贾志清,卢琦,等. 沙生植物——梭梭研究进展. 林业科学研究,2004,17(1):125~132

(下转第424页)

3 结论与讨论

3.1 不同品种百合鳞茎适宜辐射剂量的筛选

以鳞片扦插繁殖率降至 50 % 为参考标准, 本试验筛选结果是: 铁炮百合 'white fox' 辐射诱导的适宜剂量为 1.5 ~ 3.0 Gy; 东方百合 'Marrero' 的适宜剂量为 1.5 ~ 2.0 Gy, 这与张克中等^[6,7]在东方百合 'Berlin' 上得到的结果基本一致; 对铁亚杂交系百合 'Ceb Dazzle' 品种而言, 1.5 ~ 2.5 Gy 为适宜的剂量。

3.2 不同剂量辐射后, 百合鳞片扦插幼苗耐热生理反应的差异

前人在园艺植物的耐热性研究^[8~11]上, 得出高温胁迫下耐热材料叶片相对电导率变化较热敏感材料缓慢, 耐热品种蛋白质含量降低、MDA 含量上升缓慢等结果。有关百合幼苗耐热性比较的研究也显示, 耐热材料叶片中游离脯氨酸含量比感热材料的上升慢^[12~14]。本试验采用辐射加高温双重胁迫来研究不同品系百合幼苗的耐热生理反应, 结果表明, 铁炮百合 'White Fox'、铁亚杂交品种 'Ceb Dazzle' (除 2.0 Gy 处理) 和东方百合 'Marrero' 经不同剂量辐射后, 鳞片扦插苗的可溶性蛋白含量均降低; 3 个品种百合扦插苗叶片质膜透性均比对照增加, 但是随着辐射剂量的提高叶片的相对电导率又呈波动性变化; 游离脯氨酸和 MDA 含量亦随辐射剂量的增加呈波动性变化, 其中引起这两个生理指标含量降低的适宜辐射剂量因品种而异, 'White Fox' 为 2.0 Gy、'Ceb Dazzle' 为 2.5 Gy、'Marrero' 为 2.0 ~ 2.5 Gy。

将耐热生理指标、鳞片相对繁殖率和 M_1 植株的观赏品质综合考虑评价后, 本试验认为 'White Fox' 在 1.5 ~ 2.0 Gy 剂量、'Marrero' 和 'Ceb Dazzle' 在 1.5 ~ 2.5 Gy 剂量辐射后, 扦插幼苗能够表现出一定的耐热生理反应。但这种效应还需要在 M_2 植株中做进一步的研究和验证。

参考文献:

- [1] 齐孟文, 王孟国. 我国花卉辐射育种的进展与剖析. 核农学报, 1997, 18(6): 288 ~ 290
- [2] 罗少波, 李智军, 等. 大白菜品种耐热性的鉴定方法. 中国蔬菜, 1996(2): 16 ~ 18
- [3] 中国科学院上海植物生理研究所, 上海市植物生理学会编, 科学出版社, 1990, 305 ~ 306
- [4] 利容千, 王建波. 植物逆境细胞及生理学. 武汉: 武汉大学出版社, 2002
- [5] 陈少裕. 膜脂过氧化对植物细胞的伤害. 植物生理学报, 1991, 27(2): 84 ~ 90
- [6] 张克中, 赵祥云, 等. 辐射对百合鳞片生产不定芽及 M_1 植株的影响. 北京农学院学报, 2002, 17(4): 19 ~ 25
- [7] 贾月慧, 张克中, 等. 辐射亚洲百合 'pollyanna' 雄性不育突变体的 RAPD 分析. 核农学报, 2005, 19(1): 29 ~ 32
- [8] 陈发棣, 陈素梅, 等. 五个小菊品种的耐热性鉴定. 上海农业学报, 2001, 17(3): 80 ~ 82
- [9] 康俊根, 翟依仁, 等. 甘蓝耐热性鉴定方法. 中国蔬菜, 2002, (1): 4 ~ 7
- [10] 张志忠, 吴菁华, 等. 茄子耐热性苗期筛选指标的研究. 中国蔬菜, 2004, (2): 4 ~ 7
- [11] 李 敏, 王维华, 等. 高温胁迫对菠菜叶片保护酶活性和膜透性的影响. 园艺学报, 2004, 31(1): 99 ~ 100
- [12] 周斯建, 义鸣放, 等. 高温胁迫下铁炮百合幼苗形态及生理反应的初步研究. 园艺学报, 2005, 32(1): 145 ~ 147
- [13] 王凤兰, 周厚高, 等. 4 个新铁炮百合品系幼苗的抗热指标测定. 仲恺农业技术学院学报, 2003, 16(2): 38 ~ 42
- [14] 张施君, 周厚高, 等. 高温胁迫对抽苔期新铁炮百合的生理影响. 中国农学通报, 2004, 20(5): 191 ~ 192

(上接第 444 页)

- [4] 刘玉光, 韩二牛, 等. 梭梭育苗技术. 内蒙古林业, 2002, (10): 23
- [5] Parveen, Birnbaum E H. *In vitro* propagation of *Haloxylon aphyllum* (Minkw.) Iljin. Acta Hort. (ISHS), 2001, (560): 461 ~ 464
- [6] Ramirez A E, Birnbaum E H. Induction and characterization of callus in *Haloxylon aphyllum* (Minkw.) Iljin. Acta Hort (ISHS), 2001, (560): 465 ~ 468
- [7] 崔凯荣, 邢更生, 等. 植物激素对体细胞胚胎发生的诱导与调节. 遗传, 2000, 22(5): 349 ~ 354
- [8] 赵 芳, 李 云. 生长调节物质对刺槐复叶离体再生的影响. 核农学报, 2004, 18(3): 207 ~ 211