

# 野生梭梭的离体培养和植株再生

杜敏华, 惠丰立, 刘 征, 柴春月

(南阳师范学院 生命科学与技术学院, 河南 南阳 473061)

[摘 要] 以野生梭梭带腋芽茎段为外植体进行离体再生研究, 探讨不同植物生长调节剂、硝酸银和蔗糖的质量浓度对其愈伤组织诱导、不定芽分化和生根的影响。结果表明, 野生梭梭带腋芽茎段愈伤组织诱导的最佳培养基为 MS+2,4-D 2.0 mg/L + 6-BA 0.5 mg/L + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 6.0 g/L, 诱导率为 100%; 不定芽分化的最佳培养基为 MS+NAA 0.5 mg/L + TDZ 1.0 mg/L + AgNO<sub>3</sub> 3.5 mg/L + 蔗糖 26 g/L + 琼脂 6.5 g/L, 不定芽分化率为 97.8%; 影响野生梭梭再生的最主要因素是 NAA, 其次是 TDZ 和 AgNO<sub>3</sub>, 蔗糖影响最小。

[关键词] 梭梭; 茎段; 离体培养; 植株再生

[中图分类号] Q813.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)07-0164-05

## Plant regeneration in vitro from stem shoots explants of wild *Haloxylon ammodendron*

DU Min-hua, HUI Feng-li, LIU Zheng, CHAI Chun-yue

(College of Biology Science and Technology, Nanyang Normal University, Nanyang, Henan 473061, China)

**Abstract:** The regeneration system of Wild *Haloxylon ammodendron in vitro* was studied with stem shoots as explants to investigate the effects of different plant growth regulators, AgNO<sub>3</sub> and sucrose etc on *H. ammodendron* stem shoots callus induction, bud differentiation and rooting of explants. Results showed the optimal medium for callus induction was MS+2,4-D 2.0 mg/L + 6-BA 0.5 mg/L + sucrose 30 g/L + agar 6.0 g/L, and the induction frequency was 100%; the best bud differentiation medium was MS+0.5 mg/L NAA+1.0 mg/L TDZ+3.5 mg/L AgNO<sub>3</sub>+26 g/L sucrose+6.5 g/L agar, and the bud differentiation rate was 97.8%; the major factors affecting the bud differentiation and bud multiplying of *H. ammodendron* plants were NAA and TDZ in the first place and AgNO<sub>3</sub>, and sucrose in the next place.

**Key words:** *Haloxylon ammodendron*; stem shoots; *in vitro* culture; plant regeneration

梭梭(*Haloxylon ammodendron* (C. A. Mey) Bunge)为藜科(Chenopodiaceae)梭梭属(*Haloxylon Bunge*)灌木,耐干旱、严寒,喜沙性,平均高2~3 m,有的高达5 m,分布在北纬36°~48°、东经60°~111°的干旱沙漠地带,被称为“沙漠植被之王”,是戈壁沙漠最优良的防风固沙植被之一<sup>[1]</sup>。然而由于人们长期以来盲目采挖其根部寄生的肉苁蓉(*Cistanche deserticola*,一种珍贵的中药材),造成梭

梭自然更新困难,区域性发展滞缓濒危,因而梭梭与同属的白梭梭(*H. persicum*)一起被列为我国首批渐危种保护植物<sup>[2-3]</sup>。

梭梭主要靠种子繁殖,自花结实率低,种子发芽保存期短,发芽率衰退明显,因而开展梭梭的无性繁殖方法研究显得尤为重要<sup>[4-5]</sup>。目前,尚未见梭梭枝条扦插成功的报道,梭梭属植物组织培养方面的研究也很少,仅限于 Ramirez 等<sup>[6]</sup>对无叶梭梭(*H. aphyll-*

\* [收稿日期] 2007-01-04

[基金项目] 河南省重大科技攻关项目(0524050006)

[作者简介] 杜敏华(1964-),男,河南西峡人,副教授,硕士,主要从事植物组织培养及食品生物技术研究。

E-mail: duminhua2@126.com

*lum*) 胚性细胞的初步诱导, Parveen 等<sup>[7]</sup> 以梭梭 (*H. aphyllum*) 无菌苗带芽茎尖为试材进行的离体培养, 以及施茜等<sup>[8]</sup> 利用梭梭 (*Haloxylon ammodendron*) 无菌苗的子叶、下胚轴、茎尖为材料进行的愈伤组织诱导和植株再生的比较性尝试。目前国内外尚未见以带腋芽茎段为外植体建立的梭梭离体再生体系报道。

本试验以梭梭 (*H. ammodendron*) 的带腋芽茎段为试材, 采用正交试验设计, 系统地研究了影响植株再生体系建立的因素, 以期筛选出各阶段的最佳培养条件, 解决梭梭分化率低、增殖缓慢、生根困难等问题, 为实现其快速无性繁殖、扩大种源生产、保存优良品种提供行之有效的方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

梭梭 (*H. ammodendron*) 种苗由宁夏农林科学院沙漠治理研究所提供。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 材料处理 取梭梭当年生带腋芽茎段, 自来

水冲洗 1~2 h 后, 用体积分数 75% 酒精处理 18 s, 再用体积分数 0.1% 升汞 (加体积分数 0.1% 吐温-20) 浸泡 9~13 min, 稍加摇动, 取出后用无菌水冲洗 4~6 次。

1.2.2 初代培养 用消毒滤纸吸干表面水分, 将茎段剪成 0.5~1.0 cm 左右的小段, 每段带 1 个腋芽, 迅速接入愈伤组织诱导培养基, 每瓶接种一个外植体。愈伤组织诱导培养基以 MS + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 6.0 g/L 为基本培养基, 加不同质量浓度的 2,4-D 和 6-BA, 暗处理 15 d 后, 转入光照培养。

1.2.3 不定芽分化培养 挑取新鲜、颗粒状的愈伤组织, 接入附加不同配比植物生长调节剂的 MS 培养基中, 诱导芽分化和增殖。分化和增殖培养基选用改良 MS + 6.5 g/L 琼脂, 采用 L<sub>16</sub> (4<sup>5</sup>) 正交设计, 添加不同质量浓度的 TDZ、NAA、AgNO<sub>3</sub> 和蔗糖等植物生长调节剂, 进行不定芽分化和增殖培养基的优选, 以不添加植物生长调节剂为对照。以培养 30 d 的不定芽分化率为考察指标。试验设计见表 1。

表 1 梭梭不定芽分化 L<sub>16</sub> (4<sup>5</sup>) 正交试验设计

Table 1 Orthogonal test L<sub>16</sub> (4<sup>5</sup>) design layout of differentiated adventitious buds of *Haloxylon ammodendron*

水平 Level	因子 Factors				对照 CK
	AgNO <sub>3</sub> / (mg · L <sup>-1</sup> )	蔗糖/ (g · L <sup>-1</sup> ) Sucrose	NAA/ (mg · L <sup>-1</sup> )	TDZ/ (mg · L <sup>-1</sup> )	
	A	B	C	D	
1	2.5	26	0.1	0.2	1
2	3.5	36	0.3	0.5	2
3	4.5	46	0.5	0.8	3
4	5.5	56	0.7	1.0	4

1.2.4 生根培养 将分化培养所得的 1.8~3.5 cm 的新梢转入生根培养基中进行生根培养, 培养基选用 1/2 MS + IBA 0.15 mg/L + NAA 0.25 mg/L + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 5.5 g/L。

1.2.5 培养条件 培养基 pH 为 5.8~6.0, 白天温度为 (25 ± 1) , 夜晚为 (20 ± 1) , 空气相对湿度 60%~65%, 光照强度 2 800 lx, 每日光照时间为 13~15 h。

1.2.6 指标计算与数据统计方法 愈伤组织诱导率/ % = (形成愈伤的外植体数/ 接种外植体数) × 100%; 不定芽分化率/ % = (形成不定芽的外植体数/ 接种外植体数) × 100%; 生根率/ % = (生根外植体数/ 接种外植体数) × 100%; 繁殖系数 = 增殖芽数/ 接种芽数。

每组试验重复 3 次, 每次试验各处理数不少于 60 个外植体, 数据采用 SPSS10.0 软件进行统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 梭梭愈伤组织的诱导与继代培养

表 2 表明, 2,4-D 对梭梭茎段愈伤组织的诱导影响很大, 当培养基中只有 6-BA 而缺少 2,4-D 时, 所有组合均无愈伤组织产生。随 2,4-D 质量浓度升高, 愈伤组织产生速度增快, 4~6 d 即可见切口处膨大, 30 d 左右浅黄白色愈伤组织可覆盖整个外植体; 但当 2,4-D 质量浓度超过 2.0 mg/L 时, 愈伤组织变硬, 容易褐化。当培养基中 2,4-D 质量浓度为 2.0 mg/L、6-BA 为 0.5 mg/L 时, 不仅愈伤组织诱导率为 100%, 而且松散的愈伤组织比例最高, 为 30%~55%。故诱导愈伤组织的最佳培养基为 MS + 2,4-D 2.0 mg/L + 6-BA 0.5 mg/L。

本试验愈伤组织继代培养时适当降低 2,4-D 质量浓度, 选用培养基 MS + 2,4-D 1.5 mg/L + 6-BA 0.5 mg/L 作为继代培养基。挑取松散易碎的愈伤

组织接种于琼脂固化的继代培养基上,继代培养 4~6 继代时间视愈伤组织生长量而异,一般以 26~28 d 为代才可得到具有分化能力、颗粒状的红色愈伤组织。 宜。继代培养 5~8 d 后愈伤组织即可恢复生长。

表 2 不同植物生长调节剂对比对梭梭愈伤组织诱导率的影响

Table 2 Effects of different hormones combination on callus induction frequency of *Haloxylon ammodendren*

2,4-D/ (mg ·L <sup>-1</sup> )	6-BA/ (mg ·L <sup>-1</sup> )	愈伤组织诱导率/ % Frequency of callus induction	2,4-D/ (mg ·L <sup>-1</sup> )	6-BA/ (mg ·L <sup>-1</sup> )	愈伤组织诱导率/ % Frequency of callus induction
0.0	0.0	0.0	2.0	1.0	100.0
1.0	0.0	76.0	2.5	1.0	92.5
1.5	0.0	81.0	3.0	1.0	91.2
2.0	0.0	83.0	0.0	1.5	0.0
2.5	0.0	90.0	1.0	1.5	90.4
3.0	0.0	87.0	1.5	1.5	95.5
0.0	0.5	0.0	2.0	1.5	92.8
1.0	0.5	87.5	2.5	1.5	94.3
1.5	0.5	96.8	3.0	1.5	89.3
2.0	0.5	100.0	0.0	2.0	0.0
2.5	0.5	100.0	1.0	2.0	91.7
3.0	0.5	100.0	1.5	2.0	93.5
0.0	1.0	0.0	2.0	2.0	94.3
1.0	1.0	89.3	2.5	2.0	95.6
1.5	1.0	97.8	3.0	2.0	91.5

2.2 不同生长调节剂对梭梭不定芽分化与增殖的影响

影响的大小顺序是 NAA > TDZ > AgNO<sub>3</sub> > 蔗糖,4 种生长调节剂的极差均比对照大,说明其变异是可靠的。

表 3 表明,各生长调节剂对梭梭不定芽分化率

表 3 梭梭不定芽分化 L<sub>16</sub>(4<sup>5</sup>) 正交试验的结果

Table 3 Differentiated adventitious buds of *Haloxylon ammodendren* in the Orthogonal test L<sub>16</sub>(4<sup>5</sup>)

处理 Treatment	AgNO <sub>3</sub> / (mg ·L <sup>-1</sup> )	蔗糖/ (g ·L <sup>-1</sup> ) Sucrose	NAA/ (mg ·L <sup>-1</sup> )	TDZ/ (mg ·L <sup>-1</sup> )	对照 CK	接种数 Incubation number	分化数 Differentiation number	不定芽分化率/ % Differentiation rate
	A	B	C	D				
1	1	1	1	1	1	82	40	48.8
2	1	2	2	2	2	80	26	32.6
3	1	3	3	3	3	86	65	75.6
4	1	4	4	4	4	83	60	72.8
5	2	1	2	3	4	79	65	82.3
6	2	2	1	4	3	79	60	76.3
7	2	3	4	1	2	84	76	90.8
8	2	4	3	2	1	86	75	87.2
9	3	1	3	4	2	85	82	96.2
10	3	2	4	3	1	85	41	48.5
11	3	3	1	2	4	92	18	19.5
12	3	4	2	1	3	77	30	38.9
13	4	1	4	2	3	82	33	40.3
14	4	2	3	1	4	79	66	83.5
15	4	3	2	4	1	83	62	74.2
16	4	4	1	3	2	87	22	25.2
T <sub>1</sub>	229.8	267.6	169.8	262.0	258.7			
T <sub>2</sub>	336.6	240.9	228.0	179.6	244.8			
T <sub>3</sub>	203.1	259.5	342.5	231.6	231.1			
T <sub>4</sub>	223.2	224.1	252.4	319.5	258.1			
t <sub>1</sub>	57.45	66.90	42.45	65.50	64.68			
t <sub>2</sub>	84.15	60.23	57.00	44.90	61.20			
t <sub>3</sub>	50.78	64.88	85.63	57.90	57.78			
t <sub>4</sub>	55.80	56.03	63.10	79.80	64.53			
R	33.37	10.87	43.18	34.98	6.90			

表 4 表明,不同质量浓度 NAA 对梭梭不定芽分化的影响达极显著水平,不同质量浓度 TDZ 和 AgNO<sub>3</sub> 对梭梭不定芽分化的影响达显著水平,蔗糖对梭梭不定芽分化无显著影响,这与直观分析结果一致。由表 3 可知,梭梭不定芽分化的最佳生长调

节剂组合为 A<sub>2</sub>B<sub>1</sub>C<sub>3</sub>D<sub>4</sub>,即 AgNO<sub>3</sub> 3.5 mg/L + NAA 0.5 mg/L + TDZ 1.0 mg/L + 蔗糖 26 g/L。以该组合进行梭梭不定芽分化继代培养,其分化率可达 97.8 %。

表 4 梭梭不定芽分化率的方差分析结果

Table 4 Variance analysis of the differentiation rates of *Haloxylon ammodendren*

变异来源 Origin of variation	自由度 DF	平方和 SS	均方 MS	均方比 F	F <sub>0.05</sub>	F <sub>0.01</sub>
AgNO <sub>3</sub>	3	2 703.03	901.01	21.02 *	9.280	29.46
蔗糖 Sucrose	3	284.51	94.84	2.21	9.280	29.46
NAA	3	3 866.18	1 288.94	30.07 * *	9.280	29.46
TDZ	3	2 567.48	855.83	19.96 *	9.280	29.46
误差 Error	3	128.06	42.87			
总计 Total	15	9 549.26				

注: \*为 0.05 显著性水平; \*\*为 0.01 显著性水平。

Note: \* means significant difference at P=0.05; \*\* means significant difference at P=0.01.

### 2.3 梭梭的生根培养与移栽

待梭梭不定芽长至 1.8 ~ 3.5 cm 时,转至生根培养基培养。根据本中心实验室的前期研究可知,最适宜于梭梭生根的培养基为 1/2MS + IBA 0.15 mg/L + NAA 0.25 mg/L + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 5.5 g/L + 活性炭 3 g/L。在生根培养基上生长 30 ~ 35 d,可见白色根点长出,生根率达 89.5%;40 ~ 45 d 后,长出较长的根;炼苗 3 ~ 5 d,将生根苗从培养基中取出,流水洗去根上的培养基,移栽到蛭石、珍珠岩、腐叶土质量比为 1 : 1 : 1 的基质中,成活率可达 95.6 %。

## 3 讨论

### 3.1 梭梭离体带芽茎段再生体系的建立与优化

本试验以野生梭梭离体带芽茎段为试材,采用 2,4-D 与 6-BA 不同质量浓度组合研究其对野生梭梭愈伤组织的诱导效果,通过正交试验设计对影响不定芽分化的因子进行了分析,优化了其植株再生体系,初步找到了野生梭梭离体培养和植株再生的主要影响因子,建立了高效的野生梭梭离体培养再生体系。该体系不定芽分化率高于 Parveen 等<sup>[7]</sup>报道的最高分化率(91.6%),愈伤组织诱导率与施茜等<sup>[8]</sup>的结果(100%)相符,较好地解决了野生梭梭不定芽分化率低、增殖缓慢、生根困难等问题。

与其他外植体<sup>[6-8]</sup>相比,用带腋芽茎段进行培养形成不定芽的比例大,增殖率高,且变异性小。这可能是由于芽是植物体的生长中心,同时也是植物体合成生长素的重要场所,在生理生化状况,尤其是在内源激素的水平上与其他外植体存在较大差异,且

带芽茎段的分生能力强,因而有利于芽的分化,这就决定了不同外植体具有各自不同的离体培养表现。

### 3.2 不同植物生长调节剂对梭梭再生体系的影响

在大多数植物组织培养的研究中,通常使用 2,4-D 诱导愈伤组织的产生,使用浓度为 10<sup>-5</sup> ~ 10<sup>-7</sup> mol/L<sup>[9]</sup>。本试验结果表明,2,4-D 对梭梭茎段愈伤组织的诱导影响很大,随 2,4-D 质量浓度升高,愈伤组织产生速度明显增快,但 2,4-D 质量浓度超过 2.0 mg/L 时愈伤组织变硬,容易褐化,故诱导梭梭茎段产生愈伤组织的 2,4-D 质量浓度以 2.0 mg/L 为宜。但是 2,4-D 属中等毒性的植物生长调节剂,有一定的致癌作用及残留效应,大鼠急性口服后 LD<sub>50</sub> 为 375 mg/kg<sup>[9]</sup>,因此在植物的组织培养过程中应慎重使用<sup>[10]</sup>。NAA 是一种生长素,在组织培养中通常被用于诱导细胞的分裂和根的分化。本试验中 NAA 质量浓度为 0.5 mg/L 时,最利于梭梭不定芽的形成。

TDZ (N-苯基 N'-噻二唑-5-脲,thidiazuron) 为人工合成的取代脲类,是一种新型的植物生长调节剂,具有比嘌呤细胞分裂素更强的细胞分裂活性,通常使用浓度为 10<sup>-9</sup> ~ 10<sup>-5</sup> mol/L,大鼠急性口服后 LD<sub>50</sub> > 4 000 mg/kg,无致畸、致癌、致突变作用<sup>[10]</sup>,目前已成功应用于某些植物的愈伤组织、体细胞胚及不定芽的诱导与增殖中<sup>[11-12]</sup>,但应用于梭梭属植物的组织培养还未见相关报道。本试验中 TDZ 是促进不定芽分化和增殖的主要因子,其质量浓度为 1.0 mg/L 时最适于不定芽的形成和分化,而且 TDZ 与 NAA 的质量浓度配比值较低,就可产生较好的效果,有利于进一步降低组织培养成本。TDZ

在适宜的分化培养基上能够促进植物愈伤组织迅速形成不定芽,但在本试验中发现,在含有 TDZ 的培养基中长期继代的梭梭幼苗,会表现出玻璃化、茎融合及矮小等特征,因此应及时将其转入幼苗生长培养基中。

### 3.3 其他试验因子对梭梭再生体系的影响

通常认为,AgNO<sub>3</sub> 对一些梭梭属植物的再生分化有一定的影响,适量的 AgNO<sub>3</sub> 能显著提高不定芽的分化频率。本试验中 AgNO<sub>3</sub> 质量浓度为 3.5 mg/L 时最有利于梭梭不定芽的形成。AgNO<sub>3</sub> 可逆转乙烯的抑制作用,防止外植体产生过多乙烯对不定芽形成的抑制作用<sup>[13]</sup>。加入 AgNO<sub>3</sub> 对初代培养和继代培养中的黄化现象也有一定的抑制功效,具有控制芽黄化的作用<sup>[14]</sup>。蔗糖除起维持渗透压和提供碳源的作用外,还对离体培养过程中器官的发生具有影响<sup>[15-16]</sup>,如能影响丛生芽的发生频率。

#### [参考文献]

- [1] 马全林,王继和,赵明,等.退化人工梭梭林的恢复技术研究[J].林业科学研究,2006,19(2):151-157.
- [2] 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[M].北京:中国环境科学出版社,1991:157-170.
- [4] 郭泉水,谭德远,刘玉军,等.梭梭对干旱的适应及抗旱机理研究进展[J].林业科学研究,2004,17(6):796-803.
- [5] 贾志清,卢琦,郭保贵,等.沙生植物——梭梭研究进展[J].林业科学研究,2004,17(1):125-132.
- [6] Ramirez A E,Birnbaum E H. Induction and characterization of callus in *Haloxylon aphyllum* (Minkw.) Iljin[J]. Acta Hort (ISHS),2001,560:465-468.
- [7] Parveen,Birnbaum E H. *In vitro* propagation of *Haloxylon aphyllum* (Minkw.) Iljin[J]. Acta Hort (ISHS),2001,560:461-464.
- [8] 施茜,孙振元,卢琦.梭梭(*Haloxylon ammodendron*)愈伤组织诱导及植株再生[J].核农学报,2005,19(6):441-444.
- [9] 贺红,潘瑞焱,何亚文,等. Factors affecting organogenesis of *Citrus microcarpa* Bunge [J]. 热带亚热带植物学报,1997,5(3):53-56.
- [10] 朱惠香,张宗俭,陈虎保.常用植物生长调节剂应用指南[M].北京:化学工业出版社,2002.
- [11] 王关林,方宏筠,那杰. Application of potent cytokin in thidiazuron (TDZ) to plant tissue culture [J]. 植物学通报,1997,14(3):47-53.
- [12] Reynolds A G. Phenylureas CPPU and thidiazuron affect yield components, fruit composition, and shortage potential of four seedless grape selections [J]. J Amer Soc Hort Sci, 1992, 117(1):85-89.
- [13] 杨文玉,白永延. Stimulation of shoot regeneration in leaf tissue culture of *Solanum tuberosum* by silver nitrate [J]. 植物生理学报,1998,24(1):86-90.
- [14] Debasis C,Azad M A K,Datta S K. *In vitro* propagation of rose cultivars [J]. Indian Journal of Plant Physiology, 2000, 5(2):189-192.
- [15] 林盛,陈幸华. Effect of sucrose on *in vitro* culture of coconut embryo [J]. 热带作物学报,1999,22(1):20-21.
- [16] Tang H R, Ren Z L, Reustle G. Plant regeneration from leaves of sweet and sour cherry cultivars [J]. Scientia Horticulturae, 2002, 93:235-244.