

# 蒙古沙冬青子叶节诱导培养再生植株的研究

郭琪, 王沛雅, 杨晖\*, 李鑫, 张军, 杨涛

(甘肃省科学院生物研究所, 甘肃省微生物资源开发利用重点实验室, 甘肃兰州 730000)

**摘要:** [目的] 建立蒙古沙冬青子叶节丛生芽再生体系。 [方法] 以蒙古沙冬青子叶节为外植体, 研究种子萌发培养基中 6-BA 浓度、子叶节萌发天数、丛生芽诱导的基本培养基及 6-BA 浓度对丛生芽诱导的影响和外源激素对丛生芽伸长及生根的影响。 [结果] 表明: (1) 添加 6-BA 的萌发培养基与不添加的相比能够显著促进子叶节的生长及子叶节丛生芽的诱导, 且 6-BA 浓度在  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 诱导率最高可达 73.3%, 平均芽数 2.26 个; (2) 种子萌发天数对子叶节丛生芽的诱导有显著影响, 萌发 7 d 的子叶节丛生芽诱导率最高, 诱导率为 74.7%, 但与萌发 9、11 d 的子叶节丛生芽诱导率差异不显著; (3) MS 和 B5 培养基对丛生芽诱导的影响差异不显著, 但 B5 抑制褐化的效果显著好于 MS; (4) 采用  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA +  $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  IAA 激素组合有利于丛生芽伸长, 伸长率为 60.5%; (5) 不同浓度生长素组合均能促进丛生芽幼苗生根,  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  IBA 生根率最大, 生根数最多。 [结论] 最佳蒙古沙冬青子叶节丛生芽再生体系为: 以在 MS +  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA 培养基中黑暗培养 7~11 d 的幼苗子叶节为外植体, 在 B5 +  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA 培养基中诱导丛生芽, 待丛生芽长约 0.3~0.5 cm 后, 转入 B5 +  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA +  $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  IAA 培养基中进行伸长培养, 当丛生芽伸长至 2~3 cm 时, 单株切下转入  $1/2$  B5 +  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  IBA 培养基中生根, 该体系与愈伤组织培养相比能缩短培养时间, 改善褐化严重、玻璃化等问题, 可为蒙古沙冬青的扩繁及进一步开展遗传转化奠定基础。

**关键词:** 蒙古沙冬青; 子叶节; 丛生芽; 再生植株

中图分类号: S723

文献标识码: A

文章编号: 1001-1498(2018)03-0144-07

## Research on Cotyledonary Nodes Regeneration System of *Ammopiptanthus mongolicus*

GUO Qi, WANG Pei-ya, YANG Hui, LI Xin, ZHANG Jun, YANG Tao

(Institute of Biology, Gansu Academy of Sciences, Key Laboratory of Microbial Resources Exploitation and Application, Lanzhou 730000, Gansu, China)

**Abstract:** [Objective] To establish cotyledonary nodes regeneration system of *Ammopiptanthus mongolicus*. [Method] The effects of concentrations of 6-BA in seed germination medium, seed germination days, type of basal induction medium and 6-BA concentrations on the induction of cluster bud were studied using cotyledonary nodes of *A. mongolicus* as explants. The effects of exogenous hormones on elongation and rooting of explants were discussed as well. [Result] The results showed that: (1) The medium containing 6-BA can significantly promote the cotyledonary node growth and the induction of cluster bud compared to the medium without 6-BA. And when the 6-BA concentration was at  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , the induction rate was up to 73.3% with 2.26 buds in average. (2) The days of seed germination also had a significant effect on the induction rate of cluster bud. The induction rate of the 7-day-old cotyledonary node reached the maximum of 74.7%, but had no statistically significant difference with the induc-

收稿日期: 2017-06-09

基金项目: 甘肃省国际科技合作专项 (1504WKCA073); 甘肃省基础研究创新群体计划 (1606RJIA325); 甘肃省科学院创新团队计划 (CX201601)

作者简介: 郭琪 (1982—), 女, 硕士, 副研究员. 主要研究方向: 植物生物技术和中药材资源的开发. E-mail: guoqi9207@163.com

\* 通讯作者: 杨晖 (1965—), 女, 博士, 研究员. 主要从事植物种质资源创新的工作. E-mail: yanghui43@163.com

tion rate of the 9-, and 11-day-old cotyledonary nodes. (3) B5 or MS as the basal medium for induction of cluster bud had no difference, but B5 worked better in inhibiting browning. (4) For elongation culture, the optimal condition was  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA +  $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  IAA with an elongation of 60.5%. (5) Although the root can be induced from the combination of different concentrations of auxins, the best rooting rate and the maximum number of root occurred when IBA was  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . [ **Conclusion** ] The optimal cotyledonary nodes regeneration system of *A. mongolicus* includes the following steps: the cotyledonary nodes, cultivated on the MS medium containing  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA in the dark after 7 to 11 days, are used in B5 medium containing  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA to regenerate cluster bud. When the length of buds is about 0.3–0.5 cm, they are transferred to B5 medium with  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA and  $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  IAA for elongation culture. When the clumps stretch to 2–3 cm, the single plants are cut into  $1/2\text{B5} + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  IBA medium to take root. Compared with the callus tissue culture, this process can shorten the culture time, improve the serious brown and vitrification, and will lay the foundation of propagation and further genetic transformation for *A. mongolicus*.

**Keywords:** *Ammopiptanthus mongolicus*; cotyledonary nodes; cluster bud; regeneration plant

蒙古沙冬青 (*Ammopiptanthus mongolicus* (Maxim. ex Kom.) Cheng f.), 又称大沙冬青, 属豆科沙冬青属 (*Ammopiptanthus* Cheng f.) 常绿阔叶灌木, 在我国主要分布于内蒙古、甘肃、宁夏的荒漠地区, 具有极强的抗旱、抗寒、抗盐碱性和耐蚀性<sup>[1-2]</sup>, 在防沙固沙、防止水土流失等方面具有重要的生态价值。此外, 蒙古沙冬青提取物中被证实含有白藜芦醇、生物碱和黄酮类化合物等多种活性成分, 具有抗肿瘤、抗炎、抗自由基、抗病毒等药理作用<sup>[3-5]</sup>。蒙古沙冬青作为一种重要的生态、药用种质资源其开发应用前景十分广阔, 但自身狭小的分布范围和近年人类活动造成的生境破坏, 其数量正在不断减少, 现已被列为国家二级保护植物<sup>[6]</sup>。对珍稀濒危种质资源采用组织培养的方式进行快速繁殖是重要的保护手段之一。许多研究学者早在 20 世纪 80 年代就开始尝试采用蒙古沙冬青无菌幼苗的子叶、胚轴或茎段进行愈伤组织诱导与芽的分化<sup>[7-11]</sup>。近年, 新的研究也多是选用上述外植体诱导培养再生植株<sup>[12-13]</sup>。通过体细胞胚胎发生的方式进行再生植株诱导, 在培养过程中存在愈伤组织易褐化、难继代, 分化率低, 玻璃化现象严重等问题。本研究选取蒙古沙冬青子叶节为外植体, 进行丛生芽诱导培养再生植株, 以器官直接分化途径建立的快速繁殖体系, 可以明显降低组培褐化率, 缩短培养周期, 为蒙古沙冬青的种质资源保护提供技术支撑, 为进一步开展遗传转化获得抗性更加优良的蒙古沙冬青奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

蒙古沙冬青种子于 2016 年 9 月采自甘肃省武

威市民勤县沙生植物园。

### 1.2 方法

1.2.1 培养条件 种子萌发基本培养基为 MS, 黑暗、 $19 \sim 24^\circ\text{C}$  温度下萌发; 丛生芽诱导基本培养基为 MS、B5, 伸长、生根基本培养基为 B5; 诱导、伸长、生根培养温度  $19 \sim 24^\circ\text{C}$ , 光照时间  $14 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ , 光照强度  $1200 \text{ lux}$ 。以上培养基均含  $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  琼脂,  $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  蔗糖, pH 值 5.8。

1.2.2 种子处理 挑选饱满、大小一致的蒙古沙冬青种子, 用自来水冲洗干净, 在无菌条件下用 75% 的乙醇浸泡 1 min, 无菌水冲洗 2~3 次后用 0.1%  $\text{HgCl}_2$  浸泡 25 min, 用无菌水冲洗 4~5 次, 滤纸吸干表面水份。

1.2.3 蒙古沙冬青子叶节再生体系的建立

1.2.3.1 种子萌发培养基中 6-BA 浓度的筛选及子叶节外植体的获得 将蒙古沙冬青种子接种到含不同 6-BA 浓度 ( $0.0, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的 MS 培养基中, 黑暗培养 7 d, 取萌发的幼苗, 保留子叶近胚轴的分生组织部分约 2 mm 和上胚轴约 3 mm, 切去其余部分, 然后在 2 片子叶的胚芽处将胚轴纵向切成均等的二半, 剔除腋芽后在子叶与胚轴交接处划开 2~3 个伤口, 得到 2 个子叶节外植体。将外植体的近轴面朝上, 倾斜  $45^\circ$  插入添加  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA 的 MS 培养基中诱导丛生芽, 每处理各接种 10 瓶, 每瓶接种 8 个, 培养 30 d 后统计丛生芽诱导率及出芽数, 以确定萌发培养基中 6-BA 的适宜浓度。

丛生芽诱导率 = 出芽外植体数/接种外植体数  $\times 100\%$

平均芽数 = 总芽数/出芽外植体数

1.2.3.2 种子萌发天数对丛生芽诱导的影响 取在萌发培养基中黑暗培养 1、3、5、7、9、11、13、15 d 的蒙古沙冬青幼苗,切取子叶节外植体接种于含  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA 的 MS 培养基中诱导丛生芽,每处理各接种 10 瓶,每瓶接种 8 个,培养 30 d 后统计丛生芽诱导率及出芽数,以确定最适宜的萌发天数。

1.2.3.3 丛生芽诱导基本培养基的筛选 将黑暗培养 7 d 的蒙古沙冬青幼苗的子叶节外植体分别接种于含  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA 的 MS 培养基和 B5 培养基中诱导丛生芽,每处理各接种 10 瓶,每瓶接种 8 个,培养 30 d 后统计丛生芽诱导率及出芽数,确定诱导丛生芽的最适基本培养基。

1.2.3.4 丛生芽诱导培养基中 6-BA 浓度的筛选 将黑暗培养 7 d 的蒙古沙冬青幼苗的子叶节外植体分别接种于含不同浓度 6-BA ( $0.5$ 、 $1.0$ 、 $1.5$ 、 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的 B5 培养基中诱导丛生芽,每处理各接种 10 瓶,每瓶接种 8 个,培养 30 d 后统计丛生芽诱导率及出芽数,确定丛生芽诱导培养基中最适 6-BA 浓度。

1.2.3.5 伸长培养基的确定 子叶节处的丛生芽长约  $0.3 \sim 0.5 \text{ cm}$  后,剔除剩余子叶,分别转入含  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA 并附加不同的浓度配比  $\text{GA}_3$  和 IAA 的 B5 培养基中进行伸长培养,每处理各接种 10 瓶,每瓶接种 4 个,30 d 后统计丛生芽伸长率及

伸长长度,确定最佳伸长培养基。

丛生芽伸长率 = 抽茎外植体数/接种外植体数  $\times 100\%$

丛生芽伸长长度 (cm) = 伸长后的长度 - 伸长前的长度

1.2.3.6 不同生长素对生根的影响 当丛生芽伸长至  $2 \sim 3 \text{ cm}$  时,单株切下转接到添加不同浓度生长素和生长素组合的 1/2B5 培养基中诱导生根,每处理各接种 10 瓶,每瓶接种 4 个,30 d 时统计生根率和根数,确定适宜生根的生长素及最适浓度。以根长达到  $0.5 \text{ cm}$  作为生根的标准。

生根率 = 生根的外植体总数/接种外植体总数  $\times 100\%$

平均生根数 = 生根条数/生根的外植体总数

### 1.3 数据处理

利用 SPSS17.0 软件对数据进行统计分析,确定不同阶段各处理平均值之间在 0.05 和 0.01 概率水平上的差异显著性。

## 2 结果与分析

### 2.1 萌发培养基中 6-BA 浓度的确定

表 1 表明:萌发培养基中 6-BA 的浓度对蒙古沙冬青幼苗生长和子叶节外植体丛生芽的诱导影响显著,在添加 6-BA 的 MS 培养基中,蒙古沙冬青幼苗的胚轴均比不添加的粗大,且获得的子叶节外植体

表 1 萌发培养基中 6-BA 浓度对蒙古沙冬青子叶节生长和子叶节丛生芽诱导的影响

Table 1 Effects of concentration of 6-BA in germination medium on cotyledonary nodes growth and induction of cluster bud from of *Ammopiptanthus mongolicus*

处理 Treatment	6-BA 浓度 Concentration /( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	诱导率 Induction rate/%	平均芽数 Average bud number/个	生长状况 Growth status
1	0.0	$18.21 \pm 0.38\text{C}$	$0.40 \pm 0.23\text{D}$	子叶节胚轴细弱,零星有芽。 Hypocotyl of cotyledonary node was thin and buds were in a fewer number.
2	1.0	$36.08 \pm 0.62\text{B}$	$1.48 \pm 0.12\text{C}$	子叶节胚轴细弱,芽数清晰,后期有明显茎叶。 Hypocotyl of cotyledonary node was thin; buds can be clearly identified and there were normal stem and leaves in the latter stages.
3	2.0	$73.32 \pm 0.51\text{A}$	$2.06 \pm 0.11\text{B}$	子叶节胚轴粗壮,芽数清晰,后期有明显茎叶。 Hypocotyl of cotyledonary node was thick; buds can be clearly identified and there were normal stem and leaves in the latter stages.
4	3.0	$75.04 \pm 0.33\text{A}$	$2.26 \pm 0.17\text{B}$	子叶节胚轴粗壮,芽数清晰,后期有明显茎叶,但部分叶片有畸形。 Hypocotyl of cotyledonary node was thick; buds can be clearly identified and both normal and malformed stem and leaves were available in the latter stages.
5	5.0	$74.83 \pm 0.56\text{A}$	$5.02 \pm 0.33\text{A}$	子叶节胚轴粗壮,芽多细密呈簇状,无有效芽。 Hypocotyl of cotyledonary node was thick; buds were densely clustered and there were no normal buds.

注:表中计算结果为平均值  $\pm$  标准误,同列不同大写字母表示在 0.01 水平差异显著,下同。

Note: The results obtained of every row were means  $\pm$  SE ( $\alpha < 0.01$ ). The same as below.

在丛生芽诱导阶段的诱导率和平均芽数均显著高于不添加6-BA的萌发处理。使用 $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA萌发培养基获得的子叶节进行丛生芽诱导时丛生芽数最多,但子叶节处芽呈簇聚集生长,形态矮小、细弱,无有效芽。使用 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA萌发培养基获得的子叶节进行丛生芽诱导时,丛生芽诱导率最高,但后期生长部分叶片有畸形。因此,综合考虑蒙古沙冬青幼苗生长和子叶节外植体丛生芽诱导状况,确定萌发培养基中6-BA的最佳浓度为 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

## 2.2 种子萌发天数对丛生芽诱导的影响

不同萌发天数的蒙古沙冬青子叶节均能诱导出丛生芽,丛生芽诱导率及芽数随种子萌发天数的增加呈先增加后降低的趋势(表2)。不同处理间,丛生芽诱导率存在不同程度的差异显著性,其中,种子萌发1 d的子叶节外植体丛生芽诱导率最低,种子萌发7 d的子叶节丛生芽诱导率最高,但与萌发9、11 d的子叶节丛生芽诱导率差异不显著。种子萌发1~11 d,由子叶节分化产生的丛生芽芽数差异不显著。综合考虑丛生芽诱导率及平均芽数,种子萌发7~11 d后得到的子叶节外植体是诱导子叶节丛生芽分化的最佳材料。

表3 基本培养基对蒙古沙冬青子叶节丛生芽诱导的影响

Table 3 Effects of basal medium on induction of cluster bud from cotyledonary nodes of *Ammopiptanthus mongolicus*

培养基 Medium	诱导率 Induction rate / %	平均芽数 Average bud number / 个	生长状况 Growth status
MS	$73.35 \pm 0.26\text{A}$	$2.06 \pm 0.22\text{A}$	丛生芽生长20~30 d时,叶缘、芽尖易褐化,30 d以上易褐变死亡。 Leaf margin and shoot tip were easy to browning when cluster buds were 20~30 days old and they were easy to death for browning after 30 d.
B5	$75.02 \pm 0.34\text{A}$	$2.10 \pm 0.23\text{A}$	丛生芽生长30 d时,芽与叶片翠绿,生长健康。 Buds and leaves were green and healthy after 30 d of growth.

## 2.4 丛生芽诱导培养基中6-BA浓度的确定

蒙古沙冬青子叶节外植体在含不同浓度6-BA的B5培养基中都能产生丛生芽(表4),随着6-BA

表2 萌发天数对蒙古沙冬青子叶节丛生芽诱导的影响  
Table 2 Effects of seed germination days on induction of cluster bud from cotyledonary nodes of *Ammopiptanthus mongolicus*

处理 Treatment	种子萌发天数 Seed germination days/d	诱导率 Induction rate / %	平均芽数 Average bud number / 个
1	1	$18.33 \pm 0.42\text{E}$	$1.99 \pm 0.06\text{A}$
2	3	$27.35 \pm 0.23\text{D}$	$2.01 \pm 0.10\text{A}$
3	5	$35.16 \pm 0.20\text{C}$	$2.00 \pm 0.11\text{A}$
4	7	$74.70 \pm 0.56\text{A}$	$2.13 \pm 0.06\text{A}$
5	9	$74.53 \pm 0.57\text{A}$	$2.10 \pm 0.02\text{A}$
6	11	$74.38 \pm 0.42\text{A}$	$2.06 \pm 0.10\text{A}$
7	13	$51.26 \pm 0.42\text{B}$	$1.89 \pm 0.04\text{B}$
8	15	$27.37 \pm 0.23\text{D}$	$1.56 \pm 0.26\text{C}$

## 2.3 丛生芽诱导基本培养基的确定

含有相同浓度6-BA的MS培养基和B5培养基对丛生芽诱导率和丛生芽数的影响差异不显著,但B5培养基抑制褐化的效果显著好于MS培养基(表3),丛生芽生长30 d时,生长状况良好。故选择B5培养基为丛生芽诱导的基本培养基。

表4 丛生芽诱导培养基中6-BA浓度对子叶节丛生芽诱导的影响

Table 4 Effects of concentration of 6-BA in induction medium on induction of cluster bud from cotyledonary nodes of *Ammopiptanthus mongolicus*

处理 Treatment	6-BA浓度 Concentration / ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	诱导率 Induction rate / %	平均芽数 Average bud number / 个	生长状况 Growth status
1	0.5	$73.9 \pm 0.17\text{B}$	$1.45 \pm 0.19\text{D}$	芽数较少,生长缓慢。Buds were fewer and slow-growing.
2	1.0	$78.1 \pm 0.20\text{A}$	$2.26 \pm 0.38\text{C}$	芽数清晰,后期有明显茎叶。 Buds can be clearly identified and there were normal stem and leaves in the latter stages.
3	1.5	$78.9 \pm 0.12\text{A}$	$3.37 \pm 0.26\text{B}$	芽呈簇状,后期有茎叶,但部分为畸形叶。 Buds were clustered and both normal and malformed stem and leaves were available in the latter stages.
4	2.5	$79.6 \pm 0.23\text{A}$	$4.26 \pm 0.54\text{A}$	芽多细密呈簇状,无有效芽。 Buds were densely clustered and there were no normal buds.

异极显著,当6-BA浓度为1.5、2.5 mg · L<sup>-1</sup>时,平均芽数虽多但呈簇状,后期生长发育不佳。因此,丛生芽诱导培养基中6-BA的最适浓度为1.0 mg · L<sup>-1</sup>。

## 2.5 伸长培养基的确定

赤霉素能显著促进植物茎叶的伸长与生长,但本研究(表5)发现:添加不同浓度赤霉素的激素组合,虽然能促进茎叶的生长,但玻璃化现象严重,茎

叶均呈不同程度的黄绿色透明状态,生长后期,无有效叶片,易褐化死亡;无赤霉素的激素组合,叶片呈正常绿色,当激素组合为6-BA 1.0 mg · L<sup>-1</sup> + IAA 0.3 mg · L<sup>-1</sup>时,茎叶伸长速度加快,与6-BA 1.0 mg · L<sup>-1</sup> + IAA 0.5 mg · L<sup>-1</sup>激素组合差异不显著。因此,选用含有6-BA 1.0 mg · L<sup>-1</sup> + IAA 0.3 mg · L<sup>-1</sup>激素组合的B5培养基作为蒙古沙冬青丛生芽伸长的最适培养基。

表5 不同激素组合对蒙古沙冬青子叶节丛生芽伸长培养的影响

Table 5 Effects of different concentration combinations of exogenous hormones on elongation of cluster bud from cotyledonary nodes of *Ammopiptanthus mongolicus*

处理 Treatment	激素浓度 Hormone concentration/ (mg · L <sup>-1</sup> )			伸长率 Elongation rate /%	伸长长度 Elongation length /cm	生长状况 Growth status
	6BA	GA <sub>3</sub>	IAA			
1	1.0	0.1	0.0	20.31 ± 0.29CD	0.55 ± 0.32CD	叶片细长,茎叶呈黄绿略透明,玻璃化。 Stem and narrow and long leaves were yellow-green with somewhat transparent and vitrified.
2	1.0	0.3	0.0	16.70 ± 0.73D	0.35 ± 0.11D	叶片细长,茎叶呈黄绿略透明,玻璃化。 Stem and narrow and long leaves were yellow-green with somewhat transparent and vitrified.
3	1.0	0.5	0.0	5.02 ± 0.54E	0.20 ± 0.04E	叶片增长增宽,黄绿透明,玻璃化。 Leaves became widen, were elongate, yellow-green with transparent and vitrified.
4	1.0	1.0	0.0	-	-	叶片增长增宽,叶片黄绿透明,玻璃化,茎无伸长。 Leaves became widen, were elongate, yellow-green with transparent and vitrified. Stem had no elongation.
5	1.0	1.5	0.0	-	-	叶片增长增宽,叶片黄绿透明,玻璃化,茎无伸长。 Leaves became widen, were elongate, yellow-green with transparent and vitrified. Stem had no elongation.
6	1.0	0.0	0.1	20.72 ± 0.42C	0.65 ± 0.16C	叶片正常绿色,茎伸长缓慢。 Leaves were normal and green. Stem were slowly elongate.
7	1.0	0.0	0.2	40.35 ± 0.31B	0.92 ± 0.23BC	叶片正常绿色,茎伸长。 Leaves were normal and green. Stem were elongate.
8	1.0	0.0	0.3	60.55 ± 0.20A	1.15 ± 0.12AB	叶片正常绿色,茎伸长快速。 Leaves were normal and green. Stem elongated fast.
9	1.0	0.0	0.5	61.06 ± 0.16A	1.05 ± 0.09AB	叶片正常绿色,茎伸长快速。 Leaves were normal and green. Stem elongated fast.

## 2.6 不同生长素及浓度对生根的影响

不同浓度单一生长素和不同浓度 IAA 与 NAA 组合可以不同程度的促进蒙古沙冬青丛生芽幼苗生根(表6),当 IBA 浓度为 1.0 mg · L<sup>-1</sup>时,生根率最大,平均生根数最多。因此,选用 1.0 mg · L<sup>-1</sup> IBA 用于诱导蒙古沙冬青幼苗生根。

## 3 讨论

以子叶节为外植体进行丛生芽诱导建立组培再生体系是不发生愈伤组织的器官型的再生方式,此再生方式具有诱导率高、再生周期短、变异率低、再

生植株易成活等优点,目前已广泛应用于大豆植株再生和遗传转化技术体系的研究中<sup>[14]</sup>。蒙古沙冬青属第三代古地中海沿岸的植物,是豆科中比较原始的种<sup>[2]</sup>。本研究采用蒙古沙冬青无菌苗的子叶节为外植体,诱导丛生芽获得高频率的再生植株在蒙古沙冬青组织培养研究中尚属首次。

本研究结果表明,在蒙古沙冬青种子萌发初期,培养基中6-BA的添加与否对获得的子叶节诱导丛生芽有显著影响。外源细胞分裂素能使子叶节膨大增粗,说明子叶节处的分生细胞生长活跃,从而有利于诱导丛生芽,这与王伟<sup>[15]</sup>在研究大豆子叶节丛生

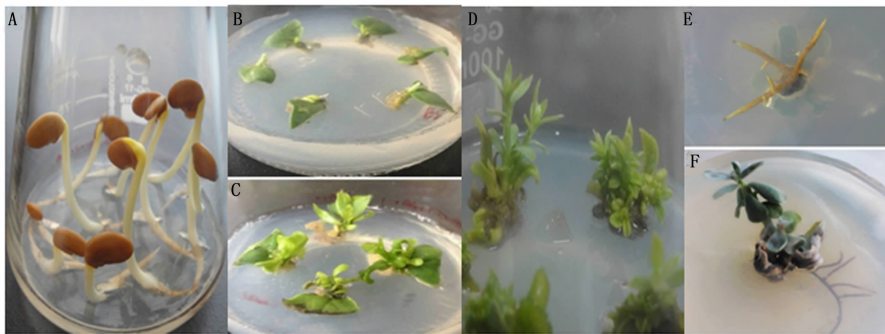
表6 不同生长素及浓度对蒙古沙冬青生根的影响

Table 6 Effects of different auxins and concentration on rooting of *Ammopiptanthus mongolicus*

处理 Treatment	激素浓度 Hormone concentration /(mg · L <sup>-1</sup> )			生根率 Rooting rate /%	平均生根数 Average root number/条
	IBA	IAA	NAA		
1	0.0	0.0	0.0	0.00	0.00
2	0.5	0.0	0.0	40.76 ± 0.36D	1.02 ± 0.10D
3	1.0	0.0	0.0	52.83 ± 0.29A	2.33 ± 0.38A
4	2.0	0.0	0.0	46.33 ± 0.43B	2.00 ± 0.29AB
5	0.0	0.5	0.0	20.51 ± 0.52IJ	0.56 ± 0.38E
6	0.0	1.0	0.0	28.90 ± 0.31H	0.98 ± 0.22D
7	0.0	2.0	0.0	30.33 ± 0.19G	1.01 ± 0.19D
8	0.0	0.0	0.5	21.27 ± 0.28I	0.78 ± 0.31DE
9	0.0	0.0	1.0	30.63 ± 0.43G	1.23 ± 0.40CD
10	0.0	0.0	2.0	36.72 ± 0.20F	1.07 ± 0.12D
11	0.0	1.0	0.5	20.41 ± 0.56J	1.33 ± 0.19CD
12	0.0	1.5	0.5	42.65 ± 0.24C	1.87 ± 0.07B
13	0.0	2.0	0.5	38.50 ± 0.24E	1.56 ± 0.17C

芽诱导时的结论一致。6-BA 浓度并非越高越有利于丛生芽后期的生长,在添加高浓度的 6-BA (3、5 mg · L<sup>-1</sup>) 萌发培养基中,丛生芽生长后期会出现畸形芽或因为数量过多,芽与芽之间产生抑制而无有效芽,从而降低再生频率。

种子萌发天数即种子萌发时的生理状态与丛生芽的诱导率密切相关,种子萌发 1 d 时,由于萌发时间短,种皮未自然脱落,胚轴未伸出,2 片子叶较难分离。种子萌发 3~5 d 时,子叶黄色,胚轴伸长,但较短且细弱,获取子叶节外植体时容易断裂。种子萌发 7~11 d 时,子叶变成浅黄绿色,胚轴伸出且增粗(图 1A),2 片子叶较易从中轴线分离;而种子萌发天数超过 11 d,丛生芽诱导率和出芽数下降,可能是随着萌发天数的增加,胚芽逐渐伸长,顶端生长逐步占据优势,子叶节处分生组织的分生能力逐渐减弱所致。故种子萌发 7~11 d 时子叶节组织分裂能力最强,是最适宜的子叶节外植体材料。



A. 萌发 7~11 d 的蒙古沙冬青种子; B. 子叶节诱导的丛生芽形成; C. 丛生芽生长 30~45 d; D. 丛生芽伸长至 2~3 cm; E. 生根 30~40 d, 根长 1.5~2.0 cm; F. 生根 70~90 d

A. Seed germination of 7-11 d; B. Cluster bud germination from cotyledonary nodes; C. Cluster bud of 30-45 d; D. Cluster bud height 2-3 cm; E. Root of 30-40 d, root length 1.5-2.0 cm; F. Rooting of 70-90 d

图 1 蒙古沙冬青子叶节诱导丛生芽再生体系

Fig. 1 Cotyledonary nodes regeneration system of *Ammopiptanthus mongolicus*

丛生芽诱导阶段,本研究选用 B5 作为诱导的基本培养基,说明在 NH<sup>4+</sup>/NO<sup>3-</sup> 比值较低,VB<sub>1</sub> 和 VB<sub>6</sub> 的倍数增大,无甘氨酸的环境中更有利于蒙古沙冬青子叶节丛生芽的再生,这与安利佳等<sup>[16]</sup>、邵玲玲<sup>[17]</sup>、李海峰等<sup>[18]</sup> 对豆科植物组织培养研究中培养基的选择一致。细胞分裂素与生长素的组合能促进芽的分化与增殖<sup>[19]</sup>,在本研究中,选用不同浓度的 6-BA 与 NAA 组合使子叶节处除诱导出丛生芽外还会诱导出根,从而影响丛生芽的分化,因此,选用单一细胞分裂素 6-BA 进行丛生芽的诱导。

蒙古沙冬青组培苗炼苗移植研究结果有待进一

步发表。

## 4 结论

通过筛选种子萌发培养基中 6-BA 浓度、确定适宜的子叶节萌发天数、确定丛生芽诱导的基本培养基和 6-BA 浓度及研究不同激素对丛生芽伸长和生根的影响,建立的蒙古沙冬青子叶节丛生芽再生体系为:种子在萌发培养基 MS + 2.0 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA 中黑暗培养 7~11 d 后,取子叶节,在诱导培养基 B5 + 1.0 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA 中诱导丛生芽,待子叶节处的丛生芽长约 0.3~0.5 cm 后,剔除剩余子叶,转入

丛生芽伸长培养基 B5 + 1.0 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.3 mg · L<sup>-1</sup> IAA 中进行伸长培养,当丛生芽伸长至 2 ~ 3 cm 时,单株切下转入生根培养基 1/2B5 + 1.0 mg · L<sup>-1</sup> IBA 生根。该体系与愈伤组织培养相比,能够极大地改善褐化严重、玻璃化等问题,对蒙古沙冬青的扩繁及进一步的保护利用具有重要意义和理论价值。

### 参考文献:

- [1] 刘美,吴世新,潘伯荣,等. 中国沙冬青属植物的地理分布及生境特征[J]. 干旱区地理, 2017, 40(2): 380-387.
- [2] 刘美芹,卢存福,尹伟伦. 珍稀濒危植物沙冬青生物学特性及抗逆性研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2004, 10(3): 384-388.
- [3] 吴剑雄. 鄂尔多斯濒危药用植物[-]. 呼和浩特:内蒙古人民出版社, 2012:32.
- [4] 冯文娟. 沙冬青属植物的化学成分研究[D]. 新疆:新疆师范大学, 2010.
- [5] 张嘉男,陶波,方梅,等. 沙冬青总黄酮体外抗 BPIV-3 的试验研究[J]. 甘肃农业大学学报, 2016, 51(6): 6-10.
- [6] 阿里穆斯,庄丽,苏德毕力格,等. 濒危药用植物蒙古沙冬青的生态适宜性区划[J]. 内蒙古师范大学学报:自然科学汉文版, 2014, 43(4): 457-467.
- [7] 丁晓丽. 大沙冬青组织培养的探讨[J]. 干旱区研究, 1988(4): 44-46.
- [8] 慈忠玲,于福杰,魏学增. 珍稀濒危树种-沙冬青体细胞胚胎发

- 生的组织学观察[J]. 内蒙古林学院学报, 1994, 16(1): 36-39.
- [9] 蒋志荣,安力,王立,等. 不同激素对沙冬青组织培养生芽的影响[J]. 中国沙漠, 1997, 17(2): 209-211.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 王方琳,柴成武,尉秋实,等. 珍稀濒危植物沙冬青的组织培养[J]. 中国农学通报, 2016, 32(22): 32-36.
- [13] 金牧兰. 蒙古沙冬青不同外植体诱导培养再生植株的研究[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学, 2015.
- [14] 侯文胜,林抗雪,陈普,等. 大豆规模化转基因技术体系的构建及其应用[J]. 中国农业科学, 2014, 47(21): 4198-4210.
- [15] 王伟. 大豆子叶节再生体系的优化及转 EPSPS 基因的研究[D]. 天津:天津大学, 2012.
- [16] 安利佳,李凤霞,张俊敏,等. 豆科植物组织培养的研究[J]. 植物学报, 1992, 34(10): 743-752.
- [17] 邵玲玲. 柠条锦鸡儿组织培养关键技术的研究[D]. 兰州:甘肃农业大学, 2008.
- [18] 李海峰,赵志莲,刘光明. 培养基成分对云南红豆杉细胞生长和产生 10-去乙酰巴卡亭 III 的影响[J]. 中草药, 2009, 40(10): 1644-1646.
- [19] 黄烈健,王鸿. 林木植物组织培养及存在问题的研究进展[J]. 林业科学研究, 2016, 29(3): 464-470.

(责任编辑:徐玉秀)