

沙棘优良抗旱品种离体再生体系的建立和优化

于亚军^{1,2} 夏新莉¹ 尹伟伦¹

(1 北京林业大学生物科学与技术学院 2 大连大学生物工程学院)

摘要:本文在沙棘杂交育种工作和抗旱性综合评价研究的基础上,获得了优良抗旱品种雄性植株无性系,并较系统地研究了该无性系通过器官发生途径实现离体培养,建立和优化再生体系所需的条件。结果表明:春季采集生长旺盛的健康新梢,建立无菌培养体系效果最好,试管苗再生可以通过两条途径实现:1)采用培养基 WPM + BA0.5 mg/L + 2,4-D0.5 mg/L 可以诱导无菌叶片和茎段切口处产生愈伤组织,采用培养基 WPM + BA0.4 ~ 0.6 + IBA 0.02 ~ 0.03,可以诱导茎段来源的愈伤组织再分化形成大量绿色不定芽点;经继代培养后,不定芽最终可以生长成为具有一定高度和粗度的健壮新梢;在生根培养基 1/2WPM + IBA0.5 mg/L + NAA0.5 mg/L 上培养 20 d 后,生根率可以达到 100%。2)不定芽也可以直接从茎段或叶片的切口处发生,采用最佳的培养基(WPM + TDZ0.01 ~ 0.02 mg/L + IBA0.01 ~ 0.02 mg/L)和适宜的试材类型(从无根组培苗上剪取的茎段和从有根组培苗上剪取的叶盘),不定芽发生率可以达到 100%,平均每个茎段上产生的不定芽数为 4.45 个,叶片上产生 3.25 个;不定芽再经过增殖、伸长、壮苗(培养基为 WPM + BA0.2 mg/L + IBA0.05 mg/L)后,在生根培养基 1/2WPM + IBA0.5 mg/L + NAA0.5 mg/L 上培养 20 d 后亦可 100% 生根。

关键词:沙棘;抗旱;再生;组织培养

中图分类号: S723.1⁺32 文献标志码: A 文章编号: 1000-1522(2010)02-0052-05

YU Ya-jun^{1,2}; XIA Xin-li¹; YIN Wei-lun¹. ***In vitro* plant regeneration from a drought-resistant filial generation of *Hippophae rhamnoides* L.** *Journal of Beijing Forestry University* (2010) **32** (2) 52-56 [Ch, 18 ref.]

1 College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, 100083, P. R. China;

2 Bioengineering College, Dalian University, Liaoning Province, 116622, P. R. China.

Breeding efforts to obtain more drought-resistant seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) materials have resulted in a good filial generation, in which a Mongolia seabuckthorn 'Wulanshalin' was used as female parent and one of the improved Chinese seabuckthorn 'Fengning' supplied pollen. In this work, the authors tested the *in vitro* regenerability of the seabuckthorn through organogenesis. New shoots derived from healthy and vigorously growing plants of spring in the greenhouse are the most appropriate explants to the whole plant regeneration. Regenerated plantlets can be efficiently obtained by two medium systems. System I consisted of callus induction medium of WPM (wood plant medium) supplemented with 0.5 mg/L BA and 0.5 mg/L 2,4-D and shoot induction medium of WPM with 0.4-0.6 mg/L BA and 0.02-0.03 mg/L IBA. System II included WPM medium supplemented with 0.01-0.02 mg/L TDZ and 0.01-0.02 mg/L IBA and WPM medium with 0.2 mg/L BA and 0.05 mg/L IBA. Stem segments from unrooted plantlets and leaf discs from rooted plantlets are appropriate explants and 100% efficiency can be achieved. A total of 4.45 buds on each stem segment and 3.25 buds on each leaf disc were attained. The media of both systems were adopted in this research to receive adventitious buds either

收稿日期: 2009-03-20

基金项目: "十一五"国家科技支撑计划课题(2006BAD03A01)、国家林业局重点项目(2005-01)、国家林业局林业科技推广项目(2006-77)。

第一作者: 于亚军, 博士, 讲师。主要研究方向: 植物生物技术。电话: 0411-87402310-603 Email: yuyajun_002@tom.com 地址: 116622 大连大学生物工程学院。

责任作者: 尹伟伦, 院士, 教授, 博士生导师。主要研究方向: 植物生理与生物技术。Email: yinwl@bjfu.edu.cn 地址: 100083 北京市清华东路 35 号北京林业大学生物科学与技术学院。

本刊网址: <http://www.bjfujournal.cn>; <http://journal.bjfu.edu.cn>

regenerated from calli or directly derived from stem segments and leaves. The length of buds increased after several times of subculture. The regenerated shoots from the effective culture systems could root with nearly 100% efficiency in half strength WPM medium supplemented with 0.5 mg/L IBA and 0.5 mg/L NAA after 20 days.

Key words *Hippophae rhamnoides* L.; drought-resistant; regeneration; tissue culture

沙棘(*Hippophae rhamnoides* L.)是一种耐寒、抗旱、耐土壤贫瘠的植物类型,具有较高的应用价值^[1-2]。近年来,我国不断选育出生态效益和经济效益兼备的沙棘良种^[3],良种繁育和进一步优化是今后工作任务的重点之一。植物组织培养技术是良种繁育的有效手段,采用田间苗的营养器官作为外植体进行无性繁殖,具有繁殖系数高、速度快、苗木整齐、保持种源特性、不易发生变异等特点。沙棘是雌雄异株的植物,种子繁殖产生的后代容易发生变异,可采用扦插或嫁接的方法进行无性繁殖来保持种质特性^[4-5],但这些方法往往又存在着成苗率低、速度慢的缺点,难以适应苗木供给的需求^[6]。沙棘组织培养工作已有报道^[7-14],但仍存在着外植体褐变严重、成苗率和繁殖系数低、生根率和移栽成活率低等问题,因此,其快速繁殖技术还需要进一步研究^[12-13]。而不定芽的大量诱导产生及再生体系的建立,一方面有利于良种快速繁育技术的研究,另一方面也为基因转化及良种的进一步优化打下基础。沙棘通过器官发生途径建立再生体系已有少量报道^[8,11],沙棘体细胞胚胎诱导与植株再生也有报道^[6,15]。但由于不同的沙棘基因型之间再生体系建立所需的基本培养基、植物生长调节剂等因素有所不同,本研究所采用沙棘优良品种的再生体系建立目前尚未见报道,该品种是本实验室在中国沙棘(*H. rhamnoides* L. ssp. *sinensis* Rousi)、蒙古沙棘(*H. rhamnoides* L. ssp. *mongolica* Rousi)及它们的杂交品种当中,通过抗旱适应性的综合评价筛选出的^[16]。此外,由于抗旱良种沙棘的培育和优化仍需不断探索,植物遗传转化为林木良种培育提供了一条崭新的途径,而转基因植物的获得首先需要建立离体再生体系,本文在前人工作的基础上,探讨了该良种沙棘通过器官发生途径再生所需的条件,成功地建立了高效、稳定的再生体系,希望为进一步的基因工程研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验采用的杂交品种为1、2年生实生苗雄株,其母本“乌兰沙林”是从蒙古沙棘“乌兰格木”中选育出的优良实生后代;父本为中国沙棘优良类型“丰宁”,二者均含有优良的基因类型^[2]。

1.2 方法

于2006年、2007年3—9月采集无病虫害盆栽沙棘枝条,用喷壶冲洗掉灰尘,基部剪出新茬,放入实验室洁净处水培2~3 d。春季取枝条顶端新梢幼嫩部分、枝条中部和下部带叶茎段,夏、秋两季取半木质化带叶茎段,流水冲洗30 min,用70%乙醇浸泡30 s,不断搅动;再用20%次氯酸钠灭菌20 min;无菌水冲洗10次以上。

在超净工作台上将茎段/新梢基部剪出新茬,接种于启动培养基上(其中,接种在MS、1/2MS和WPM为基本培养基的3个处理上新梢剔除污染后总数分别为42、40、42个),剥离茎尖接种于启动培养基上。

初代培养5~7 d后,将茎段/新梢外植体转接到增殖培养基上扩繁15~20 d;剪取腋芽萌发后产生的新梢(2.5 cm以上)接种在生根培养基上,将茎尖转接到增殖培养基上扩繁30~40 d,观察叶片萌发与茎叶分化情况;将不带节间的无菌茎段(每种培养基接40个茎段,6种培养基)直立接种在愈伤组织诱导培养基上培养14 d后,取各种类型的愈伤组织转移到新鲜的诱导培养基上继续培养6~7 d,再转移到分化培养基上培养3个月,其间每隔15 d需要继代培养1次,直到产生一定数量和高度的新梢,调查统计愈伤组织上不定芽萌发率及1.0 cm以上的新梢并计算增殖系数;将不带节间的无菌茎段和叶片(分别从有根和无根的组培苗上等量剪取,每个培养基接种总数为40个)划伤,接种(茎段直立接种,叶片平放)在分化培养基上培养10~20 d,将产生的不定芽转移到新鲜的壮苗培养基上,继代培养2~3次,每次继代间隔15 d,1 m以后调查统计并计算增殖系数。

将两个途径再生的1.0 cm以上新梢转移到生根培养基中生根,20 d后调查生根情况。计算公式如下:

增殖系数 = 1.0 cm以上新梢数 / 接种茎段或叶片数

愈伤组织诱导率 = (产生愈伤组织的叶片或茎段数 / 接种的叶片或茎段数) × 100%

不定芽发生率 = (萌发的不定芽数 / 愈伤组织块数或叶片、茎段数) × 100%

生根率 = (生根植株数 / 接种植株数) × 100%

初代培养(启动培养)以 MS、1/2MS(大量元素减半,其他成分不变)和 WPM 为基本培养基,琼脂浓度均为 0.7%,在预试验的基础上均添加激素 BA0.2 mg/L 和 NAA0.1 mg/L;继代培养(增殖培养)时注意剔除污染的外植体,并将琼脂浓度降为 0.65%,培养基中其他成分与初代培养时相同。

愈伤组织诱导培养基:WPM + BA0.5 mg/L + 2,4-D0.5 mg/L;

分化培养基:WPM + BA0.2 ~ 1.0 mg/L + IBA0.01 ~ 0.05 mg/L 和 WPM + TDZ0.01 ~ 0.06 mg/L + IBA0.01 ~ 0.06 mg/L,其 BA 与 IBA 的比值均为 20,TDZ 与 IBA 的比值均为 1.0;

壮苗培养基:WPM + BA0.2 mg/L + IBA0.05 mg/L。蔗糖浓度为 2.0%(生根培养基为 1.0%);

生根培养基:1/2WPM(大量元素和蔗糖减半,其他成分不变) + IBA0.5 mg/L + NAA0.5 mg/L;

pH 值为 5.6 培养温度为(25 ± 2)°C,光照强度 52 μmol/(m²·s),光照时间 14 h/d。

试验结果均采用 SAS 软件进行统计分析。

2 结果与分析

初代和继代培养 13 ~ 14 d 后,茎段和新梢外植体在瓶内长高,并伴有腋芽萌发,剥离的茎尖在培养基上未分化出茎叶而逐渐死亡。春季接种的新梢生长最快,30 d 后腋芽萌发长度至 0.5 ~ 2.5 cm,植株高度达 6 ~ 7 cm,节间伸长,顶部生长至培养瓶瓶口;采用 SAS 统计程序分析的结果显示,沙棘初代培养以 WPM 为最佳的基本培养基,基本培养基之间差异显著(图 1)。

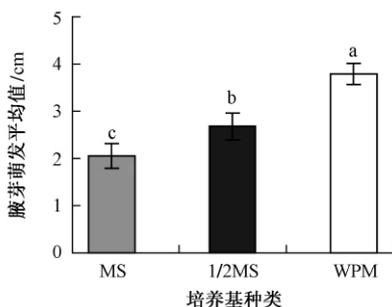


图1 基本培养基对沙棘新梢外植体腋芽萌发的影响

Fig. 1 Effect of basal media on buds sprout and regeneration from young stems of seabuckthorn

在获得大量无菌苗以后,取其茎段和叶片接种 14 d 后,切口处出现大量的愈伤组织,愈伤组织诱导率 100%。叶片上产生的白色愈伤组织较疏松,用镊子一碰即碎,最终无分化;而茎段来源的愈伤组织颜色有白色、浅绿色两种,结构较致密,产生的愈伤组织量大、新鲜。

取各种类型的愈伤组织转移到新鲜的培养基上继续培养 6 ~ 7 d,再转移到分化培养基上 3 ~ 4 d 后,浅绿色和白色愈伤组织上均产生少量绿色芽点。

切取带有绿色芽点的愈伤组织块,继续在新鲜的分化培养基上培养 30 ~ 45 d 后(其间需要继代培养 1 ~ 2 次,以免产生的酚类物质扩散到培养基中导致培养物死亡)得到大量绿色不定芽,不定芽经继代培养,最终生长成有一定高度和粗度的健壮新梢,经生根培养后成苗,生根率可以达到 100%。

在基本培养基为 WPM 添加不同植物生长调节剂的培养基上,平均每个无菌不带节的茎段经过脱分化形成愈伤组织后,再分化形成不定芽的百分率有所不同,采用 WPM + BA0.4 ~ 0.6 mg/L + IBA0.02 ~ 0.03 mg/L,茎段上的愈伤组织块产生不定芽的百分率可以稳定在 60% 以上,SAS 统计程序分析的结果显示,与其他几种培养基比较,差异性显著。其中,WPM + BA0.5 mg/L + IBA0.025 mg/L 为筛选出的最佳培养基,愈伤组织上不定芽的萌发率达 77.5%。

愈伤组织在分化培养基上持续不断地产生新梢,培养 3 m 后调查发现,在 WPM + BA0.6 mg/L + IBA0.03 mg/L 上增殖系数最高,可达到 3.35(表 1)。

表1 植物生长调节剂对沙棘茎段来源的愈伤组织再生不定芽的影响

Tab. 1 Effects of plant growth regulators on adventitious bud regeneration derived from calli on stem segments of seabuckthorn

培养基	接种茎段数	愈伤组织上不定芽萌发率/%	1.0 cm 以上新梢数	增殖系数
WPM + BA0.2 mg/L + IBA0.01 mg/L	40	25.0 ± 23.0 ^c	56	1.40
WPM + BA0.4 mg/L + IBA0.02 mg/L	40	60.0 ± 31.62 ^{ab}	116	2.90
WPM + BA0.5 mg/L + IBA0.025 mg/L	40	77.5 ± 34.26 ^a	130	3.25
WPM + BA0.6 mg/L + IBA0.03 mg/L	40	62.5 ± 29.46 ^a	134	3.35
WPM + BA0.8 mg/L + IBA0.04 mg/L	40	32.5 ± 16.87 ^c	54	1.35
WPM + BA1.0 mg/L + IBA0.05 mg/L	40	37.5 ± 17.68 ^{bc}	62	1.55

注:a、b、c、d……表示在 0.05 水平上差异显著,下同。

在分化培养基上无菌茎段和叶片切口处均能直接再生出不定芽,且对不同浓度配比的植物生长调节剂反应不同(表 2、3)。

试验中发现,无根苗上剪取的茎段比有根苗上剪取的更容易再生不定芽(表 2),在培养基 WPM + TDZ0.01 mg/L + IBA0.01 mg/L 上,无根苗上剪取的茎段再生不定芽平均数为 4.45 个,不定芽再生率 100%;而有根苗上剪取的茎段在同样的培养基上再生不定芽平均数只有 1.25 个,再生率 85%。无根苗茎段增殖系数最高可达到 2.95。

叶片划伤后直接接种在分化培养基上,15 ~ 20

d 后在叶片基部产生不定芽,所不同的是,有根苗上剪取的叶片比无根苗上剪取的更容易再生出不定芽(表3)。这可能是由于植物激素水平影响到器官的形态建成所致。

TDZ 诱导沙棘叶片直接再生不定芽效果明显好于 BA,有根苗叶片在 WPM + TDZ0.01 ~ 0.03 mg/L + IBA0.01 ~ 0.03 mg/L 上分化效果好,统计分析的结果表明,与其他培养基比较差异性显著(表3)。

不定芽再生的位置多数在叶片基部。无根苗叶片在 WPM + TDZ0.03 mg/L + IBA0.03 mg/L 上分化

效果最好,但平均每个叶片仅再生 1.65 个芽,经 SAS 软件统计分析的结果表明,培养基之间差异不显著。切取不定芽接种在壮苗培养基上培养 1 个月,可培育出茎横切面直径在 0.01 cm 以上、高度在 1.00 cm 以上的健壮新梢,有根苗上剪取的叶片增殖系数最高可达到 2.50。

选取高度为 1.00 cm 以上的新梢接种在生根培养基中 6 ~ 7 d 后,白色粗壮的不定根开始形成,20 d 后每株组培苗可产生不定根 6 ~ 15 条,生根率 100%。

表2 植物生长调节剂对来源不同的沙棘茎段直接再生不定芽的影响

Tab.2 Effects of plant growth regulators on adventitious bud regeneration from stem segments of rooted and unrooted plantlets

培养基	接种茎段数		不定芽再生平均数		不定芽再生率%		增殖系数	
	有根苗	无根苗	有根苗	无根苗	有根苗	无根苗	有根苗	无根苗
WPM + BA0.2 mg/L + IBA0.01 mg/L	20	20	0.25 ± 0.44 ^f	1.60 ± 0.76 ^{de}	25	95	0.15	0.95
WPM + BA0.4 mg/L + IBA0.02 mg/L	20	20	0.45 ± 0.51 ^{ef}	1.80 ± 1.06 ^{ede}	45	90	0.30	1.05
WPM + BA0.5 mg/L + IBA0.025 mg/L	20	20	0.65 ± 0.75 ^{de}	3.00 ± 1.03 ^b	25	95	0.45	1.55
WPM + BA0.6 mg/L + IBA0.03 mg/L	20	20	1.20 ± 0.77 ^{abc}	2.10 ± 0.85 ^{bcd}	80	100	0.65	2.05
WPM + BA0.8 mg/L + IBA0.04 mg/L	20	20	1.45 ± 0.76 ^a	1.65 ± 0.75 ^{de}	90	95	1.05	1.50
WPM + BA1.0 mg/L + IBA0.05 mg/L	20	20	0.45 ± 0.51 ^{ef}	1.70 ± 0.80 ^{ede}	45	95	0.40	1.05
WPM + TDZ0.01 mg/L + IBA0.01 mg/L	20	20	1.25 ± 0.72 ^{ab}	4.45 ± 0.83 ^a	85	100	1.05	2.95
WPM + TDZ0.02 mg/L + IBA0.02 mg/L	20	20	0.95 ± 1.00 ^{bed}	2.60 ± 1.57 ^{bc}	65	95	1.40	1.55
WPM + TDZ0.03 mg/L + IBA0.03 mg/L	20	20	0.85 ± 0.75 ^{cd}	2.20 ± 1.44 ^{bcd}	65	90	1.40	1.50
WPM + TDZ0.04 mg/L + IBA0.04 mg/L	20	20	0.30 ± 0.47 ^{ef}	1.85 ± 1.31 ^{ede}	30	90	0.90	1.10
WPM + TDZ0.05 mg/L + IBA0.05 mg/L	20	20	0.30 ± 0.47 ^{ef}	1.45 ± 1.43 ^{de}	30	60	0.85	1.00
WPM + TDZ0.06 mg/L + IBA0.06 mg/L	20	20	0.10 ± 0.31 ^f	1.25 ± 1.16 ^e	10	70	0.85	1.00

表3 植物生长调节剂对来源不同的沙棘叶片直接再生不定芽的影响

Tab.3 Effects of plant growth regulators on adventitious bud regeneration from leaf discs of rooted and unrooted plantlets

培养基	接种叶片数		不定芽再生平均数		不定芽再生率%		增殖系数	
	有根苗	无根苗	有根苗	无根苗	有根苗	无根苗	有根苗	无根苗
WPM + BA0.2 mg/L + IBA0.01 mg/L	20	20	0.80 ± 0.62 ^b	0	70	0	0.55	0
WPM + BA0.4 mg/L + IBA0.02 mg/L	20	20	0.85 ± 0.75 ^b	0	65	0	0.70	0
WPM + BA0.5 mg/L + IBA0.025 mg/L	20	20	0.60 ± 0.75 ^b	0	45	0	0.50	0
WPM + BA0.6 mg/L + IBA0.03 mg/L	20	20	0.70 ± 0.80 ^b	0	50	0	0.50	0
WPM + BA0.8 mg/L + IBA0.04 mg/L	20	20	0.60 ± 0.68 ^b	0.10 ± 0.31	50	10	0.40	0
WPM + BA1.0 mg/L + IBA0.05 mg/L	20	20	0.45 ± 0.69 ^b	0.15 ± 0.37	35	15	0.25	0
WPM + TDZ0.01 mg/L + IBA0.01 mg/L	20	20	2.70 ± 1.63 ^a	1.40 ± 0.99	90	80	1.95	0.60
WPM + TDZ0.02 mg/L + IBA0.02 mg/L	20	20	3.25 ± 1.65 ^a	1.45 ± 0.99	100	75	2.50	0.55
WPM + TDZ0.03 mg/L + IBA0.03 mg/L	20	20	2.50 ± 1.70 ^a	1.65 ± 1.09	85	70	1.95	0.60
WPM + TDZ0.04 mg/L + IBA0.04 mg/L	20	20	0.90 ± 0.79 ^b	0.55 ± 0.60	65	45	0.65	0.35
WPM + TDZ0.05 mg/L + IBA0.05 mg/L	20	20	1.10 ± 0.64 ^b	0.50 ± 0.61	85	45	0.70	0.10
WPM + TDZ0.06 mg/L + IBA0.06 mg/L	20	20	0.45 ± 0.51 ^b	0.25 ± 0.44	45	25	0.30	0

3 讨 论

3.1 关于再生不定芽的茎段和叶片的取材问题

试验中发现,取材对不定芽再生影响较大。在同一培养基上,茎段形成的愈伤组织容易分化出不定芽,叶片上产生的白色愈伤组织较疏松,用镊子一碰即碎,最终无分化;不经过愈伤组织途径时,无根苗上剪取的茎段比有根苗上剪取的更容易直接再生不定芽,有意思的是,有根苗上剪取的叶片比无根苗上剪取的更容易再生出不定芽。因此在遗传转化

时有针对性地取材,有利于提高再生率,进而有利于最终提高转化率。这在沙棘组织培养的其他文献中未见报道。

3.2 关于褐变的问题及解决途径

据报道,沙棘组织培养的难点之一是褐变^[17],本研究在预备试验过程中也遇到过这个问题,通过两年初代接种和继代培养的实践,我们认为该沙棘优良抗旱品种的褐变问题可以采取以下几个方法有效地控制:1) 春季采集生长旺盛的新梢相对与其他季节来说接种后不易发生褐变;2) 初代培养(启动

培养)琼脂浓度可以适当加大至0.7%~0.8%,以防止褐变蔓延至整瓶培养基;继代培养时再将琼脂浓度降至0.65%~0.7%,以保证组培苗的快速生长。如在继代培养过程中再遇到褐变的问题,仍然可以采取琼脂浓度高低交替变化的方法加以解决;3)采取缩短继代时间的方法,及时更换新鲜的培养基,也可以在一定程度上缓解沙棘组培苗的褐变现象。

3.3 关于器官发生的试管苗再生途径问题

通过器官发生途径再生沙棘试管苗,一方面实现了该优良抗旱品种的快速繁殖;另一方面也是植物遗传转化的基础,因为只有建立有效的受体系统,保证较高的、稳定的再生率,才能进一步开展基因转化,不断优化种质资源。本文在器官发生途径的研究基础上,就愈伤组织再生系统和直接分化再生系统这两个系统进行试验,愈伤组织再生可获得大量的不定芽,经继代培养可持续不断地产生新梢用于生根,适合于转化苗在细胞水平上的前期选择,有利于转化细胞对非转化细胞的竞争,进而有利于提高转化率。叶片和茎段直接分化系统产生的不定芽数相对于愈伤组织产生的少,但获得再生植株的时间相对短,操作简单。因此,在未来的遗传转化工作中,这两个途径都具有尝试的价值。

沙棘茎尖离体培养已有少量成功的报道^[13],本文在试验中也尝试了茎尖分生组织离体培养再生沙棘优良抗旱品种试管苗的工作,但未取得成功,其原因有待于进一步研究。沙棘体细胞胚胎发生途径再生小植株的研究也有少量报道^[15],但通过体细胞胚胎发生途径再生植株时,启动培养采用的外植体往往是种子或实生苗,由于遗传背景的复杂性,这些非营养器官繁殖成苗很难保证优良品种不发生变异。本文采用新梢这种营养器官作为外植体接种在培养基上,快速繁殖出大量可用于再生不定芽的叶片和茎段,通过两条器官发生途径(经过愈伤组织和不经过愈伤组织)产生了大量不定芽,不定芽经伸长和壮苗以后,在适宜的生根培养基上可以实现100%生根,获得完整的小植株,再生频率较高且可重复性强。本研究工作希望能为沙棘优良品种的快速繁殖和进一步优化提供参考。

参 考 文 献

[1] 黄铨. 中国沙棘育种研究进展[J]. 国际沙棘研究与开发, 2006, 4(4): 25-29.

- [2] BERNATH J, FOLDESI D. Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.): A promising new medicinal and food crop [J]. *Journal of Herbs, Spices, and Medicinal Plants*, 1992, 1: 27-35.
- [3] 黄铨. 沙棘的杂种优势及其利用[J]. 国际沙棘研究与开发, 2004, 2(3): 27-32.
- [4] KDWIVEDI S, PALJOR E L I, ATTREY D P, et al. Propagation of common seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) through hardwood cutting in Ladakh [J]. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 2002, 72: 228-229.
- [5] PRAKASH O, NAGAR P K, AHUJA P S. Vegetative propagation of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) by hardwood cuttings [J]. *Annals of Forestry*, 1999, 7(2): 287-291.
- [6] 徐虹, 梁宗锁. 沙棘组织培养技术的研究[J]. 西北植物学报, 2001, 21(2): 267-272.
- [7] MONTPETIT D, LALONDE M. *In vitro* propagation and subsequent nodulation of the actinorhizal *Hippophae rhamnoides* L. [J]. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 1988, 15(3): 189-199.
- [8] 赵国林. 沙棘的组织培养和植株再生[J]. 植物生理学通讯, 1989, 25(1): 42.
- [9] YAO Y M. Micropropagation of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) [J]. *Agricultural Science in Finland*, 1995, (4): 503-512.
- [10] 孙兰英, 单金友, 王春艳. 沙棘组织培养培养基筛选试验[J]. 沙棘, 1998, 11(3): 14-16.
- [11] 李师翁, 范小蜂, 卢东平. 大果良种沙棘愈伤组织诱导及植株再生的研究[J]. 西北植物学报, 2001, 21(2): 262-266.
- [12] 康冰, 张广军, 吕月玲, 等. 俄罗斯大果沙棘组织培养技术研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2002, 30(6): 162-166.
- [13] 孙伟. 沙棘茎尖培养试验初报[J]. 中国农学通报, 2000, 16(1): 56.
- [14] 周洁, 岳冬梅, 陈贵, 等. 沙棘组培快繁技术研究[J]. 安徽农业科学, 2005, 33(2): 236-237, 249.
- [15] 刘翠琼. 中国沙棘和北美红杉体细胞胚胎诱导及其组织细胞学的研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2006.
- [16] 李亮, 夏新莉, 尹伟伦. 用隶属函数值法对10个沙棘品种抗旱性的综合评价[J]. 山东林业科技, 2001(1): 59-60.
- [17] 孙兰英. 沙棘组织培养研究进展[J]. 国际沙棘研究与开发, 2006, 4(4): 30-32.
- [18] PETER S R, METIVIER E C, YEUNG K R. et al. *In vitro* rooting of microshoots of *Cotinus coggygia* Mill, a woody ornamental plant [J]. *In vitro Cell Dev Biol plant*, 2007, 43: 9-15.

(责任编辑 赵 勃)