

文章编号:1007-4961(2007)02-0140-03

卫矛属植物组织培养无菌苗的方法研究

吴 琰^{1,2}, 郭宝林¹, 鲁韧强², 金万梅²

(1 河北农业大学 林学院, 河北 保定 071000; 2 北京市农林科学院 林业果树研究所, 北京 100093)

摘要:以卫矛属3种植物为试验材料,研究了取材方法、取材时间和不同品种对组培污染率的影响;采用茎段、小茎尖和嫩梢培养对卫矛属植物进行消毒处理,以其获得无菌苗。结果表明,宽瓣扶芳藤在春季3~4月腋芽萌发时进行消毒处理效果最好;胶东卫矛的消毒最为容易;以嫩梢培养方式进行消毒处理效果最佳。

关键词:组织培养;无菌苗;卫矛属植物

中图分类号:S 687.3

文献标识码:A

Approaches to get germ-free *Euonymus* plantlets through tissue culture

WU Yan^{1,2}, GUO Bao-lin¹, LU Ren-qiang², JIN Wan-mei²

(1 College of Forestry, Agricultural University of Hebei, Baoding 071000, China;

2 Institute of Forestry and Pomology, Beijing Academy of Agriculture
and Forestry Science, Beijing 100093, China)

Abstract: *Euonymus* L. plants were sterilized in stem culture, caulody culture and branch culture. The experimental result indicated that: it's the best way for *Euonymus fortunei* Kuanban to be sterilized when axillary shoots were sprouting during March and April in Spring; *Euonymus kiautschovicus* was the easiest one to be sterilized among *Euonymus* plants; it's the best way to choose sprouts culture to be sterilized.

Key words: tissue culture; germ-free plant; *Euonymus*

扶芳藤 [*Euonymus fortunei* (Turcz.) Hand. - Mazz.] 和胶东卫矛 (*Euonymus kiautschovicus* Loes.) 均属卫矛科卫矛属植物,在城镇绿化中已广泛应用^[1,2],其需求量不断增加,为了满足绿化上的需要,建立工厂化组培快繁体系是解决供需矛盾的重要途径。要建立高效组培快繁体系,首先要获得消毒的快繁材料,进而获得无菌苗。植物无菌苗的获得方法有小茎尖培养、带腋芽茎段培养和嫩梢培养等;取材时间、部位、品种等是影响无菌苗获得的主要因素^[3-5]。本试验以胶东卫矛、宽瓣扶芳藤和圆瓣扶芳藤为试材,对无菌苗获得方法及影响因素进行了研究,旨在为获得卫矛属植物无菌苗,也为其他植物组织培养提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料

胶东卫矛 (*Euonymus kiautschovicus* Loes)、宽瓣扶芳藤 (*E. fortunei* kuanban) 和圆瓣扶芳藤 (*E. fortunei* orbiculatus) 均采自北京市农林科学院林业果树研究所苗圃。

试验所用试剂 6-BA 和 IBA 为 Sigma 产品,其余药品为国产分析纯。基本培养基为 MS,初代培养基为 MS+6-BA 0.5 mg/L+IBA 0.2 mg/L。

1.2 植物材料处理方法

1.2.1 茎段培养 选取田间幼嫩的带腋芽的茎段,自来水冲洗数次,用饱和洗涤灵水 200 r/m 振荡 4 h,无菌水冲洗 1 次;70% 的酒精浸泡 30 s;接着用

收稿日期:2006-12-26;修改稿收期:2007-03-26

作者简介:吴 琰(1981-),男,河北石家庄人,在读硕士生。主要从事植物遗传转化研究。

通讯作者:郭宝林(1952-),男,河北定兴人,教授,主要从事经济林栽培生理和生物技术研究。

金万梅(1971-),女,甘肃靖远人,在读博士生,主要从事生物技术与植物遗传转化研究。

0.1%的升汞处理 8 min; 无菌水冲洗 3 次, 每次 5 min; 外植体接种在初代培养基上。

1.2.2 小茎尖培养 选取田间生长饱满的芽, 自来水冲洗数次, 用饱和的洗涤灵水浸泡 5 min, 无菌水冲洗 1 次; 在超净工作台上用解剖刀剥去外面 3~4 层鳞片, 将小茎尖用 0.1% 的升汞处理 5 min; 无菌水冲洗 3 次, 每次 5 min; 外植体接种在初代培养基上。

1.2.3 嫩梢培养 取腋芽萌发展开 2 叶的新梢, 流水冲洗 60 min; 在饱和洗涤灵水中轻刷后, 用饱和洗涤灵水 200 r/m 振荡 4 h, 无菌水冲洗 1 次; 70% 的酒精浸泡 30 s; 接着用 0.1% 的升汞处理 8 min; 无菌水冲洗 3 次, 每次 5 min; 外植体接种在初代培养基上。

1.3 污染率及萌芽率统计

统计接种 10 d 后的污染率和 4 周后的萌芽率, 即:

污染率(%) = (污染的材料数/接种的总的材料数) × 100%,

萌芽率(%) = (萌芽材料数/无污染的材料数) × 100%。

2 结果与分析

2.1 取材时间对宽瓣扶芳藤消毒效果的影响

茎段培养的宽瓣扶芳藤在不同的时间取材, 对消毒效果产生较大影响(见表 1)。从 10 月 9 日和 11 月 10 日 2 次取材进行消毒, 污染率分别为 48.3% 和 77.3%, 萌芽率分别为 17.2% 和 6.0%, 萌芽时间较长, 分别需要 36 d 和 33 d。12 月 15 日已进入冬季, 此时取材进行消毒, 污染率高达 98.0%, 而萌芽率仅为 2.0%。翌年 2 月 21 日消毒, 快繁材料的污染率较 11 月和 12 月有所降低, 但萌发率较冬季高, 萌芽时间只需要 12 d。翌年 3 月 27 日和 4 月 21 日属于宽瓣扶芳藤腋芽开始萌发时期, 此时取材进行消毒, 快繁材料污染率较低, 而且萌芽率最高, 达到 100%, 萌芽时间也较短, 只需要 10~15 d。可见, 在春季 3 月~4 月宽瓣扶芳藤腋芽萌发时进行取材消毒, 其污染率低、萌芽率高、萌芽所需时间短, 消毒效果最好。

表 1 取材时间对宽瓣扶芳藤污染和萌芽的影响

Table 1 Effect of different sample collecting time on contamination and germination of *E. fortunei* Kuanban

时间/月-日 Time	接种数/个 Inoculated number	污染数/个 Contaminated number	污染率/% Contamination rate	萌芽率/% Germination rate	萌芽天数/d Germination duration
10-09	116	56	48.3	17.2	36
11-10	132	102	77.3	6.0	33
12-15	120	118	98.0	2.0	27
02-21	88	64	72.7	18.2	12
03-27	166	64	38.6	100.0	10
04-21	60	26	43.3	100.0	15

2.2 材料处理方式对消毒效果的影响

3 种材料采用不同处理方式的污染率、萌芽率以及萌芽所需天数均有不同(见表 2)。从表 2 可以看出, 3 种处理方式中, 以茎段培养的污染率最高, 达到 80% 左右; 而小茎尖培养污染率最低, 在 20%~40%; 嫩梢培养的污染率在 50% 左右。茎段培养的萌芽率最高, 而小茎尖培养萌芽率最低, 宽瓣扶芳藤的 3 种处理方式的萌芽率比较接近, 但仍是茎段培养的萌芽率最高, 小茎尖培养的萌芽率最低。3 种处理方式的萌芽天数有所不同, 小茎尖培养的萌芽所需天数最长, 需 1 个月甚至更长; 茎段培养的萌芽所需时间居中, 但也要 20~33 d 左右; 嫩梢培养的萌芽所需时间最短, 仅为 15~20 d。综合 3 种处理方式对不同材料的污染率、萌芽率和萌芽所需天数 3 个指标, 以嫩梢培养的污染率和萌芽率居中, 但萌芽所需天数最短, 消毒效果也最好。

2.3 不同品种材料对消毒效果的影响

不同品种均采用小茎尖培养, 其污染率和萌芽率均有所不同(见图 1)。试验材料取于 2006 年 2 月 13、14 日。由图 1 可以看出, 宽瓣扶芳藤的污染率最

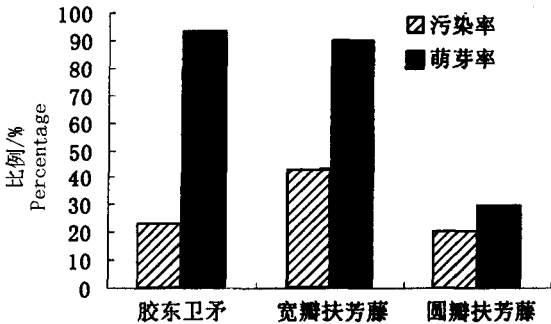


图 1 不同品种萌芽率和污染率的比较
Fig.1 Comparison of different varieties on contamination rate and germination rate

表2 不同材料处理方式对污染和萌芽的影响

Table 2 Effect of different treating methods on contamination and germination

材料 Material	时间 /月-日 Time	处理方式 Treating methods	接种数/个 Inoculated number	污染数/个 Contaminated number	污染率/% Contamination rate	萌芽率/% Germination rate	萌芽天数/d Germination duration
胶东卫矛	03-20	茎段培养	52	40	76.9	100.0	18
	02-13	小茎尖培养	104	24	23.1	92.5	36
	03-31	嫩梢培养	94	42	44.7	100.0	15
宽瓣扶芳藤	04-19	茎段培养	114	102	82.3	100.0	20
	02-13	小茎尖培养	170	72	42.4	89.8	30
	03-31	嫩梢培养	102	54	52.9	90.9	15
圆瓣扶芳藤	03-20	茎段培养	132	102	77.3	100.0	33
	02-14	小茎尖培养	148	30	20.3	29.7	37
	04-04	嫩梢培养	60	26	43.3	26.7	20

高达42.4%，比胶东卫矛和圆瓣扶芳藤的污染率高出近1倍，而胶东卫矛和圆瓣扶芳藤的污染率比较接近，分别为23.1%和20.3%；胶东卫矛比圆瓣扶芳藤的污染率高。圆瓣扶芳藤的萌芽率最低为29.7%，胶东卫矛和宽瓣扶芳藤萌芽率较为接近，分别为92.5%和89.8%，胶东卫矛的萌芽率高于宽瓣扶芳藤的萌芽率。

3 讨论

组织培养获得卫矛属无菌苗的研究表明，取材时间是影响植物消毒效果的主要因素。不同取材时间，植物材料的生理状态不同。从10月份开始，植物材料的生理活动趋于缓慢，此时采到比较幼嫩的材料进行处理，所以污染率较低，但此时的生理活性较低，萌芽率也较低，萌芽所需时间比较长。12月进入冬季后，材料进入休眠状态，此时采取的材料均较成熟，带菌比幼嫩材料多，污染率高，萌芽率低，萌芽时间长。翌年2月底至3月初，材料的休眠快要解除，生理活动渐渐恢复，但是因休眠尚未完全解除，所以萌芽率不高，而萌芽所需天数却缩短。到3月底4月初的时候，材料生理活动旺盛，刚萌发的新梢自身带菌也较少，所以污染率低，萌芽率高，萌芽所需时间短。这与李健和吕校石的研究结果一致^[6,7]。

另外，还有研究表明外植体取材部位以材料中上部为宜^[8]。

材料处理方式对消毒效果有一定的影响。这与冯金玲的试验结果一致^[5]。选择茎段培养时，3种材料的污染率都比较高。茎段有的比较幼嫩，而有的比较成熟，幼嫩的茎段自身带菌较少，而成熟的茎段带菌多，特别是茎段内部带菌较多。因此选择幼嫩茎段，污染率较低^[6,8]。另外，在腋芽鳞片与鳞片之间的缝隙处以及腋芽与茎段之间接触部位可能是

消毒不彻底的两个区域，这两处在实验室处理以及无菌台灭菌时都较难彻底消毒，这可能也是茎段培养污染率高的一个原因。采用小茎尖培养，污染率相对较低一些，可能是在升汞消毒前剥去了最外面几层鳞片，消毒彻底一些，但萌芽率不高，萌芽所需时间长，这可能是因为升汞在彻底消毒的同时导致对其毒害作用也加强了。选择嫩梢培养污染率比茎段培养和小茎尖培养低些，可能是由于它比小茎尖成熟，而比茎段幼嫩，无论是自身带菌还是外部带菌都居二者中间。由于它相对成熟些，所以升汞的毒害作用不明显，萌芽率和萌芽所需时间与茎段培养差不多。3种处理方式均可获得无菌苗。

植物品种也会影响消毒效果。试验所选用的3个品种都是卫矛科卫矛属植物，从对材料处理方式看，综合其污染率、萌芽率和萌芽所需时间，胶东卫矛消毒最容易，消毒效果最好，说明同属植物消毒的难易程度是有区别的。因此，获得不同材料的无菌苗方法是不同的。尽管同属植物的消毒方法值得借鉴，但也要根据材料自身情况选择适宜的消毒方法。

参考文献：

- [1] 沈夏淦. 扶芳藤[J]. 植物杂志, 1996, (6): 18.
- [2] 罗 铮. 三种优良的攀缘植物[J]. 中国花卉盆景, 1997, (6): 6-7.
- [3] 曹改义, 刘国民. 植物组织培养教程[M]. 甘肃: 甘肃科学技术出版社, 1996. 9-12.
- [4] 陈正华. 木本植物组织培养及其应用[M]. 北京: 高等教育出版社, 1986. 29-30.
- [5] 谭文澄. 观赏植物组织培养技术[M]. 北京: 农业出版社, 1987. 85.
- [6] 李 健, 宋小平, 刘海隆, 等. 正交试验优选南方红豆杉外植体的消毒方案[J]. 福建林业科技, 2006, 33(2): 132-135.
- [7] 冯金玲, 陈 辉, 杨志坚, 等. 锥栗组织培养外植体消毒和选择[J]. 福建林学院学报, 2006, 26(1): 22-25.
- [8] 王彭伟. 肾蕨组培快繁的研究[J]. 北京林业大学学报, 1998, 20(2): 107.

(编辑 刘彦琴)