

扶芳藤组织离体培养的研究

陆秀君, 高爽, 徐石

(沈阳农业大学 林学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘要:以扶芳藤带芽茎段为外植体,基本培养基为 MS,附加不同浓度的 6-BA、2,4-D、IBA 和 NAA。最佳愈伤组织诱导培养基为:MS+6-BA 1.0 mg/L+2,4-D 0.05 mg/L;最佳芽诱导培养基为:MS+6-BA 1.4 mg/L;再生苗增殖的培养基为:MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L。生根采用试管外盆插生根的方法。

关键词:扶芳藤;组织培养;愈伤组织;增殖

中图分类号:S 687.303.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2007)12-0208-03

扶芳藤 *Euonymus fortunei* (Turcz) Hand. - Mazz., 是卫矛科卫矛属多年生常绿藤本植物^[1],其分布广泛,适应性强,具耐旱和耐贫瘠的特点^[2-4],在暖地秋冬季叶色红艳,是非常好的地被植物^[5],也可应用于垂直绿化,现已广泛应用于城市园林绿化中。沈阳农业大学 2004 年春季从新疆引进扶芳藤品种,栽植于植物园内,但其适应性差,常表现为长势弱,植株不健壮,严重影响了观赏效果,通过 2 a 的引种驯化,其在沈阳地区的适应性已经有所提高。研究的目的是通过组织培养这种无性快速繁殖的方法,大量繁殖扶芳藤这一优良的藤本植物,使其在沈阳地区城市绿化中发挥重要作用。

1 材料与方

1.1 试验材料

2006 年 4 月在沈阳农业大学植物园内取扶芳藤 1 a 生幼嫩枝条上的带芽茎段为外植体。

采集扶芳藤新发幼茎,取带芽茎段切成 1 cm 左右→用消毒液预处理 15 min→在自来水下流水冲洗 2 h→75% 的酒精消毒→无菌水冲洗 3~4 次→用滴加 2~3 滴吐温的 0.1% 升汞消毒→无菌水反复冲洗 5~6 次→用镊子取带芽茎段,近根部向下插入培养基进行接种。

1.2 内容及方法

1.2.1 不同消毒方法对外植体生长的影响 以 MS 为培养基,采用酒精和滴加 2~3 滴吐温的 0.1% 升汞消毒。消毒方法和时间为酒精 20 s+升汞 3 min、酒精 20 s+升汞 4 min、酒精 20 s+升汞 5 min、酒精 30 s+升汞 3 min、酒精 30 s+升汞 4 min、酒精 30 s+升汞 5 min,分别记为处理 1、2、3、4、5、6,调查污染状况。

1.2.2 基本培养基的筛选 在预备试验的基础上,选用

0.5 mg/L 的 6-BA 和 0.5 mg/L 的 IBA 的激素配比,比较 MS、B₅、White、改良 B₅、WPM 这 5 种培养基对扶芳藤生长的影响。

1.2.3 初代培养 在确定适宜的培养基中分别添加细胞分裂素 6-BA(0~2.0 mg/L)和 2,4-D(0.05、0.1 mg/L),通过 30 种不同的处理,研究不同激素浓度与组分对愈伤组织和芽诱导的影响,找出初代培养最佳激素浓度配比。

1.2.4 继代培养 在确定适宜的培养基中添加细胞分裂素 6-BA(1.0 mg/L)、生长素 NAA(0.1、0.5、1.0 mg/L)和生长素 IBA(0.1、0.5、1.0 mg/L),通过 6 种不同处理,研究不同激素种类和浓度对比对再生苗增殖的影响。

以上培养条件均为:糖 30 g/L,琼脂 7 g/L,pH 5.8,培养温度(24±2)℃,光强 1500 lx,光照时间为 14 h·d⁻¹。

1.2.5 生根培养 采用试管外生根的方法,将泥炭土与 0.25~0.5 mm 细砂 1:3 配制,用 3% 的硫酸亚铁消毒,晾干后加入生根培养液(成分:以 MS 培养基矿物成分、有机质,加 IBA 2.5 mg/L),分装入花盆中。将增殖培养中高 4~5 cm、生长健壮的小苗从三角瓶中取出切下后,将其茎基部蘸取 0.05 mg/L 的 IBA 10 s,然后插到分装上述土壤的花盆中,插入深度 0.5~0.8 cm。

2 结果与分析

2.1 外植体消毒

将采来的茎段经预处理后,用 75% 的酒精和滴加 2~3 滴吐温的 0.1% 升汞进行消毒,不同的消毒方法对外植体的污染率有不同的影响(表 1)。不同的消毒处理,其供试外植体的污染率和无菌外植体得率有差异。延长酒精处理时间 10 s,对降低外植体污染率效果不明显;而增加升汞处理时间,明显减少了外植体的污染率,但对外植体的伤害较大,当酒精 30 s+升汞 5 min 时,有部分小苗两端发白,失去了生活力,小苗致死,无菌外植体得率较低。因此,用酒精 30 s+升汞 4 min 进行消毒灭菌,其

第一作者简介:陆秀君(1966-),女,博士,教授,主要从事苗木栽培及栽培生理生态方面的研究。E-mail:luxujun1993@sina.com。

收稿日期:2007-06-21

无菌外植体得率最高,为 80%。

表 1 不同消毒方法对外植体的生长影响

处理号	接种数 /个	无菌苗数 /个	无菌苗得率 /%	污染数 /个	污染率 /%
1	40	26	65	14	35
2	40	30	75	10	25
3	40	26	65	12	30
4	40	28	70	12	30
5	40	32	80	8	20
6	40	24	60	14	35

2.2 基本培养基筛选

分别选用添加 0.5 mg/L 6-BA 和 0.5 mg/L IBA 的 MS、B₅、White、改良 B₅ 和 WPM 5 种培养基,植入消毒的茎段进行启动培养。培养 5 d 以后,差异不十分明显,只有个别出现污染;10 d 以后,茎段生长状况出现差异,有的茎段生长健壮,有的没有生长,有的则污染很多;15 d 以后这种差异更加明显(表 2)。从表 2 可以看出,使用上述 5 种基本培养基,外植体生长状况出现一定差异。其中外植体在 MS 培养基生长最好,生长率可达 90%,没有不生长的茎段,污染率也很低,仅为 10%;在 B₅ 培养基上生长偏差,生长率为 50%,不生长的比例为 30%,污染也很严重;White 和改良 B₅ 中基本不生长,停滞生长的比例占到 50%,污染率高达 25%;在 WPM 培养基生长率为 70%,不生长和污染的比例均为 15%。

由此可见,最适合扶芳藤生长的培养基为 MS,其次为 WPM 和 B₅,White 和改良 B₅ 基本不适合扶芳藤生长。

表 2 基本培养基筛选

培养基	接种数 /个	生长数 /个	生长率 /%	不生长 数/个	不生长 率/%	污染数 /个	污染率 /%
MS	40	36	90	0	0	4	10
B ₅	40	20	50	12	30	8	20
White	40	10	25	20	50	10	25
改良 B ₅	40	8	20	20	50	12	30
WPM	40	28	70	6	15	6	15

注:以上为培养 15 d 后的结果

2.3 初代培养

外植体接种于 MS 附加不同种类和浓度激素的培养基上,带芽茎段在 10 d 左右在培养基表面出现白色结构紧密、中间呈颗粒状的愈伤组织,但有的并不产生愈伤组织或仅产生很少的愈伤组织,而是在茎节处膨大突起,5 d 后发育成芽,20 d 左右能长成高约 2~4 cm 长的嫩茎段,叶片嫩绿色,统计结果见表 3。从表 3 可以看出,2,4-D 在愈伤组织的诱导中起着重要的作用,6-BA 对芽有的诱导有重要的影响作用。当 2,4-D 浓度为 0 时,愈伤组织诱导率很低,只有一少部分产生愈伤组织,愈伤组织呈白色,表面光滑,结构紧密,很难分化再生;当 2,4-D 的浓度为 0.05 mg/L 时,愈伤组织诱导率急剧提高,随着 6-BA 浓度的升高,愈伤组织数量也提高,当 6-BA 浓度达到 1.0 mg/L 时,愈伤组织产生的

最多,可达 100%,这时大部分愈伤组织为浅绿色,表面有许多颗粒状突起,是理想的愈伤组织;当 2,4-D 的浓度为 0.1 mg/L 时,愈伤组织诱导率有所下降,此时产生大量黄白色的愈伤组织,结构松散,水渍状。

当 2,4-D 浓度为 0 时,芽的诱导率很高,随着 6-BA 浓度的升高,芽的诱导率也随着升高,当 6-BA 浓度达到 1.4 mg/L 时,芽诱导率最高,可达 92%。当 2,4-D 与 6-BA 同时存在时,同时促进愈伤组织和芽的诱导,但芽的诱导率不如只附加 6-BA 的高。

当 MS 附加 2,4-D 0.05 mg/L,同时 6-BA 的浓度在 1.0 mg/L 左右时,愈伤组织诱导率最高,为 100%;当 MS 附加 6-BA 1.4 mg/L 时,芽的诱导率最高,为 92%。

表 3 激素组合对初代培养中愈伤组织和芽诱导的影响

处理	激素种类/mg · L ⁻¹ 6-BA	2,4-D	接种数 /个	愈伤组织 诱导数/个	愈伤组织 诱导率/%	芽诱导 数/个	芽诱导 率/%
1	0.2	0	50	10	20	38	76
2	0.4	0	50	12	24	39	78
3	0.6	0	50	15	30	41	82
4	0.8	0	50	16	32	40	80
5	1.0	0	50	15	30	40	80
6	1.2	0	50	16	32	42	84
7	1.4	0	50	13	26	46	92
8	1.6	0	50	12	24	45	90
9	1.8	0	50	10	20	43	86
10	2.0	0	50	10	20	42	84
11	0.2	0.05	50	41	82	30	60
12	0.4	0.05	50	43	86	32	64
13	0.6	0.05	50	48	96	30	60
14	0.8	0.05	50	50	100	31	62
15	1.0	0.05	50	50	100	32	64
16	1.2	0.05	50	50	100	34	68
17	1.4	0.05	50	48	96	36	72
18	1.6	0.05	50	46	92	35	70
19	1.8	0.05	50	47	94	34	68
20	2.0	0.05	50	49	98	34	68
21	0.2	0.10	50	30	60	15	30
22	0.4	0.10	50	34	68	19	38
23	0.6	0.10	50	35	70	20	40
24	0.8	0.10	50	32	64	17	34
25	1.0	0.10	50	34	68	19	38
26	1.2	0.10	50	32	64	16	32
27	1.4	0.10	50	32	64	18	36
28	1.6	0.10	50	29	58	20	40
29	1.8	0.10	50	30	60	17	34
30	2.0	0.10	50	33	66	18	36

2.4 继代培养

2.4.1 扩繁培养 当茎段上的小芽长成带有 4~5 片叶子和 2~3 个茎节的小枝条时,将其切下,去掉叶片,切断枝条,每个节段带一对侧芽,然后将带侧芽的节段再接入 MS+6-BA 1.4 mg/L 的培养基(即表 3 所列的 7 号培养基)中培养,2 周后侧芽又发育长大,反复此阶段的操作,这种重复培养可保持高增殖率,且增殖周期短。

2.4.2 增殖培养 当扩繁培养的小苗长出 4~5 片叶子时,将其转入增殖培养基中,增殖结果如表 4 所示。从表 4 可以看出,NAA 对扶芳藤再生苗的增殖效果比

IAA 好。当附加 NAA 浓度只为 0.1 mg/L 时,植株生长健壮,增殖也快,增殖倍数为 3.25;随着 NAA 浓度的升高,植株生长情况逐渐变差,增殖生长缓慢;NAA 浓度为 1 mg/L 时,植株叶片变黄,甚至停滞生长。当附加 IBA 浓度为 0.1 mg/L 时,植株生长较弱,增殖生长缓慢;随着 IBA 浓度的增加,植株逐渐生长正常,植株增殖速度快;当 IBA 浓度为 1 mg/L 时,植株叶片变黄,增殖速度变得缓慢,甚至停滞。

可见,在以 MS+6-BA 1.0 mg/L 为基本培养基,附加不同浓度的 NAA 或 IBA,再生苗增殖情况差异很大。扶芳藤再生苗增殖培养最佳培养基组合为 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L。在此培养基上,再生苗生长健壮,植株增殖快,增殖倍数达到 3.25。

表 4 激素组合对继代培养中再生苗增殖的影响

培养基	6-BA	NAA	IBA	接种数	增殖倍数	再生苗生长状况
1	1.0	0.1	0	50	3.25	植株健壮,叶色嫩绿,增殖快
2	1.0	0.5	0	50	2.31	生长正常,增殖较快
3	1.0	1.0	0	50	1.03	叶片变黄,植株生长停滞
4	1.0	0	0.1	50	1.94	长势很弱,生长缓慢
5	1.0	0	0.5	50	2.58	植株生长正常,增殖生长快
6	1.0	0	1.0	50	1.15	叶片变黄,植株生长停滞

2.5 生根

在组织培养中,生根是一个重要的方面,然而很多植物品种存在生根难的问题。生根过程中,试管苗的基部往往形成愈伤组织,发出的根与茎之间并无维管组织的直接联系,以致移栽后不能成活,因此试验采用试管

外生根技术,就是从组培中形成的嫩茎上切取插条进行试管外生根,这是一项降低成本的有利措施,不但减少了试管生根需要无菌操作的工时耗费,也减少了一次培养基制作的材料、能源与工时耗费。生根结果如表 5 所示。5 d 后拔出小苗观察,有 10% 生根;10 d 后观察,有 60% 生根;15 d 后,全部试验的小苗均长出强壮的根,且生长健壮,这时便可以移入大田。

表 5 试管外生根

天数/d	扦插数/盆	生根数/个	生根率/%
5	40	4	10
10	40	24	60
15	40	40	100

3 结论

综上所述,用扶芳藤新发幼茎上的带芽茎段为外植体进行组织培养,建立快速无性繁殖体系,其愈伤组织诱导率与芽诱导率均很高,分别为 100% 和 92%,较成功。增殖培养中,采用单个芽诱导和芽增殖相结合的增殖方法,增殖率很高,增殖系数可达 3.25。木本植物在组织培养中生根难是组织培养最大的影响因素,使之成为在生产实践中应用的最大障碍,从而降低了它的实际意义和可利用性。试验采用了试管外生根的方法,经试验,15 d 全部试验植株都产生了大量的根,生长健壮,可移入大田,既缩短了生根时间,又解决了生根难的问题,使组织培养成为扶芳藤大量快速繁殖的主要途径,可以在较短的时间内获得大量规格一致、生长健壮、长势良好的扶芳藤幼苗,发挥组织培养培育植株的优势。

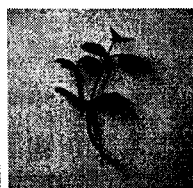
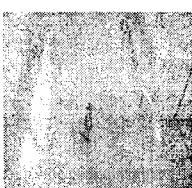
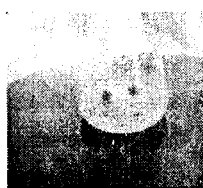


图 1 愈伤组织(一) 图 2 愈伤组织(二) 图 3 芽诱导

图 4 芽增殖培养 图 5 试管外生根 图 6 生根苗

参考文献

- [1] 王建. 药用植物扶芳藤的组织培养[J]. 广西中医学院学报, 2004, 27(2): 62-63.
- [2] 金万梅, 尹淑萍, 鲁树强, 等. 扶芳藤组织培养再生体系的建立[J]. 植物生理学通讯, 2005(1): 27-30.

- [3] 沈夏淦. 扶芳藤[J]. 植物杂志, 1996(6): 18.
- [4] 罗锦. 三种优良的攀缘植物[J]. 中国花卉盆景, 1997(8): 6-7.
- [5] 王茂良, 赵梁军, 任桂芳, 等. 扶芳藤再生体系的建立[J]. 园艺学报, 2004, 31(2): 241-244.

Study on Tissue Culture of *Euonymus fortunei*

LU Xiu-Jun, GAO Shuang, XU Shi

(College of Forestry, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110161, China)

Abstract: The annual shoot of *Euonymus fortunei* were cultured on MS contained 6-BA, 2,4-D, IBA and NAA at different levels. The optimal media of inducing callus was on MS+6-BA 1.0 mg/L+2,4-D 0.05 mg/L; The optimal media of inducing buds was on MS+6-BA 1.4 mg/L; Best for proliferation of regenerative seeding was on MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L. Rootage was pot cuttage out of the test tube.

Key words: *Euonymus fortunei*; Tissue culture; Callus; Proliteration