

胶东卫矛组织培养快速繁殖技术研究

杨亚亚¹, 麻冬梅², 许兴^{1,2*}

(1. 宁夏大学生命科学学院, 银川 750021; 2. 宁夏大学农学院)

摘要:以胶东卫矛的茎段为外植体, 研究其再生植株在不同外源激素配比下的适宜培养基。试验结果表明: 胶东卫矛茎段启动培养基中以 MS 培养基附加 BA 2.0 mg/L、NAA 1.0 mg/L 较好, 继代培养基以 MS 培养基附加 BA 1.0 mg/L、NAA 0.5 mg/L 较为合适。生根培养基为 1/2MS+NAA 0.3 mg/L + IBA 0.1 mg/L 最佳, 生根率高达 100%。

关键词:胶东卫矛; 组织培养; 快速繁殖

Study on Techniques for Rapid Propagation of *Euonymus kiautschovicus* (Loes.) // YANG Ya-ya, MA Dong-mei, XU Xing

Abstract: The stem segments of *Euonymus Kiautschovicus* (Loes.) were used as explants to study the suitable mediums with different proportions of exogenous hormones for regeneration plant in this paper. The results showed that the suitable medium for the initiation of explants was MS medium supplemented with 6-BA 2.0 mg/L and NAA 1.0 mg/L, While for the proliferation of bud clusters it was MS medium supplemented with 6-BA 1.0 mg/L and NAA 0.5 mg/L⁻¹. For rooting of adventitious buds, 1/2 MS medium replenished with NAA 0.3 mg/L and IBA 0.1 mg/L was excellent, and the rooting rate was 100%.

Key words: *Euonymus kiautschovicus* Loes.; Tissue culture; Rapid propagation

Author's address: School of Life Science Ningxia University, 750021, Yinchuan, China

胶东卫矛(*Euonymus kiautschovicus* Loes.)系卫矛科卫矛属植物, 为常绿阔叶灌木, 其叶色碧绿, 耐修剪, 不仅具有观赏价值和经济价值, 还能净化空气, 抗烟除尘^[1], 因此是城镇绿化中的优良树种, 尤其适合北方冬天常绿彩叶树种缺乏之地。但是由于目前自然环境恶化和水资源缺乏, 卫矛属植物良种化程度低^[2]、虫害严重^[3], 因此胶东卫矛抗逆的能力有待提高。建立高效、快速的组培体系, 是我们下一步进行胶东卫矛植物基因工程育种的前提条件, 同时为胶东卫矛的工厂化育苗提供技术支持, 推动该树在园林中的应用。

1 材料与方法

1.1 材料

胶东卫矛采自宁夏永宁县安宁园林绿化有限公司栽培基地。试验所用试剂 6-BA、NAA、IBA 和琼脂为 Sigma 产品, 其余药品为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 外植体的获得

取带腋芽的茎段或顶芽, 剪去叶片, 留叶柄基部,

用 0.1% 洗衣粉水轻轻刷洗枝条后, 在流水下冲 0.5~1 h。在超净工作台上将材料转入灭过菌的三角瓶中, 用 70% 的酒精浸泡 30 s, 无菌水冲洗 2~3 次, 再用 0.1% 的升汞处理 8 min, 无菌水冲洗 5~6 次, 每次 2~3 min, 将带腋芽的茎段切成长 1.0~1.5 cm 的小段备用。

1.2.2 基本培养基的筛选

将经表面消毒的带有 1 对侧芽的茎段接种于 MS 培养基、B₅ 培养基和 McCown & Lloy 培养基, 3 种培养基中分别添加 0.5 mg/L、1.0 mg/L、2.0 mg/L 和 4.0 mg/L 6-BA, 20 d 后观察生长情况。

1.2.3 启动培养基的筛选

将经表面消毒的带有顶芽或 1 对侧芽的茎段接种于以 MS 为基本培养基, 在 MS 培养基中仅添加 0 mg/L、0.5 mg/L、1.0 mg/L、2.0 mg/L、4.0 mg/L、8.0 mg/L 的单一细胞分裂素 6-BA 和 KT; 待筛选出适宜的细胞分裂素 6-BA 后, 以该细胞分裂素 0.5 mg/L、1.0 mg/L、2.0 mg/L 和 NAA 0 mg/L、0.5 mg/L、1.0 mg/L 和 2.0 mg/L 为试验水平, 采取完全随机区组实验设计, 设计 12 个处理, 每处理 3 个重复。20 d 后观察、记录腋芽诱导率、芽生长状况, 以腋芽的诱导率进行统计和方差分析, 筛选出适宜的激素配比的腋芽诱导培养基。

收稿日期: 2007-11-12

修回日期: 2007-12-18

基金项目: 国家“973”项目“重要耐盐、耐低温转基因植物的生物学整合效应分析研究”(编号: 2006CB100106)。

第一作者简介: 杨亚亚(1982-), 男, 硕士生, 研究方向为植物基因工程研究。通讯作者: 许兴, 男, 教授, 博士生导师。E-mail: yyyaaa598@126.com

1.2.4 继代培养基的筛选

将高于 3 cm 的初培苗切割后转接到以 MS 为基本培养基,以 6-BA 0.5 mg/L、1.0 mg/L、2.0 mg/L 和 NAA 0.5 mg/L、1.0 mg/L、2.0 mg/L 交叉配比的 9 个试验水平的培养基,所有试验采用完全随机接种,30 d 后观察,记录丛芽诱导率和茎段生长及分化情况,选择适宜激素配比的增殖培养基。

1.2.5 无菌苗的生根

取生长良好、高约 2 cm 以上的无菌无根苗,生根培养基中培养,30 d 后观察生根情况。

1.3 培养条件

培养温度 25℃ 左右,每天光照 12 h,光照度 2 000 lx,培养基 pH5.8。

2 结果与分析

2.1 基本培养基试验

由表 1 可以看出 MS 培养基培养效果明显好于 B₅ 培养基和 McCown & Lloy 培养基, B₅ 次之, McCown & Lloy 最差。MS 培养基中芽的分化平均达到 87.2%,而在 B₅ 培养基和 McCown & Lloy 培养基平均为 56.4% 和 52.6%。并且在实验过程中发现,MS 培养基中的外殖体褐化最轻,其他两个培养基褐化比较严重,MS 培养基中苗的生长势也相应地最好。

表 1 基本培养基筛选结果

基本培养基	6-BA 浓度 /mg·L ⁻¹	接种数/个	分化数/个	分化率/%
MS	0.5	30	26	86.7
MS	1.0	29	26	89.7
MS	2.0	32	29	90.6
MS	4.0	28	23	82.1
B ₅	0.5	30	16	53.3
B ₅	1.0	33	19	57.6
B ₅	2.0	31	21	67.7
B ₅	4.0	27	13	48.1
McCown & Lloy	0.5	29	14	48.2
McCown & Lloy	1.0	28	15	53.6
McCown & Lloy	2.0	29	17	58.6
McCown & Lloy	4.0	30	15	50.0

2.2 不同激素处理对腋芽诱导的影响

2.2.1 6-BA 不同浓度处理对腋芽的诱导

MS 培养基中添加 6-BA 一种激素,结果见表 2。接种 20 d 后,添加了 6-BA 的处理腋芽均有不同程度的诱导萌发,6-BA 的 5 个浓度梯度中,0.5、1.0 和 2.0 mg/L 时腋芽的诱导率均比 MS 对比的高,而 6-BA 浓度为 4.0 和 8.0 mg/L 时,腋芽诱导受到抑制,诱导率降低。所诱导的芽在培养 20d 前均为单芽,芽生长达 0.5~1.0 cm,培养 1 个月后,出现少量的丛生芽。

表 2 6-BA 不同浓度对腋芽的诱导效果

6-BA 浓度/mg·L ⁻¹	接种数/个	出芽数/个	诱导率/%
0	30	25	83.3
0.5	27	24	88.9
1.0	29	28	96.6
2.0	31	31	100
4.0	30	28	93.3
8.0	32	27	84.3

注:基本培养基为 MS。

2.2.2 KT 不同浓度处理对腋芽的诱导

为了比较不同的细胞分裂素对腋芽诱导效果的差异,试验了只添加 KT 对腋芽的诱导的效果。结果可见 KT 对北海道黄杨腋芽的诱导率较低,5 个浓度处理的诱导率均比 MS 对照低,说明 KT 诱导腋芽的效果比 6-BA 差。所诱导的芽均为单芽,芽的生长与仅添加 6-BA 的情况相似。

以 6-BA 和 KT 对腋芽的诱导率为结果,通过单因素方差分析计算得 *F* 值是 6.876,显著水平为 0.255。确定单一细胞分裂素 6-BA 和 KT 对腋芽的诱导率存在显著差异,6-BA 对胶东卫矛腋芽诱导率明显优于 KT。

表 3 KT 不同浓度对腋芽的诱导效果

KT 浓度/mg·L ⁻¹	接种数/个	出芽数/个	诱导率/%
0	29	24	82.8
0.5	25	19	84.0
1.0	18	15	83.3
2.0	21	17	80.9
4.0	19	13	68.4
8.0	24	12	50.0

注:基本培养基为 MS。

2.2.3 6-BA 和 NAA 不同浓度组合对腋芽的诱导

根据添加 6-BA、NAA 的诱导结果,选择 6-BA 浓度 0.5 mg/L、1.0 mg/L 和 2.0 mg/L 分别与 NAA 的 0、0.5 mg/L、1.0 mg/L、2.0 mg/L 4 个浓度进行完全随机交叉试验进行北海道黄杨诱导培养基筛选,结果见表 4。

表 4 不同浓度 6-BA 和 NAA 对比对腋芽的诱导效果

6-BA 浓度 /mg·L ⁻¹	NAA 浓度 /mg·L ⁻¹	接种数/个	分化数/个	分化率/%	生长势
0.5	0.0	49	44	90.0	+++
0.5	0.5	51	47	92.6	+++
0.5	1.0	47	45	95.7	++
0.5	2.0	53	41	77.4	+
1.0	0.0	52	46	88.5	+
1.0	0.5	48	43	89.6	++++
1.0	1.0	50	46	92.0	+++
1.0	2.0	49	43	87.8	+
2.0	0.0	49	44	89.8	+
2.0	0.5	54	51	94.4	++++
2.0	1.0	52	50	96.2	++++
2.0	2.0	48	42	87.5	+

注: + 示颜色发黄, ++ 示颜色略黄, +++ 示较好, ++++ 示很好。

技术开发

通过二因素方差分析(表5)认为:6-BA对胶东卫矛的腋芽效果不显著,NAA对胶东卫矛的腋芽诱导极显著,6-BA×NAA的交互作用对腋芽的诱导存在显著性差异。6-BA的3个浓度水平中腋芽的诱导率较高,当6-BA浓度相同时,NAA浓度的增加,有利于腋芽的诱导;但NAA浓度达到2.0 mg/L时,与6-BA的3个浓度的处理的诱导率均反而降低,并且苗的生长势较差,大部分苗的叶片发黄。6-BA 2.0+NAA 0.5 mg/L和6-BA 2.0mg/L+NAA 1.0 mg/L培养基对胶东卫矛腋芽的诱导有较好的效果。各处理诱导所得的芽在培养前30天仅见单芽,之后有少量的丛芽出现。我们还发现,在不含NAA或NAA的含量超过1.0 mg/L时的培养基中苗在生长的过程中逐渐发黄;NAA对于芽的诱导有一定的关系,在一定范围内,随着NAA浓度的增加,芽的诱导需要的时间减少。

表5 方差分析结果

变异来源	自由度	F值	显著水平
6-BA	2	3.253	0.056 2
NAA	3	17.449	0.000 0
6-BA×NAA	6	3.477	0.012 9

2.3 不同激素处理对继代培养的影响

将在诱导培养基中诱导所得的单芽接种到表6所列的4种培养基中,30 d后所得的结果如表5,可见芽体有不同程度地明显生长,有新的芽体出现成为丛生芽。

表6 不同6-BA和NAA组合对丛生芽诱导的影响

BA浓度 /mg·L ⁻¹	NAA浓度 /mg·L ⁻¹	接种单 芽数/个	诱导丛 芽数/个	丛芽诱 导率/%	丛芽的平 均芽/个
0.5	0.5	30	25	83.3	1.0
0.5	1.0	30	0	0	0
0.5	2.0	30	0	0	0
1.0	0.5	30	28	93.3	3.3
1.0	1.0	30	26	86.7	2.9
1.0	2.0	30	0	0	0
2.0	0.5	30	22	73.3	1.5
2.0	1.0	30	20	66.7	1.6
2.0	2.0	30	13	46.7	0.9

以后每30天继代1次,继代增殖系数约为3倍。结果表明,继代培养采用原诱导培养基诱导丛生芽的效果较差,降低6-BA浓度有利于丛生芽的诱导,当NAA的浓度大于6-BA的浓度时,丛生芽的诱导率为0。在一定范围内,6-BA的浓度与丛生芽诱导数成正比,当NAA的浓度与丛生芽诱导数成正比,当6-BA浓度过高时引起苗黄化甚至死亡。

2.4 生根培养

将继代培养中芽体生长良好、苗约3 cm的健壮小苗转到表6所列的生根培养基中诱导生根。结果

见表7。

表7 不同培养基对诱导生根的影响

NAA浓度 /mg·L ⁻¹	IBA浓度 /mg·L ⁻¹	生根率/%
0	0	80
0.1	0.1	88
0.1	0.3	91
0.1	0.5	70
0.3	0.1	100
0.3	0.3	96
0.3	0.5	55
0.5	0.1	96
0.5	0.3	0
0.5	0.5	0

注:基本培养基为1/2MS。

表7表明,在1/2MS+NAA 0.3 mg/L+IBA 0.1 mg/L培养基中根的诱导达到100%,30 d后每个苗长出4条左右较长的根。从表7结果来看,胶东卫矛生根相对较容易,但当NAA或IBA的浓度大于0.5 mg/L时,则对苗的生根产生抑制作用;诱导根原基所需的天数与NAA和IBA的天数有关,在一定范围内诱导根原基所需的天数与NAA和IBA的浓度呈正相关。

3 讨论

植物基因工程在植物遗传育种中占有越来越重要的地位,在这个过程中植物组培技术是非常重要的环节,往往起到“瓶颈”的作用。胶东卫矛作为木本植物,我们在整个组培的过程中发现,分化率较低,这一点与桑新华^[2]等在胶东卫矛再生体系的建立报道上一致,因此这一方面的研究还需进一步开展。此外,由于我们实验仅获得胶东卫矛的无菌苗,移栽试验有待进一步的进行。

取材季节是胶东卫矛组织培养中的另一个“瓶颈”,从3月份到9月份的过程中,3、4月份材料生理活动旺盛,新萌发的芽和枝条本身带菌少,诱导芽相对容易,用同样的杀菌剂和消毒的时间,3、4月份污染极少,5、6月份细菌污染相对较多,真菌污染相对较少,在后来的实验过程中,两种菌的污染比较严重,这也与吴琰^[5]、陈正华^[6]等的研究结果一致。

植物生长调节剂在植物组培的过程中对植物的生理方面非常敏感,多种激素的使用往往优于其中一种激素的使用,适当细胞分裂素和生长剂配比有利于芽的诱导、苗的分化、植物生长势等,但有时这几方面不能同时满足,尤其是木本植物本身分化难,过分地强调分化往往会影响苗的长势;生长素有利于根原基的诱导,但在根原基上诱导之后,转入无激素培养基根生长得更好。在北海道黄杨组培中,适宜的6-BA

和 NAA 浓度配比起关键的作用,其中一种激素浓度过高或过低都将影响芽的分化、苗的生长状况,比例严重失调甚至引起苗的死亡。NAA 和 IBA 都对根原基的诱导具有敏感的作用,浓度过高往往引起诱导出的根原基畸形,浓度低则根原基诱导缓慢或不能诱导出根原基。

MS 培养基对于大多数木本观赏植物来讲,无机盐浓度偏高,降低无机盐有利于生根^[6],因此在实验中采用 1/2MS 培养基作为生根基本培养基。

我们以胶东卫矛带芽茎段作外殖体较易诱导腋芽的萌发生长,建立起了相对稳定高效的组培体系,通过继代培养可在短时间内大量增殖。试验结果表明,最佳诱导培养基为 MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 1.0 mg/L,继代培养以 MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L 效果较好,在 1/2MS + NAA 0.3 mg/L + IBA 0.1 mg/L 培养

基上较易生根。

参考文献

- [1] 石建宁. 丝棉木嫁接胶东卫矛在宁夏园林中的应用[J]. 防护林科技, 2006(4): 92-93.
- [2] 桑新华, 张秀海, 任桂芳, 等. 胶东卫矛再生体系的建立[J]. 北方园艺, 2005(5): 76-78.
- [3] Hodgson D J, Godfray H C J. The consequences of clustering by *Aphis fabae* foundresses on spring migrant production[J]. *Oecologia*, 1999, 118: 446-452.
- [4] 吴琰, 郭宝林, 鲁韧强, 等. 卫矛属植物组织培养无菌苗的方法研究[J]. 河北林果研究, 2007, 22(2): 140-142.
- [5] 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.
- [6] 王瑞云, 王玉国. 北海道黄杨试管苗的生根与移栽[J]. 山西农业大学学报, 24(2): 118-121.

(责任编辑 吴祝华)

土壤含水量对凤丹幼苗根颈加粗和生理特性影响

张琪^{1,2}, 张秀新², 徐迎春^{1*}, 张盈^{1,2}, 赵玉昆¹

(1. 南京农业大学园艺学院, 南京 210095; 2. 中国农业科学院蔬菜花卉研究所)

摘要: 在盆栽条件下研究了土壤相对含水量(SRWC)对凤丹幼苗根颈加粗和部分生理特性的影响。试验共设 5 个水分水平(土壤相对含水量分别为 100% (CK)、75%~80%、65%~70%、55%~60%、45%~50%, 处理时间为 20 d。结果表明: 与 CK 相比, 适度的水分胁迫(土壤相对含水量为 75%~80%)下, 凤丹幼苗的叶面积、主根长显著增大, 根颈粗增大了 17.95%, 脯氨酸含量增加近一倍, 根系活力增大了 12.57%, MDA 含量减少了 27.91%。说明适度的水分胁迫有利于凤丹生长发育及根颈加粗。除此之外, 随着土壤相对含水量的降低, 凤丹幼苗的主根长、根颈粗、叶面积、地上部及地下部干鲜重等指标呈下降趋势; 叶绿素、可溶性糖含量下降, 叶片游离脯氨酸和丙二醛含量上升。

关键词: 土壤相对含水量; 凤丹; 根颈; 生理特性

牡丹(*Paeonia suffruticosa* Andr.) 为芍药科芍药属多年生落叶灌木, 我国的传统名花, 具有很高的观赏价值。苗木生产是牡丹产业化生产的重要内容, 目前主要采用嫁接法繁殖, 通常以凤丹为砧木, 将牡丹良种接穗嫁接于其根颈部位。根长达 20 cm、根颈直径达 2 cm 以上才能保证嫁接成活及嫁接苗生长良好。由于凤丹实生苗在大田条件下生长缓慢, 需要培育 3~4 a 其根颈粗度才能达到嫁接标准, 为加快育苗速度, 需找到加快凤丹根系加粗生长的方法。

根系是土壤水分的直接吸收利用者, 当土壤水分胁迫时, 作物根系会首先感到, 同时根系形态结构、化学成分的数量和作物质量也发生相应变化^[1]。在大田作物^[2-3]及观赏植物^[4-5]上的研究表明, 土壤相对含水量显著影响植物根系的生长及形态, 但在牡丹中还未有报道。本研究即以 2 a 生凤丹为材料, 通过不同土壤相对含水量处理, 研究其对根颈生长发育的影响, 以找到适宜的水分条件以加速凤丹根颈的膨大, 缩短砧木培育周期, 进而加快牡丹苗木的培育速度, 为市场提供优质的苗木。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验于 2006~2007 年在南京农业大学园艺学院

收稿日期: 2007-11-20

修回日期: 2008-01-12

基金项目: 中国农业科学院基本科研业务专项(编号: 0032007021)。

第一作者简介: 张琪(1983-), 女, 硕士生, 主要从事观赏植物栽培生理研究。通讯作者: 徐迎春, 女, 副教授。E-mail: ceice12001@163.com