

扶芳藤茎尖的玻璃化法超低温保存及其植株再生

王贞, 高健洲, 刘燕*

北京林业大学园林学院, 国家花卉工程技术中心, 北京 100083

扶芳藤属卫矛科卫矛属常绿藤本灌木, 我国拥有丰富的扶芳藤资源, 目前已经引起了专家学者的注意, 扶芳藤的资源 and 变异研究(潘青华等 2004)、叶片粗蛋白和氨基酸成分分析(潘青华等 2005)、组织培养(王茂良等 2004; 金万梅等 2005)以及抗寒性(赵黎芳等 2004)等方面已有一些报道。研究发现, 在田间管理条件完全一致的资源圃中, 扶芳藤的攀援特性、叶形、叶色、冬季叶色变化、花序形态以及种子性状等的种内变异类型很多(潘青华等 2004), 这说明常规保存扶芳藤种质资源的方法不仅需要大量的人力与财力, 而且难以长期保存, 保存过程中会发生变异。液氮超低温保存是目前植物种质资源长期稳定保存的最好方法, 其中玻璃化法以其独特的优势备受人们推崇。

本文研究圆瓣扶芳藤 [*Euonymus fortunei* (Turcz.) Hand.-Mazz. cv. 'Yuanban'] 组织培养苗茎尖的超低温保存和保存茎尖的再生。2003年3月, 从北京北林科技苗圃取圆瓣扶芳藤实生苗的带芽茎段, 截成 1.5 cm 的小段, 用消毒液处理 15 min, 在自来水下流水冲洗 30 min 后, 于超净工作台上, 将带芽茎段用 75% 酒精消毒 30 s, 再用 0.1% 的 HgCl_2 消毒 7 min, 然后用无菌水冲洗 10 遍, 接种于添加 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA 和 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA 的 MS 固体培养基上。5 d 后芽开始萌动, 45 d 后进行继代培养, 以继代培养 30 d 生长健壮的组织培养苗为材料进行超低温保存。培养条件: 光照为 $40\sim 60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 温度为 $23\sim 25$ 。

在超净工作台上, 以继代 30 d 生长健壮的扶芳藤组织培养苗进行如下试验: (1) 切取茎尖 1~2、2~3、3~5 mm, 放入 1.8 mL 冷冻管中(10 个·管⁻¹), 先用 Loading 溶液($2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘油 + $0.4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖)处理 20 min, 再经 100% PVS_2 ($300 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘油 + $150 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙二醇 + $150 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ DMSO, 以含 $0.4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖的 MS 液体培养基配制)于 0 条件下处理 50 min; (2) 切取茎尖 2~3 mm, 经

Loading 溶液分别预处理 0、10、20、30、40、50、60 min 后, 在 0 条件下用 100% PVS_2 处理 50 min; (3) 切取茎尖 2~3 mm, 经 Loading 溶液处理 20 min 后, 在 0 条件下用 100% PVS_2 分别处理 0、10、20、30、40、50、60 min。然后更换新的 PVS_2 溶液, 迅速将冷冻管浸入液氮中, 冻存 1 d 后取出茎尖, 于 40 水浴中化冻 70 s, 再转到室温下用 MS 液体培养液(含 $1.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖, pH 5.8)洗涤 2 次, 每次 10 min, 然后接种在 MS + $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA + $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖的固体培养基(琼脂 $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 5.8)上暗培养, 7 d 后转到正常光照条件下恢复培养, 30 d 后检测茎尖成活率(存活茎尖数占冻存茎尖总数的百分比)。每个处理有 10 个茎尖, 重复 3 次。得到如下结果。

1. 茎尖长度对其在超低温保存后的成活率影响很大, 2~3 mm 的茎尖液氮保存后的成活率最高(为 74.3%), 而 1~2 和 3~5 mm 的茎尖保存后成活率分别为 14.3% 和 24%。茎尖过小, 再生能力较差, 茎尖过大会导致茎尖玻璃化程度不够而影响成活率, 这与已有报道(王子成和邓秀新 2001)一致。

2. Loading 溶液处理时间对茎尖液氮保存的成活率也有影响, 其成活率随着处理时间的延长而提高, 处理 20 min 以上的差异不显著(表 1)。

表 1 PVS_2 和 Loading 溶液处理时间对超低温保存后扶芳藤茎尖成活率的影响

处理液	处理时间/min						
	0	10	20	30	40	50	60
PVS_2	0	10.0	22.0	40.0	47.1	74.3	75.0
Loading	10.5	36.1	74.3	75.6	74.3	75.7	77.6

收稿 2007-01-18 修定 2007-02-14

* 通讯作者(E-mail: chbly@sohu.com; Tel: 010-82376017-601)。

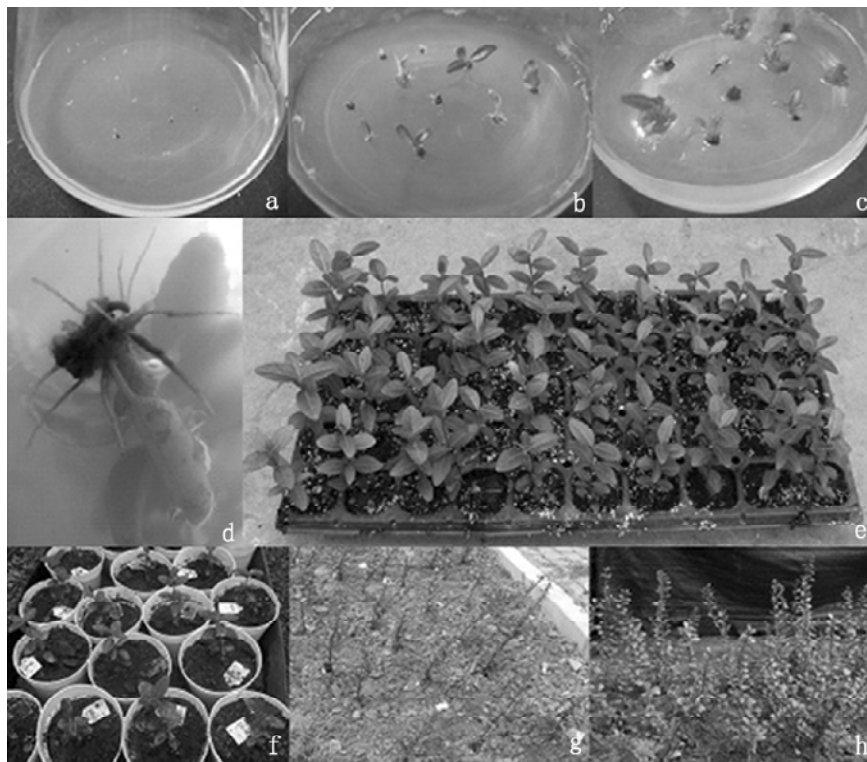


图1 液氮保存后扶芳藤茎尖培养和植株再生

a: 液氮保存后的茎尖; b: 液氮保存 30 d 后茎尖直接成苗; c: 液氮保存 30 d 后茎尖形成的愈伤组织; d: 超低温再生苗生根; e: 超低温再生苗移栽到穴盘; f: 超低温再生苗移栽入花盆; g: 超低温再生苗移栽入露地; h: 移栽 3 个月后露地生长情况。

3. 扶芳藤茎尖保存成活率与 PVS_2 的脱水时间也有关系: 时间短, 脱水效果不充分, 影响成活率; 脱水时间过长, 细胞组织受到伤害后的恢复能力差。最佳的处理是 0 条件下处理 50~60 min (表 1)。

4. 经液氮保存的茎尖再生培养基与继代增殖培养基的效果不同: 在添加 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA 和 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA 的 MS 固体培养基上的茎尖, 不能直接生成幼苗而形成愈伤组织; 而在只添加 6-BA 的 MS 培养基上的茎尖, 则可直接成苗, 这与 6-BA 的浓度也有关系, 茎尖在添加 $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA 的再生培养基上的生长速度优于添加 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA 的。

5. 液氮再生苗生根后 40 d, 移栽到穴盘上栽培, 基质为草碳:珍珠岩=3:1。开始覆盖塑料膜, 喷水以保持湿度, 15 d 时, 幼苗恢复生长后去掉覆盖膜, 正常肥水管理, 移栽成活率高达 100%。穴盘中幼苗生长时间过长会导致营养不良和根系出

现盘根现象, 所以生长 50 d 左右需要换盆, 盆径 $16 \text{ cm}\times 16 \text{ cm}$, 基质为草碳:沙:园土=1:1:1。于 2006 年 4 月中旬, 将液氮再生苗移栽到苗圃露地栽培。移栽初期遮荫, 避免阳光直射, 移栽后 1 个月, 幼苗恢复生长, 去掉遮荫网, 正常肥水管理, 再生苗长势良好。移栽 3 个月后, 苗高可达 50 cm (图 1)。

参考文献

- 金万梅, 尹淑萍, 鲁韧强, 潘清华, 白金(2005). 扶芳藤组织培养再生体系的建立. 植物生理学通讯, 41 (1): 27~29
- 潘清华, 宋婉, 鲁韧强, 续久如(2004). 扶芳藤种质资源及变异研究. 北京林业大学学报, 26 (2): 58~62
- 潘清华, 张维海, 鲁韧强(2005). 扶芳藤叶片粗蛋白和氨基酸成分分析. 中国农学通报, 21 (8): 204~207
- 王茂良, 赵梁军, 任桂芳, 王建红, 冯慧(2004). 扶芳藤再生体系的建立. 园艺学报, 31 (2): 241~244
- 王子成, 邓秀新(2001). 玻璃化法超低温保存柑桔茎尖及植株再生. 园艺学报, 28 (4): 301~306
- 赵黎芳, 张金政, 张启翔, 石雷, 鲁韧强(2004). 盐和水分预处理对扶芳藤幼苗抗寒性的影响. 植物研究, 24 (7): 213~316