

扶芳藤组织培养再生体系的建立

金万梅 尹淑萍* 鲁韧强 潘青华 白金

北京市农林科学院林业果树研究所, 北京 100093

提要 扶芳藤茎段比叶盘易产生不定芽; 4种基因型中, 圆瓣扶芳藤的不定芽再生频率远远高于其他3种; MS+6-BA 2.0 mg·L⁻¹是圆瓣扶芳藤不定芽诱导的最适培养基; 低温处理10 d可显著提高不定芽的再生频率; 暗培养对扶芳藤再生影响不大; 扶芳藤诱导不定芽的最适pH范围在5.8~6.2之间; 最适琼脂浓度为0.6%。

关键词 扶芳藤; 组织培养; 再生

Establishment of Regeneration System for *Euonymus fortunei* Hand.-Mazz. in vitro

JIN Wan-Mei, YIN Shu-Ping*, LU Ren-Qiang, PAN Qing-Hua, BAI Jin

Institute of Forestry and Pomology, Beijing Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Beijing 100093

Abstract The results showed that: efficiency of adventitious buds induction from stem was higher than that from leaf disc; among the four tested genotypes (*Euonymus fortunei* Orbiculatus, *E. fortunei* Hongmai, *E. fortunei* Kuanban and *E. fortunei* Hongya), *E. fortunei* orbiculatus obtained the highest regeneration rate; the optimum medium for *E. fortunei* orbiculatus was MS+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA; exposing explants at low temperature for 10 d was helpful; dark or light cultivation of explants reached nearly the same regeneration rate; the optimum pH of medium was 5.8–6.2 and the agar concentration was 0.6%.

Key words *Euonymus fortunei*; tissue culture; regeneration

扶芳藤为卫矛科卫矛属多年生匍匐或攀援灌木, 其分布广泛, 适应性强, 具有耐旱和耐贫瘠的特点, 已广泛应用于城市园林绿化中^[1,2]。植物组织培养再生体系是植物材料和培养环境相互作用的结果^[3]。基因型是影响植物离体再生的主要因素, 生长调节物质可以诱导外植体不同器官的形成, 温度、光照等其它培养因子可以调节外植体的生理状态, 有利于提高其对再生的反应性^[4~6]。扶芳藤组织培养的研究尚未见报道。本文对影响扶芳藤再生的基因型、生长调节物质、温度、光照、pH以及琼脂浓度等因素进行研究, 目的在于建立扶芳藤组织培养再生体系。

材料与方法

4种扶芳藤(*Euonymus fortunei* Hand.-Mazz.) 品系: 圆瓣扶芳藤(Orbiculatus)、红脉扶芳藤(Hongmai)、宽瓣扶芳藤(Kuanban)和红芽扶芳藤(Hongya)均采自本所苗圃内。这4种扶芳藤在冬季不落叶, 红脉扶芳藤和红芽扶芳藤的叶色转为

浅红和红色, 圆瓣扶芳藤和宽瓣扶芳藤则转为灰暗色。

2, 4-D、NAA、KT和6-BA为Sigma产品, 其余试剂均为国产分析纯。基本培养基为MS培养基。

取扶芳藤带芽茎段, 以流水冲洗60 min, 用0.1%的升汞消毒5 min, 无菌水冲洗3次, 每次5 min, 接种于初代培养基(MS+6-BA 0.5 mg·L⁻¹)上。选取继代25~30 d的试管苗, 叶片剪成大小约1.5 mm×2 mm的叶盘, 取无腋芽的节间剪成2~4 mm的茎段, 作为再生的外植体。在预备试验的基础上进行以下处理: (1)扶芳藤叶盘和茎段接种在含不同生长调节物质的培养基上; (2)圆瓣扶芳藤的外植体接种在MS+6-BA 2.0 mg·L⁻¹培养基上, 于0℃低温下处理0、5、10、20、30 d;

收稿 2004-04-12 修定 2004-10-08

* 通讯作者(E-mail: spyin@vip.sina.com, Tel: 010-82594698)。

(3) 圆瓣扶芳藤的外植体接种在MS+6-BA 2.0 mg·L⁻¹培养基上, 于温度(25±2)℃下, 暗培养0、5、10、20、30 d; (4) 圆瓣扶芳藤的外植体接种在pH分别为5.0、5.4、5.8、6.2、6.6、7.0的MS+6-BA 2.0 mg·L⁻¹培养基上; (5) 圆瓣扶芳藤的外植体接种在琼脂浓度分别为0、0.3、0.6、0.9、1.2的MS+6-BA 2.0 mg·L⁻¹培养基上。以上处理均培养在光照14 h·d⁻¹(光照度2 000~3 000 lx)、温度为(25±2)℃的条件下。45 d后统计外植体再生芽数和不定芽再生频率。按公式: 不定芽再生频率 = 再生不定芽的外植体数/接种的总外植体数和外植体再生不定芽数 = 再生不定芽的总数 / 再生不定芽的外植体数计算。

结果与讨论

1 生长调节物质对不同基因型扶芳藤离体再生的影响

不同扶芳藤的叶盘接种在附加不同生长调节物质的10种培养基上, 叶盘均无不定芽产生; 但经过3周培养后, 所有处理都可以产生大量的愈伤组织, 分化能力较弱的红芽和红脉扶芳藤也产生大量的愈伤组织(图1-a、b)。基因型是影响扶芳藤茎段再生的主要因素, 圆瓣扶芳藤分化能力强, 其再生频率比红脉、宽瓣、红芽扶芳藤均高。对于扶芳藤的同一品系而言, 培养在含有不同生长调节物质的培养基上, 其再生频率差异较

大(表1)。圆瓣扶芳藤在MS+6-BA 2.0 mg·L⁻¹培养基上的再生不定芽最多(图1-c), 在MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+KT 1.0 mg·L⁻¹培养基上的再生不定芽次之, 其他4种培养基上的不定芽均很少, 在MS+2, 4-D 0.05 mg·L⁻¹和MS+NAA 0.05 mg·L⁻¹上无不定芽产生。红脉扶芳藤仅在MS+6-BA 2.0 mg·L⁻¹+2, 4-D 0.05 mg·L⁻¹培养基上产生很少的芽。宽瓣扶芳藤在MS+6-BA 2.0 mg·L⁻¹和MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+KT 1.0 mg·L⁻¹产生芽较多, 在MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+KT 1.0 mg·L⁻¹+2, 4-D 0.05 mg·L⁻¹上可以获得较少的不定芽(图1-d), 其余培养基上均未得到不定芽。红芽扶芳藤仅在MS+6-BA 1.0 mg·L⁻¹+KT 1.0 mg·L⁻¹+NAA 0.05 mg·L⁻¹培养基上有少量的不定芽产生。

2 低温处理时间对扶芳藤再生的影响

低温处理时间是影响扶芳藤再生的重要因子。表2表明, 低温处理10 d可以提高再生频率; 但随着低温处理时间的延长, 再生频率下降。低温处理时间对每种外植体再生不定芽数也有一定的影响: 低温处理10 d的再生不定芽数最多, 为2.37; 随着低温处理时间的延长, 再生不定芽数逐渐降低。

3 暗培养时间对扶芳藤再生的影响

表3表明, 暗培养对扶芳藤再生的影响不大, 暗培养处理之间无明显差异。外植体再生不定芽数也无明显差异, 均在1.86~2.29之间。这

表1 不同生长调节物质对不同基因型扶芳藤茎段再生不定芽的影响

Table 1 Effects of different growth regulators on bud regeneration from stem segments of *Euonymus fortunei* with different genotypes

培养基和加入生长调节物质的浓度/mg·L ⁻¹	圆瓣扶芳藤再生不定芽频率/%	红脉扶芳藤再生不定芽频率/%	宽瓣扶芳藤再生不定芽频率/%	红芽扶芳藤再生不定芽频率/%
MS	0 ^d	0 ^b	0 ^{bc}	0 ^b
MS+6-BA 2.0	88.6 ^a	0 ^b	56.1 ^a	0 ^b
MS+KT 2.0	12.3 ^c	0 ^b	0 ^{bc}	0 ^b
MS+2, 4-D 0.05	0 ^d	0 ^b	0 ^{bc}	0 ^b
MS+NAA 0.05	0 ^d	0 ^b	0 ^{bc}	0 ^b
MS+6-BA 2.0+2, 4-D 0.05	10.6 ^c	7.7 ^a	0 ^{bc}	0 ^b
MS+6-BA 2.0+NAA 0.05	11.0 ^c	0 ^b	0 ^{bc}	0 ^b
MS+6-BA 1.0+KT 1.0	45.1 ^b	0 ^b	49.4 ^a	0 ^b
MS+6-BA 1.0+KT 1.0+2, 4-D 0.05	8.2 ^c	0 ^b	11.5 ^b	0 ^b
MS+6-BA 1.0+KT 1.0+NAA 0.05	8.5 ^c	0 ^b	9.7 ^b	10.2 ^a

不同字母表示显著性差异($P \leq 0.05$)。

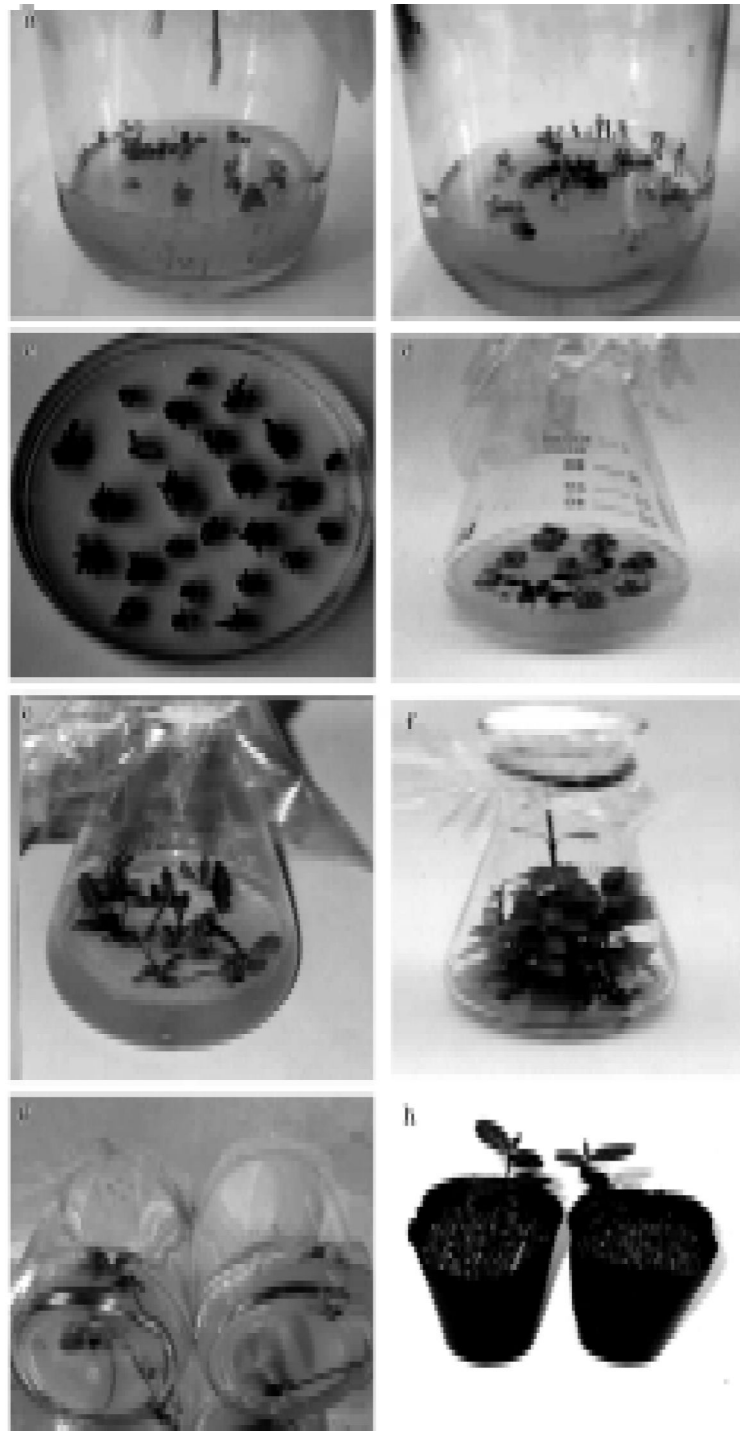


图1 扶芳藤不定芽的诱导、生长和移栽

Fig.1 Induction and growth of adventitious buds of *Euonymus fortunei* and transplants

a. 诱导红芽扶芳藤叶片产生愈伤组织, b. 诱导红脉扶芳藤叶片产生愈伤组织, c. 圆瓣扶芳藤的茎段再生不定芽, d. 诱导宽瓣扶芳藤茎段产生愈伤组织和不定芽, e. 圆瓣扶芳藤不定芽的增殖, f. 圆瓣扶芳藤不定芽生长, g. 圆瓣扶芳藤单芽生根, h. 圆瓣扶芳藤移栽成苗。

表2 低温处理时间对圆瓣扶芳藤茎段再生的影响

Table 2 Effects of low temperature on bud regeneration from stem segments of *E. fortunei* Orbiculatus

低温处理时间/d	外植体再生不定芽数/个	不定芽再生频率/%
0	1.56 ^b	82.3 ^{ab}
5	2.03 ^a	88.6 ^a
10	2.37 ^a	91.4 ^a
20	1.38 ^b	74.7 ^b
30	1.35 ^b	73.3 ^b

不同字母表示显著性差异 ($P \leq 0.05$)。

表3 暗培养时间对圆瓣扶芳藤茎段再生的影响

Table 3 Effects of dark on bud regeneration from stem segments of *E. fortunei* Orbiculatus

暗培养处理时间/d	外植体再生不定芽数/个	不定芽再生频率/%
0	1.86 ^a	84.5 ^a
5	2.16 ^a	89.6 ^a
10	2.18 ^a	89.8 ^a
20	2.29 ^a	91.2 ^a
30	1.90 ^a	87.5 ^a

不同字母表示显著性差异 ($P \leq 0.05$)。

与于冬梅等^[6]的暗培养对草莓再生以及马艳^[7]认为暗培养易诱导苦皮藤器官形成结果一致。

4 pH对扶芳藤再生的影响

pH是影响扶芳藤再生的重要因子, pH过高或过低均影响再生频率。从表4可知, pH 5.0和5.4处理的再生频率均很低; pH 6.6和7.0的再生频率较高; 在pH 5.8和6.2, 再生频率最高。外植体再生不定芽数也表现出相似的趋势, pH 5.8和6.2, 外植体再生不定芽数达到2.33和2.30。

5 琼脂浓度对扶芳藤再生的影响

琼脂浓度也是影响扶芳藤再生的因素, 琼脂浓度过低或过高都不利于扶芳藤再生。由表5可知, 不加琼脂处理的, 很难再生不定芽; 琼脂浓度为3 g·L⁻¹的再生频率为71.5%; 琼脂浓度为12 g·L⁻¹的再生频率为76.6%; 琼脂浓度为6 g·L⁻¹的再生频率最高。琼脂浓度为6 g·L⁻¹的处理外植体再生不定芽数最多。

在成苗过程中, 扶芳藤在MS+6-BA 0.5 mg·L⁻¹+

表4 pH对圆瓣扶芳藤茎段再生的影响

Table 4 Effects of pH on bud regeneration from stem segments of *E. fortunei* Orbiculatus

pH	每外植体平均再生不定芽数/个	不定芽再生频率/%
5.0	1.09 ^{bc}	38.1 ^{bc}
5.4	1.00 ^{bc}	47.3 ^{bc}
5.8	2.33 ^a	95.6 ^a
6.2	2.30 ^a	96.2 ^a
6.6	1.27 ^{bc}	75.4 ^b
7.0	1.52 ^b	78.6 ^b

不同字母表示显著性差异 ($P \leq 0.05$)。

表5 琼脂浓度对圆瓣扶芳藤茎段再生的影响

Table 5 Effects of agar concentrations on bud regeneration from stem segments of *E. fortunei* Orbiculatus

琼脂浓度/g·L ⁻¹	每外植体平均再生不定芽数/个	不定芽再生频率/%
0	0 ^{bc}	0 ^{bc}
0.3	1.38 ^b	71.5 ^b
0.6	2.12 ^a	92.3 ^a
0.9	2.03 ^a	88.2 ^a
1.2	1.49 ^b	76.6 ^b

不同字母表示显著性差异 ($P \leq 0.05$)。

IBA 0.2 mg·L⁻¹培养基上扩繁增殖很快(图1-e、f), 在MS+IBA 0.2 mg·L⁻¹上容易生根(图1-g)。生根苗移栽后易成活(图1-h)。关于扶芳藤不同品系间再生频率的差异的原因及扶芳藤叶盘不定芽的再生尚需进一步研究。

参考文献

- 1 沈夏滢. 扶芳藤. 植物杂志, 1996, (6):18
- 2 罗铮. 三种优良的攀缘植物. 中国花卉盆景, 1997, (8):6~7
- 3 曹孜义, 刘国民. 植物组织培养教程. 兰州: 甘肃科学技术出版社, 1996. 9~12
- 4 赵云, 王海燕, 王茂林. 基因型对油菜子叶外植体再生植株的影响. 中国油料, 1997, 19(4):1~4
- 5 廖祥儒, 郭中伟, 杜建芳等. 低温和PEG预处理对小麦愈伤组织形成及IAA氧化的影响. 植物学通报, 2000, 17(3): 257~259
- 6 于冬梅, 胡文玉, 王关林. 基因型和培养因子对诱导草莓叶片再生芽的影响. 沈阳农业大学学报, 1998, 29(2):138~143
- 7 马艳, 肖娅萍, 胡雅琴. 苦皮藤组织培养与植株再生. 中草药, 2003, 34(10):4~7