

桃叶卫矛组织培养的研究

张丽杰¹, 王强恩², 周强², 张才²

(1. 沈阳农业大学 林学院, 辽宁 沈阳 110161; 辽宁省实验林场, 辽宁 清原 113311)

摘要:以桃叶卫矛的成熟胚为外植体,研究了不同消毒方法对桃叶卫矛离体胚萌发的影响,并筛选出最佳消毒液及消毒时间。同时,选取不同培养基和激素浓度进行卫矛的离体胚培养最佳激素组合筛选。结果表明:不同的灭菌剂和不同的灭菌时间对无菌苗的萌发与生长有显著的影响;筛选出 MS1/2+BA 0.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 7 g/L 的培养基为成熟胚萌发的最适培养基配比。

关键词:桃叶卫矛;灭菌方法;组织培养

中图分类号:S 687 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)17-0141-03

桃叶卫矛(*Euonymus bungeanus* Maxim)为卫矛科卫矛属的落叶小乔木。该树种对风和烟尘有很强的抵抗力,病虫害少,且枝叶娟秀细致,树冠饱满形美,是园林

绿化观赏树种,同时具有较高的经济价值。桃叶卫矛的繁殖一般采用播种、扦插、分株繁殖等方法,但由于受种子园数量以及产量所限制,所获得的优质苗木非常少,而且繁殖速度也比较慢,而且播种繁殖种子的采集时间要求很强,采种后预处理复杂,且后期管理要求高,在生产上很难采用种子繁殖的方法大规模培育苗木^[1]。因此,该研究应用组织培养的手段探索桃叶卫矛无性繁殖的新途径,并取得良好效果。

第一作者简介:张丽杰(1972-),女,硕士,讲师,现主要从事林木遗传育种教学研究工作。E-mail:zhanglijie_106@sina.com。

基金项目:“十一五”国家科技基础条件平台建设资助项目(2005DKA21003)。

收稿日期:2010-05-11

参考文献

- [1] 申明亮,邓才富,易思荣,等. 重庆药用牡丹规范化生产技术规程(SOP)[J]. 中国现代药, 2009, 11(5): 9-12.
- [2] 范俊安,张艳,夏永鹏,等. 重庆垫江牡丹皮生产历史与生产现状分析[J]. 中药材, 2006, 29(4): 401-403.
- [3] 范俊安,张艳,丘宗荫,等. 重庆垫江牡丹皮原植物和形态组织学研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(10): 843-845.

[4] 李雪冬. 旅游心理学[M]. 天津:南开大学出版社, 2008: 59.

[5] 王海堂,刘庆伦,王保杰. 关于加强农村土地流转和集约化经营引导与管理协调的调研报告[J]. 山东农业大学学报(社会科学版), 2009(3): 60-62.

[6] 王晓晖,王占营,刘迎锋. 浅谈牡丹应用[J]. 现代园艺, 2009(1): 33-35.

The Ornamental Exploitation Instance and the Countermeasure about Medical Peony in Dianjiang Chongqing

ZHANG Zu-rong^{1,2}, YOU Yu-ming^{1,3}

(1. Department of Life Science, Chongqing University of Arts and Sciences, Chongqing 402168; 2. Chongqing Peony Institute, Chongqing 405160; 3. Dianjiang County tour Bureau, Chongqing 405160)

Abstract: Through three research means including questionnaire, visit and inquisition, information collection, this paper had a complete and in-depth investigation and analysis on the ornamental exploitation instance about medical peony in Dianjiang Chongqing. The results showed that the exploitation had achieved marked effect through many years work by the local government. But there were many problems in dire need of improving. Such as the form and colour, the scent and quantity, the florescence length and forecast, and tour service and propagandizing management. For this, this paper advanced some corresponding solving countermeasures.

Key words: Dianjiang Chongqing; medical peony; ornamental exploitation; investigation and analysis

1 材料与方法

1.1 试验材料

取自辽宁省湾甸子实验林场 10 a 生的桃叶卫矛,选取发育良好的母树,采取当年生的成熟种子,以成熟胚为外植体作为试验材料。

1.2 试验方法

1.2.1 培养基的配置 选取了 MS、MS1/2(所有元素都减半)和 1/2MS(大量元素减半)3 种基本培养基,附加细胞分裂素 BA(0、0.2、0.5 mg/L),生长素 NAA(0、0.1、0.2、0.5 mg/L),蔗糖 30 g/L,琼脂 7 g/L,pH 5.8,用常规方法配制分装后,经 121℃ 灭菌 20 min 备用。

1.2.2 材料消毒 将桃叶卫矛种子的假种皮去除,然后将种子用自来水浸泡 3 d,每天换 2 次水;接种前 1 d 用流水冲洗。然后在超净工作台上进行消毒处理。试验设计 4 种消毒组合。每组合设 5 个处理。每个处理重复 5 次,每瓶 3 个外植体(表 1)。外植体消毒后,切开种子取出成熟胚,将其接种在培养基上进行培养。

表 1 试验所用的不同种类消毒剂 and 消毒时间

序号	消毒剂			
	种类	处理时间/s	种类	处理时间/min
1	70%酒精	30	0.1%升汞	8
2	70%酒精	30	0.1%升汞	10
3	70%酒精	30	0.08% H_2O_2	8
4	70%酒精	30	0.08% H_2O_2	10

1.2.3 培养条件 接种后放入培养室中光照培养(12 h/d),培养室的温度控制为 23~25℃,光照强度为 2 000 lx 左右,湿度在 60%~70%之间。

2 结果与分析

2.1 不同消毒剂和消毒时间对外植体生长的影响

将种子浸泡 3 d 后,按表 1 中的消毒剂和消毒时间对桃叶卫矛的种子进行消毒。然后将处理好的种子用解剖刀切开,取出种胚接种到培养基中,10 d 后统计外植体染菌情况。将染菌情况记录于表 2。

表 2 不同消毒剂和不同处理时间对外植体生长的影响

培养基	处理	消毒剂	处理时间/min	平均染菌率/%	$F_{0.01}$
					显著水平
MS	1	0.08% H_2O_2	8	46.67	A
	2	0.08% H_2O_2	10	36.67	A
	3	0.1%升汞	8	38.89	A
	4	0.1%升汞	10	10.56	B

注:每个处理 3 次重复,用 LSD 最小显著差数法进行多重比较。

由表 3 可知,不同消毒方法对外植体的萌发与生长有极显著影响($P < 0.01$)。因此选择最佳消毒方法是必要的,在以后的试验中选取 70%的酒精浸泡 30 s+0.1%升汞 10 min 为最佳消毒处理。

2.2 不同培养基对外植体生长的影响

试验中选用了 3 种基本培养基:MS、1/2MS(只有大

量元素减半)、MS1/2(所有元素都减半),将预处理的种子用解剖刀解开发出种胚,然后接种于上述 3 种培养基中。每种培养基设 4 个处理,共计 12 个处理,每处理重复 5 次,每瓶接种 3 个外植体。10 d 后观察统计成熟胚在不同培养基上的萌发情况。

表 3 不同培养基对外植体萌发的影响

培养基	总接种数	总萌发数	总萌发率/%	生长状况
MS	60	14	23.33	子叶薄,长势弱胚根长势弱
MS1/2	60	34	56.67	子叶胚根长势均良好
1/2MS	60	21	35.00	子叶卷曲,胚根褐化

由表 3 可知,培养基不同,对桃叶卫矛成熟胚的离体萌发的影响是很大的。其中在 MS1/2 培养基上的成熟胚的子叶萌发及长势很好,而在 MS 培养基上的外植体的子叶长势很弱,子叶略为变绿,但大部分子叶出现黄褐色;1/2MS 培养基上的外植体在接种 3~4 d 后,子叶膨胀,边缘向里卷曲,并且在胚根处出现褐变现象。以后褐变的外植体逐渐死亡。

2.3 不同激素配对外植体生长的影响

将成熟胚取出后接种于 MS1/2 培养基上,试验共设 3 个处理和 1 个对照。接种 10 d 后,观察外植体在培养基上的生长情况,并对萌发率进行统计。

表 4 MS1/2 培养基中不同激素配对外植体萌发率

激素配比/ $mg \cdot L^{-1}$	接种数	萌发数	萌发率/%	生长状况
BA 0+NAA 0	15	5	33.33	长势良好
BA 0.2+NAA 0.5	15	7	46.67	长势良好
BA 0.5+NAA 0.2	15	12	80.00	长势良好
BA 0.5+NAA 0.1	15	10	66.67	长势良好

由表 4 可以看出,BA 0.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L 的激素组合萌发率最高达到 80%,BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L 的激素组合也较高为 66.67%,由此可知可推测高 BA 含量与低的 NAA 含量组合可能更有利于胚的萌发,不加任何激素的配方也有一定的萌发率,而且萌发率相对较高,但无菌苗的长势差,15 d 后逐渐失去活力而死亡。这可能是在启动初期,外植体本身含有一定的外源激素,可以促进其萌发,但促进萌发的能力有限,因此只有添加适宜的外源激素才能最大程度地促进其形成完整的无菌苗。由以上统计结果表明,激素组合 MS1/2+BA 0.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L 萌发率最高,且长势也好。因此,选取 MS1/2+BA 0.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L 为最适宜的激素组合。

2.4 生根培养

在无菌苗生根培养过程中,选取了 MS1/2(所有元素都减半)培养基;附加了 0.2 mg/L 的生长素 NAA,将已发育良好,生长正常的小苗转入生根培养基中。5 d 后观察,在无菌苗的根部已经长出浅绿色的块状愈伤组织,10 d 后,在愈伤组织上长出大约 1 cm 左右的不定根。但是,在生根培养过程中,大部分萌发苗出现了褐变现

象,褐变是离体组织培养时细胞中多酚氧化酶活性增加,致使酚类物质氧化生成棕褐色醌类物质的结果^[2-3]。目前,已经在许多植物的组织培养过程中发现了有外植体褐变现象^[4]。例如,在白桦(*Betula platyphlla*)的组织培养中,低盐浓度的 WPM 培养基比 MS 培养基更能有效的阻止褐变^[5]。在桑树(*Morus alba*)的组织培养中,褐变的原因归为水的硬度、蔗糖的品质、无机盐的浓度、培养基的硬度、继代时间长短、光照和培养温度、外植体的生理状态等综合影响的结果^[6]。

2.5 试管苗的移栽

试管苗的移栽要经过移栽前的准备、移栽和移栽后的养护管理等环节。试管苗从试管内移到试管外,由异养转为自养,由原来的恒温、高温、弱光变为自然变温、低温、强光,环境条件由无菌变为有菌,变化是很剧烈的。因此,在移栽前 1 周左右的时间,将根系生长良好的封口膜打开,进行练苗 2~3 d,使小苗逐渐适应外界的环境。然后将已经生根的无菌苗移栽至盛有草炭土的基质的容器中。刚开始几天要用保鲜膜保水和遮荫,以防止外界强烈的光照和水分的散失。

将生长良好长出细根的小苗用镊子取出,自来水洗去根部琼脂移栽入准备好的塑料花盆中,并浇透水,盖上塑料膜以防水分散失过快。10 d 后观察,植株生长良好。

3 结论

该项研究是首次通过选取桃叶卫矛的成熟种子,利用成熟胚为外植体,获得无菌苗、生根苗、移栽这一无性繁殖方法。

通过选取 4 种不同的灭菌剂和不同的灭菌时间对外植体进行消毒处理,结果表明,不同灭菌剂采用不同

的灭菌时间对外植体的萌发与生长有显著的影响。

选取以 MS₁/2MS、MS₁/2 的 3 种培养基为外植体萌发培养基,并附加不同浓度的 BA 和 NAA 结果表明外植体在 MS₁/2 培养基上萌发率最高,生长较好。因此,筛选出 MS₁/2+BA 0.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L 培养基为成熟胚萌发的最适培养基。萌发率可以达到 80%。

以 MS₁/2 培养基为生根培养基,附加生长素 NAA, 0.2 mg/L 5 d 后,在苗根部长有约 3 mm 的块状愈伤,并在愈伤部位长有细根。

经过 2~3 d 的练苗,将已生根的小苗转入草炭土基质的容器中,10 d 后观察,小苗生长正常。

试验证明,选取桃叶卫矛的成熟胚为外植体进行诱导使其萌发、生根、成苗,这是一条可行的植株再生途径。

参考文献

- [1] 刘继生,张鹏,金春德,等.桃叶卫矛种子的发芽特性[J].延边大学学报,2001,23(4):254-256.
- [2] 刘兰英.“薄壳香”核桃组培中的褐化及防止措施研究[J].园艺学报,2002,29(2):171-172.
- [3] 陈正华.木本植物组织培养及应用[M].北京:高等教育出版社,1986:456-466.
- [4] 陶静,詹亚光,姜静,等.白桦组培再生系统的研究[J].东北林业大学学报,1998,26(5):7-9.
- [5] 邱璐,陈善娜,夏跃明,等.桑树组织培养中褐化问题的研究[J].云南大学学报,2000,22(1):76-78.
- [6] 郭奕明,杨映根,郭毅,等.落叶松体细胞胚胎发生[J].植物生理学通讯,2003,39(3):531-534.
- [7] Bonga J M, Durzan D J. 林木组织培养[M].北京:中国林业出版社,1982:17-20.

Study of Tissue Culture of *Euonymus bungeanus*

ZHANG Li-jie¹, WANG Qiang-en², ZHOU Qiang², ZHANG Cai²

(1. Forestry College of Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110161; 2. Liaoning Province Tests Tree Farm, Qingyuan, Liaoning 113311)

Abstract: In order to achieve the exsomatize regeneration of the *Euonymus bungeanus* Maxim. taking its mature embryo as explants, studies the influence on the explants growth under different sterilizing agents and different sterilization time, and impact on them which was caused by different mediums and different hormone concentration ratios. This experiment studies the possible approaches of from vitro germination to normal strains with the hope to get the regeneration plants. The results showed that the different agents and different sterilization time on the germination and growth of non-vaccine has a significant impact. Filter out the MS₁/2+BA 0.5 mg/L+NAA 0.2 mg/L+sucrose 30 g/L+agar 7 g/L medium for the germination of mature embryos of the best medium ratio.

Key words: *Euonymus bungeanus*; sterilization methods; tissue culture