

火焰卫矛组织培养及植株再生研究

祖庆学, 赵德刚

(贵州大学生命科学学院贵州省农业生物工程重点实验室, 贵州 贵阳 550025)

摘要: 以火焰卫矛成熟胚培养长出的子叶为外植体进行组织培养及植株再生研究, 建立了火焰卫矛再生体系, 成熟胚培养基为 WPM+TDZ $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; 子叶愈伤组织诱导和不定芽分化培养基为 WPM+6-BA $6\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +IBA $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; 生根培养基为 1/2MS+NAA $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +活性炭 $0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

关键词: 火焰卫矛; 子叶; 组织培养

中图分类号: S687; S722.3⁺7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-7351(2008)03-0080-04

Tissue culture and plantlet regeneration of *Euonymus alatus* 'compacta'

ZU Qing-xue, ZHAO De-gang

(Guizhou Key Lab of Agro-Bioengineering, College of Life Sciences, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025, China)

Abstract: The cotyledon from mature embryo of *Euonymus alatus* 'compacta' was used as the explant for studying the tissue culture and the plantlet regeneration. The results indicated that the medium for mature embryo was WPM+TDZ $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, the medium for callus induction from the cotyledon and the medium for bud differentiation were WPM+6-BA $6\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +IBA $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, the medium for rooting of adventitious buds was 1/2MS+NAA $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +active carbon $0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. These provide fundamentals for rapid propagation and genetic engineering of *Euonymus alatus* 'compacta'.

Key words: *Euonymus alatus* 'compacta'; cotyledon; tissue culture

火焰卫矛(*Euonymus alatus* 'compacta')是卫矛科卫矛属落叶灌木, 株高1.5~3 m, 冠幅可达3 m, 树枝幼时绿色、无毛, 老枝上生有木栓质的翅。花期5月~6月上旬, 花色浅红或浅黄色, 聚伞花序。叶从椭圆形至卵圆形均有, 有锯齿, 单叶对生, 春季叶片为深绿色, 秋季变为血红色或火焰红色。火焰卫矛适应性强, 耐阴, 并且极耐低温, 是一种经济价值极高的园艺观赏植物。火焰卫矛主要通过扦插或种子繁殖, 不仅繁殖系数低、速度慢, 而且品质易退化, 难以得到迅速推广和发展^[1]。研究火焰卫矛组织培养技术, 既可保持其优良种性, 又可在短期内使优株迅速扩大繁殖, 并可为基因工程改良奠定基础。本文报道了利用火焰卫矛成熟胚长出的子叶为外植体获得再生植株的研究结果。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为火焰卫矛种子。

1.2 培养条件

培养基采用固体培养基, 琼脂质量浓度 $6\sim 8\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 蔗糖质量浓度 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 值为 6.0, 光照时间 $12\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$, 光强为 $3\ 000\sim 4\ 000\text{ lx}$, 培养温度为 $23\sim 27^\circ\text{C}$ 。

1.3 方法

1.3.1 无菌材料培养 将保存于 4°C 冰箱中光滑、子粒饱满的火焰卫矛种子去除蜡质, 在流水中冲洗 $24\sim 36\text{ h}$ 。在超净工作台上用 75% 酒精消毒 3 min, 无菌水冲洗 2~3 遍, 再用 0.1% 的升汞分别消毒 5 min、10 min、12 min, 无菌水冲洗 6~7 遍, 放于无菌滤纸上吸干种子表面水分。将种子成熟胚挑出接种到胚培

收稿日期: 2008-03-04; **修回日期:** 2008-04-30

基金项目: 贵州省优秀科技教育人才省长专项资金和贵州省高层次人才专项基金资助

作者简介: 祖庆学(1979-), 男, 贵州威宁人, 贵州大学生命科学学院在读硕士研究生, 从事植物基因工程研究。

通讯作者: 赵德刚, Email: dzghao@gzu.edu.cn。

培养基 WPM + TDZ(0.5, 1.0, 1.5)mg·L⁻¹上, 4 d 后观察消毒效果, 14 d 后根据成熟胚诱导生长状况, 确定胚状体长势最好的培养基作为成熟胚诱导培养基。每个处理 5 皿, 每皿 20~30 个外植体。

1.3.2 外植体来源 培养成熟胚, 以其长出的无菌芽苗子叶为外植体。

1.3.3 愈伤组织的诱导及分化 以 WPM、MS 2 种培养基为基本培养基, 将切好的外植体接种于上述 2 种培养基中, 研究培养基对愈伤组织诱导及分化的影响, 培养基中附加 6-BA 6 mg·L⁻¹、IBA 0.2 mg·L⁻¹。每处理接种 90 个外植体, 30 d 统计愈伤组织诱导情况, 50 d 观察愈伤组织芽分化情况(见表 1)。

以 WPM 培养基为基本培养基, 进行不同浓度、不同种类的激素处理, 研究子叶诱导愈伤组织及不定芽分化的最佳激素组合(见表 2、表 3)。

1.3.4 生根诱导 生根培养基选用 1/2MS 为基本培养基, 添加不同浓度的 NAA 和 IBA, 共计 4 个处理, 每处理 5 瓶, 每瓶 4 个重复。

1.3.5 炼苗和移栽 待幼苗长至约 5 cm, 根长约 2~3 cm 后, 将幼苗在培养瓶中炼苗 7 d, 洗去根部培养基, 移栽到黄土:蛭石 = 1:1 的基质中。

2 结果分析

2.1 无菌材料培养

用 0.1% 的升汞分别消毒 5 min、10 min、12 min, 4 d 以后观察发现经 5 min 消毒的种子, 胚染菌严重, 而经 10 min、12 min 消毒的种子, 则没有发现胚污染;但是 14 d 左右观察发现, 消毒 12 min 的种子一部分胚死亡, 没有变绿, 而消毒 10 min 的种子胚诱导培养后, 胚状体生长良好。因此, 本研究最终采用 0.1% 的升汞消毒火焰卫矛种子 10 min, 将消毒好的种子切开, 挑出成熟胚, 接种于胚培养基上, 14 d 以后诱导生长出具有绿色子叶和下胚轴的完整胚状体或子叶。根据观察, 在 WPM + TDZ 0.5 mg·L⁻¹培养基中诱导的胚状体或子叶生长健壮, 胚状体没有褐化现象, 诱导率达 80% 左右。

2.2 愈伤组织诱导与不定芽分化

2.2.1 不同培养基对愈伤组织诱导及芽分化的影响 在相同培养条件下, 培养 14 d 后, 在 MS 和 WPM 培养基上的子叶均开始出现少量愈伤组织, 但培养 30 d 后愈伤组织生长状况和增殖速度产生差异, 在 MS 培养基上愈伤组织呈淡绿色质地疏松, 增殖速度较快, 而在 WPM 培养基中, 愈伤组织呈绿色质地致密, 增殖速度较慢。培养 50 d 后观察, WPM 培养基上的愈伤组织分化, 并有子叶直接分化出芽, 而在 MS 培养基上虽有不定芽的分化, 但分化率低(表 1)。从本研究可以看出, 愈伤组织绿色致密、生长速度较慢, 有利于分化出芽, 因此 WPM 培养基更有利于火焰卫矛愈伤组织诱导及芽分化。

表 1 不同种类培养基对愈伤组织诱导及芽分化的影响

培养基	外植体数	愈伤组织诱导率/%	芽诱导率/%	愈伤组织生长状况
WPM	90	50.6	68.8	绿色, 稍致密, 生长速度适中
MS	90	45.8	26.5	初为淡绿色, 后夹杂红色, 疏松颗粒状, 生长速度快

2.2.2 不同激素对比对火焰卫矛愈伤组织诱导的影响 根据观察, 以子叶为外植体接种到愈伤组织培养基上培养 15 d 左右, 外植体边缘开始膨大, 在伤口边缘形成愈伤组织。在添加 6-BA 6 mg·L⁻¹和 IBA 0.2 mg·L⁻¹的培养基中, 愈伤组织质地致密, 颜色深绿, 有利于分化出芽, 愈伤组织诱导率达 50.6%, 但也极易褐化, 褐化率达 46.8%。而添加 6-BA 4 mg·L⁻¹和 IBA 0.2 mg·L⁻¹的培养基中, 愈伤组织诱导率为 43.5%, 褐化较轻, 褐化率为 38.5%(见表 2)。经观察发现, 部分褐化的愈伤组织也能分化。因此 WPM + 6-BA 6 mg·L⁻¹ + IBA 0.2 mg·L⁻¹可作为愈伤组织诱导培养基。

2.2.3 不同激素对比对火焰卫矛不定芽分化的影响 对不定芽诱导的分化培养基进行研究的结果表明, 子叶诱导出的愈伤组织继续培养大约 14 d 后, 愈伤组织开始分化出绿色不定芽, 在 WPM + 6-BA 6 mg·L⁻¹ + IBA 0.2 mg·L⁻¹培养基中诱导效果最好, 诱导率达到了 68.8%, 生长旺盛;而在 WPM + 6-BA 4 mg·L⁻¹ + IBA 0.2 mg·L⁻¹培养基中芽的诱导率为 53.6%, 长势也较好。观察发现褐化的愈伤组织继

续培养后,部分也能分化出不定芽(见表3)。因此 WPM+6-BA $6\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +IBA $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 可作为不定芽分化培养基。

表2 不同激素对比对火焰卫矛愈伤组织诱导的影响

编号	基本培养基	激素/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$		愈伤诱导率/%	生长情况
		6-BA	IBA		
A ₁	WPM	4	0.2	43.5	愈伤组织绿色,生长慢,分化率稍高,有褐化
A ₂	WPM	4	0.5	42.2	愈伤组织绿色,较疏松,有愈伤组织分化,
A ₃	WPM	6	0.2	50.6	愈伤组织绿色,稍致密,分化出芽率较高,褐化较重
A ₄	WPM	6	0.5	42.8	愈伤组织绿色,生长稍慢,有愈伤分化
A ₅	WPM	8	0.2	39.7	愈伤组织淡绿色,稍疏松,有愈伤分化,褐化严重
A ₆	WPM	8	0.5	38.4	愈伤组织淡绿色,有愈伤分化,褐化严重

表3 不同激素对比对火焰卫矛芽诱导分化的影响

编号	基本培养基	激素/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$		芽诱导率/%	形态
		6-BA	IBA		
A ₁	WPM	4	0.2	53.6	长势较好
A ₂	WPM	4	0.5	46.5	长势一般
A ₃	WPM	6	0.2	68.8	生长旺盛
A ₄	WPM	6	0.5	44.7	长势一般
A ₅	WPM	8	0.2	41.6	长势一般
A ₆	WPM	8	0.5	43.9	长势一般

2.3 再生芽生根诱导

当芽长到约3 cm时,将其切下转入生根培养基中,诱导生根培养。25 d后,芽基部产生白色不定根,其中 $1/2\text{MS}+\text{NAA } 0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{活性碳 } 0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 培养基生根效果相对较好(图1),生根率达到50%左右。

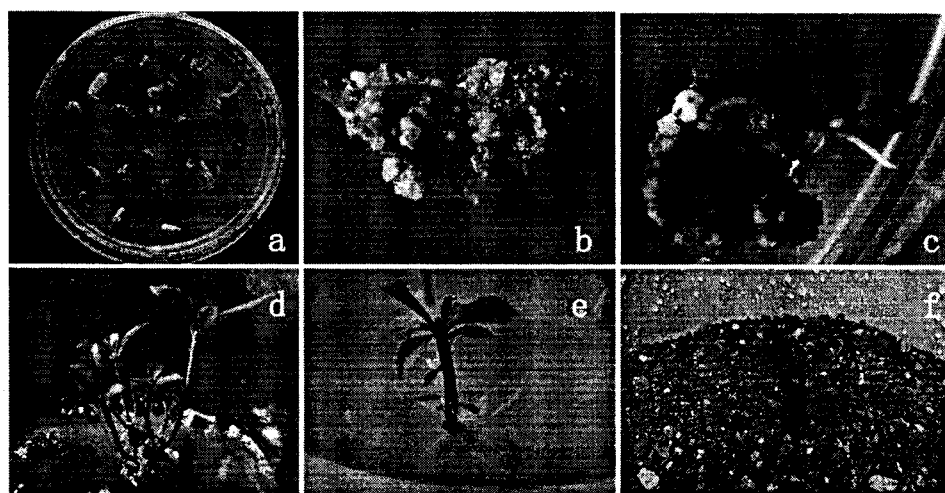


图1 火焰卫矛组织培养与植株再生

a. 成熟胚诱导培养, b. 愈伤组织诱导分化, c. 不定芽分化, d. 壮苗增殖培养, e. 再生根, f. 再生植株移栽成活

3 讨论

火焰卫矛组织培养研究中遇到了常见的外植体褐化问题^[2],本研究采用在培养基中添加 $0.5\sim 1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 活性碳、缩短继代时间等,可明显降低外植体的褐化现象。植物组织培养过程中,常通过外植体诱导

出愈伤组织,再从愈伤组织诱导分化出芽^[3]。在火焰卫矛组织培养及植株再生研究中,发现利用火焰卫矛子叶诱导产生愈伤组织,并从愈伤组织分化出芽,继代培养可从生有不定芽的愈伤块上增生出很多小芽,因此,在诱导子叶产生愈伤组织时,也能直接分化出不定芽,平均每外植体分化不定芽数可达6个,而且长势良好。唐玉林等^[4]认为,组培中根的生长受基因型、细胞分裂素/生长素比值大小的影响,即不同基因型的植物生根率不同;细胞分裂素/生长素比值大不利于生根。我们在研究火焰卫矛再生苗再生芽诱导不定根中,采用常用的生根培养基1/2MS培养基和NAA、IBA不同浓度组合,结果表明,火焰卫矛再生苗在低离子浓度培养基中生根率稍高于高离子浓度培养基的生根率。胡淑宜等^[5]在研究活性炭对绿豆水培幼苗生长时认为,活性炭能促进幼苗各项生理指标活力显著增值,主根长而白,下胚轴长,侧根发达。在本研究发现,在培养基中加入 $0.5\sim 1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 活性炭后,能促进不定根生长,这可能和活性炭有效吸附组织培养中产生的单宁等多元酚类化合物有关,也有可能与黑暗环境有利于根的生长有关。

植物细胞具有全能性,诱导其脱分化及再分化形成植株受多种外界因素的影响,其中外源激素对其分化影响最大,培养基中细胞分裂素与生长素的合理配置才能诱导特定器官及细胞分化。Chen等^[1]利用种子萌发出的下胚轴和子叶为外植体,WPM为基本培养基,不同配比的NAA和6-BA直接诱导不定芽,子叶分化芽的最高诱导率为65.5%,下胚轴分化芽的最高诱导率为75.0%。本研究以成熟胚培养的子叶为外植体,研究结果表明WPM为最适合的基本培养基,这与Chen等^[1]报道结果一致。胡远等^[6]采用不同浓度的6-BA、IBA组合及6-BA、NAA组合研究小油桐外植体再生芽分化率,发现含6-BA、IBA组合的培养基对小油桐外植体再生芽的分化率高于含6-BA、NAA组合的培养基。作者以WPM为基本培养基,研究不同配比的IBA和6-BA对火焰卫矛愈伤组织和芽分化的影响,研究结果发现:IBA $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和6-BA $6\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组合,愈伤组织诱导和芽分化率最高,诱导率和分化率分别为50.6%和68.8%。本研究首次突破了木本植物火焰卫矛子叶愈伤组织诱导和芽分化,并且再生芽的生根率达50%,为火焰卫矛快速繁殖和基因工程改良奠定了基础。

参考文献:

- [1]Yongqin Chen,Litang Lu,Wei Deng,et al. In vitro regeneration and *Agrobacterium-mediated* genetic transformation of *Euonymus alatus*[J]. Plant Cell Rep, 2006, 10(25):1043-1051.
- [2]曹攸义,刘国民. 实用植物组织培养技术教程[M]. 山东:科学技术出版社,1996.
- [3]谭文澄,戴策刚. 观赏植物组织培养技术[M]. 北京:中国林业出版社,1997:60-65.
- [4]唐玉林,陈婉芬,周 雯. 烟草叶块根芽过程中内源激素水平变化[J]. 南京农业大学学报,1996,19(2):12-16.
- [5]胡淑宜,黄碧中,林启模. 绿豆水培中活性炭对幼苗生长的影响[J]. 福建林业科技,1999,26(1):34-37.
- [6]胡 远,赵德刚. 小油桐外植体分化及植株再生影响因素的初步研究[J]. 福建林业科技,2008,35(1):209-213,221.

(上接第79页)

- [30]Rajevan MS, Pandey RM. Lateral bud culture of papaya (*Carica papaya*, L.) or clonal propagation[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1986, 6:181-188.
- [31]Reuveni O, Shlesinger DR, Lavi U. In vitro clonal propagation of dioecious *Carica papaya*[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1990, 20:41-46.
- [32]Sriprasertsak P, Burikam S, Attathom S, et al. Determination of cultivar and sex of papaya tissue derived from tissue culture [J]. Kasetsart J. Natural Sciences, 1988, 22(5):24-29.
- [33]Storey W B. Segregation of sex types in Solo papaya and their application to the selection of seed[J]. Amer. Soc. Hort. Sci, 1938, 35:83-85.