

# 胶东卫矛再生体系的建立

桑新华<sup>1,2</sup>, 张秀海<sup>2</sup>, 任桂芳<sup>3</sup>, 黄丛林<sup>2</sup>, 张潞生<sup>1</sup>

(1. 中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100089;

2. 北京市农林科学院北京农业生物技术研究中心, 100094; 3. 北京市园林科学研究所, 100102)

**摘要:**通过对胶东卫矛不同外植体来源、不同激素种类以及激素配比的比较,初步建立了胶东卫矛组织培养及再生体系;胶东卫矛茎段愈伤组织诱导培养基为MS+6-BA 0.5 mg/L(毫克/升)+IBA 0.05 mg/L(毫克/升),分化培养基为MS+6-BA 0.5 mg/L(毫克/升)+IBA 0.05 mg/L(毫克/升),生根培养基为MS+NAA 0.4 mg/L(毫克/升)+IBA 0.1 mg/L(毫克/升);在此基础上进一步进行了抗生素敏感性实验,确定了胶东卫矛茎段转化的卡那霉素筛选浓度为50 mg/L(毫克/升),羧苄青霉素浓度为200 mg/L(毫克/升),为胶东卫矛的遗传转化奠定了基础。

**关键词:**胶东卫矛; 茎段; 组织培养

**中图分类号:**S687.2 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2005)05-0076-03

胶东卫矛(*Euonymus kiautschovicus* Loes.)是卫矛科半常绿灌木,其叶色碧绿青翠,耐修剪,是一种优良的绿化观赏树种;它不仅适用于庭院、甬道、建筑物周围,而且也已经广泛用于主干道的绿化。另外,由于能净化空气,抗烟吸尘,又是污染区理想的绿化树种。然而,由于目前水资源愈加缺乏、冬季恶劣天气的加剧和城市绿化的迅速发展,胶东卫矛抵抗逆境(干旱、寒冷、盐碱等)的能力有待提高。植物分子生物学和基因工程技术的飞速发展为提高植物的抗性带来了新的思路,通过转化一个与抗性有关的功能基因或调节基因,改变植物在逆境下的生理生化反应,可达到提高植物抗性的目的<sup>[1]</sup>。此项工作的前提条件是要建立稳定高效的再生体系。本文对胶东卫矛的组织培养和遗传转化体系进行了系统的研究,以其为胶东卫矛的转化建立一个高效、实用的技术系统。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试材料胶东卫矛来源于北京市园林科学研究所。

### 1.2 方法

**1.2.1 外植体的获得** 取温室栽培的胶东卫矛幼嫩枝条,剪掉叶片,用自来水冲洗干净,先用70%酒精消毒30 s(秒),然后用无菌水冲洗,再用10%次氯酸钠分别消毒5 min、10 min、15 min(分钟),然后再用无菌水冲洗6次,最后剪成带腋芽的茎段<sup>[2]</sup>,接种在腋芽增殖培养基上(MS+6-BA 2 mg/L+NAA 0.2 mg/L(毫克/升)),4 d(天)后观察消毒的效果。每个处理10瓶,每瓶3个茎段重复。

**1.2.2 愈伤组织的诱导及其分化** 以MS为基本培养基,进行不同浓度、不同种类的激素的处理(表1)。

**1.2.3 生根培养基** 采用MS基本培养基,分别添加不同浓度的IBA和NAA,共计12个处理。每处理10瓶,每瓶3个重复。

**1.2.4 抗生素敏感性试验** 根据离体培养结果,筛选出适宜的分化培养基,附加不同的抗生素进行敏感性试验。将外植体置于附加不同浓度的卡那霉素(Km)(0、30、40、50、75、

表1 不同激素种类和浓度的组合

培养基 编号	2, 4-D (mg/L)	KT (mg/L)	6-BA (mg/L)	IBA (mg/L)
1	2			
2	2	1		
3	4			
4	4	1		
5	4	2		
6			1	
7			1	0.5
8				0.5
9			1.5	0.5
10			1	1
11			1	0.05
12			0.5	0.05
13				0.05

100 mg/L(毫克/升))的培养基上,另取一部分经过农杆菌侵染后的外植体接种于附加不同浓度的羧苄青霉素(Cb)(0 mg/L、100 mg/L、200 mg/L、300 mg/L、400 mg/L、500 mg/L(毫克/升))的培养基上,定期记录外植体褐变情况。

**1.2.5 幼苗的移栽** 将长3 cm~5 cm(厘米)的芽梢转入生根培养基,形成完整的植株后,转入蛭石和营养土中生长,最后大田栽培。所有培养基都采用固体培养,凝胶浓度为5 g/L(克/升),蔗糖浓度为30 g/L(克/升),pH值为5.8,光照14 h/d(小时/天),培养温度为25℃。

## 2 结果与分析

### 2.1 外植体的来源

分别选择5%、10%、15%的NaClO溶液消毒胶东卫矛带腋芽的茎段,3 d(天)以后经5%NaClO处理的外植体开始污染,而经10%、15%NaClO处理的外植体则没有发现污染。考虑到NaClO对外植体的副作用,试验最终采用10%NaClO消毒胶东卫矛茎段。将消毒好的外植体接入腋芽增殖培养基,1周左右,茎段叶腋处出现腋芽突起,2周后芽长大,叶展开,30 d(天)苗高5 cm~6 cm(厘米)。将伸长的腋芽切成短段移入MS培养基继代培养<sup>[4]</sup>。

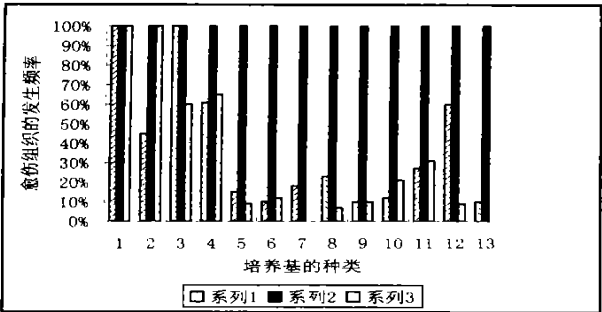
**2.2 不同激素配比和利用不同外植体诱导胶东卫矛愈伤组织以及分化苗的比较**

分别用茎段和叶片做外植体,接种于1—13号培养基上,

\*基金项目:北京市科委合同项目(H020620110130)和北京市留学回国人员项目资助。

收稿日期:2005-05-08

每个组合接种 10 瓶, 每瓶接种 10 个外植体块。20 d(天) 转换一下培养基, 观察实验结果如图。



利用不同外植体胶东卫矛愈伤组织诱导情况图

系列 1 代表茎段在培养基上培养 15 d(天)以后的生长情况, 系列 2 代表茎段在培养基上培养 40 d(天)以后, 系列 3 代表叶片在培养基上培养 40 d(天)以后的生长情况

2.2.1 2-4-D 和 KT 对叶片和茎段愈伤组织诱导的影响  
根据调查结果, 15 d(天)以后, 茎段在 1 号和 3 号培养基上发生频率为 100%, 继续培养, 愈伤组织加大, 疏松, 柔软, 0.5 cm~1 cm(厘米)大小不等。叶片在 1 号培养基上愈伤组织的诱导率为 80%。40 d(天)以后, 茎段在这 5 种培养基上都诱导出愈伤, 叶片在 1 和 3 两种培养基上愈伤组织的发生频率也达到 100%, 但是都没有分化苗出现。

2.2.2 6-BA 和 IBA 对叶片和茎段愈伤组织诱导的影响  
根据调查结果, 15 d(天)后茎段在各培养基上愈伤组织发生频率分别为 10%, 18%, 23%, 10%, 12%, 27%, 60%, 10%; 叶片在各个培养基上的愈伤组织发生频率均为 0。继续培养, 愈伤量增加, 40 d(天)之后, 愈伤组织发生率都可以达到 100%。只有在 11 号培养基上分化出苗。以叶片做为外植体, 切口处开始也分化出愈伤, 但速度较慢, 平均诱导率为 12%, 而且没有分化出苗。由此可见, 胶东卫矛茎段更适合于愈伤组织的诱导以及分化苗的产生。从理论上讲, 植物细胞具有全能性, 所以无论选用植株上哪一部位都能诱导成株, 但是研究表明, 相同植物的不同组织或者部位在器官发生能力上有相当大的区别, 这一结果也验证了以往的一些报道<sup>[5,9]</sup>。

2.2.3 愈伤组织的种类与成苗 根据颜色和质地的疏密, 愈伤组织大致可以分为黄褐色、疏松、透明和碧绿、致密两种类型。由 2-4-D 和 KT 诱导的愈伤组织质地较为疏松, 由表面光滑、呈半透明的球状体组成, 具有胚性愈伤的外观特征, 但不能分化成苗。而由 6-BA 和 IBA 诱导的愈伤组织多为浅绿色至深绿色, 质地较为致密, 表面粗糙, 呈块状, 不用更换培养基, 这种愈伤组织可直接分化出不定芽, 逐渐长成小芽丛。

2.3 不同激素种类和浓度对比对生根的影响

胶东卫矛试管苗高达 3 cm~5 cm(厘米)时, 转接到不同激素浓度配比的生根培养基上。

根据观察, 茎段在 10 d(天)后基部出现不定根, 随着时间的延长, 根不断加粗, 形成带有根毛的辐射根, 茎段逐渐成为完整的植株; 14 d(天)后, 生根量达高峰。其中 M12 号培养基生根率最高, 达 100%; 从根的质量看, 根较粗壮、数量也多、长势也好。而 M1、M3 号培养基内的苗虽须根多、生长也较好, 但根细长。其它培养基中根量少, 愈伤组织多, 不适合做生根培养基。而且激素浓度越高, 植株切口处产生的愈伤组织块越大, 反而抑制了生根。

2.4 抗生素敏感性试验

基因转化操作过程中, 抗生素浓度的筛选是至关重要的

表 2 植株在不同激素配比下生根的情况

编号	IBA (mg/L)	NAA (mg/L)	生根率 %	生长势	愈伤组织 状况
M 1	0	0	75	++++	—
M 2	0	0.5	50	+++	—
M 3	0.1	0	75	++++	—
M 4	0.1	0.5	40	++++	—
M 5	0.1	1	30	++	—
M 6	0.5	1	0	++	—
M 7	0.5	0.5	0	++	—
M 8	0.5	0	50	+++	—
M 9	0	1	25	+++	—
M 10	0.3	0.5	0	++	—
M 11	0.5	0.75	0	++	—
M 12	0.1	0.4	100	++++	—

注: ++ 示生根情况一般, +++ 示较好, ++++ 示很好; — 示苗基部无愈伤块, — — 示愈伤块直径小于 0.4 cm(厘米), — — — 示愈伤块直径小于 0.8 cm(厘米), — — — — 示愈伤块直径大于或等于 0.8 cm(厘米)。

一环。适合的抗生素浓度既要能有效地抑制非转化细胞生长, 又要不影响转化细胞的正常生长。因此建立基因转化受体系统时测定植物材料对抗生素的敏感性很有必要, 必须针对不同的受体材料确定适合的筛选浓度。

表 3 愈伤组织在不同卡那霉素(Km)浓度下分化的情况

卡那霉素浓度(mg/L)	生长分化情况
30	分化减慢, 80%持绿, 20%褐化
40	分化减慢, 60%持绿, 40%褐化
50	分化减慢, 10%持绿, 90%褐化
75	分化逐步停滞, 全部褐化
100	分化逐步停滞, 全部褐化

将胶东卫矛愈伤组织接种在不同浓度卡那霉素的选择培养基上, 30 d(天)后观察褐变情况。由试验结果看出, 愈伤组织受体系统适合在较低浓度的卡那霉素培养, 当卡那霉素浓度达到 30 mg/L(克/升)时, 愈伤组织还可以分化, 只是生长明显放慢, 有部分褐化; 当卡那霉素浓度达到 50 mg/L(克/升)时, 褐化明显增加; 而浓度至 100 mg/L(毫克/升)时, 基本上都死亡。高浓度的抗生素能迅速杀死细胞, 而死细胞对周围细胞的生长有强烈的抑制作用, 不利于转化细胞生长。因此, 在转化确定筛选浓度时应略低于全致死浓度。据此结合试验结果确定愈伤组织受体系统的卡那霉素筛选浓度为 50 mg/L。

羧苄青霉素敏感性试验抑制农杆菌生长是转化的一个重要环节, 本实验选择羧苄青霉素作为抑菌性抗生素, 设定浓度梯度为 0 mg/L、100 mg/L、200 mg/L、300 mg/L、400 mg/L、500 mg/L(毫克/升)进行敏感性试验, 结果显示, 羧苄青霉素不抑制植物细胞正常生长, 其选择压在 200 mg/L(毫克/升)时即可达到较好抑菌效果, 低于这个浓度 4 d(天)之后培养基内就出现菌斑。

2.5 试管苗的移栽

待根长到长于 2 cm(厘米)时<sup>[7]</sup>, 打开瓶口, 将试管苗在弱光处放置 3 d(天)后取出, 用自来水洗去根部培养基, 直接移栽到营养土和蛭石(1:1)的混合基质中, 浇足水, 荫处管理。7 d(天)后浇 1/2MS 营养液; 移栽后 1~3 周, 每天喷水 5~6 次, 这一阶段为生根试管苗移栽后管理的重要时期, 要保持较高的空气湿度。

3 讨论

植物遗传转化是定向改良作物品种原有特性的有利途

几种药剂防治番茄叶霉病田间试验

戚文荣

(青海省农科院植保所, 西宁 810016)

番茄叶霉病病原菌为(*Cladosporium fdvum* cook)半知菌亚门、枝孢属的黄枝孢菌。由于保护地高温、高湿的环境条件,致使番茄叶霉病成为保护地番茄生产上的主要病害之一,为此选用6种高效、低毒的化学药剂,在田间针对番茄叶霉病进行药剂筛选试验,为发展无公害番茄生产提供有效的药剂。

1 材料与方法

1.1 供试药剂

- A: 50%万霉灵 WP 1000×(江苏省新沂农药有限公司)
- B: 80%新太生 WP 350×(利民化工有限责任公司)
- C: 60%佛吗、锰锌 WP 600×(沈阳化工研究所)
- D: 50%施美特 WP 1000×(山东京博农化有限公司)
- E: 72%霜疫力克 WP 600×(山东京博农化有限公司)
- F: 77%氢氧化铜 WP 600×(浙江禾本农药化工有限公司)
- G: 50%多菌灵 WP 600×(江苏镇江农药厂出品)

1.2 试验方法

试验选用50%万霉灵等6种药剂,以50%多菌灵为对照药剂,不加药为空白对照,共8个处理,每处理重复3次,小区面积为6.8×1.9=13 m<sup>2</sup>(平方米),小区随机排列,每667 m<sup>2</sup>(平方米)药液量为45 kg(公斤)。选常年发病严重的地区,病害发生初期于6月13日第1次施药,每隔7 d(天)喷1次,共喷3次,喷药时雾滴分布要均匀,叶片正、反面都要喷。

1.3 调查方法和病害的分级标准

每小区对角线5点取样,每点选1株,每株各选5片叶片(既定点、定株、定叶)挂牌调查。第一次施药前调查发病基数,最后一次施药后7 d(天)(7月4日)调查发病情况,并对调查数据记录。番茄叶霉病的分级标准:以每株每一片叶上的病斑面积占整个叶面积的百分率来分级。

0级:无病斑;1级:病斑面积占整个叶面积5%以上;3级:病斑面积占整个叶面积6%~10%;5级:病斑面积占整个叶面积11%~20%;7级:病斑面积占整个叶面积21%~

50%;9级:病斑面积占整个叶面积50%以上。

1.4 药效计算方法

a: 病情指数=  $\frac{\sum[(\text{各级病叶数} \times \text{相对级数值})]}{\text{调查总叶数} \times 9} \times 100$

b: 防治效果(%)=  $\frac{1 - \text{cko 病指数} \times \text{pt1 病指数}}{\text{ck1 病指数} \times \text{pt0 病指数}} \times 100$

2 结果分析

对试验获得的数据进行统计,对防效经反正弦转换后进行F测验和LSR测验,以确定其差异显著性,结果见表。

药剂防治番茄叶霉病结果统计表

处理	药前病情指数			药后病情指数			防治效果 (%)	显著性	
	1	2	3	1	2	3		0.05	0.01
A: 万霉灵	17.78	15.11	24	20.3	18.7	25.56	74.5	a	A
B: 新太生	16.22	19.7	28	24	26.5	33.3	70.4	b	A
C: 佛吗锰锌	18.44	29.78	18.89	29.78	43	25.44	67.4	c	B
D: 施美特	20	14.78	20.44	28.22	16.5	23.0	73	ab	A
E: 霜疫力克	17.78	25.33	30.67	25.7	30.67	37.2	71.4	b	A
F: 氢氧化铜	19.77	14.22	18.89	33.78	21.33	25.78	66.2	c	BC
G: 多菌灵	16.44	22.22	20.44	31.89	35.7	31.11	62.6	d	C
H: 空白对照	10.67	17.5	15	50.32	60.44	50.56			

从表1可知,在发生番茄叶霉病的田间每隔7 d(天)喷一次,连续喷3次药,其防效分别为万霉灵74.5%、施美特73%、72%霜疫力克71.4%、新太生70.4%、60%佛吗锰锌67.4%、氢氧化铜66.2%、多菌灵62.6%;50%万霉灵和50%施美特防效最好,其次为72%霜疫力克、80%新太生、60%佛吗锰锌。对防治效果进行差异显著性比较,试验选择的5种药剂与对照药剂有极显著性差异,77%氢氧化铜与对照药剂差异显著;50%万霉灵与50%施美特间差异不显著,而与其它药剂间差异显著;50%施美特、72%霜疫力克和80%新太生与60%佛吗锰锌、77%氢氧化铜、50%多菌灵间有极显著差异,60%佛吗锰锌与对照药剂间有极显著差异。

3 结论

通过田间防治番茄叶霉病试验,50%万霉灵 WP 和 50%施美特 WP 是防治叶霉病的最好药剂(防效为73%以上),其次为72%霜疫力克 WP 和80%新太生效果较好,而60%佛吗锰锌 WP 和77%氢氧化铜 WP 效果较差,50%多菌灵最差。

防治番茄叶霉病,50%万霉灵和50%施美特 WP 为1 000倍,72%霜疫力克 WP 为600倍,80%新太生为350倍,连续喷3次,间隔7 d~10 d(天),注意药剂要交替使用,以免产生抗药性。

径,在这个操作过程中,植物细胞组织培养技术是其重要的技术基础,往往起到“瓶颈”作用。一个好的组织培养体系必须是再生频率高,易于重复,简单快速,适应性广,以及没有基因型的依赖。胶东卫矛作为木本植物,分化率较低,还远远没有达到这个要求,因此限制了其基因工程改良,因此这一方面的研究还急需突破。

本研究结果初步建立了一个实用的胶东卫矛离体培养和植株再生技术体系,其离体培养操作程序为:带腋芽的茎段接种在腋芽增殖培养基上(MS+6-BA 2 mg/L+IBA 0.2 mg/L(毫克/升)),10 d(天)后,腋芽开始萌动,待芽长到2 cm~3 cm(厘米)时剪下来转接到MS快繁培养基上,培养一段时间以后,取上部幼嫩的茎段截成0.1 cm~0.2 cm(厘米)的小段,接种在分化培养基上,30 d(天)后部分可以直接出苗。待苗长到3 cm~5 cm(厘米)的时候转移到生根培养基上,10 d(天)就有不定根的发生,待根生长良好时,即可以移栽。

参考文献:

[1] 王关林等.植物基因工程[M].北京:科学出版社,2002.

[2] 王建.药用植物扶芳藤的组织培养[J].广西中医学院学报,2004,17(2):62~63.

[3] 于萍,王燕,牟淑英等.金叶卫矛的茎段培养以及试管繁殖[J].园艺学报,2000,27(1):69~70.

[4] 王茂良,赵梁军,任桂芳等.扶芳藤再生体系的建立[J].园艺学报,2004,31(2):241~244.

[5] 杨其简,周禾,孙彦等.紫花苜蓿愈伤组织诱导以及组织培养[J].北京农学院学报,2004,14(2):28~30.

[6] 张明丽,李青.木本观赏植物组织培养以及植株再生的研究进展[J].河北林业科技,2004,23(4):23~26.

[7] 王鹏,土建民,王占华等.提高组培苗移栽成活率的技术方法[J].中国林副特产,2004,171(4):21~22.

[8] 向邓云.植物生长调节物质对植物组织培养形态建成的调节控制[J].涪陵师专学报,2001,17(3):119~123.

注:本文作者还有:吴忠义<sup>2</sup>、田路明<sup>1</sup>、古润泽<sup>3</sup>,联系作者:黄丛生、张路生