

小果卫矛组织培养与快速繁殖

袁云香^{1,2,*}, 商澎^{3,4}

¹西北工业大学生命学院, 西安710072

²渭南师范学院环境与生命科学学院, 陕西渭南714099

³西北工业大学深圳研究院, 广东深圳518057

⁴空间生物实验模拟技术国防重点学科实验室, 西安710072

摘要:以小果卫矛(*Euonymus microcarpus*)茎段为外植体, 通过对茎段腋芽启动、增殖、生根的影响因素进行筛选研究, 建立了小果卫矛的快速繁殖体系。结果表明: 小果卫矛茎段腋芽诱导的启动培养最佳培养基为MS+2.0 mg·L⁻¹ 6-苄氨基嘌呤(6-BA)+0.3 mg·L⁻¹ 萘乙酸(NAA), 诱导率为92.00%; 增殖最佳培养基为WPM+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA+1.0 mg·L⁻¹ NAA, 增殖系数达6.4; 最适生根培养基为1/2MS+1.2 mg·L⁻¹ NAA, 生根率达到81.33%。

关键词: 小果卫矛; 腋芽; 组织培养; 快速繁殖

小果卫矛(*Euonymus microcarpus*)为卫矛科(Celastraceae)卫矛属常绿灌木, 是我国独有树种, 数量稀少, 仅分布于少数几个省份如陕西、山西、湖北、四川等。小果卫矛叶片呈椭圆形、阔倒卵形或卵形, 花黄绿色, 果成熟时种子棕红色, 外被橘黄色假种皮, 是极具观赏价值的园林绿化植物(中国科学院植物研究所1972; 中国科学院中国植物志编辑委员会1999; 中国科学院西北植物研究所1981)。小果卫矛抗寒性高于冬青卫矛(*E. japonicus*)、扶芳藤(*E. fortunei*)和女贞(*Ligustrum lucidum*) (王永格和丛日晨2010), 是适宜北方地区引种栽培的极具开发潜力的常绿观赏树种; 其根、茎具有祛风湿、强筋骨之功效, 可用于治疗风湿痹痛、筋骨痿软(中国科学院西北植物研究所1981), 是重要的骨伤科药用植物; 其树木质地坚硬, 适合做雕刻, 还是南阳烙花筷的原料。小果卫矛是集多种价值于一体的天然植物资源, 在医疗保健和工业生产等领域均有着广泛的用途, 亟待进一步开发利用(秦浩等2016)。目前, 有关小果卫矛繁殖的研究主要以种子繁殖、常规扦插和嫁接为主, 但由于小果卫矛种子繁殖效率低, 常规的扦插繁殖较难生根, 致使规模繁殖受限, 限制了小果卫矛的开发与利用(张双进等2018)。组织培养具有不受生长季节限制、繁殖快等优点, 可在短时间内获得大量无性系。目前, 关于小果卫矛的研究较少: 何云(2009)研究了小果卫矛的内生真菌; 张双进等(2018)研究发现小果卫矛扦插生根较难;

王永格和丛日晨(2010)研究发现小果卫矛抗寒力大于女贞和冬青卫矛; 秦浩等(2016)调查发现小果卫矛是目前山西天然分布的卫矛属植物中唯一的常绿植物。而关于小果卫矛组织培养的研究尚未见报道。因此, 本试验以小果卫矛嫩茎为外植体, 建立小果卫矛组培苗离体培养快速繁殖技术体系, 以期对小果卫矛的深入研究和工厂化生产提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料小果卫矛[*Euonymus microcarpus* (Oliv. ex Loes.) Sprague]采自陕西杨凌西北农林科技大学校内, 剪取当年生颜色淡绿、无病虫害健壮嫩茎, 置于保鲜袋中带回实验室备用。

1.2 方法

1.2.1 外植体灭菌

将小果卫矛嫩茎放置于烧杯内, 去掉叶片和叶柄, 用软毛刷蘸洗洁精轻轻将茎表面脏物洗净, 于流水下冲洗1~2 h后, 转至超净工作台内进行外植体消毒处理: 采用体积分数为75%的乙醇溶液浸泡30 s, 质量分数为0.1%的HgCl₂溶液浸泡15 min。消毒完后用无菌水冲洗5~7次, 将茎段表面的水分

收稿 2020-03-09 修定 2020-05-06

资助 国家自然科学基金(31000410)、渭南师范学院教改项目(JG201710)和陕西省教育厅科学研究计划项目(18JS036)。

* 通讯作者(yuanyunxiang2006@126.com)。

用无菌滤纸吸干,在培养皿中将茎剪成2~3 cm长的带一个茎节的小段备用。

1.2.2 小果卫矛茎段腋芽诱导的启动培养

将灭菌后的茎段作为外植体,接种到含有不同浓度6-苄氨基嘌呤(6-benzylaminopurine, 6-BA)和萘乙酸(1-naphthaleneacetic acid, NAA)的MS启动培养基上,研究不同浓度6-BA和NAA配比对小果卫矛腋芽诱导的影响。每个诱导处理接种15瓶,每瓶接种4个外植体。每个试验处理重复3次。密切观察并记录腋芽生长状况,于35 d左右统计诱导率。

1.2.3 小果卫矛无菌苗增殖培养

将启动培养基中诱导获得的无菌小果卫矛腋芽小心剪取为单芽,接种到增殖培养基上进行增殖培养。增殖试验按照正交设计 $L_9(3^4)$,采用3个因素,分别是不同基本培养基(MS、WPM和 B_5)、不同6-BA浓度(1、2和3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)和不同NAA浓度(0.3、0.5和1.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$),每个因素3水平,共9个处理组合。于接种后45 d左右统计增殖系数,详细观察并记录幼苗增殖状况。

1.2.4 小果卫矛无菌苗生根培养及移栽

当无菌苗生长至2~4 cm时,分离单株转接至以1/2MS为基本培养基,附加0.1、0.3、0.5、0.8、1.0、1.2、1.5、2.0和2.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA的生根培养基上进行生根培养。每个处理接种10瓶,每组试验重复3次,于45 d后统计生根数及生根率,密切观察生根情况并做好记录。

上述培养基中均添加30 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖、8 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂, pH值为5.8~6.0,在121℃下高压灭菌20 min。组培材料置于光照强度25~35 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、光照时间14 $\text{h}\cdot\text{d}^{-1}$ 、培养温度(25±2)℃的光照培养箱中培养。

1.2.5 数据处理及分析

诱导率(%)=萌芽外植体数/接种后无菌茎段总数×100;增殖系数=形成的有效芽数/接种苗数;生根率(%)=生根苗数/接种苗数×100。采用SPSS 22.0统计软件进行显著性分析及多重对比。

2 实验结果

2.1 不同6-BA和NAA配比对小果卫矛腋芽诱导的影响

小果卫矛茎段接种到诱导培养基后,第10天

左右有芽点开始萌动,随后芽点长出腋芽。到第35天左右,不同诱导培养基上小果卫矛茎段都有不同程度的萌发,诱导率达12.93%~92.00%;最低诱导率与最高诱导率之间相差7倍多(表1),表明不同诱导培养基对小果卫矛外植体萌发率的影响较大。在NAA浓度不变的条件下,随着6-BA浓度的升高,诱导率呈现先上升后降低的趋势。6-BA浓度在0.5~2.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 之间均能不同程度诱导腋芽,其中最适宜配比组合为2.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA和0.3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA,诱导率最高,芽萌发最早,叶片嫩绿平展,长势良好(图1-A和B)。激素浓度过高时,腋芽诱导率明显下降,且茎段基部接触培养基处容易产生质地疏松、淡白色的愈伤组织团块,腋芽长势较差;过低则不利于腋芽的诱导。

2.2 不同因素对小果卫矛腋芽增殖的影响

小果卫矛腋芽在增殖培养第20天左右开始萌发,第35天左右芽苗长至2~4 cm (图1-C)。增殖培养第45天左右,发现1~6号处理组芽苗叶片自然伸展、颜色淡绿,芽粗壮,长势良好;7~9号处理组芽苗叶片细长微卷、颜色淡黄绿,芽较细弱,切后接近培养基处的基部形成愈伤组织。

由表2中的极差分析结果可知,对小果卫矛腋

表1 不同浓度6-BA和NAA对小果卫矛腋芽诱导的影响
Table 1 Effects of different concentrations of 6-BA and NAA on axillary bud induction of *E. microcarpus*

编号	6-BA浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	NAA浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	诱导率/%
1	0.5	0.1	12.93±0.35 ^a
2	1.0	0.1	22.87±1.16 ^b
3	1.5	0.1	51.87±0.94 ^c
5	2.5	0.1	75.30±1.42 ^f
5	2.5	0.1	55.27±1.22 ^{cd}
6	0.5	0.3	13.57±1.22 ^a
7	1.0	0.3	26.37±1.17 ^b
8	1.5	0.3	62.17±1.76 ^c
9	2.0	0.3	92.00±1.50 ^e
10	2.5	0.3	58.73±0.84 ^{de}
11	0.5	0.5	23.97±1.27 ^b
12	1.0	0.5	26.43±1.07 ^b
13	1.5	0.5	62.63±0.67 ^c
14	2.0	0.5	75.37±1.22 ^f
15	2.5	0.5	61.57±3.37 ^e

不同小写字母标识表示差异显著($P<0.05$),下同。

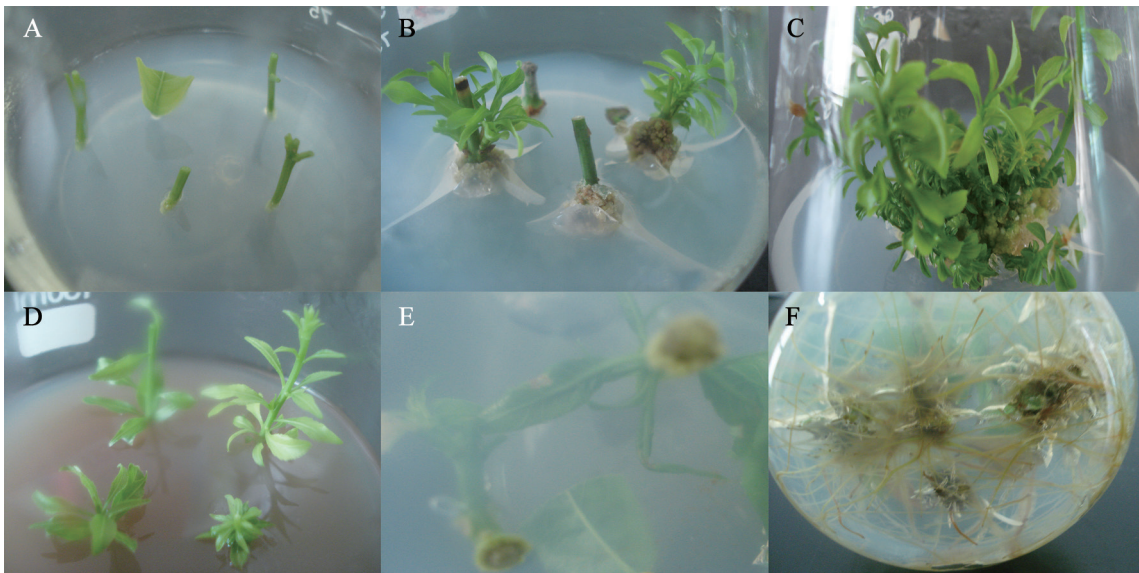


图1 小果卫矛腋芽诱导(A和B)、增殖(C)和生根培养(D~F)
Fig.1 Axillary bud induction (A and B), propagation (C) and rooting culture (D~F) of *E. microcarpus*

表2 不同因素对小果卫矛腋芽增殖的影响
Table 2 Effects of different factors on axillary bud propagation of *E. microcarpus*

编号	A (培养基)	B (6-BA浓度/mg·L ⁻¹)	C (NAA浓度/mg·L ⁻¹)	增殖系数
1	MS	1.0	0.3	2.90±0.49 ^a
2	MS	2.0	0.5	4.70±0.50 ^{bc}
3	MS	3.0	1.0	4.10±0.32 ^{ab}
4	WPM	1.0	0.5	3.60±0.31 ^{ab}
5	WPM	2.0	1.0	6.40±0.52 ^d
6	WPM	3.0	0.3	5.70±0.32 ^{cd}
7	B ₅	1.0	1.0	2.70±0.50 ^a
8	B ₅	2.0	0.3	4.50±0.51 ^{bc}
9	B ₅	3.0	0.5	4.00±0.25 ^{ab}
K ₁	11.7	9.2	13.1	—
K ₂	15.7	15.6	12.3	—
K ₃	11.2	13.8	13.2	—
极差	4.5	6.4	0.9	—

K₁~K₃分别表示1~3水平各自对应的试验结果之和; 极差=平均得率最大值-平均得率最小值。

芽增殖的影响大小顺序为: 6-BA浓度>培养基种类>NAA浓度。6-BA浓度在小果卫矛腋芽增殖中的作用最大(极差最大, 为6.4), 从6-BA三个水平的K值(各个水平下的指标总和)可以看出, 小果卫矛腋芽增殖系数并不是随着6-BA浓度的增加而增加。6-BA浓度在1.0~2.5 mg·L⁻¹范围时, 随着6-BA浓度的增大, 增殖系数呈上升趋势; 当6-BA浓度为2.0 mg·L⁻¹时, 其增殖系数最大, 达6.4; 但当6-BA浓度

达到2.5 mg·L⁻¹时, 增殖系数下降。小果卫矛增殖最佳培养基为A2B2C3, 即WPM+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA+1.0 mg·L⁻¹ NAA。

通过方差分析(表3)可知, 6-BA浓度对小果卫矛腋芽增殖的影响最大, 达到极显著水平; 培养基种类对小果卫矛腋芽增殖的影响达到显著水平; NAA浓度对小果卫矛腋芽增殖的影响不显著。为了验证小果卫矛腋芽增殖的最佳培养基, 用培养

表3 小果卫矛腋芽增殖培养的方差分析
Table 3 Analysis of variance for axillary bud propagation of *E. microcarpus*

方差来源	自由度	平方和	均方	F值	P值
A	2	4.055 6	2.027 8	17.718 4	0.000 7
B	2	7.262 2	3.631 1	31.728 2	0.030 5
C	2	0.162 2	0.081 1	0.708 7	0.585 2
误差	2	0.228 9	0.114 4	—	—
总和	8	11.708 9	—	—	—

自由度是自由取值的变量个数; 平方和是各项与平均项之差的平方的总和; 均方是方差除以自由度; F值是F检验的统计量值; P值即概率, 反映某一事件发生的可能性大小。

基WPM+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA+1.0 mg·L⁻¹ NAA进行增殖培养试验, 增殖培养45 d左右统计小果卫矛芽苗的增殖系数达到6.4左右, 萌芽早, 芽苗生长较快, 芽茎较粗壮, 基部愈伤组织少。

2.3 不同浓度NAA对小果卫矛幼苗生根的影响

将增殖培养基上生长健壮的幼苗进行单株分离, 接种到生根培养基上。增殖培养15 d左右, 在茎段基部接触培养基处有根基部凸起, 形成根原基; 20 d左右开始出现不定根, 培养45 d后形成完整根系(图1-D~F)。每个培养基配方均能不同程度地诱导小果卫矛生根(表4): 当NAA浓度在0.1~1.2 mg·L⁻¹范围内时, 幼苗的生根率随着NAA浓度的升高而增加; 而NAA浓度在1.2~2.5 mg·L⁻¹范围内时, 生根率呈下降趋势; NAA浓度为1.2 mg·L⁻¹时生根率最高, 为81.33%, 幼苗根原基形成较早, 根系较发达, 长势良好。因此, 最佳小果卫矛生根培养基为1/2MS+1.2 mg·L⁻¹ NAA。

表4 不同浓度NAA对小果卫矛生根的影响
Table 4 Effects of different NAA concentrations on rooting culture of *E. microcarpus*

编号	NAA浓度/mg·L ⁻¹	生根率/%
1	0.1	29.23±0.65 ^a
2	0.3	36.67±1.05 ^b
3	0.5	39.37±0.19 ^b
4	0.8	62.67±0.67 ^c
5	1.0	67.87±0.94 ^d
6	1.2	81.33±0.88 ^f
7	1.5	72.67±1.14 ^e
8	2.0	62.33±1.20 ^c
9	2.5	37.67±0.62 ^b

3 讨论

在植物腋芽萌发过程中, 不同种类不同浓度的植物生长调节物质的对比对腋芽萌发起着重要作用(Janssen等2014)。试验以小果卫矛嫩茎为外植体, 腋芽萌动早晚、诱导率及生长状态在不同的诱导培养基上差异显著。最适腋芽诱导的培养基配比为MS+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.3 mg·L⁻¹ NAA, 诱导率最高达92.00%, 芽萌发早, 叶片正常, 茎秆粗壮, 长势良好。6-BA和NAA结合使用有利于小果卫矛腋芽的诱导, 这与杨国等(2016)和王强等(2018)的研究结果相似。

不同植物由于遗传背景及生物学特性的差异, 对基本培养基的各类营养成分的需求也有不同。本试验选用了MS、WPM和B₅三种基本培养基, 附加不同浓度的6-BA和NAA, 采用正交设计试验, 发现适宜小果卫矛芽苗增殖的基本培养基为WPM, 6-BA浓度是影响小果卫矛芽苗增殖的主要因素。培养基WPM+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA+1.0 mg·L⁻¹ NAA最适宜增殖培养, 增殖系数最高, 芽粗, 生长快。当6-BA浓度为3.0 mg·L⁻¹时, 芽苗生长受阻, 叶片出现卷曲等变异现象, 这与吴玲利等(2015)对白木通(*Akebia trifoliata* var. *australis*)快繁的研究较一致。本试验建立的小果卫矛组培苗快繁体系拟为小果卫矛的开发利用以及工厂化育苗提供参考。

参考文献(References)

CAS Editorial Committee of the Flora of China (1999). Flora of China. 45 (3). Beijing: Science Press, 32–50 (in Chinese) [中国科学院中国植物志编辑委员会(1999). 中国

- 植物志. 45 (3). 北京: 科学出版社, 32–50]
- He Y (2009). Preliminary study on endophytic fungus in *Euonymus microcarpus* (Oliv.) Sprague (dissertation). Yangling: Northwest A&F University (in Chinese with English abstract) [何云(2009). 小果卫矛内生真菌的初步研究(学位论文). 杨凌: 西北农林科技大学]
- Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences (1972). A Guide to Higher Plants in China. Book 2. Beijing: Science Press, 666 (in Chinese) [中国科学院植物研究所 (1972). 中国高等植物图鉴. 第2册. 北京: 科学出版社, 666]
- Janssen BJ, Drummond RSM, Snowden KC (2014). Regulation of axillary shoot development. *Curr Opin Plant Biol*, 17: 28–35
- Northwest Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences (1981). Flora of Qinling. 1 (3). Beijing: Science Press, 203–204 (in Chinese) [中国科学院西北植物研究所 (1981). 秦岭植物志. 1 (3). 北京: 科学出版社, 203–204]
- Qin H, Wang Y, Zhao XN, et al (2016). *Euonymus microcarpus* (Oliv.) Sprague—a new recorded species of *Euonymus* (Celastraceae) in Shanxi. *J Shanxi Univ Nat Sci Ed*, 39 (1): 117–119 (in Chinese with English abstract) [秦浩, 王烨, 赵小娜等(2016). 小果卫矛——山西省卫矛属一新纪录种. 山西大学学报(自然科学版), 39 (1): 117–119]
- Wang Q, Chen DY, Yang G, et al (2018). Tissue culture and rapid propagation *in vitro* of *Clinacanthus nutans*. *Plant Physiol J*, 54 (2): 232–236 (in Chinese with English abstract) [王强, 陈冬怡, 杨国等(2018). 鳄嘴花的组织培养和快速繁殖. 植物生理学报, 54 (2): 232–236]
- Wang YG, Cong RC (2010). A comparative study on the cold resistance of evergreen broad-leaved tree species *Euonymus microcarpus* in Beijing. *J Green Sci Technol*, 22 (2): 8–10, 46 (in Chinese) [王永格, 丛日晨(2010). 常绿阔叶树种小果卫矛引种北京的抗寒性比较研究. 园林科技, 22 (2): 8–10, 46]
- Wu LL, Ke BF, Gong C, et al (2015). Tissue culture and rapid propagation of *Akebia trifoliata* var. *australis*. *Plant Physiol J*, 51 (6): 903–908 (in Chinese with English abstract) [吴玲利, 柯滨峰, 龚春等(2015). 白木通组织培养及快速繁殖. 植物生理学报, 51 (6): 903–908]
- Yang G, Luo J, Mo YW, et al (2016). Tissue culture and rapid propagation *in vitro* of *Polygala fallax*. *Plant Physiol J*, 52 (3): 349–355 (in Chinese with English abstract) [杨国, 罗洁, 莫亿伟等(2016). 黄花倒水莲的组织培养和快速繁殖. 植物生理学报, 52 (3): 349–355]
- Zhang SJ, Chen QH, Wang JX (2018). Study on cutting rooting of evergreen and cold-tolerant species *Euonymus microcarpus* in north China. *Nongjia Canmou*, (14): 126, 206 (in Chinese) [张双进, 陈秋红, 王金霞(2018). 北方常绿耐寒树种小果卫矛扦插生根研究. 农家参谋, (14): 126, 206]

Tissue culture and rapid propagation of *Euonymus microcarpus*

YUAN Yunxiang^{1,2,*}, SHANG Peng^{3,4}

¹School of Life Sciences, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072, China

²College of Environment and Life Sciences, Weinan Normal University, Weinan, Shaanxi 714099, China

³Research & Development Institute in Shenzhen, Northwestern Polytechnical University, Shenzhen, Guangdong 518057, China

⁴Key Laboratory for Space Biosciences and Biotechnology, Xi'an 710072, China

Abstract: Young stem segments of *Euonymus microcarpus* were taken as explants and the rapid propagation system was established to study the factors influencing axillary bud induction, propagation and rooting culture. The results show that the optimal medium for axillary bud induction was MS+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA+0.3 mg·L⁻¹ NAA, with a maximal induction rate of 92.00%. The optimal propagation medium was WPM+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA+1.0 mg·L⁻¹ NAA, and the propagation coefficient was 6.4. The optimal medium for rooting was 1/2MS+1.2 mg·L⁻¹ NAA; the rooting rate reached 81.33%.

Key words: *Euonymus microcarpus*; axillary bud; tissue culture; rapid propagation

Received 2020-03-09 Accepted 2020-05-06

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31000410), Weinan Normal University Teaching Reform Project (JG201710), and Scientific Research Program Funded by Shaanxi Provincial Education Department (18JS036).

*Corresponding author (yuanyunxiang2006@126.com).