

文章编号: 1001-1498(2008)01-0096-05

## 五叶地锦离体培养及植株再生

尹凌波<sup>1</sup>, 陈颖<sup>1</sup>, 孙振元<sup>2</sup>, 杨学军<sup>2</sup>, 赵梁军<sup>1\*</sup>

(1. 中国农业大学观赏园艺与园林系, 北京 100094; 2 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091)

**摘要:**以五叶地锦 (*Parthenocissus quinquefolia*)子叶柄、下胚轴、叶片为外植体进行离体培养,以 1/2 MS、B<sub>5</sub>和 Heller 为基本培养基,附加不同浓度的细胞分裂素 (6-BA, KT, TDZ)及生长素 (NAA)诱导下胚轴直接再生不定芽。实验结果表明,暗处理 30 d,靠近下胚轴的子叶柄接种在 1/2 MS+0.3 mg·L<sup>-1</sup>6-BA 培养基上,其不定芽分化率最高达 64.67%;下胚轴接种在 1/2 MS+2.0 mg·L<sup>-1</sup>KT+0.05 mg·L<sup>-1</sup>NAA 和 Heller+0.5 mg·L<sup>-1</sup>BA+0.1 mg·L<sup>-1</sup>NAA 培养基上,其不定芽分化率接近,达到 24%左右;无菌苗的叶片接种在 B<sub>5</sub>+0.5 mg·L<sup>-1</sup>TDZ+0.05 mg·L<sup>-1</sup>NAA 培养基上,其不定芽分化率达 17.7%。芽增殖培养基为 1/2 MS+0.5 mg·L<sup>-1</sup>6-BA+0.1 mg·L<sup>-1</sup>NAA 增殖系数为 3~5, 1/2 MS+0.5 mg·L<sup>-1</sup>BA+500 mg·L<sup>-1</sup>活性炭适于再生幼苗的生根,生根苗经移栽全部成活。

**关键词:**五叶地锦;子叶柄;下胚轴;叶片;植株再生

中图分类号: S723.1

文献标识码: A

### In vitro Culture and Plant Regeneration of *Parthenocissus quinquefolia*

YN Ling-bo<sup>1</sup>, CHEN Ying<sup>1</sup>, SUN Zhen-yuan<sup>2</sup>, YANG Xue-jun<sup>2</sup>, ZHAO Liang-jun<sup>1</sup>

(1. Research Institute of Ornamental Horticulture and Landscape Architecture, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

2. Research Institute of Forestry, CAF, Beijing 100091, China)

**Abstract:** Adventitious shoots were successfully regenerated from cotyledon petioles, hypocotyl explants and leaf explants of *in vitro* cultures of *Parthenocissus quinquefolia*. They were cultured on half strength Murashine and Skoog (MS), B<sub>5</sub> and Heller basal medium supplemented with various plant growth regulators Auxins, naphthaleneacetic acid (NAA) and in combination with three cytokinins, benzylaminopurine (BA), kinetin (KT) and thidiazuron (TDZ) were tried. The study showed that the highest regeneration rate were obtained by cotyledon petioles segments near to the hypocotyl under dark time of 30 days cultured on half strength MS basal medium supplemented with 0.3 mg·L<sup>-1</sup>BA (64.67%), hypocotyl explants cultured on half strength MS basal medium supplemented with 2.0 mg·L<sup>-1</sup>KT and 0.05 mg·L<sup>-1</sup>NAA and Heller basal medium supplemented with 0.5 mg·L<sup>-1</sup>BA and 0.1 mg·L<sup>-1</sup>NAA (both about 24%). Leaf explants cultured on B<sub>5</sub> basal medium supplemented with 0.5 mg·L<sup>-1</sup>TDZ and 0.05 mg·L<sup>-1</sup>NAA, the differentiation rate of adventitious buds was as high as 17.7%. Using half strength MS as the multiplication medium for buds supplemented with 0.5 mg·L<sup>-1</sup>6-BA and 0.1 mg·L<sup>-1</sup>NAA, the multiplication coefficient was 3-5. Half strength MS and 0.5 mg·L<sup>-1</sup>BA and 500 mg·L<sup>-1</sup>activated carbon was suitable for the rooting of regenerated plantlets, and nearly 100% of these plantlets survived after transplanted.

**Key words:** *Parthenocissus quinquefolia*; cotyledon petioles explants, hypocotyl explants; leaf explants; plant regeneration

收稿日期: 2007-06-10

基金项目: 国家科技支撑计划: “优质抗逆专用地锦新品种选育”(2006BAD01A19-5)

作者简介: 尹凌波 (1980—), 女, 硕士生, E-mail: yinlingbo@sina.com

\*通讯作者: 赵梁军, 教授, 博士生导师, 主要从事园林植物生理生态研究, E-mail: zhaolj5073@sina.com

五叶地锦 (*Parthenocissus quinquefolia* (L.) Planch.) 是葡萄科 (Vitaceae) 爬山虎属 (*Parthenocissus* Planch.) 的攀缘性藤本植物,耐旱、耐寒、耐瘠薄,生态适应性强,在广大的干旱、半干旱地区广泛分布,生长速度快,秋季叶色美观,为重要的园林植物。但五叶地锦攀缘能力差,叶幕不整齐,影响其园林效果的发挥。冯大领等<sup>[1]</sup>利用地锦子叶和子叶柄外植体,李正红等<sup>[2]</sup>利用地锦幼胚建立了地锦的再生体系,而五叶地锦再生体系尚未建立。本研究以子叶柄、下胚轴和叶片为外植体建立了五叶地锦的再生体系,为基因工程改良五叶地锦奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 外植体的获得

在无菌条件下,取五叶地锦的种子,盐酸浸泡 20 min,流水冲洗 30 min,用 700 mL · L<sup>-1</sup>乙醇表面消毒 30 s,无菌水冲洗 3~4 次,然后用 1 g · L<sup>-1</sup> HgCl<sub>2</sub> 杀菌 8 min,无菌水冲洗 5~6 次;最后接种到不含激素的 1/2 MS 培养基上。当下胚轴长到 4~5 cm,子叶柄长到 1 cm 时,切取子叶柄、下胚轴和叶片诱导不定芽。

### 1.2 叶片再生体系的建立

将无菌苗的叶片切成 10 mm × 5 mm 的方块,接种到含不同植物激素浓度及组合的 B<sub>5</sub> 培养基上(激素配比见表 1),使叶背面朝下。培养条件为 25 ± 2 °C、光强为 25 μmol · m<sup>-2</sup> · s<sup>-1</sup>、光周期为 16 h 光 / 8 h 暗。各种培养基中均附加 30 g · L<sup>-1</sup>蔗糖, 5 g · L<sup>-1</sup>琼脂粉,调整到 pH 值 5.8。每个处理接种 100 个外植体,并重复 3 次。

### 1.3 下胚轴再生体系的建立

将下胚轴切成 1 cm 长的小段,接种到以 1/2 MS Heller 为基本培养基含不同植物激素浓度及组合的培养基上(激素配比见表 2),暗培养 30 d 后统计分化率。

### 1.4 子叶柄再生体系的建立

将子叶柄切成 1 cm 长的小段,接种到含不同植物激素浓度及激素组合的 1/2 MS 培养基上(激素配比见表 3),每个处理接种 100 个外植体,并 3 次重复,进行暗培养 30 d 后统计分化率。

### 1.5 子叶柄不同部位组织的分化能力

为了研究子叶柄不同部位的再生能力,将子

叶柄切成 3 部分,各 3 mm,分别靠近子叶端,中段,靠近胚轴端;分别接在 1/2 MS + 0.3 mg · L<sup>-1</sup> BA 培养基上。暗培养 30 d 后统计分化率。

### 1.6 暗处理时间对子叶柄的分化能力的影响

为了研究子叶柄在不同培养条件下的再生能力,切取靠近胚轴端的子叶柄进行暗培养 10、20、30、40 d,以光照培养为对照,然后分别接在 1/2 MS + 0.3 mg · L<sup>-1</sup> BA 培养基上统计分化率。

### 1.7 再生苗增殖及生根移栽

当不定芽 2~3 cm 时,转接 1/2 MS + 0.5 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.1 mg · L<sup>-1</sup> NAA 增殖培养基上,当增殖苗长到 4~5 cm 时,接种到生根培养基 1/2 MS + 0.5 mg · L<sup>-1</sup> BA + 500 mg · L<sup>-1</sup> 活性炭上生根。培养条件同 1.2。将生根的健壮苗经炼苗后进行移栽。

## 2 结果与分析

### 2.1 植物激素对叶片不定芽分化的影响

接种 7 d 后,叶片膨大,切口处产生黄绿色愈伤组织,18 d 后,不定芽产生,芽丛不从愈伤组织产生,而是从叶片上其他部分上直接产生,每个叶片产生不定芽 1~3 个不等(图 1, 2)。

将五叶地锦无菌苗的叶片接种在各种培养基上进行培养,不定芽的诱导率很低(见表 1)。仅在 B<sub>5</sub> 培养基中添加 TDZ 0.5 mg · L<sup>-1</sup> 和 NAA 0.05 mg · L<sup>-1</sup> 的条件下能诱导产生愈伤和不定芽,分化率为 17.7%,每个外植体平均产生不定芽数为 2.3 个。在其他几种培养基上,仅产生质地致密的黄绿色愈伤组织而不能分化出不定芽。这说明激素种类与激素浓度组合对五叶地锦叶片不定芽的分化影响很大。

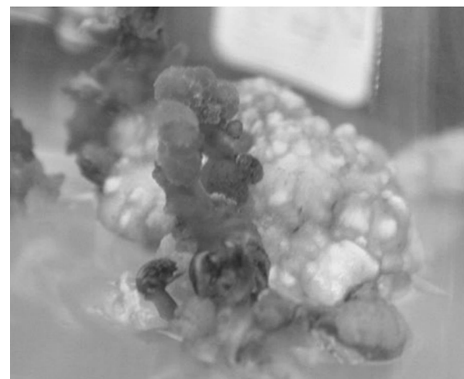


图 1 五叶地锦叶片接种 14 d 后生成不定芽

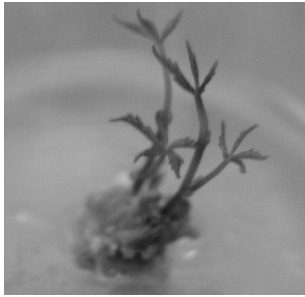


图 2 五叶地锦叶片接种 30 d后不定芽伸长

表 1 植物激素不同组合及不同浓度对叶片不定芽分化的影响

处理编号	激素组合及浓度 / ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )		外植体数	分化率 / %	外植体平均 不定芽数
	TDZ	NAA			
1	0.2	0.01	100	0	0
2	0.5	0.01	100	0	0
3	0.8	0.01	100	0	0
4	0.2	0.05	100	0	0
5	0.5	0.05	100	17.7 $\pm$ 1.5	2.3 $\pm$ 0.1
6	0.8	0.05	100	0	0
7	0.5	0.1	100	0	0

## 2.2 植物激素对下胚轴不定芽分化的影响

接种 7 d后,下胚轴一端膨大,14 d后,不定芽从膨大处产生,每个下胚轴产生 1~2个不定芽(图 3,4)。



图 3 五叶地锦下胚轴接种 14 d后生成不定芽

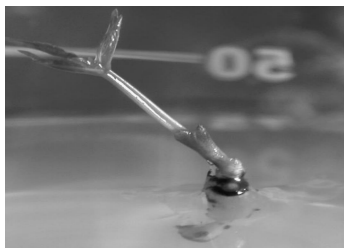


图 4 五叶地锦下胚轴接种 30 d后不定芽伸长

将五叶地锦无菌苗的下胚轴接种在正交试验设计的培养基上,不定芽的诱导率很低(见表 2)。五叶地锦下胚轴在 1/2 MS附加 KT 2.0 mg

$\cdot \text{L}^{-1}$ 和 NAA 0.05  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 或 Heller附加 BA 0.5  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 NAA 0.1  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养基上都能诱导切口一端膨大处产生不定芽。经过 SPSS 的最小显著差异法分析统计,两者的分化率和平均芽数没有显著差异,分化率分别为 24.3% 和 23.6%,外植体平均产生不定芽数分别为 1.57 个和 1.64 个,在其他几种培养基上,仅切口处一端膨大而不能分化出不定芽,这说明 1/2MS 和 Heller附加合适的激素均可诱导产生不定芽,而且诱导率和平均芽数的差别不大。在同一种基本培养基上不同的激素种类和浓度对不定芽的分化影响不同。不同的培养基可以诱导五叶地锦下胚轴产生相似的再生率和再生芽数。

表 2 植物激素不同组合及不同浓度对下胚轴不定芽分化的影响

处理编号	基本培养基	激素组合及浓度 / ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )			外植体数	分化率 / %	外植体平均 不定芽数
		BA	KT	NAA			
1	1/2MS	0	1.0	0.05	100	0	0
2	1/2MS	0	2.0	0.05	100	24.3 $\pm$ 1.5A	1.57 $\pm$ 0.02A
3	1/2MS	0	3.0	0.05	100	0	0
4	1/2MS	0.5	0	0.05	100	0	0
5	1/2MS	0.5	0	0.1	100	0	0
6	1/2MS	1.0	0	0.1	100	0	0
7	Heller	0.2	0	0.05	100	0	0
8	Heller	0.2	0	0.1	100	0	0
9	Heller	0.5	0	0.1	100	23.6 $\pm$ 0.7A	1.64 $\pm$ 0.01A
10	Heller	0.8	0	0.1	100	0	0
11	Heller	0.5	0	0.2	100	0	0
12	Heller	0	2.0	0.05	100	0	0

## 2.3 植物激素对子叶柄不定芽分化的影响

接种 7 d后,子叶柄一端膨大,14 d后,不定芽从膨大处产生,每个子叶柄产生不定芽 1~4个(图 5,6)。

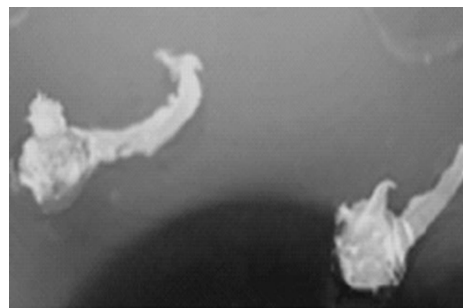


图 5 五叶地锦子叶柄接种 14 d后生成不定芽

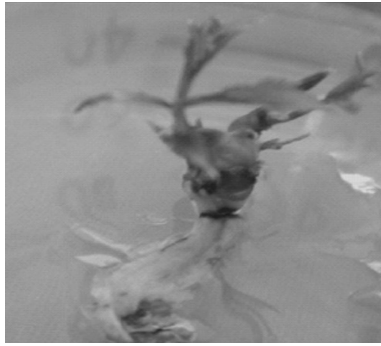


图 6 五叶地锦子叶柄接种 30 d 后不定芽伸长

将五叶地锦无菌苗的子叶柄接种在正交试验设计的培养基上,不定芽的诱导率见表 3。五叶地锦子叶柄在  $1/2MS$  附加  $BA\ 0.3\ mg \cdot L^{-1}$  培养基上能诱导产生不定芽,分化率为 63.33%,外植体平均产生不定芽数为 3.54 个,而在其他培养基上仅切口处一端膨大未出现不定芽,这说明不同的激素种类和浓度对叶片不定芽的分化影响不同。

表 3 植物激素不同组合及不同浓度对子叶柄不定芽分化的影响

处理 编号	激素组合及浓度 / ( $mg \cdot L^{-1}$ )		外植体数	分化率 / %	外植体平均 不定芽数
	BA	NAA			
1	0.1	0	100	0	0
2	0.3	0	100	63.33 $\pm$ 1.6	3.54 $\pm$ 0.08
3	0.5	0	100	0	0
4	0.1	0.01	100	0	0
5	0.3	0.01	100	0	0
6	0.5	0.01	100	0	0

#### 2.4 不同部位子叶柄和暗培养时间对子叶柄不定芽分化的影响

子叶柄不同部位,暗培养不同时间和光照条件下均可以产生不定芽(见表 4)。

表 4 表明,所接种的不同部位的子叶柄均有不定芽产生,但其分化不定芽的能力有所不同,靠近胚轴端子叶柄的分化率最高值为 64.67%。经数据分析软件 SPSS 的最小显著差异法分析表明,与其他两部分相比,其差异达显著水平,而靠近子叶端最少,为 2.33%。子叶柄的分化率的不定芽数也与分化率呈现相同的趋势。随着暗处理时间的延长,再生率出现先增高后降低的趋势,在暗处理 30 d 时达到最高值为 64.67%,表明暗处理时间过长或者不足都会对子叶柄的再生产生影响。光培养对照中不定芽的分化率及

分化的不定芽数均为最低。

表 4 不同部位子叶柄和不同暗培养条件对子叶柄不定芽分化的影响

处理 编号	下胚轴 部位	暗处理 时间 / d	外植 体数	分化 率 / %	外植体平均 不定芽数
1	近轴端	30	100	64.67 $\pm$ 1.70A	3.54 $\pm$ 0.12A
2	中部	30	100	20.00 $\pm$ 1.63C	1.98 $\pm$ 0.10B
3	近子叶端	30	100	2.33 $\pm$ 1.25D	1.25 $\pm$ 0.20CD
4	近轴端	0	100	7.33 $\pm$ 2.05D	1.11 $\pm$ 0.08D
5	近轴端	10	100	32.67 $\pm$ 1.25B	2.23 $\pm$ 0.15B
6	近轴端	20	100	61.67 $\pm$ 1.70A	3.40 $\pm$ 0.08A
7	近轴端	30	100	64.67 $\pm$ 2.87A	3.51 $\pm$ 0.06A
8	近轴端	40	100	28.33 $\pm$ 1.25B	1.63 $\pm$ 0.26BC

注:不同字母表示在 0.01 水平差异显著。

#### 2.5 再生苗的增殖与生根

分化的不定芽能够在原培养基上很好地伸长,当芽长 2~3 cm 时,及时将不定芽切下转接到  $1/2MS + 0.5\ mg \cdot L^{-1} 6BA + 0.1\ mg \cdot L^{-1} NAA$  的增殖培养基上,每 30 d 继代 1 次,增殖系数为 3~5。当增殖苗长到 4~5 cm 时,接种到  $1/2MS + 0.5\ mg \cdot L^{-1} BA + 500\ mg \cdot L^{-1}$  活性炭的生根培养基上,30 d 后形成很好的根系,生根率达 100% (图 7, 8)。当新根为 2~3 cm 时可移出炼苗,30 d 后小苗可达 10~15 cm,定植后成活率 100%。

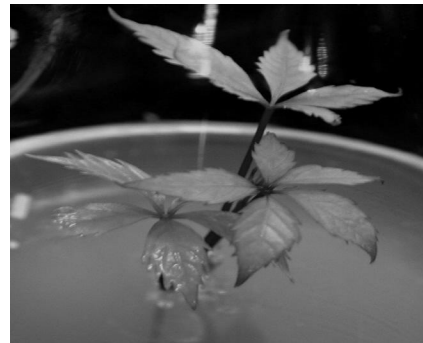


图 7 五叶地锦不定芽的增殖



图 8 五叶地锦不定芽的生根

### 3 小结与讨论

(1)本研究成功建立了五叶地锦子叶柄、下胚轴和叶片不定芽再生体系,最佳再生体系分别为:暗处理 30 d,靠近下胚轴的子叶柄接种在  $1/2 MS + 0.3 mg \cdot L^{-1} 6-BA$  培养基上,其不定芽分化率最高达 63.33%。下胚轴接种在  $1/2 MS + 2.0 mg \cdot L^{-1} KT + 0.05 mg \cdot L^{-1} NAA$  和 Heller +  $0.5 mg \cdot L^{-1} BA + 0.1 mg \cdot L^{-1} NAA$  培养基上,其不定芽分化率接近,达到 24%左右,无菌苗的叶片接种在  $B_5 + 0.5 mg \cdot L^{-1} TDZ + 0.05 mg \cdot L^{-1} NAA$  培养基上,其不定芽分化率达 17.7%。

(2)五叶地锦属于藤本植物,属间不同种的再生能力差异较大。目前有关爬山虎属植物再生植株的研究集中在地锦 (*Parthenocissus tricuspidata* (Sieb. et Zucc.) Planch.) 上,李正红等<sup>[2]</sup>探明从地锦幼胚诱导植株再生,冯大领等<sup>[1]</sup>以地锦的子叶和子叶柄为材料,进行了体胚再生。本实验中五叶地锦子叶柄再生的培养基与此篇文章报道的不定芽诱导培养基相同,均为  $1/2 MS + 0.3 mg \cdot L^{-1} 6-BA$ ,文献[1]中报道地锦子叶柄的再生率为 16.7%,而本实验中五叶地锦的最高再生率可达到 64.67%。实验中对暗培养时间和子叶柄的部位进行了筛选,最佳暗培养时间五叶地锦和地锦相同均为 30 d,地锦和五叶地锦这两种植物在子叶柄再生上对外源植物激素诱导效应相同。

(3)本实验成功建立了五叶地锦以子叶柄、下胚轴和叶片为外植体的不定芽再生体系,并发现再生受许多内外因素的影响。外部因素如培养基成分、植物激素的浓度及组合等对不定芽的分化影响不同,在不定芽分化过程中,细胞分裂素与生长素的浓度比起着关键作用,它决定着分化的方向。实验中还发现五叶地锦不同部位所需的再生培养基差异很大,子叶柄和下胚轴在基本培养基为  $1/2 MS$  附加不同激素配比的培养基上可生成不定芽,而叶片的再生则需要  $B_5$  培养基上形成。下胚轴除了可以在  $1/2 MS$  培养基上产生不定芽,还可以在 Heller 培养基上再生,但需在两种基本培养基上附加不同的激素和激素配比才行。实验中叶片的再生在选用的

多种激素种类及组合中,只有在 TDZ 上形成了不定芽,细胞分裂素 TDZ (thidiazuron) 是一种具有高生理活性的细胞分裂素,促进再生的效果比 BA 高得多<sup>[3]</sup>,尤其对较难再生的基因型,效果更明显<sup>[4]</sup>。实验中对所接种的不同部位再生能力进行了研究,近子叶端,中部,近胚轴端均有不定芽产生,但其分化不定芽的能力有所不同,靠近胚轴端的子叶柄分化率最高,为 64.67%,而靠近子叶端最少。在 Nagori R. 等<sup>[5]</sup>对番荔枝 (*Annona squamosa* Linn.) 和尚爱芹<sup>[6]</sup>对北海道黄杨 (*Buxus japonica* Muel - Arg.) 下胚轴不定芽分化的研究中发现靠近子叶端的分化率最高,张松等<sup>[7]</sup>对大白菜 (*Brassica pekinensis* (Lour.) Rupr.) 子叶再生的研究中发现子叶基部再生率最高。以上的研究与本实验结果相似,可能是由于种子中内源激素分配不均造成的。随着暗处理时间的延长,再生率出现先增高后降低的趋势,这与田志宏<sup>[8]</sup>在马蹄金 (*Dichondra repens* Forst.) 下胚轴再生过程结果基本一致。实验中得到分化率并不很高,因此需要进一步提高其分化率为遗传转化提供基础。

#### 参考文献:

- [1] 冯大领,李云,孙振元. 爬山虎体细胞胚的发生及组织学研究[J]. 北京林业大学学报, 2004, 26(4): 97 - 99
- [2] 李正红,孙振元,刘秀贤,等. 地锦体细胞胚胎发生研究[J]. 林业科学研究, 2005, 18(1): 36 - 40
- [3] Martinielli L, Gribaudo I. Somatic Embryogenesis in Grapevine[M]. Netherland Kluwer, Academic Publishers. Molecular Biology and Biotechnology of Grapevine, 2001: 327 - 351
- [4] 王关林,方宏筠,那杰. 高活性细胞激动素 TDZ 在植物组织培养中的应用[J]. 植物学通报, 1997, 14(3): 47 - 53
- [5] Nagori R, Puohit S D. *In vitro* plantlet regeneration in *Annona squamosa* through direct shoot bud differentiation on hypocotyl segments[J]. Scientia Horticulturae, 2004, 99: 89 - 98
- [6] 尚爱芹,蔡汉,闫晓洁,等. 北海道黄杨下胚轴的离体培养及植株再生[J]. 中国农业科学, 2005, 38(12): 2502 - 2507
- [7] 张松,温孚江,魏毓棠. 外植体处理及接种方式对大白菜植株再生的影响[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2001, 32(1): 78 - 80
- [8] 田志宏,王涛,严寒,等. 不同外植体对愈伤组织诱导及分化的影响[J]. 草业科学, 2004, 21(5): 71 - 76