

胡海英,李 瑜. 金莲花种子无菌播种及离体培养技术[J]. 江苏农业科学,2016,44(7):230-233.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.07.064

金莲花种子无菌播种及离体培养技术

胡海英¹, 李 瑜²

(1. 宁夏大学科技处, 宁夏银川 750021; 2. 宁夏大学生命科学学院, 宁夏银川 750021)

摘要:通过金莲花种子无菌播种、离体培养技术的研究,初步建立金莲花离体培养的技术体系和方法,为其种质资源的保护和利用提供前期的技术基础。以金莲花种子为外植体,筛选出适宜金莲花无菌播种发芽、离体培养的培养基配方。结果表明:金莲花种子用 100 mg/L GA_3 冷浸 4 d 效果最佳,其发芽率为 92.67%;用无毒级杀菌消毒剂爱力克配制成 2 500 mg/L,与 75% 乙醇配合消毒 20 min 效果最佳;适宜金莲花种子无菌播种培养基配方为 MS + 0.1 mg/L TDZ + 0.5 mg/L IBA;适宜金莲花试管苗丛生芽增殖的培养基配方为 1/2MS + 0.05 mg/L TDZ + 0.5 mg/L KT + 0.5 mg/L IBA + 100 mg/L PVP + 40 mg/L 维生素 C;适宜金莲花试管苗壮苗生长的培养基为 1/2MS + 0.5 mg/L NAA + 40 mg/L 维生素 C + 100 mg/L PVP + 0.5% 活性炭。

关键词:金莲花;种子;无菌播种;组织培养

中图分类号: S567.23*9.043

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2016)07-0230-03

金莲花(*Trollius chinensis* Bunge.)别称旱荷、旱莲花、寒荷、陆地莲等,为毛茛科金莲花属,属于一年生或多年生草本植物,喜冷凉湿润环境,多生长在海拔 1 800 m 以上的高山草甸或疏林地带。金莲花在我国分布较为广泛,其主产地在河北塞罕坝上周边地区的沿坝地带,在宁夏主要零星分布于六盘山等地区。金莲花植株秀丽、花色金黄,是优良的花坛、花镜和盆花材料^[1-3];同时,金银花花朵有极高的药用价值,可入药或制茶^[2-6]。目前,国内有关金莲花的研究多集中于金莲花药理成分提取、分离、鉴定和医药制剂与质量控制方面^[7],如刘丽娟等对长瓣金莲花^[8]、黄文哲等对短瓣金莲花^[9]的茎叶化学成分进行了研究,叶绍明等通过研究建立了关于金莲花有效成分的提取工艺体系^[10]。在金莲花的人工栽培、养护管理方面,陈智卿等进行了一系列较为详尽的研究,认为通过实生播种进行金莲花种苗培育,其幼苗死亡率高达 70%~80%,且幼苗期栽培管理较难,难以达到迅速培育优质种苗的目的^[1-2,11];由于金莲花的休眠特性,使其自然繁殖系数低,幼苗死亡率高。在金莲花组织培养的研究方面,国内有零星相关报道,杨玉芳等以山西金莲花种子为材料建立了金莲花离体培养体系,但是金莲花除菌环节较困难,污染严重,繁殖系数低^[12]。因此,解决金莲花发育迟缓、无菌苗生长缓慢、继代不稳定等问题仍是当前重要的研究工作。本研究在药用植物组织培养研究的基础上,通过不同种类、不同浓度细胞分裂素、生长素的搭配使用,选择适宜的种子无菌播种、增殖培养的培养基配方,初步建立金莲花离体培养技术和方法,以期在金莲花种质资源保护与利用提供前期的试验支持。

1 材料与方法

1.1 材料与方法

金莲花种子,由宁夏隆德县金莲花示范种植基地提供,引种于河北坝上地区,别称坝上金莲花。经干燥、挑拣杂物等处理后,置于牛皮纸袋中,于 4℃ 冰箱冷藏保存。

在无菌播种前解除种子休眠,先将种子清洗后浸没于 100 mg/L GA_3 溶液中,于 4℃ 低温冷藏 4 d(该条件发芽率可达 92.67%)后进行无菌消毒。培养基采用 MS 基本培养基^[13-15],其中含 6 g/L 琼脂、30 g/L 蔗糖,pH 值 5.8。添加的植物激素有细胞分裂素 6-苄基氨基嘌呤(6-BA)、噻苯隆(TDZ);生长素 α -萘乙酸(NAA)、吲哚乙酸(IBA)。抗氧化剂为聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、维生素 C。吸附剂为活性炭。

消毒液选用上海宇涵生物科技公司生产的新一代无毒级杀菌消毒剂爱立克,配制成 2 500 mg/L 浓度备用。

1.2 试验方法

1.2.1 不同消毒时间对金莲花种子无菌萌发的影响 将清洗并解除休眠的种子置于超净工作台上,先用 75% 乙醇浸泡 30 s,然后用无菌水清洗 3 次,再用 2 500 mg/L 消毒液分别浸泡 15、20、25 min,最后用无菌水清洗 3 次,用无菌滤纸吸干水分后接种到培养基中,观察种子的发芽情况、污染情况,统计其发芽率、污染率。培养条件:光照时间 8 h/d,光照度为 1 000 lx,培养温度为(25±1)℃。

1.2.2 金莲花种子无菌接种培养基的筛选 用以上筛选出的打破休眠并用最佳无菌消毒方法处理的种子后,将种子接种在不同配方的培养基上。以污染率、发芽率为指标,筛选种子无菌播种最适培养基配方。培养条件:光照时间 8 h/d,光照度 1 000 lx,培养温度(25±1)℃。

1.2.3 金莲花试管苗丛生芽增殖培养基的筛选 将金莲花试管苗分成带部分根、茎、叶的材料,分别接种到含不同浓度 6-BA、TDZ、IBA 的增殖培养基中(配方详见表 2),观察其从生芽的分化情况。培养条件:光照时间 8 h/d,光照度

收稿日期:2015-05-21

基金项目:宁夏自然科学基金(编号:NZ13034);宁夏大学自然科学基金(编号:ZR1217)。

作者简介:胡海英(1976—),女,宁夏平罗人,硕士,副教授,主要研究方向为植物资源保护与利用。E-mail:haiying@nxu.edu.cn。

2 000 lx,培养温度(25±1)℃。

表 1 金莲花种子无菌播种培养基配方

编号	配方
A1	1/2MS+0.1 mg/L 6-BA+0.02 mg/L NAA
A2	MS+0.2 mg/L 6-BA+0.05 mg/L NAA
A3	MS+0.02 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA
A4	MS+0.2 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA
A5	1/2MS+0.05 mg/L TDZ
A6	1/2MS+0.05 mg/L TDZ+0.05 mg/L IBA+40 mg/L 维生素 C+100 mg/L PVP
A7	MS+0.1 mg/L TDZ+0.5 mg/L IBA

表 2 金莲花无菌苗不定芽增殖培养基配方

编号	配方
B1	1/2MS+0.1 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA
B2	MS+0.02 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA
B3	1/2MS+0.005 mg/L TDZ+0.02 mg/L IBA+40 mg/L 维生素 C+100 mg/L PVP
B4	1/2MS+0.05 mg/L TDZ+0.5 mg/L IBA+40 mg/L 维生素 C+100 mg/L PVP
B5	MS+0.2 mg/L TDZ+0.1 mg/L 6-BA+0.1 mg/L IBA
B6	1/2MS+0.05 mg/L TDZ+0.5 mg/L KT+0.5 mg/L IBA+100 mg/L PVP+40 mg/L 维生素 C
B7	1/2MS+0.05 mg/L TDZ+0.05 mg/L IBA

1.2.4 金莲花试管苗壮苗生根培养基的筛选 以金莲花试管苗为材料,分别接种到含不同浓度的 TDZ、NAA、IBA 的壮苗生根培养基中(培养基配方见表 3),观察其生长及生根情况。培养条件:光照时间 8 h/d,光照度 2 000 lx,培养温度(25±1)℃。

表 3 金莲花试管苗壮苗生根培养基配方

编号	配方
C1	MS+0.05 mg/L TDZ+0.05 mg/L IBA
C2	1/2MS+0.5 mg/L NAA+40 mg/L 维生素 C+100 mg/L PVP+0.5% 活性炭
C3	1/2MS+0.5 mg/L IBA+40 mg/L 维生素 C+100 mg/L PVP+0.5% 活性炭

1.3 数据统计

本研究中用到的相关公式如下:发芽率=(发芽的种子数/试验种子总数)×100%;污染率=(污染的种子数/试验种子总数)×100%;成苗率=(发芽种子形成幼苗数/发芽的种子数)×100%;增殖系数=(再生丛生芽数/接种数)×100%。

统计分析所得数据采用 SPSS 19.0 软件进行标准误差及方差分析。

2 结果与分析

2.1 不同消毒时间对种子无菌萌发的影响

经种子休眠解除处理后,对金莲花种子进行无菌消毒处理,由表 4 可以看出,灭菌时间不同,消毒效果不同,即污染率不同。

消毒时间为 15 min,接种 3~7 d 后,种子表面长出霉菌,颜色为白色、黑色居多且菌毛较长,形成较大的菌圈,培养基

表 4 不同消毒时间对种子萌发的影响

灭菌时间 (min)	接种数 (粒)	发芽率 (%)	污染率 (%)
15	100	0.00±0.00	100.00
20	100	50.56±0.18	21.47±3.26
25	100	19.67±2.33	19.25±2.48

表面形成 1 层墨绿色的菌层,种子材料全部被污染,无发芽。延长灭菌时间至 20 min,污染率为 21.47%,发芽率可达 50%。灭菌时间延长至 25 min 时,接种 3~7 d 后,部分培养基会轻微泛黄,发芽率低。结果说明,灭菌时间过长则会抵制种子活性,影响种子发芽,因此选用 2 500 mg/L 消毒剂爱立克结合 75% 乙醇对金莲花种子灭菌处理 20 min,可以达到较好的消毒效果。

2.2 不同激素配比对金莲花种子无菌发芽效果的影响

不同种类、浓度配比的细胞分裂素、生长素可以直接影响金莲花种子的无菌发芽效果。从表 5 可以看出,选用含 0.05~0.10 mg/L TDZ 培养基进行金莲花无菌播种,与含有 NAA、6-BA 植物激素的培养基相比,种子的发芽率、成苗率相对较高,而且发芽时间也较其他培养基快 4~8 d。从发芽率、成苗率、发芽时间的比较可知,选用培养基 MS+0.1 mg/L TDZ+0.5 mg/L IBA 进行无菌播种,其种子发芽率为 51%,成苗率达 50%,较其他培养基效果明显。由此可知,MS+0.1 mg/L TDZ+0.5 mg/L IBA 培养基适合用于金莲花种子的无菌发芽培养(图 1)。

表 5 不同激素配比对金莲花种子无菌发芽效果的影响

编号	发芽率(%)	成苗率(%)	发芽时间(d)
A1	33.33±1.93	19.76±2.03	14~25
A2	34.33±4.52	20.12±3.95	11~20
A3	0.00±0.00	0.00±0.00	
A4	0.00±0.00	0.00±0.00	
A5	40.51±0.92	41.26±0.93	7~20
A6	40.00±0.97	25.66±3.97	7~21
A7	51.28±0.82	50.28±0.87	6~23

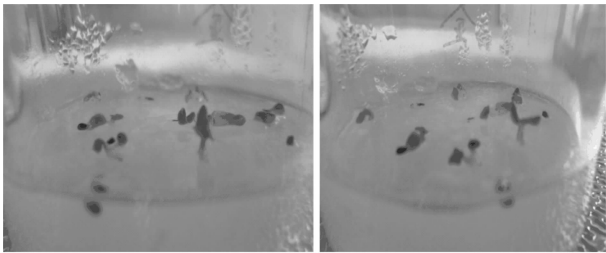


图 1 金莲花种子无菌发芽效果

2.3 不同激素配比对金莲花试管苗丛生芽增殖的影响

从表 6 可以看出,增殖培养 20 d 后,各培养基金莲花从生芽的增殖系数有明显差异。经方差分析可知,金莲花在 B6 增殖培养基中增殖系数显著高于其他培养基,接种后长出新生芽的时间较短,约为 21 d,且增殖丛生芽数多、生长健壮。在本研究中,光照培养一段时间后,材料容易褐化。有研究报道,褐变在植物组织培养中普遍存在,不同植物可采用不同的方法进行预防和控制^[14]。笔者发现,在培养基中加入 PVP、活性炭可有效防止褐变的发生。

表 6 不同激素配比对金莲花试管苗丛生芽增殖的影响

编号	增殖系数	现象
B1	0b	无菌苗没有丛生芽长出
B2	0b	无菌苗没有丛生芽长出
B3	1.67b	丛生芽数量较多但茎秆较细、有褐化
B4	1.10b	丛生芽数较少,幼苗有的干枯坏死
B5	0b	无丛生芽,且培养基有污染
B6	1.75a	丛生芽数多,且茎秆粗壮,褐化程度低
B7	1.61b	丛生芽生长较矮,有褐化

注: $F_{0.05}=2.87$ 。同列数据后不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

表 7 不同激素配比对金莲花试管苗壮苗生根培养的影响

编号	株高 (cm)	现象
C1	1.10 ± 0.34	植株矮小,叶轴、茎秆纤细。部分叶片有褐化现象。主根数量少,几乎不生根
C2	1.98 ± 0.06	叶片没有褐化现象,但部分叶片边缘伸展程度大。生根现象明显。植株高
C3	0.98 ± 1.05	无菌苗存活率低,叶片没有褐化现象。植株矮小,几乎不生根

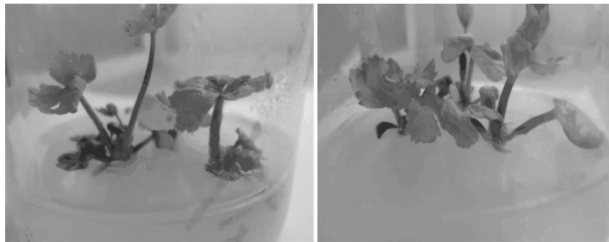


图2 金莲花试管苗增殖培养效果

3 结论

由本研究结果可知,(1)4℃低温层积结合 100 mg/L GA₃ 可以有效打破金莲花种子的休眠,低温层积处理 4 d 效果最佳,种子发芽率可达 92.67%。(2)用新一代无毒级杀菌消毒剂爱力克,配制成 2 500 mg/L 溶液,与 75% 乙醇配合消毒 20min 效果最好。(3)细胞分裂素、生长素不同浓度配比影响金莲花的无菌发芽、增殖生长,适宜金莲花无菌发芽的培养基为 MS + 0.1 mg/L TDZ + 0.5 mg/L IBA;适宜金莲花试管苗丛生芽增殖的培养基为 1/2MS + 0.05 mg/L TDZ + 0.5 mg/L KT + 0.5 mg/L IBA + 100 mg/L PVP + 40 mg/L 维生素 C;适宜金莲花试管苗壮苗、生根的培养基为 1/2MS + 0.5 mg/L NAA + 40 mg/L 维生素 C + 100 mg/L PVP + 0.5% 活性炭。(4)在培养基中加入维生素 C、PVP 等抗氧化成分,配合活性炭,并在金莲花无菌试管苗再生出 2~3 张叶、培养时间约为 18 d 时及时对其幼苗进行转接,可有效避免褐化。

4 讨论

4.1 金莲花种子休眠的解除方法

顾增辉等研究认为,纯丙酮配制 GA₃ 溶液浸泡种子 4 h 处理金莲花种子发芽效果最好^[4],与本研究结果一致。但处理后,将种子进行无菌消毒后进行播种时,种子在培养基中的发芽效果与纸床发芽效果差异显著。可能是因为用纯丙酮对种子处理过后,虽然对种子经过几次无菌水的清洗,但不排除还留有一定量纯丙酮溶液对种子萌发造成的影响,使长出的幼苗不能顺利生长成苗。因此,是否用此方法对金莲花种子进行休眠解除并应用于组织培养还有待于进一步研究。

2.4 不同激素配比对金莲花试管苗壮苗生根培养的影响

不同激素配比对金莲花试管苗生长影响不一,在添加不同生长素的培养基中诱导获得的不定根粗而短,且叶片边缘伸展程度大。由于试验中添加了活性炭,叶片、茎部没有褐化现象,且明显促进了生根。未添加生长素的培养基中诱导获得的不定根数量少、植株矮小、生长缓慢,说明生长素,尤其是 NAA 有利于金莲花不定根的形成,从而促进试管苗的伸长生长。因此,选用 C2 (1/2MS + 0.5 mg/L NAA + 40 mg/L 维生素 C + 100 mg/L PVP + 0.5% 活性炭)培养基作为金莲花试管苗壮苗生根培养基(表 7)。金莲花试管苗增殖培养效果见图 2。

4.2 不同的无菌消毒方法

在野生花卉引种驯化中,以种子为外植体建立离体培养体系是一条多快好省的途径,但在建立离体培养技术前的基础是对外植体进行无菌消毒。在对金莲花无菌消毒方法中,杨玉芳等采用 HgCl₂ 消毒,对种子有一定的毒害作用,造成材料大量污染、发芽率低等问题^[12]。在本试验中,用新型的消毒剂对种子组织毒害小,除能杀死所有细菌繁殖体外,对所有细菌芽孢、病毒、藻类和真菌等均有很强的杀灭作用,但是长时间作用也会对种子产生毒害,从而影响种子萌发。并且外植体污染问题不能根除,也可能与金莲花本身的野生生存环境有关,金莲花快速生长期、种子成熟期为多雨季节,多湿、半阴环境有利于微生物的繁衍,其果实为蒴果,采收时蒴果均已开裂,其间繁衍了大量真菌或细菌等微生物,增加了组织培养材料除菌的难度^[15-16]。

4.3 金莲花试管苗发芽、生长缓慢

本研究发现,金莲花种子的发芽率在有菌环境(培养皿滤纸发芽)、无菌培养基条件下存在一定的差异。前者种子发芽率略高于后者,且发芽时间短(3 d 开始发芽),严力群等也有过类似报道^[5]。但在无菌培养基中,最快 6 d 开始发芽,可能是无菌培养基含水量高、各种激素配合作用,以及 pH 值等均是影响金莲花种子发芽慢的因素,但主导制约因素还待研究。另外,本研究中使用具有细胞分裂素作用的 TDZ,能诱导离体培养材料的多种途径形态发生,比 6-BA、KT 等细胞分裂素效果明显。在培养基中加入维生素 C、PVP,配合活性炭,并在金莲花无菌试管苗再生出 2~3 张叶时(培养时间约为 18 d 左右),及时对其幼苗进行转接,可有效避免褐化。尽管综合应用了以上措施,但金莲花无菌发芽最快在第 6 天,且增殖系数最多为 1.75,还不能完全达到离体快繁的目标。因此,解决金莲花试管苗生长缓慢、提高增殖快繁倍数仍是今后的研究重点。

参考文献:

[1]陈智卿,李大林. 金莲花人工育苗技术[J]. 河北林业科技,2004 (4):39.
[2]蔡连捷. 金莲花的药用价值及栽培技术[J]. 中国种业,2003(8):43.

李 畅,苏家乐,肖 政,等. 旱涝交替胁迫下杜鹃花叶片内源激素含量的变化[J]. 江苏农业科学,2016,44(7):233-235.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.07.065

旱涝交替胁迫下杜鹃花叶片内源激素含量的变化

李 畅,苏家乐,肖 政,刘晓青,何丽斯,陈尚平

(江苏省农业科学院园艺研究所/江苏省高效园艺作物遗传改良重点实验室,江苏南京 210014)

摘要:以鹿角杜鹃(敏感)和马银花(忍耐)2种对水分胁迫敏感性差异较大的杜鹃花三年生实生苗为试验材料,设置旱涝交替胁迫(重度干旱胁迫20 d后进行淹水胁迫),通过酶联吸附免疫法测定了旱涝交替胁迫前后杜鹃花叶片ABA、IAA、GA、CTK 4种内源激素含量的变化。结果发现,旱涝交替胁迫下2种杜鹃花叶片IAA、GA、CTK含量均有不同程度的下降,ABA含量则显著增加。旱涝交替胁迫下杜鹃花4种激素协调的总趋势是向气孔关闭、减缓生长的方向进行。抗性较强的马银花在处理前4种激素的含量均高于鹿角杜鹃;旱涝交替胁迫下其IAA和GA含量、IAA/ABA和GA/ABA下降幅度大于抗性较弱的鹿角杜鹃,CTK含量下降幅度、ABA含量的增加幅度小于抗性较弱的鹿角杜鹃。

关键词:杜鹃花;鹿角杜鹃;马银花;旱涝交替胁迫;内源激素

中图分类号: S685.210.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)07-0233-03

杜鹃花是杜鹃花科(Ericaceae)杜鹃花属(*Rhododendron*)植物的泛称,在我国栽培历史悠久,是深受国人喜爱的十大传统名花之一。随着城市的发展,杜鹃花在园林绿化中应用面积逐年增加^[1]。但杜鹃花对水分反应十分敏感^[2],而水分胁迫是植物生长发育中最常遇到的逆境胁迫之一,且近年来长江中下游夏季“旱涝并存、旱涝急转”现象发生频次呈上升趋势^[3-4],因此有必要了解杜鹃花对旱涝交替胁迫下的响应机制。植物的抗逆性与植物内源激素有着密切联系,逆境胁迫下植物体各种内源激素产生和分配的平衡发生改变,在一定环境胁迫限度内植物体可通过激素水平的变化来调节其生理

机能和生长节律以适应逆境^[5]。植物激素在植物抗水分胁迫中的作用早已引起人们普遍关注^[6-8],但未见有关杜鹃花水分胁迫下内源激素方面的报道。故本试验以2种对水分胁迫敏感性差异较大的杜鹃花为材料,采用酶联免疫法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA),对旱涝交替胁迫下2种杜鹃花叶片中脱落酸(ABA)、吲哚丁酸(IAA)、赤霉素(GA)、细胞分裂素(CTK)等4种内源激素含量进行了测定,以期了解旱涝交替胁迫下杜鹃花叶片主要内源激素的变化规律,从内源激素方面为杜鹃花对旱涝交替胁迫下生理响应机制的研究提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为在前期试验基础上筛选出的2种对水分胁迫响应差异较大的杜鹃花:鹿角杜鹃(*R. latoucheae*)和马银花(*R. ovatum*),其中鹿角杜鹃为旱涝水分胁迫敏感型,马银花为忍耐型。选用生长势一致、健壮的三年生实生苗为试验材料,盆直径18 cm,高16 cm。盆土由泥炭和珍珠岩(3:1)混合配成,最大持水量55.07%。每盆1株,每个试验材料30盆。

收稿日期:2015-06-11

基金项目:国家科技支撑计划(编号:2013BAD01B070403);江苏省自然科学基金(编号:BK2012789);江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(13)2016]。

作者简介:李 畅(1982—),女,内蒙古乌兰浩特人,硕士,助理研究员,主要从事花卉种质资源与遗传育种研究。E-mail:changli529@foxmail.com。

通信作者:苏家乐,硕士,研究员,从事花卉苗木品种选育及栽培技术研究。E-mail:sujl66@aliyun.com。

[3] 丁万隆,陈 震,陈 君. 金莲花属药用植物资源及利用[J]. 中国野生植物资源,2003,22(6):19-21.

[4] 顾增辉,龙雅宜. 金莲花种子的休眠、萌发与活力的研究[J]. 植物资源与环境,1992,1(4):30-33.

[5] 严力群,丁万隆,朱殿龙. 金莲花人工栽培与野生抚育研究进展[J]. 时珍国医国药,2008,19(2):286-288.

[6] 李 娜,黄璐琦,邵爱娟,等. 金莲花种子休眠和贮藏特性的研究[J]. 现代中药研究与实践,2010,24(1):1-5.

[7] 辛春兰,潘海峰. 金莲花的研究进展[J]. 承德医学院学报,2003,20(4):348-350.

[8] 刘丽娟,王秀坤,匡海学. 长瓣金莲花茎叶化学成分的研究[J]. 药学学报,1992,27(11):837-840.

[9] 黄文哲,王 磊,段金殿. 短瓣金莲花化学成分的研究[J]. 中草药,2000,31(10):731-732.

[10] 叶绍明,李药兰,杨宜婷,等. 金莲花提取工艺[J]. 中国中药杂志,2002,27(6):463-464.

[11] 曹运强,周庆营,张汝利. 金莲花如何播种育苗[J]. 中国林业,2007(4):56.

[12] 杨玉芳,王 玄,赵红霞,等. 金莲花组织培养和快繁体系建立的研究[J]. 中国农学通报,2011,27(8):136-139.

[13] 朱殿龙,丁万隆,陈士林. 金莲花属植物的研究进展[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2006,8(4):26-33.

[14] 陈 凯,刘 颖. 如何控制植物组织培养中褐变的产生[J]. 邯郸农业高等专科学校学报,2004(3):5-6.

[15] 陈正华. 木本植物组织培养及其应用[M]. 北京:高等教育出版社,1986:456-466.

[16] 程家胜. 植物组织培养与工厂化育苗技术[M]. 北京:金盾出版社,2003.