

郑志新,范翠丽,孙洪生. 金莲花初代培养探索[J]. 江苏农业科学,2016,44(8):66-69.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.08.017

金莲花初代培养探索

郑志新¹, 范翠丽¹, 孙洪生²

(1. 河北北方学院农林科技学院,河北张家口 075131;2. 河北北方学院科研处,河北张家口 075000)

摘要:为了探讨不同因素对金莲花初代培养的影响,最终筛选金莲花初代培养的最适外植体、灭菌处理及诱导或分化培养基,为金莲花离体快繁和规模化、工厂化育苗提供理论依据。以金莲花叶片、叶柄、根颈和根为外植体,以乙醇和 HgCl_2 为灭菌剂,以 MS 为基本培养基,通过不同浓度的 6-BA 和 NAA 配比,进行金莲花初代组织培养研究。结果显示,叶柄是金莲花再生初代培养的最佳外植体,其通过愈伤组织诱导途径建立再生体系,最佳的灭菌组合是 75% 乙醇灭菌 10 s + 0.1% HgCl_2 灭菌 4 min,最适培养基为 MS + 6-BA 8.0 mg/L + NAA 2.0 mg/L;其次是根颈,以不定芽分化途径为主,最佳灭菌组合为 75% 乙醇灭菌 20 s + 0.1% HgCl_2 灭菌 6 min,最适培养基为 MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L。

关键词:金莲花;初代培养;灭菌处理;叶柄;根颈不定芽;愈伤组织;诱导培养基;工厂化育苗

中图分类号: S682.19 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)08-0066-03

金莲花(*Trollius chinensis* Bunge)属毛茛科(*Ranunculaceae*)金莲花属(*Trollius*),别称“金芙蓉”“金梅草”“旱莲花”等,是稀有野生药用植物,喜湿喜凉,多生长在海拔 1 800 ~ 2 700 m 的疏林或山地,集中分布在河北、山西、内蒙和东北等地,其中以河北承德地区所产金莲花药材质量最佳^[1-5]。近年来,人们逐渐认识到金莲花的药用价值和观赏价值,对其大量采摘,再加上旅游、开荒、放牧等行为,金莲花野生资源及其生境遭到了极大的破坏,价格逐年上涨。因此,对金莲花进行引种驯化和人工栽培具有非常重要的意义。目前,金莲花的人工栽培方法常见种子直播法和幼苗移栽法^[6]。杨玉芳等采取实生播种进行金莲花幼苗培育,结果发现金莲花幼苗死亡率很高,且幼苗苗期栽培管理困难,难以达到迅速培育优质种苗的目的^[7],而组织培养技术可以在短时间内培育大量优质种苗^[8-9]。本试验对金莲花的初代培养进行详细的探索,以期对金莲花的工厂化育苗、次生代谢物生产等提供理论及技术依据。

1 材料与方法

1.1 材料

随机选取在温室播种的金莲花幼苗(苗期 3 个月),种子购自河北承德。

1.2 试验时间及地点

试验于 2015 年 1—5 月在河北北方学院组织培养实验室进行。

1.3 试验方法

收稿日期:2015-06-30

基金项目:河北北方学院校级重大课题(编号:ZD201411);河北省高等学校科学技术研究项目(编号:QN2015165)。

作者简介:郑志新(1980—),女,河北张北人,硕士,讲师,主要从事植物栽培及繁育等研究。E-mail:zjkzzxin@126.com。

通信作者:孙洪生,博士,教授,主要从事中医临床文献研究。

E-mail:sun003@126.com。

1.3.1 金莲花初代培养外植体的筛选 将金莲花幼苗从温室取回,用清水冲洗干净根部基质后置于流水中冲洗 2 h,再用洗衣粉水浸泡 30 min,接着用流水冲洗 4 h,将金莲花幼苗分成叶片、叶柄、根颈和根 4 个部分,先用 75% 乙醇表面消毒 10 s,再用 0.1% HgCl_2 灭菌 6 min,无菌水冲洗干净,接种于 MS + 4.0 mg/L 6-BA + 1.0 mg/L NAA 的培养基上。

1.3.2 灭菌剂及处理时间对金莲花叶柄和根颈初代培养的影响 外植体筛选出来的叶柄和根颈经过清洗处理后,分别置于无菌瓶中,用 75% 乙醇和 0.1% HgCl_2 的不同组合进行外植体表面灭菌,筛选最佳的灭菌处理时间组合。

1.3.3 培养基组成对金莲花叶柄和根颈初代培养的影响 以 MS 为基本培养基,在此基础上添加不同浓度的 6-BA 和 NAA,筛选叶柄愈伤组织诱导和根颈分化的最适培养基。

1.3.4 培养基的制备和培养条件 基本培养基中添加蔗糖 30 g/L、琼脂 3.5 g/L,于 121 °C 高温灭菌 20 min,灭菌前 pH 值调至 5.8,培养室温度控制在 (25 ± 2) °C,光照 14 h/d。

1.4 试验数据统计分析

接种 1 周后统计污染率,2 周后统计死亡率、成活率、愈伤组织诱导率和不定芽分化率等,记录数据的同时观察外植体生长状况并拍照。污染率 = 污染外植体数/接种外植体数 $\times 100\%$;成活率 = 成活外植体数/接种外植体数 $\times 100\%$;死亡率 = 死亡外植体数/接种外植体数 $\times 100\%$;愈伤组织诱导率 = 诱导愈伤组织外植体数/成活外植体数 $\times 100\%$;分化率 = 分化根颈数/成活根颈数 $\times 100\%$ 。

所得数据采用 Excel 2010 和 SPSS 17.0 进行统计、方差分析和多重比较(Duncan's 法)。

2 结果与分析

2.1 不同外植体的初代培养情况

将处理过的金莲花幼苗分成叶片、叶柄、根颈和根 4 个部分,分别接种在 MS + 4.0 mg/L 6-BA + 1.0 mg/L NAA 上,观察其各自的变化情况。1 周后,叶片有 13.33% 被污染,

50.00% 死亡,只有 16.67% 有愈伤组织形成,且愈伤组织相对较多(图 1),其余的 20% 无生长表现,死亡叶片最初表现为颜色逐渐变黑,而后死亡;叶柄的污染率和死亡率与叶片相比相对较低,分别只有 7.00%、24.00%,叶柄的愈伤组织诱导率较高,达到了 52.00%,愈伤组织颜色发白,紧实度相对较差,稍显疏松,但是愈伤组织相对很多(图 2);叶片和叶柄均没有不定芽分化。将根颈接入相同培养基,2 周后只有

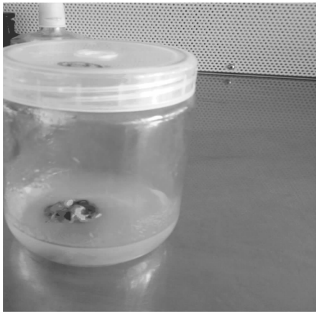


图1 叶片形成的愈伤组织



图2 叶柄诱导形成愈伤组织



图3 根颈萌发形成新株

表 1 不同外植体初代培养情况

外植体	污染率 (%)	死亡率 (%)	愈伤组织诱导率 (%)	不定芽分化率 (%)	愈伤组织生长表现
叶片	13.33	50.00	16.67	0	白色,肥大
叶柄	7.00	24.00	52.00	0	色白,疏松,量大
根颈	4.35	0	0	95.65	—
根系	57.78	38.89	0	0	—

注:“—”代表即无愈伤组织形成,也无生长表现。

2.2 灭菌时间对金莲花初代培养的影响

2.2.1 灭菌剂及处理时间对金莲花叶柄初代培养的影响
通常情况下,75% 乙醇和 0.1% HgCl₂ 结合是常用的外植体灭菌组合,不同的外植体因为其幼嫩程度和所携带杂菌的量不同而对具体的灭菌时间会有差别。由表 2 可知,在 75% 乙醇灭菌时间相同时,随着 0.1% HgCl₂ 灭菌时间延长,污染率下降,死亡率增加。用 75% 乙醇灭菌 10 s 时,HgCl₂ 灭菌 4 min 和 6 min 之间的差别不大,HgCl₂ 灭菌 4 min 时成活率达到 78.00%,只比 6 min 多 6.00 百分点;而当 HgCl₂ 灭菌时间达到 8 min 时,污染率为 0,而死亡率达到了 92.00%,说明 HgCl₂ 对幼嫩的叶柄有较强的毒害作用。同样,当 HgCl₂ 灭菌时间一致时,随着 75% 乙醇表面灭菌时间的增加,叶柄污染率逐渐下降,灭菌死亡率逐渐增大,叶柄组织成活率逐渐下降,HgCl₂ 灭菌时间为 8 min,只有 75% 乙醇灭菌 10 s 的叶柄组织有成活,可知在 75% 乙醇和 0.1% HgCl₂ 的共同作用下,HgCl₂ 的作用占主导地位。针对叶柄的组织培养,最佳的外植体处理组合为 75% 乙醇灭菌 10 s + 0.1% HgCl₂ 灭菌 4 min,此时叶柄的污染率虽达到 18.00%,但是死亡率最低,只有 4.00%,成活率也最高,达到 78.00%。

2.2.2 灭菌剂及处理时间对金莲花根颈初代培养的影响
以根颈为外植体进行组织培养时,在 75% 乙醇处于相同处理时,随着 HgCl₂ 灭菌时间的增加,根颈的污染率下降,死亡率增加,这与叶柄的表面灭菌效果是一致的;当 HgCl₂ 灭菌时间一致时,随着 75% 乙醇表明处理时间的延长,根颈同样表现出与叶柄相同的变化趋势(表 3),可能是因为根颈底部有少

量根系的存在使得其所携带的杂菌相对于叶柄偏多,所以根颈的最佳表面灭菌处理组合为 75% 乙醇 20 s + 0.1% HgCl₂ 6 min,此时的成活率达到了 90.00%。

表 2 灭菌剂及处理时间对金莲花叶柄初代培养的影响

各灭菌剂的灭菌时间		接种数 (个)	污染率 (%)	灭菌死亡率 (%)	成活率 (%)
75% 乙醇 (s)	0.1% HgCl ₂ (min)				
10	4	50	18.00	4.00	78.00
10	6	50	12.00	16.00	72.00
10	8	50	0	92.00	8.00
20	4	50	14.00	12.00	74.00
20	6	50	8.00	74.00	18.00
20	8	50	0	100.00	0
30	4	50	8.00	22.00	70.00
30	6	50	0	84.00	16.00
30	8	50	0	100.00	0

表 3 灭菌剂及处理时间对金莲花根颈初代培养的影响

各灭菌剂的灭菌时间		接种数 (个)	污染率 (%)	灭菌死亡率 (%)	成活率 (%)
75% 乙醇 (s)	0.1% HgCl ₂ (min)				
10	4	50	74.00	0	26.00
10	6	50	48.00	0	52.00
10	8	50	0.00	28.00	72.00
20	4	50	44.00	4.00	52.00
20	6	50	4.00	6.00	90.00
20	8	50	2.00	34.00	64.00
30	4	50	38.00	6.00	56.00
30	6	50	4.00	28.00	68.00
30	8	50	0	48.00	52.00

2.3 培养基组成对金莲花初代培养的影响

2.3.1 培养基组成对金莲花叶柄愈伤组织诱导的影响
表 4 表明,将叶柄接种在以 MS 为基本培养基附加不同浓度 6-BA(4.0、8.0 mg/L)和 NAA(0.5、1.0、1.5、2.0 mg/L)培

培养基上,约 1 周后有白色愈伤组织形成,呈絮状疏松态,10 d 左右愈伤组织逐渐增多,2 周以后愈伤组织开始变黑。具体的愈伤组织诱导情况和叶柄伤口的规格有着非常重要的关系,叶柄粗壮,愈伤组织出现得早且多,叶柄细弱,愈伤组织不出现或是出现得相对晚,这可能与叶柄内部所含营养物质的量有关,而叶柄的长短对于愈伤组织诱导的影响不大。从表 4 可知,不同浓度的 NAA 对叶柄的初代培养有一定的影响,但与 6-BA 的结合效果则呈现出不一致的变化规律。当 6-BA 使用浓度为 4.0 mg/L 时,叶柄的愈伤组织诱导率在 NAA 为 1.0 mg/L 时达到最大,随着 NAA 浓度的增大,愈伤组织诱导率开始下降,在 NAA 为 2.0 mg/L 时,愈伤组织诱导率只有 25.00%,只有 NAA1.0 mg/L 的一半不到;当 6-BA 的使用浓度为 8 mg/L 时,随着 NAA 使用浓度的增大,愈伤组织诱导率也一直增加,在 NAA 为 2.0 mg/L 时,愈伤组织诱导率为 85.00%,此时 6-BA/NAA 的值是一样的,说明细胞分裂素和生长素的比例及使用浓度对于愈伤组织的诱导都具有重要的影响,因此 MS+8.0 mg/L 6-BA+2.0 mg/L NAA 是叶柄愈伤组织诱导的最佳培养基。

表 4 培养基组成对金莲花叶柄愈伤组织诱导的影响

MS 培养基中各激素 添加浓度 (mg/L)		接种叶 柄数 (个)	产生愈伤组 织的叶柄数 (个)	愈伤组织 诱导率 (%)
6-BA	NAA			
4.0	0.5	120	52	43.33
4.0	1.0	120	64	53.33
4.0	1.5	120	48	40.00
4.0	2.0	120	30	25.00
8.0	0.5	120	55	45.83
8.0	1.0	120	68	56.67
8.0	1.5	120	75	62.50
8.0	2.0	120	102	85.00

2.3.2 培养基组成对金莲花根颈初代培养的影响 生长素和细胞分裂素的配合使用,对芽的诱导效果好于细胞分裂素的单独作用,也好于生长素的单独作用,即在一定浓度的细胞分裂素(或生长素)的基础上,添加一定浓度的生长素(或细胞分裂素),对于不定芽的诱导,即根颈的分化有一定的促进作用,因为生长素可促进腋芽的生长,细胞分裂素可以促进细胞分裂和器官分化^[10]。当 NAA 浓度为 0.1 mg/L 时,随着 6-BA 浓度的增加,根颈分化率逐渐下降,可见低浓度的 6-BA 对于根颈的分化具有促进作用;而当 NAA 浓度为 0.5 mg/L,随着 6-BA 浓度的增加,根颈分化率增加,这与 NAA 浓度为 0.1 mg/L 时的结果正好相反(表 5),可见 6-BA/NAA 的值对于根颈的分化比各自的使用浓度作用更关键,因此根颈分化的最佳培养基为 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA。

3 结论与讨论

3.1 结论

在植物的离体快繁过程中,初代培养的建立是快繁的第 1 步。在金莲花的初代培养过程中,叶柄是最佳的外植体,其次是根颈;因叶柄和根颈的组织幼嫩程度及所携带杂菌的差异,各自的灭菌处理组合表现不同,其中叶柄以 75% 乙醇灭

表 5 培养基组成对金莲花根颈初代培养的影响

MS 培养基中各激素 添加浓度 (mg/L)		接种根 颈数 (个)	根颈分 化数 (个)	根颈分 化率 (%)
6-BA	NAA			
1.0	0.1	30	24	80.00
2.0	0.1	30	20	66.67
4.0	0.1	30	17	56.67
1.0	0.5	30	12	40.00
2.0	0.5	30	15	50.00
4.0	0.5	30	19	63.33

菌 10 s+0.1% HgCl₂ 灭菌 4 min 效果最佳,根颈以 75% 乙醇灭菌 20 s+0.1% HgCl₂ 灭菌 6 min 效果最佳;同时二者的分化途径也有明显的差异,叶柄以愈伤组织诱导途径为主,最适培养基为 MS+6-BA 8.0 mg/L+NAA 2.0 mg/L,而根颈以不定芽分化途径为主,最适培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L。

3.2 讨论

3.2.1 外植体的选择及灭菌对试验效果的影响 选择叶片、叶柄、根颈和根系分别作为外植体进行初代培养,在对其进行灭菌时,发现影响污染率的主要原因在于:如果灭菌时间短,只能钝化部分细菌;如果灭菌时间长,虽大部分细菌可被杀灭,同时植物组织也会被杀死,因此在灭菌这一环节,污染是最大的障碍^[11],克服这一矛盾也是控制污染率的有效途径。在选定的 4 种外植体中,叶柄表面光滑,克服这一矛盾相对容易,具有较好的愈伤组织诱导效果,是最佳的外植体选择,其次是根颈,虽灭菌较叶柄难度增加,但是作为 1 株完整的植株存在,有不定芽的分化且具有很高的成活率,可以作为外植体的补充存在。

3.2.2 激素对愈伤组织诱导和不定芽分化的影响 一般认为,诱导愈伤组织或进行不定芽分化的关键条件在于培养条件,而培养条件中的激素是最为重要的,外源激素是植物愈伤组织诱导或不定芽分化中不可缺少的组成部分。通常情况下,生长素和细胞分裂素对保持愈伤组织的形成或不定芽的分化是非常必要的,尤其是二者有效结合时,对愈伤组织形成或不定芽诱导具有强烈的刺激作用^[12]。本试验以叶柄为外植体时,在 6-BA 浓度为 4.0 mg/L 时,NAA 浓度为 1.0 mg/L 表现最好;在 6-BA 浓度为 8.0 mg/L 时,NAA 浓度为 2.0 mg/L 表现最好,虽 6-BA 和 NAA 的浓度差异很大,在其愈伤组织诱导率上表现出不同的变化趋势,但因其 6-BA/NAA 的浓度比值均为 20,因此表现出最佳的愈伤组织诱导率。以根颈为外植体时,因其具有不同的器官分化途径,对于 6-BA 和 NAA 的浓度也表现出不同的适应性,以 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L 为最佳的不定芽分化培养基,高浓度的细胞分裂素对其起抑制作用。

参考文献:

[1]河北植物志编辑委员会.河北植物志[M]. 石家庄:河北科学技术出版社,1986.
[2]王 轩,杨 笃.山西通志[M]. 北京:中华书局,1990.
[3]释镇澄.五台山志[M]. 太原:山西人民出版社,2003.
[4]中国植物志编委会.中国植物志[M]. 北京:科学出版社,2004.
[5]白宇明.中药材金莲花[J]. 中草药,1994,25(6):291.

李 旭,吴松权,姜明亮,等. 软枣猕猴桃性别相关的 SRAP 分子标记[J]. 江苏农业科学,2016,44(8):69-71.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.08.018

软枣猕猴桃性别相关的 SRAP 分子标记

李 旭, 吴松权, 姜明亮, 朴一龙

(延边大学农学院,吉林延吉 133000)

摘要:以软枣猕猴桃成龄雌株、雄株叶片为试验材料,利用 SRAP 分子标记手段及 SPSS 软件对统计数据进行分析,结果表明,从初筛的 80 对引物中筛选出 15 对可稳定扩增出多态性条带的引物组合,19 个雌、雄植株共得到 77 个条带,多态性条带为 72 个,多态率达到 93.50%;雌株多态性比率为 68.8%,雄株多态性比率为 87.0%;me2-em1、me6-em6、me7-em5、me7-em7 这 4 对引物的扩增结果表现出雌雄株间的多态性比率具有明显差异;供试的 19 个植株经聚类分析分成 2 组,2 组中均有 70% 以上表现出相同的性别。基于性别相关的 SRAP 可以有效分辨出软枣猕猴桃雌株、雄株。

关键词:软枣猕猴桃;雌雄异株;性别鉴定;SRAP;分子标记

中图分类号: Q943 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)08-0069-03

软枣猕猴桃[*Actinidia arguta* (Seib. et Zucc.) Planch. ex Miq.] 是猕猴桃科猕猴桃属中水平和垂直分布最广泛的多年生落叶藤本果树之一^[1],我国南北各地、朝鲜、日本、俄罗斯均有分布,以我国东三省资源最为丰富,其中,小兴安岭和长白山山区较为多见,是珍贵的抗寒果树资源。软枣猕猴桃果实富含维生素 C、酚类物质、类胡萝卜素及多种矿质元素,具有一定的药用价值。目前,软枣猕猴桃作为第 3 代猕猴桃,受到世界各国的广泛关注,其产业开发正蓬勃发展。但是,软枣猕猴桃为雌雄异株植物,以雌株产果实,雌株的经济价值明显高于雄株,而软枣猕猴桃实生苗需要 5~7 年才能结果,童期漫长,且实生繁殖后代出现雌雄比约为 1:4 的性别分离^[2],不利于生产需要。雌雄异株和幼苗期雌雄无法辨别给软枣猕猴桃种质资源的改良和育种带来巨大困难,因此,软枣猕猴桃的性别鉴定在生产和遗传育种方面有着重要的意义。

分子标记技术具有简单快捷等优点,逐渐成为植物辅助育种的重要手段。DNA 分子标记技术被应用于植物的性别鉴定,提高了植物性别鉴定的准确性和实用性。Michelmores 等提出的群体分离分析法(BSA)是一种有效的定位基因方法^[3],并据此得到了一些雌雄异株的植物性别连锁 DNA 标

记;Mulcahy 等在 *Silene latifolia* 中用 60 条随机引物筛选到 4 条与性别连锁的 RAPD 标记^[4];Hormaza 等通过 700 条引物的筛选,在 *Pistacia vera* 中找到 1 条单独性别连锁的 RAPD 标记^[5]。相关序列扩增多态性(SRAP)是 Li 等发展的新型分子标记^[6],该标记通过独特的引物设计对可读框(open reading frames, ORFs)进行特异性扩增,具有简便、稳定、产率高、标记分布均匀、多态性强、目的片段便于克隆等特点,已被广泛应用于图谱构建、比较基因组学、基因克隆和亲缘关系等研究^[7-10],而在性别决定方面仅应用于少数几种植物中^[11-14]。利用 SRAP 分子标记技术对软枣猕猴桃性别的相关特异片段研究未见报道。

本研究利用 SRAP 分子标记技术对软枣猕猴桃的雌、雄基因组 DNA 差异进行研究,以期对软枣猕猴桃幼苗期性别鉴定、软枣猕猴桃性别相关基因的克隆提供科学依据。同时,SRAP 体系的建立为利用 SRAP 分子标记技术对软枣猕猴桃进行相关研究提供了一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料于 2014 年 8 月取自延边大学野生浆果资源圃(枫林),选取生长势一致、无病虫害的 6 年生野生软枣猕猴桃雌株、雄株,分别取其成熟叶片,用冰盒保存,迅速带回实验室,液氮速冻。雄株取 10 个样品,记为 X1~X10;雌株取 9 个样品,记为 C1~C9。所用 SRAP 引物(表 1),均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

收稿日期:2015-06-18

基金项目:国家自然科学基金(编号:31160068)。

作者简介:李 旭(1989—),男,黑龙江兰西人,硕士研究生,从事果树栽培生理研究。E-mail: ybu09yllixu@163.com。

通信作者:朴一龙,博士,副教授,从事果树栽培和果实采后生理研究。E-mail: piaoly@ybu.edu.cn。

[6] 苏有志,周香梅. 大通地区金莲花栽培技术及开发利用[J]. 北方园艺,2008(2):247-248.

[7] 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.

[8] 王莲辉,姜运力,余金勇,等. 长瓣兜兰的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2009,45(9):887.

[9] 杨春梅,赵培飞,汪国鲜,等. 本泌松的组织培养和快速繁殖[J].

植物生理学通讯,2009,45(9):890.

[10] 李 彬. NAA 对椴子组织培养繁殖效应的研究[J]. 甘肃农业大学学报,2000,35(2):210-212,231.

[11] 李洪忠,彭世勇,于 艳,等. 花毛茛叶片组织培养的初步探索[J]. 辽宁农业职业技术学院学报,2004,6(3):4-5.

[12] 巩振辉,申书兴. 植物组织培养[M]. 北京:化学工业出版社,2007.