

陈春利, 顾德政, 刘 毓, 等. 山东银莲花组织培养植株再生体系的建立[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(24): 47–50.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.24.010

山东银莲花组织培养植株再生体系的建立

陈春利¹, 顾德政¹, 刘 毓², 孟清秀², 李可勤¹

(1. 山东农业工程学院, 山东济南 250100; 2. 济南市花卉研究所, 山东济南 250100)

摘要:以山东银莲花无菌幼嫩茎段为外植体, 研究其组织培养和植株再生技术。结果表明, 用 1% HgCl_2 处理 10 min 可以降低外植体污染率、褐化率, 且存活率较高; 最佳增殖培养基为 MS + 1.0 mg/L 6-苄氨基腺嘌呤(6-BA) + 0.2 mg/L α -萘乙酸(NAA) + 25 g/L 蔗糖 + 6 g/L 琼脂, 培养 30 d 后增殖系数为 3.43; 最适生根培养基为 1/2 MS + 10.0 mg/L 吲哚丁酸(IBA) + 35 g/L 蔗糖 + 6 g/L 琼脂, 生根率为 84.40%; 最佳组培苗移栽基质配比为珍珠岩、蛭石、草炭的体积比 = 1 : 2 : 2。山东银莲花组培再生体系的建立为进一步探讨其遗传多样性奠定了基础。

关键词:山东银莲花; 组织培养; 植株再生; 外植体

中图分类号: S682.1⁺90.4⁺3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)24-0047-03

山东银莲花 [*Anemone shikokiana* (Makino) Makino] 是毛茛科 (Ranunculaceae) 银莲花属 (*Anemone*) 植物朝鲜银莲花 (*Anemone chosonicola*) 的变种^[1], 属于多年生草本植物, 特产于山东东部, 以崂山、昆崙山为分布中心, 常生于海拔 500 m 以上的山坡草丛及阴湿林下, 崂山之崂顶及昆崙山之泰礴顶附近草丛中常见其生长^[2]。海拔、生境等对其分布具有一定的影响, 因此其分布极其狭窄, 属于典型的稀有物种, 由于崂山、昆崙山两地均为旅游景区, 山东银莲花的生境破坏严重, 使得该物种更加稀有^[3]。山东银莲花为我国的特有种质资源, 国外还未见相关研究报道, 而国内目前对其报道也很少, 最早可见的报道是臧德奎等在 1999 年对山东特有野生花卉进行的初步研究^[2]。2011 年, 徐晓艳等对山东银莲花种子萌发特性进行了研究^[4]。2014 年, 王莺等对山东银莲花的分布格局及影响因子进行了分析^[1], 刘琼从基因分化水平研究山东银莲花的遗传多样性^[5]。关于山东银莲花引种驯化、组织培养、药用价值的研究至今未见报道。为此, 实现对山东银莲花的应用, 需要开展相应的人工栽培研究, 而人工栽培的关键在于解决山东银莲花种苗繁殖问题。本试验以山东银莲花幼嫩茎段为外植体, 拟构建稳定的植株再生体系, 并探讨几个相关影响因素, 以期对山东银莲花的快速繁殖、遗传多样性研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 植物材料的获取

2015 年 10 月于昆崙山泰礴顶, 剪取山东银莲花带饱满顶芽的幼嫩茎段, 用瓶装水冲洗后装入保温杯内。

1.2 材料消毒

收稿日期: 2017-08-06

基金项目: 山东省科技发展计划 (编号: 2013GNC11021); 大学生创新创业训练计划 (编号: 201514439013)。

作者简介: 陈春利 (1971—), 女, 山东东明人, 硕士, 副教授, 主要从事园林植物与观赏园艺的教学与研究工作。E-mail: chenchunlingy@163.com。

取山东银莲花带顶芽幼嫩茎段, 用毛笔蘸洗衣粉水轻轻刷洗其表面灰尘, 然后放入干净的容器中, 在流水下冲洗 1~2 h, 再用 0.5% 多菌灵粉剂浸泡 15 min, 随后用蒸馏水冲洗 3~10 次, 最后用无菌吸水纸吸干外植体表面的水分。

外植体灭菌:将处理完的茎段转移至三角瓶中, 在超净工作台内先用 75% 乙醇消毒 30 s, 之后用无菌水冲洗 3 次, 然后用 1% NaClO 分别处理 10、20、25 min, 再用 0.1% HgCl_2 分别处理 8、10、13 min, 在灭菌过程中滴加 1~3 滴吐温并充分摇晃三角瓶, 使杀菌剂与外植体充分接触, 最后用无菌水冲洗 6~10 次, 将长为 1~2 cm 的茎段接种到含有 0.2 mg/L 6-BA 的 MS 启动培养基中。每个培养瓶中接种 1 个外植体, 每个处理接种 30 瓶, 重复 3 次, 7 d 后观察外植体的灭菌及生长情况, 并统计各处理间的污染率、褐化率、存活率。

1.3 继代与增殖培养

以 MS 为基本培养基, 分别添加植物生长调节剂 6-苄氨基腺嘌呤 (即 6-BA, 浓度设为 0.5、1.0、1.5 mg/L)、 α -萘乙酸 (即 NAA, 浓度设为 0.00、0.05、0.20 mg/L)、赤霉素 (即 GA_3 , 浓度设为 0.00、0.05、0.20 mg/L) 作为愈伤组织的诱导培养基。然后将消毒后的外植体接种于上述培养基上培养, 每个处理 30 株苗, 重复 3 次, 30 d 后统计增殖系数。

1.4 生根培养与移栽

取株高已达 2 cm 以上的丛生芽, 在无激素的 MS 培养基中壮苗培养 20 d, 再接入 1/2MS 生根培养基中进行培养。生根培养基采用 3 因素 3 水平正交试验设计, 各因素分别为 NAA (浓度设为 0.0、0.5、1.0 mg/L)、吲哚丁酸 (即 IBA, 浓度设为 0.0、5.0、10.0 mg/L)、蔗糖 (浓度设为 25、30、35 g/L)。每个处理 30 株苗, 重复 3 次。

待组培苗生长至 10 cm 左右时, 开盖后炼苗 1 周, 然后将完整的再生植株移栽于蛭石、珍珠岩、草炭体积比 = 1 : 2 : 2 的基质中 (高压灭菌), 并保持适宜温度和湿度, 隔天浇 1 次水。

1.5 培养条件

将培养室的温度恒温保持在 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$, 愈伤组织分化和植株再生阶段的光照度为 $50 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 光照时间为

16 h/d。

1.6 统计分析方法

试验数据使用 DPS 9.50、SPSS 18.0 进行方差分析和显著性分析,用 Excel 2003 制表。观测变量的计算公式如下:

- 增殖系数 = 新增殖的芽数/接种芽的总数;
- 污染率 = (污染的外植体数/接种外植体的总数) × 100% ;
- 褐化率 = (褐化的外植体数/接种外植体的总数) × 100% ;
- 存活率 = (存活的外植体数/接种外植体的总数) × 100% ;
- 生根率 = (生根的组培苗数/接种组培苗的总数) × 100% ;
- 诱导率 = (诱导分化的外植体数/存活外植体的总数) × 100% ;
- 移栽成活率 = (移栽存活的一组培苗数/移栽组培苗的总数) × 100% 。

表 1 不同消毒处理对山东银莲花茎段外植体污染率、褐化率及存活率的影响

处理	消毒药品	消毒时间 (min)	污染率 (%)	褐化率 (%)	存活率 (%)
1	1% NaClO	10	62.25 ± 1.59Aa	45.08 ± 1.62Cd	27.34 ± 1.69CDde
2	1% NaClO	20	58.24 ± 1.32Ab	48.04 ± 0.80Cc	28.88 ± 1.41Ced
3	1% NaClO	25	56.09 ± 0.77Bc	48.38 ± 1.00Cc	26.52 ± 2.45De
4	1% HgCl ₂	8	49.78 ± 3.90Cd	51.02 ± 1.00Bb	31.75 ± 2.02BCc
5	1% HgCl ₂	10	42.84 ± 0.63CDd	51.33 ± 0.64Bb	35.93 ± 3.12Aa
6	1% HgCl ₂	13	39.41 ± 0.97De	53.37 ± 0.036Aa	34.58 ± 1.80ABb

注:同列数据后标有不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著,标有不同大写字母表示在 0.01 水平上差异显著。下表同。

2.2 增殖培养

将消毒好的外植体分别接种于添加不同种类和浓度植物生长调节剂的 MS 培养基上培养,30 d 后统计增殖系数。由表 2 可知:6-BA、NAA、GA₃ 3 种培养因素对山东银莲花组培苗增殖系数的影响程度差异很大,其中 6-BA 对增殖系数的影响最大,与其他处理间差异明显。其次是 GA₃、NAA 处理。对 6-BA 的各个水平间进行多重比较发现,添加 0.5、1.0 mg/L 6-BA 与添加 1.5 mg/L 6-BA 处理间存在极显著差异,而添加 0.5、1.0 mg/L 6-BA 水平之间差异不显著;添加 GA₃ 的组培苗与不添加的相比更加纤弱,苗不够健壮,且有茎尖和叶片枯死现象。由此可见,最佳的增殖培养基为 MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA。

从试验观察结果看,6-BA 的浓度与山东银莲花的褐化程度密切相关,随着浓度的增加,褐化程度加剧,当 6-BA 的浓度达到 1.5 mg/L 时,更易导致组培苗的褐化,可能是由于 6-BA 能促进酚类化合物的合成或者是刺激多酚氧化酶活性的提高。因此综合分析确定 MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA + 25 g/L 蔗糖 + 6 g/L 琼脂为山东银莲花的最佳增殖培养基,结果显示,30 d 时增殖系数为 3.43。山东银莲花组培苗的增殖状况见图 1、图 2。

2.3 生根与移栽

2.3.1 生根培养基的筛选 将经过壮苗培养 30 d、株高达 2 cm 以上的健壮山东银莲花组培苗植株转接入含有不同浓度植物生长调节剂、蔗糖的培养基及基本培养基中进行生根培养。由表 3 可以看出:3 种因素对山东银莲花组培苗生根率的影响程度差异很大,其中 IBA 对生根率的影响最大,其次是 NAA 和蔗糖处理,且 IBA 的各个水平间差异均达到了极显著水平。因此可以得出,适合山东银莲花组培苗的最佳培养

2 结果与分析

2.1 外植体灭菌方法的选择

将经过消毒处理的山东银莲花茎段接种到培养基上培养 7 d 后,统计污染率、褐化率和存活率。由表 1 可以看出,用 1% HgCl₂ 消毒处理的外植体污染率极显著低于 1% NaClO 处理,但褐化率极显著高于 1% NaClO 处理。1% HgCl₂ 处理 10 min 的外植体存活率最高,达到 35.93%。1% HgCl₂ 各处理间差异整体不显著,但与 1% NaClO 处理 10、20 min 之间差异极显著。通过上述多重比较,综合分析不同消毒处理对外植体污染率、褐化率及存活率的影响可知,1% HgCl₂ 处理 10 min 为适合山东银莲花茎段外植体的最佳消毒处理方法。

表 2 植物生长调节剂对山东银莲花组培苗增殖培养的影响

处理	6-BA 浓度 (mg/L)	NAA 浓度 (mg/L)	GA ₃ 浓度 (mg/L)	增殖系数
1	0.5	0.00	0.00	2.00 ± 0.46
2	0.5	0.05	0.05	1.87 ± 0.25
3	0.5	0.20	0.20	2.10 ± 0.20
4	1.0	0.00	0.05	3.23 ± 0.42
5	1.0	0.05	0.20	3.00 ± 0.15
6	1.0	0.20	0.00	3.43 ± 0.29
7	1.5	0.00	0.20	1.70 ± 0.26
8	1.5	0.05	0.00	1.90 ± 0.26
9	1.5	0.20	0.05	1.67 ± 0.21
k ₁	1.99Aa	2.31Aa	2.44Aa	
k ₂	3.22Aa	2.26Aa	2.26Aa	
k ₃	1.76Bb	2.40Aa	2.27Aa	
R	1.46	0.14	0.18	

注:同列数据后标有不同大写、小写字母分别表示差异极显著(P < 0.01)、显著(P < 0.05)。下表同。

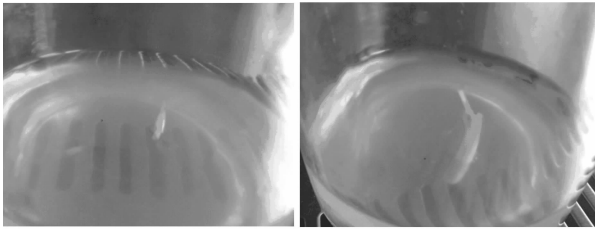


图1 山东银莲花带顶芽茎段外植体接种(左图)与启动培养(右图)

基为 1/2MS + 10.0 mg/L IBA + 35 g/L 蔗糖 + 6 g/L 琼脂。
2.3.2 驯化移栽 移栽基质的成分对组培苗的成活有很大



图2 山东银莲花组培苗增殖培养

表3 植物生长调节剂及蔗糖对山东银莲花组培苗生根的影响

处理	NAA 浓度 (mg/L)	IBA 浓度 (mg/L)	蔗糖浓度 (g/L)	生根率 (%)
1	0.0	0.0	25	0.00 ± 0.00
2	0.0	5.0	30	34.73 ± 2.19
3	0.0	10.0	35	84.40 ± 3.38
4	0.5	0.0	35	4.38 ± 1.82
5	0.5	5.0	25	33.01 ± 1.40
6	0.5	10.0	30	74.49 ± 4.70
7	1.0	0.0	30	3.29 ± 1.79
8	1.0	5.0	35	44.76 ± 7.81
9	1.0	10.0	25	65.85 ± 6.02
k_1	39.71 Aa	2.56 Aa	39.75 Aa	
k_2	37.30 Aa	37.5 Bb	34.99 Aa	
k_3	37.97 Aa	74.91 Cc	40.23 Aa	
R	2.41	72.35	5.24	

影响,与组培苗能否移栽成活直接相关。由表4可知,在处理5培养基(珍珠岩、蛭石、草炭体积比=1:2:2)上生长的组培苗较处理3、处理4 2种基质成活率高,为83.36%,达到极显著水平,而在处理2培养基(珍珠岩、蛭石、草炭体积比=0:1:1)上生长的组培苗成活率最低。山东银莲花组培苗的最佳移栽基质配比为珍珠岩、蛭石、草炭体积比=1:2:2。山东银莲花组培苗的生根与移栽状况见图3。

表4 不同比例的移栽基质对山东银莲花组培苗移栽成活率的影响

处理	珍珠岩、蛭石、草炭土比例	成活率(%)
1	1:0:1	33.52 ± 2.57 Aa
2	0:1:1	27.24 ± 3.31 Ab
3	1:1:1	58.11 ± 1.84 Bc
4	1:2:1	61.76 ± 3.10 Bc
5	1:2:2	83.36 ± 3.96 Cd



图3 山东银莲花组培苗生根培养(左图)及移栽(右图)

3 讨论

3.1 外植体的选择及灭菌

选择合适的外植体是植物组织培养成功的关键因素之一,一般在自然条件下生长势旺的植物种类更容易建立组培快繁体系,且易分化、增殖;而在自然条件下繁殖较慢的品种

进行离体培养的繁殖系数相对较小。山东银莲花是典型的山东省稀有植物物种,对生存环境的要求较为苛刻,在自然条件下生长缓慢,抗逆性差,因而较难建立组培快繁体系。此外,山东银莲花组织培养中材料的大小选择也十分重要,材料太大容易污染,材料太小,难以成活。因此,一般选取的材料长度为0.5~1.0 cm左右。

山东银莲花的带顶芽茎段由于直接暴露在土壤和空气中,且有鳞片包被,其芽体和芽体内部易积累污染物,因此消毒灭菌困难,只有选择合适的灭菌剂和灭菌方法,才能有效建立起无菌体系,一般植物组织培养中常用的消毒剂有次氯酸钠、次氯酸钙、氯化汞等,在本试验中, HgCl_2 消毒的整体效果要远远好于采用 NaClO 的消毒效果,但是山东银莲花外植体接种后会出现不同程度的褐化,随着 HgCl_2 浓度的提高,其褐化程度也在不断加大,因而山东银莲花外植体的最佳灭菌方法是用75%乙醇消毒30 s,再用无菌水冲洗3次,然后用0.1% HgCl_2 处理10 min,最后用无菌水冲洗6次,接种后可获得较低的污染率和最高的存活率。

3.2 不同植物生长调节剂对组培器官发生的影响

植物生长调节剂对于培养物的生长尤其是形态建成起着极其重要而明显的作用,植物自身的生长调节物质的种类和浓度调节着细胞分化、伸长的启动,并调节愈伤组织生长以及根、芽的分化和发育。但是外源激素必须通过植物体内的内源激素水平来起作用,因此,外植体形态发生的诱导和调节是通过多种激素的相互平衡以及协同来共同实现的。

6-BA是目前植物组培研究中常用的一种细胞分裂素,能够有效诱导植物的分化再生,本研究表明,6-BA对组培苗增殖的影响极显著,起到了决定性作用,6-BA和NAA配合使用可以获得较高的增殖系数。试验观察结果表明,6-BA浓度与山东银莲花的褐化程度密切相关,随着浓度增加,褐化程度加剧,当6-BA浓度达到1.5 mg/L时,更易导致组培苗的褐化,原因可能是6-BA能促进酚类化合物的合成或者是刺激多酚氧化酶活性的提高。一些植物在组培中添加 GA_3 可促进茎生长、提高增殖系数,但有时会导致茎尖和叶片枯死,建议间断使用。本研究添加一定浓度的NAA或 GA_3 均取得了类似的效果。添加 GA_3 的组培苗与不添加的相比更加纤弱,组培苗不够健壮,且有茎尖和叶片枯死现象。因此,综合分析确定 $\text{MS} + 1.0 \text{ mg/L } 6\text{-BA} + 0.2 \text{ mg/L NAA} + 25 \text{ g/L 蔗糖} + 6 \text{ g/L 琼脂}$ 为山东银莲花的最佳增殖培养基。

3.3 生根培养

在生根培养过程中,大量的研究表明,起主导作用的是生长素,不同类型的生长素对组培苗的生根诱导差异比较明显。本试验中植物激素的添加对山东银莲花组培苗生根率的影响程度差异很大,单独添加IBA、NAA均能诱导山东银莲花组培苗不定根的产生,但添加IBA的生根效果明显好于添加NAA的生根效果,添加NAA诱导出的根多为愈伤根系,而且分化出的根粗大,生长异常,根系脆弱,一碰就断,移栽时难以成活,组培苗经过IBA诱导出的根系不经过愈伤组织,从组培苗的基部直接发生,而且根系的生长发育状况好,根系健壮,从而移栽成活率高。因此在本试验中得出适合山东银莲花组培苗的最佳培养基为 $1/2\text{MS} + 10.0 \text{ mg/L IBA} + 35 \text{ g/L 蔗糖} + 6 \text{ g/L 琼脂}$ 。

马媛春,张粉粉,程宗明. 柳叶栒子组培快繁体系的建立[J]. 江苏农业科学,2018,46(24):50-53.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.24.011

柳叶栒子组培快繁体系的建立

马媛春,张粉粉,程宗明

(南京农业大学园艺学院,江苏南京 210095)

摘要:以柳叶栒子的实生苗为试验材料,建立无性快繁体系。结果表明,适宜的初代培养基为 MS + 0.8 mg/L 6-苄氨基腺嘌呤(6-BA) + 0.02 mg/L α -萘乙酸(NAA) + 1.2 mg/L PPM(plant preservative mixture,植物组培抗菌剂);最适宜柳叶栒子继代增殖的培养基是 MS + 1.0 mg/L 6-BA;最适宜柳叶栒子的生根培养基是 F + 0.05 mg/L NAA;生根苗驯化移栽后的成活率可达 72% 以上。

关键词:柳叶栒子;组织培养;腋芽诱导;继代增殖;驯化移栽

中图分类号: S686.04⁺3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)24-0050-04

柳叶栒子(*Cotoneaster salicifolius*)为栒子属植物,多生于山地沟边杂林中、海拔 1 800~3 000 m 处,一般分布于我国的湖北、湖南、四川、贵州等地^[1]。柳叶栒子的叶片呈革质而油亮,果实红而累累,不但可以作为一种优美的园林植物来应用,而且柳叶栒子是一味珍贵的中药材,对于治疗咳嗽、除风热有很好的疗效。我国对栒子属植物的研究和开发利用起步较晚。过去柳叶栒子主要依靠播种繁殖,不仅繁殖速度慢,繁殖的量也很少,柳叶栒子并没有发挥其应有的园林及药用价值,关于柳叶栒子的研究更是少之又少,几乎没有。而如今,随着组织培养^[2]和细胞培养^[3]等新技术的产生,使得柳叶栒子的大量扩繁有了可能,通过组织培养技术将可以在短时间内培育出大量柳叶栒子幼苗。除柳叶栒子外,我国还有 57 种栒子植物,约占全世界栒子植物数量的 2/3,但是全国各地对于栒子引种栽培的报道很少^[4-6],关于组培快繁成功的案例更是少之又少。所以通过建立柳叶栒子组培快繁体系,对栒子属植物的组培快繁体系的研究也有帮助。

收稿日期:2017-08-07

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(16)1005]。

作者简介:马媛春(1986—),女,甘肃临夏人,博士,助理研究员,主要从事果树系统生物学研究。E-mail:myc@jaas.ac.cn。

通信作者:程宗明,博士,教授,主要从事果树系统生物学研究。E-mail:zmc@njau.edu.cn。

4 结论

本研究以山东银莲花幼嫩茎段为外植体,分析了外植体消毒和不同激素配比对增殖、生根培养的影响,成功建立了其组织培养植株再生体系。结果表明,1% HgCl₂ 处理 10 min 可以降低外植体污染率、褐化率,存活率较高;最佳增殖培养基为 MS + 1.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA + 25 g/L 蔗糖 + 6 g/L 琼脂;最佳生根培养基为 1/2 MS + 10.0 mg/L IBA + 35 g/L 蔗糖 + 6 g/L 琼脂;最佳组培苗移栽基质配比为珍珠岩、蛭石、草炭体积比为 1:2:2。从外植体培养到植株再生共需 16 周左右。山东银莲花组培再生体系的建立为进一步探讨其遗传多样性奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

以柳叶栒子的实生苗为试验材料(种子来自加拿大的城市公园,于 2016 年 3 月份播种于南京农业大学生科楼 7 楼果树生物学实验室育苗室),进行消毒灭菌后,接种培养。

1.2 方法

1.2.1 外植体灭菌 选取长势较好的实生苗,剪切成 4 cm 左右的带芽茎段作为试验材料,放入容器中,在自来水下冲洗 2 h,后移至超净工作台内,用 70% 乙醇浸泡外植体 30 s 后用无菌水冲洗 3 次,然后用浓度为 4% 的次氯酸钠分别处理 3、4、5、6 min,再用无菌滤纸吸干茎段表面的水分^[7],将其切成 1 cm 左右的带芽茎段,最好可以保留 1~2 张小叶片,再接种^[8]。每个处理接种 20 瓶,每瓶接种 1 个外植体,重复 3 次,30 d 后统计成活率。

1.2.2 腋芽诱导培养 将无菌茎段接种到腋芽诱导培养基上,首先为了确定腋芽在何种基本培养基上诱导的效果更好,选取 MS、1/2MS、1/2WPM 3 种基本培养基^[9],在 3 种基本培养基内添加浓度相同的 6-苄氨基腺嘌呤(6-BA)^[10]进行预试验,20 d 后发现,腋芽在 MS 培养基上诱导的效果最好,因此在初代培养时选择 MS 作为基本培养基,另外发现,在培养基中加入抗菌物质 1.2 mg/L PPM(plant preservative mixture,

参考文献:

- [1]王 莺,逢玉娟,刘传林,等. 稀有植物山东银莲花(*Anemone shikokiana* (Makino) Makino)的分布格局及影响因子分析[J]. 植物研究,2014,34(4):440-445.
- [2]臧得奎,李 健,于东明. 山东特有野生花卉的初步研究. 烟台师范学院学报,1999,15(3):221-224.
- [3]臧得奎,孙述涛. 山东植物区系中的特有现象[J]. 西北植物学报,2000,20(3):454-460.
- [4]徐晓艳,刘庆超,刘庆华,等. 山东银莲花种子萌发特性研究[J]. 北方园艺,2011(6):72-74.
- [5]刘 琼. 山东银莲花的遗传多样性研究[D]. 济南:山东师范大学,2014.