

刘守赞,叶建丰,王江铭,等. 珍稀濒危植物堇叶紫金牛扦插和组培繁殖[J]. 江苏农业科学,2021,49(19):84-88.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.19.014

珍稀濒危植物堇叶紫金牛扦插和组培繁殖

刘守赞¹, 叶建丰², 王江铭³, 饶盈², 马丹丹⁴, 夏国华³

(1. 浙江农林大学植物园, 浙江杭州 311300; 2. 浙江省杭州市临安区天目山林场, 浙江杭州 311311;

3. 浙江农林大学林业与生物技术学院, 浙江杭州 311300; 4. 浙江农林大学暨阳学院, 浙江诸暨 311800)

摘要:为了更好地保护和开发利用堇叶紫金牛(*Ardisia violacea* W. Z. Fang et K. Yao)这一优良的珍稀濒危野生植物,采用带叶茎段和不带叶茎段进行扦插繁殖,建立组培快繁体系,重点研究 TDZ、6-BA 和 KT 对茎段增殖培养的影响,优化增殖培养条件。结果表明,堇叶紫金牛带叶茎段扦插成活率及后期生长情况显著优于不带叶茎段,成活率、开花植株率、结实植株率分别为 93.8%、76.12% 和 73.17%,结实植株平均果实数为 3.63 粒。建立了堇叶紫金牛组培快繁体系,优化了不定芽增殖的培养条件,发现 TDZ 增殖培养效果显著优于 6-BA 和 KT,当 TDZ 浓度到达 0.5 mg/L 时,茎节部膨大增粗至原来的 2 倍以上,腋芽也明显膨大,增殖倍率达 3.14。堇叶紫金牛扦插和组培繁殖有效地解决了繁殖材料稀缺的问题,对保护珍稀濒危种质资源提供了一条新途径,同时为产业化开发提供技术储备。

关键词:堇叶紫金牛;扦插繁殖;组培繁殖;细胞分裂素

中图分类号: S793.905 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2021)19-0084-05

生物多样性是人类赖以生存的生物资源,是经济得以持续发展的基础。珍稀濒危植物是生物多样性的的重要组成部分,也是生物多样性中最为脆弱、最容易消失的物种。我国是世界上植物物种多样性最丰富的国家之一,现有高等植物 3.1 万种,约占世界总数的 10%,但我国高等植物受威胁物种已达 4 000~5 000 种,占总种数的 15%~20%,高于世界 10%~15% 的水平^[1]。浙江省有 5%~8% 的植物不同程度地遭受到生存的威胁。为此,浙江省陆续开展了珍稀濒危植物调查^[2-3]、致濒机理^[4]、繁育和解濒技术^[5]以及遗传多样性研究^[6-8],并取得了显著成效。

堇叶紫金牛(*Ardisia violacea* W. Z. Fang et K. Yao)属于紫金牛科(Myrsinaceae)紫金牛属(*Ardisia* Swartz),产于我国的浙江、台湾^[9-10]和安徽^[11],其株型紧凑,叶脉纹理清晰,叶绿果艳,果期长,具有极高的观赏价值。目前对堇叶紫金牛的研究主要

集中在分类学^[12-13]和生物生态学特性^[14]方面。刘博文等调查了舟山本岛的堇叶紫金牛所在群落的物种组成并分析其群落特征^[15]。马凯等用标准样地法和每木调查法调查了堇叶紫金牛群落和结构特征,并且研究了各个样地内的物种多样性^[16]。而堇叶紫金牛的繁殖技术方面研究较少^[17-18]。本试验研究了堇叶紫金牛扦插繁殖和组培繁殖的相关情况,旨在为堇叶紫金牛的繁育提供技术储备,有利于该物种脱离濒危的现状,为珍稀濒危植物多样性保护提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 试验材料与试验地概况

堇叶紫金牛植株引自浙江省建德绿河塘林场。试验时间为 2018 年 10 月至 2019 年 10 月,试验地点设在浙江农林大学珍稀濒危植物专类园。临安地处浙江省西北部天目山区,气候温暖湿润,光照充足,雨量充沛,属中亚热带季风气候。年平均气温 16.4℃,1 月平均气温为 3.4℃,7 月平均气温 28.1℃,年降水量 1 613.9 mm,年平均相对湿度 82%,年日照时数 1 847.3 h,平均无霜期 237 d。

1.2 试验方法

1.2.1 扦插繁殖 以 54 cm×28 cm 育苗盘为扦插容器,下部铺设泥炭约 6 cm、上部覆盖珍珠岩约 4 cm 作为扦插基质,插条设 2 个处理:带叶茎段和

收稿日期:2020-11-19

基金项目:浙江省自然科学基金(编号:LY16C030004、LQ17C160005);浙江省林业局林业发展和资源保护专项(编号:浙林规[2019]90号)。

作者简介:刘守赞(1979—),男,河北武强人,硕士,讲师,主要从事植物资源开发利用研究。E-mail:szliu@zafu.edu.cn。

通信作者:夏国华,硕士,副教授,主要从事植物资源开发利用研究。E-mail:zjfc_ghxia@126.com。

不带叶茎段,插穗具 2 节,长约 0.8 cm,插条基部 1/3 用 NAA 300 mg/L 浸泡 5 min。处理 30 根插条,重复 3 次。在光照培养箱中进行培养,培养温度 $(25 \pm 2) ^\circ\text{C}$,光照度约为 $250 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,光照时间为 16 h/d。扦插 60 d 后,统计成活率,并移栽到一加仑塑料盆(口径 16 cm,底径 13 cm,高度 17.5 cm)中,栽培基质配比为田园土:泥炭:珍珠岩 = 1:1:1(体积比)。2015 年 5 月统计开花植株比例,8 月统计结实植株比例和结实植株果实数,统计平均值。

1.2.2 组培繁殖 将种子用洗涤剂漂洗 30 min,流水冲洗 10 min,然后在超净工作台上用 70% 乙醇浸泡 15 s,0.1% HgCl_2 灭菌 10~15 min,无菌水漂洗 3 次,用无菌滤纸吸干材料上的水分,放入种子萌发培养基中培养。以种子无菌萌发获得的茎段建立组培体系。研究 6-BA、KT 和 TDZ 对茎段增殖培养的影响,6-BA 和 KT 的浓度分别为 0.5、1.0、2.0、4.0 mg/L,TDZ 的浓度分别为 0.1、0.2、0.5、1.0 mg/L,以不添加细胞分裂素为对照(CK),以上培养基均添加 IBA 0.5 mg/L。MS 基本培养基由 30 g/L 蔗糖和 6.8 g/L 琼脂组成。每个处理 10 瓶,每瓶接种 3 个茎段,重复 3 次,比较不同细胞分裂素在不同浓度下对不同外植体的影响。所有增殖培养基中,pH 值均为 5.8,培养温度为 $(25 \pm 2) ^\circ\text{C}$;光照度约为 $30 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,光照时间为 16 h/d。

1.2.3 生根培养与炼苗移栽 丛生芽长至 4~5 cm 时,转入生根培养基 MS + IBA 0.25 mg/L +

NAA 0.25 mg/L 中进行培养,每株苗具 5~7 张叶时即可移栽。待苗高约 6 cm 时,植株具有 2~4 条健壮根,将培养瓶盖打开,放到全天自然光照、温度 $25 ^\circ\text{C}$ 的通风条件下炼苗 7~10 d,移栽时用镊子将试管苗从培养瓶中取出,洗净根部培养基,移栽入已灭过菌的营养土中,基质配比为泥炭:蛭石 = 1:1,移栽后 7~10 d 用塑料薄膜保湿,保持空气湿度 85% 以上,喷雾频率为 1~2 次/d。

1.3 数据分析

所有数据均采用 Excel 2016 和 SPSS 25.0 进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 莖叶紫金牛扦插繁殖

由表 1、图 1 可知,莖叶紫金牛带叶茎段和不带叶茎段扦插成活及生长结实均具有显著性差异。带叶茎段扦插成活率、次年开花结实植株率显著高于不带叶茎段。带叶茎段插穗生根早、植株健壮,扦插成活率高达 93.80%,次年开花植株、结实植株率分别达到 76.12%、73.17%,结实植株平均果实数 3.63 粒。扦插后 15 d 左右开始在切口基部发生 2~3 条白色新根,25 d 后新芽萌发,根系生长迅速,此后根系植株生长健壮。不带叶茎段插穗生根、萌芽均较迟,植株细弱,成活率较低,为 85.60%,次年开花植株、结实植株率和结实植株平均果实数明显较低,分别为 18.42%、13.33% 和 1.17 粒。

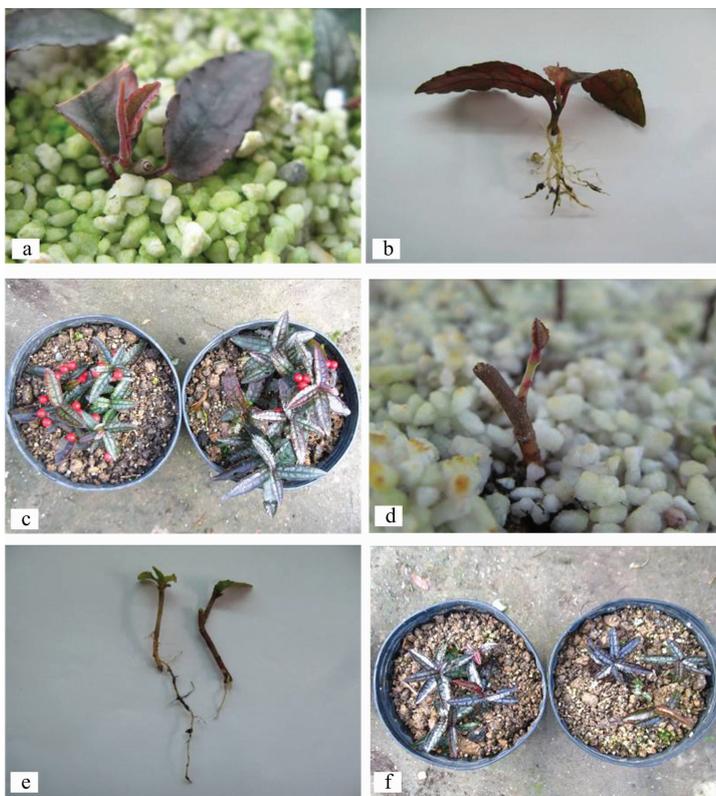
表 1 不同插条对莖叶紫金牛扦插成活及生长结实的影响

处理	扦插成活率 (%)	开花植株率 (%)	结实植株率 (%)	结实植株平均果实数(粒)	生长状况
带叶茎段	93.80 ± 5.62a	76.12 ± 3.24a	73.17 ± 5.42a	3.63 ± 0.42a	生根早,植株健壮
不带叶茎段	85.60 ± 3.42b	18.42 ± 2.42b	13.33 ± 2.12b	1.17 ± 0.20b	生根较迟,植株细弱

2.2 莖叶紫金牛组培繁殖

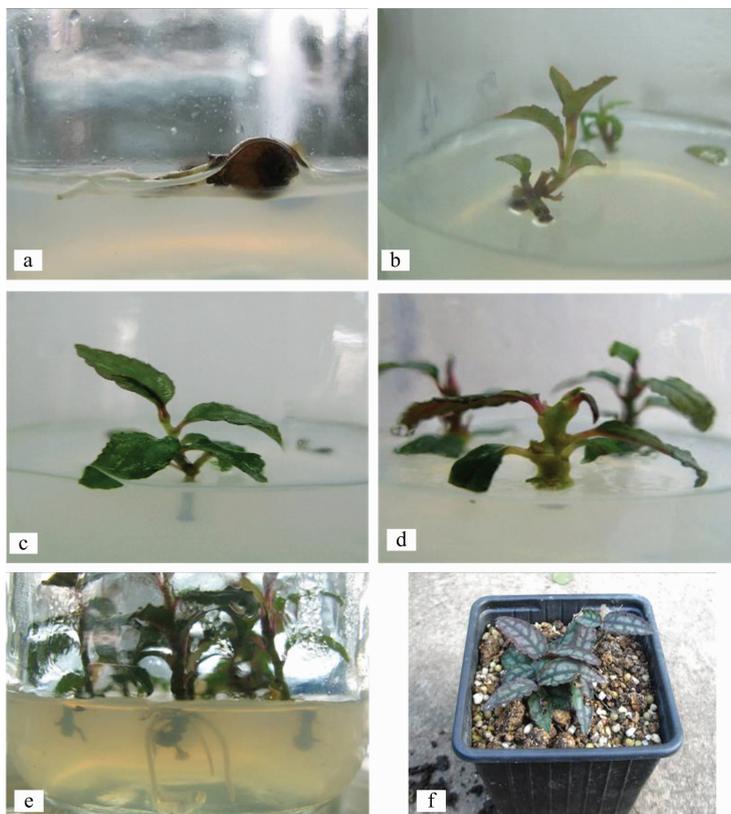
2.2.1 莖叶紫金牛组培繁殖体系建立 将由种子萌发和腋芽生长形成的茎段剪成带 2~3 个芽的茎段,接入 MS + 6-BA 0.1~3.0 mg/L + IBA 0.5 mg/L 中进行培养,发现茎段仅顶端 1 个腋(顶)芽萌发。待芽长至 4~6 cm 时,转入生根培养基 MS + IBA 0.25 mg/L + NAA 0.25 mg/L 中进行培养,培养约 15 d 开始出现新根,生根率达 95% 以上,待苗长出 2~4 条/株长约 5 cm 的健壮新根,苗高约 6 cm,具叶 5~7 张/株时移栽(图 2)。

2.2.2 不同细胞分裂素对莖叶紫金牛茎段增殖培养的影响 由于莖叶紫金牛茎段增殖较为困难,因此采用不同细胞分裂素种类和浓度对莖叶紫金牛进行培养,研究对其增殖培养的影响。由图 3、表 2 可知,细胞分裂素种类对莖叶紫金牛茎段增殖培养存在显著性差异。在增殖培养后 59 d 时,TDZ 对莖叶紫金牛茎段增殖的作用效果显著优于 6-BA 和 KT,在 0.1~0.5 mg/L 的浓度范围内,随着 TDZ 浓度的升高,茎段的增殖倍率增大,当浓度到达 0.5 mg/L 时,增殖倍率最高,达到 3.14,同时茎节部



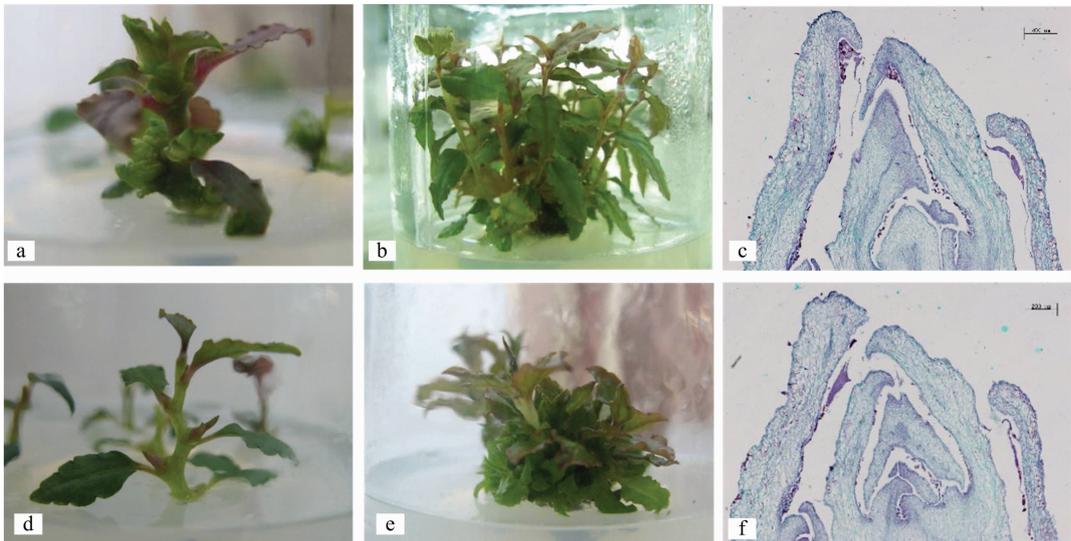
a~c. 带叶茎段扦插情况; d~f. 不带叶茎段扦插情况

图1 董叶紫金牛扦插苗生长和结实情况



a. 种子无菌萌发; b~d. 腋芽生长; e. 生根培养; f. 瓶苗移栽

图2 董叶紫金牛组培繁殖概况



a~b. TDZ 促进腋芽生长; c. TDZ 处理下腋芽切片; d~e. CK 腋芽生长; f. CK 腋芽切片

图3 TDZ 对堇叶紫金牛茎段增殖培养的影响

表 2 不同细胞分裂素对堇叶紫金牛茎段增殖培养的效果(第 60 天)

细胞分裂素		增殖倍率	生长情况
种类	浓度 (mg/L)		
TDZ	0.1	2.20 ± 0.97a	顶芽生长, 茎节部略膨大, 腋芽膨大, 部分生长
	0.2	2.25 ± 0.76a	顶芽生长, 茎节部膨大增粗, 腋芽膨大, 部分生长
	0.5	3.14 ± 0.64a	顶芽生长, 茎节部膨大增粗至原来的 2 倍以上, 腋芽明显膨大, 部分生长
	1.0	3.10 ± 1.74a	顶芽生长, 茎节部膨大增粗至原来的 2 倍以上, 腋芽明显膨大, 部分生长
6-BA	0.5	0.43 ± 0.46c	顶芽生长, 但植株较矮小, 腋芽不明显
	1.0	0.96 ± 0.10b	顶芽生长, 植株较高且健壮, 腋芽膨大, 部分生长
	2.0	0.53 ± 0.56c	顶芽生长, 植株较高且健壮, 腋芽膨大, 少数生长
	4.0	0.10 ± 0.00d	顶芽生长, 茎膨大增粗后腋芽膨大, 几乎无生长
KT	0.5	0.60 ± 0.36c	顶芽生长, 植株较高且健壮, 腋芽不明显, 少数生长, 生根良好
	1.0	0.40 ± 0.18c	顶芽生长, 植株较高且健壮, 腋芽不明显, 少数生长, 部分生根良好
	2.0	0.50 ± 0.31c	顶芽生长, 植株较高且健壮, 腋芽不明显, 少数生长, 部分生根良好
	4.0	0.53 ± 0.59c	顶芽生长, 植株较高且健壮, 腋芽不明显, 少数生长, 少量生根
CK	0.0	0.60 ± 0.69c	顶芽生长, 植株较矮小, 腋芽不明显, 少数生长, 生根良好

注:增殖倍率用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示。

膨大增粗至原来的 2 倍以上, 腋芽也明显膨大; 当浓度达到 1.0 mg/L 时, 增殖倍率下降到 3.10。而在未添加任何细胞分裂素的 CK 中, 增殖倍率仅为 0.60, 植株较矮小, 腋芽不明显。

由图 3、表 2 还可知, 6-BA、KT 的培养基中顶端 1 芽萌发, 其他腋芽极少萌发, 增殖倍率均未达到 1。在 0.5 ~ 1.0 mg/L 浓度范围中, 增殖倍率随着 6-BA 浓度的增大而增加, 当 6-BA 浓度达到 1.0 mg/L 时, 增殖倍率开始下降, 且下降幅度较大, 当 6-BA 浓度达到 4.0 mg/L 以上, 增殖倍率仅为 0.1, 腋芽成为极度缩短的茎, 茎节部明显膨大增粗, 且植株不伸长生长。随着 KT 浓度的升高(0.5 ~ 1.0 mg/L

范围), 茎段的增殖倍率反而减小, 当浓度达到 1.0 mg/L 后, 增殖倍率又略微增加。

3 讨论与结论

堇叶紫金牛扦插繁殖以带叶茎段插穗成活率较高, 达到 93.80%, 不带叶茎段较低, 为 85.60%, 均能满足生产上的应用。叶才华等对矮紫金牛进行不同留叶量扦插繁殖的试验, 发现带叶茎段和不带叶茎段的扦插成活率均在 85% 左右^[19], 低于本试验结果, 这可能是受不同紫金牛物种和不同扦插条件影响。因此, 在繁殖材料较少的条件下, 不带叶的堇叶紫金牛茎段也能用作插穗, 但扦插成活后

生长较差,开花结实推迟。

植物生长调节剂的种类和浓度是植物组织培养中芽诱导、增殖以及生长发育的关键因素,细胞分裂素、生长素能明显促进腋芽启动和增殖生长,常用的细胞分裂素有 6-BA、NAA、TDZ 等^[20]。研究表明,6-BA 对不定芽诱导起主导作用,添加适量的 6-BA 有利于不定芽的形成^[21-22]。本试验建立了莖叶紫金牛组培快繁技术体系,发现莖叶紫金牛添加 6-BA 诱导芽增殖困难,重点研究了不同细胞分裂素种类和浓度对莖叶紫金牛茎段增殖培养的影响,结果表明,3 种不同种类和浓度的细胞分裂素对莖叶紫金牛培养影响差异较大,在含有 TDZ 细胞分裂素的培养基中,茎节部和腋芽明显膨大,增殖倍率均在 2 以上,增殖效果显著优于 6-BA 和 KT,而 6-BA 在一定浓度范围内的增殖效果要显著优于 KT,这与孙骏威等的研究结果^[23]类似。孙英坤等对莖叶紫金牛组培快繁研究发现,最佳丛生芽诱导增殖培养基为改良 MS(硝酸钾含量 1 200 mg/L,其他组分不变) + TDZ 0.50 mg/L + NAA 0.10 mg/L^[18],这与本研究结果一致,也与前人在元宝枫、蓝莓等增殖培养中 TDZ 的应用效果^[24-26]一致。

莖叶紫金牛带叶茎段和不带叶茎段存在显著性差异,带叶茎段扦插成活率及后期生长情况显著优于不带叶茎段,成活率、开花植株率、结实植株率分别为 93.8%、76.12% 和 73.17%,结实植株平均果实数为 3.63 粒。建立了莖叶紫金牛组培快繁体系,并且优化了不定芽增殖的培养条件,TDZ 是莖叶紫金牛茎段增殖效果最佳的细胞分裂素,当 TDZ 浓度到达 0.5 mg/L 时,增殖效果最佳,增殖倍率达到 3.14。

参考文献:

[1] 陈灵芝. 中国的生物多样性现状及其保护对策[M]. 北京: 科学出版社, 1993.

[2] 林夏珍, 楼炉煊. 浙江省国家重点保护野生植物资源[J]. 浙江林学院学报, 2002, 19(1): 31-35.

[3] 胡绍庆, 陈征海, 孙孟军. 浙江省白豆杉资源调查研究[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2003, 29(1): 97-102.

[4] 郝朝运, 刘鹏. 我国特有珍稀植物七子花濒危原因分析[J]. 林业科学, 2007, 43(7): 86-92.

[5] 邵顺流, 钱华, 金贞福, 等. 百山祖冷杉插穗生根促进和不定根

形成[J]. 东北林业大学学报, 2006, 34(5): 47-48.

[6] 袁建国, 邱英雄, 余久华, 等. 百山祖冷杉的 ISSR 分析优化和遗传多样性初步研究[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2005, 31(3): 277-282.

[7] 郝朝运, 郭卫东, 刘鹏. 七子花种群遗传多样性和遗传分化的 RAPD 分析[J]. 园艺学报, 2005, 32(3): 463-467.

[8] 李钧敏, 金则新. 濒危植物七子花 ISSR 反应体系的优化[J]. 福建林学院学报, 2006, 26(2): 169-172.

[9] 方云忆. 浙江植物志: 第五卷[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1989: 31.

[10] Lu S Y. Myrsinaceae [M] // 2nd Edition. Huang T C. Flora of Taiwan: Vol. 4. Taipei: Taiwan University, 1998: 46.

[11] 倪咏咏. 牯牛降发现安徽地理新分布种——莖叶紫金牛[J]. 安徽林业科技, 2018, 44(6): 45.

[12] 方文哲, 姚淦. 紫金牛属研究资料[J]. 中国科学院大学学报, 1979, 17(4): 99-100.

[13] Chen J, Pipoly J J. Myrsinaceae R. Brown [M]. Wu Z Y, Raven PH. Flora of China: Vol. 15. Beijing: Science Press & St. Louis: Missouri Botany Garden Press, 1996: 10-29.

[14] Ma K, Li G Y, Zhu L J, et al. Population structure and distribution patterns of the rare and endangered *Ardisia violacea* (Myrsinaceae) [J]. Acta Ecologica Sinica, 2013, 33(2): 72-79.

[15] 刘博文, 王国明, 高浩杰, 等. 舟山本岛莖叶紫金牛所在群落物种组成与结构特征[J]. 浙江林业科技, 2017, 37(4): 54-59.

[16] 马凯, 夏国华, 闫道良, 等. 珍稀濒危植物莖叶紫金牛生存群落结构特征及物种多样性[J]. 浙江农林大学学报, 2012, 29(4): 498-509.

[17] 王刘圣丹, 邱丝丝, 夏国华, 等. 莖叶紫金牛的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2010, 46(6): 615-616.

[18] 孙英坤, 胡绍庆, 庞基良, 等. 珍稀濒危物种莖叶紫金牛高效快繁体系的建立[J]. 植物学报, 2017, 52(6): 764-773.

[19] 叶才华, 王清隆, 晏小霞, 等. 矮紫金牛扦插技术初探[J]. 热带农业科学, 2015, 35(8): 13-15.

[20] 刘进平, 吴繁花. 木薯外植体表面消毒和启动培养的研究[J]. 广西热带农业, 2004(5): 1-3.

[21] 刘柏玲, 李守洁, 张凯, 等. 彩叶植物红叶石楠离体再生体系的研究[J]. 林业科技, 2016, 41(5): 1-4.

[22] 余丽清, 周学永. 世界藜麦研究的计量分析与展望[J]. 食品工业科技, 2017, 38(15): 342-346, 351.

[23] 孙骏威, 王飞娟, 江琼, 等. 龙芽草组织培养和快速繁殖体系的建立[J]. 贵州农业科学, 2014, 42(12): 12-14, 19.

[24] 陈肖英, 叶庆生, 刘伟. TDZ 研究进展(综述)[J]. 亚热带植物科学, 2003, 32(3): 59-63, 58.

[25] 李艳菊, 陶加洪, 王兰珍, 等. 元宝枫组织培养研究[J]. 北京林业大学学报, 2005, 27(3): 104-107.

[26] 邢瑞丹, 刘庆忠, 陈新, 等. 两个蓝莓品种离体叶片不定芽再生体系的建立[J]. 山东农业科学, 2009(5): 8-11.