

长白山野生梅花草组培快繁技术研究

刘宝光¹, 田春雨²

(1. 北华大学 林学院, 吉林 吉林 132013; 2. 吉林市林业局林业总站 吉林 吉林 132013)

摘要: 用长白山野生梅花草嫩叶为外植体, 进行了组织培养研究, 建立了无性繁殖体系。结果表明: 适于愈伤组织诱导培养基为改良 MS+BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L, 愈伤组织诱导率达 65%; 适于不定芽分化的培养基为改良 MS+BA 1.0 mg/L+KT 1.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L, 不定分化效率达 11.2 个/g; 适于生根诱导的培养基为 1/2MS+NAA 0.05 mg/L+IBA 0.05 mg/L, 生根达 97.2%; 适于练苗的基质组合为 1/2 珍珠岩+1/2 蛭石, 苗木成活过 90% 以上。

关键词: 梅花草; 组织培养; 诱导

中图分类号: S 682.1⁺9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)16-0148-03

梅花草是虎耳草科多年生草本植物, 分布于我国东北、华北、西北、日本、北温带与亚寒带也有分布。长白山野生梅花草高 20~60 cm, 叶片圆形或心形, 花单生顶端, 白色或黄色, 花瓣数 5, 形似梅花, 花期 7~8 月^[1]。常生于湿草甸子、林下潮湿处及水沟旁。梅花草花艳丽且具有浓郁香味, 可用于湿地、水景园或室内观赏, 在国外早有园林应用, 观赏价值较高^[2]。全草入药, 具清热凉血, 解毒消肿, 化痰止咳功效。长白山野生梅花草分

布海拔较高, 种子细小, 采摘和调制困难, 并且种子发芽率低, 苗生长缓慢, 苗期长, 播种繁殖困难。通过组织培养可以缩短长白山野生梅花草的育种周期, 加快优良品系的驯化、选育进程, 提高苗木品质, 快速满足生产实际的需要, 为生产经营部门创造较好的经济效益。

1 材料与方法

1.1 试验材料

外植体来自于从吉林省白河林业局采挖回的梅花草盆栽植株。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体处理 外植体均来自越冬后在室内萌发出的幼嫩叶片, 外植体分上、中、下部, 剪切规格为 0.25~0.64 cm², 外植体材料表面消毒: 用软毛刷刷洗叶片后,

第一作者简介: 刘宝光(1972-), 男, 吉林省吉林人, 硕士, 工程师, 现从事林木遗传育种研究工作。E-mail: liubaoguang2005@yahoo.com.cn.

收稿日期: 2010-04-10

175(1): 184-191.

[9] Thilo C F, Heidrun H, Barbara M, et al. Molecular cloning, substrate specificity of the functionally expressed dihydroflavonol 4-reductase from *Malus domestica* and *Pyrus communis* cultivars and the consequences for

flavonoid metabolism [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2003, 412: 223-230.

Construction of Expressing Vector Containing Chalcone Synthase Gene from *Lilium* 'Acapulco'

HE Feng-mei¹, ZHU Yong-ping²

(1. College of Horticulture and Landscape Yunnan Agricultural University, Kunming Yunnan 650201; 2. College of Agriculture and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming Yunnan 650201)

Abstract: In this article, CHS1 cDNA ORF was cloned from flower petals of 'Acapulco' according to the *Lilium* 'Acapulco' CHS1 cDNA sequences published by GenBank and inserted pBI121 expression vector, and then transferred into competent cells of *Agrobacterium tumefaciens* EHA105; The digestion test and colony PCR showed that the specific expression vector designated as pBI121-CHS1 was constructed successfully. It provides a basis for the research on color transgene of *Lilium* Formolongi.

Key words: lily; CHS; expression vector; pBI121; gene

在流水下冲洗 30 min, 然后在超净工作台上用 75%酒精消毒 30 s, 用无菌水冲洗 1 次, 放入 1%次氯酸钠溶液消毒 10 min, 无菌水冲洗 5 次, 待用。

1.2.2 试验设计 愈伤组织诱导试验: 以改良的 MS 为基本培养基, 对外植体部位和附加激素 BA、NAA 进行三因素三水平 $L_9(3^3)$ 的正交设计(表 1), 试验中每个处理接种 20 瓶, 每瓶接种 1 个外植体, 叶正面向上水平放置, 15 d 后调查统计诱导率。不定芽诱导试验: 采用的基本培养基为改良 MS 培养基, 对附加激素 BA、KT 和 NAA 进行三因素三水平的正交设计(表 2), 试验中每个处理接种 10 瓶, 愈伤组织块半陷入培养基中, 15 d 后调查统计诱导率和苗木质量。生根试验: 生根以 1/2MS 为基本培养基, 对 NAA、IBA 浓度进行筛选。3 次重复, 随机区组设计, 10 d 后对生根率、生根数和根长进行调查统计, 移栽: 以蛭石、珍珠岩和 1/2 珍珠岩+1/2 蛭石为练苗基质, 也采用 3 次重复随机区组设计, 25 d 后通过调查苗木成活率对基质进行筛选。上述培养基中均附加 2%蔗糖和 0.56%琼脂, pH 值用 NaOH 和 HCl 调至 5.8。培养温度为 $(24 \pm 2)^\circ\text{C}$, 光照培养, 光暗周期为 16 h/8 h, 光强度为 $46 \sim 48 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。

表 1 愈伤组织诱导正交设计

水平	因素		
	外植体部位	BA/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	NAA/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
1	叶片上部	0.5	0.1
2	叶片中部	1.0	0.5
3	叶片下部	2.0	1.0

表 2 不定芽诱导正交设计

水平	因素		
	BA/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	KT/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	NAA/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
1	0.5	0.5	0.1
2	1.0	1.0	0.3
3	2.0	2.0	0.5

2 结果与分析

2.1 不同生长调节物质和外植体部位对愈伤组织诱导的影响

分别以幼嫩叶片的上、中、下部为外植体接种到愈伤组织诱导培养基上, 5 d 后叶片边缘开始膨大, 10 d 后在叶片边缘和叶脉处开始出现少量白色或淡黄色的愈伤组织, 其质地松软, 此后愈伤组织生长迅速, 颜色也逐渐变为淡黄绿色。外植体的不同部位 ($F=33.769$; $S=0.029$) 对愈伤组织诱导的影响达到了显著水平, BA ($F=0.538$; $S=0.650$) 和 NAA ($F=1.923$; $S=0.342$) 对愈伤组织诱导的影响不显著。对愈伤组织诱导的影响, 外植体部位>NAA>BA(表 3), 通过对外植体部位和 BA、NAA 不同浓度对愈伤组织诱导影响的综合分析可知, 利用叶片下部, 当 BA 浓度为 1.0 mg/L、NAA 浓度为

0.5 mg/L 时适宜梅花草的愈伤组织诱导。试验证明其组合的愈伤组织诱导率可达 65%, 高于其它的试验组合诱导率, 并且愈伤组织的生长增殖速度也高于其它试验组合, 可以确定处理 6 适宜于梅花草愈伤组织诱导。

表 3 愈伤组织诱导 $L_9(3^3)$ 正交实验及试验结果

处理	因素			诱导率/%
	外植体部位	BA	NAA	
1	3(叶下部)	3(2.0)	1(0.1)	45.0
2	1(叶上部)	2(1.0)	3(1.0)	20.0
3	3(叶下部)	1(0.5)	3(1.0)	60.0
4	1(叶上部)	3(2.0)	2(0.5)	20.0
5	2(叶中部)	3(2.0)	3(1.0)	30.0
6	3(叶下部)	2(1.0)	2(0.5)	65.0
7	2(叶中部)	2(1.0)	1(0.1)	25.0
8	2(叶中部)	1(0.5)	2(0.5)	25.0
9	1(叶上部)	1(0.5)	1(0.1)	15.0
\bar{y}_1	55.0	80.0	50.0	
\bar{y}_2	80.0	110.0	110.0	
\bar{y}_3	115.0	60.0	90.0	
极差(R)	60.0	50.0	60.0	

表 4 不定芽诱导 $L_9(3^3)$ 正交实验及试验结果

处理	因素			诱导量/个 $\cdot \text{g}^{-1}$
	BA	KT	NAA	
1	3(2.0)	3(2.0)	1(0.1)	2.2
2	1(0.5)	2(1.0)	3(0.5)	6.4
3	3(2.0)	1(0.5)	3(0.5)	3.5
4	1(0.5)	3(2.0)	2(0.3)	7.5
5	2(1.0)	3(2.0)	3(0.5)	6.9
6	3(2.0)	2(1.0)	2(0.3)	5.3
7	2(1.0)	2(1.0)	1(0.1)	6.5
8	2(1.0)	1(0.5)	2(0.3)	7.5
9	1(0.5)	1(0.5)	1(0.1)	5.7
\bar{y}_1	19.6	16.7	14.4	
\bar{y}_2	20.9	18.2	20.3	
\bar{y}_3	11.0	16.6	16.8	
极差(R)	9.9	1.6	5.9	

2.2 不同生长调节物质对不定芽分化诱导的影响

愈伤组织接种到芽分化诱导培养基上, 7 d 开始出现肉眼可辨的绿色芽点, 10 d 芽点开始分化为幼芽, 并不断长大。生长调节物质 BA ($F=32.399$; $S=0.030$) 对不定芽诱导的影响达到了显著水平, KT ($F=0.899$; $S=0.527$) 和 NAA ($F=9.854$; $S=0.092$) 对不定芽诱导的影响不显著, 生长调节物质对不定芽分化诱导影响的强弱表现为: BA>NAA>KT(表 4)。通过对 BA、KT 和 NAA 不同浓度对不定芽诱导影响的综合分析可知, BA 浓度为 1.0 mg/L、KT 浓度为 1.0 mg/L、NAA 浓度为 0.3 mg/L 时适宜梅花草的不定芽分化诱导。试验证明其组合的不定芽诱导可达 11.2 个/g, 高于其它的正交实验组合, 并且幼苗的生长速度也高于其它实验组合, 20 d 可长到 2~3 cm。

2.3 不同培养基生根效果比较

将生长健壮的 1.5~2.5 cm 小苗转接到生根培养

基上, 10 d 开始统计生根状况。由表 5 可知, 培养基对生根率 ($F=23.295$; $S=0.000$) 和生根条数 ($F=5.597$; $S=0.003$) 的影响均达到了显著水平, 对根长 ($F=1.637$; $S=0.205$) 的影响不显著, 通过 LSD 多重比较可知 A3 培养基于提高苗木的生根率和提高生根条数, 其诱导的生根率可达 97.2%, 生根条数可达 8.3 条。虽然 A3 培养基在根长生长方面不具有优势, 但 NAA 浓度高于 0.1 mg/L 时常在根干结合的部位有愈伤组织生成, 不利于苗木成活, 因此综合看 A3 培养基适合根长的生长, 根长达 0.83 cm (表 5)。结果表明, NAA 有益于提高生根率和生根条数, IBA 有益于根长的生长。

表 5 不同激素组合对生根效果的影响				
编号	培养基 /mg · L ⁻¹	生根率 /%	生根条 数/条	根长 /cm
A1	1/2MS+NAA 0.05	87.4±2.2 b	6.5±1.3 abc	0.45±0.20
A2	1/2MS+IBA 0.05	68.4±5.3 d	3.4±2.1 bc	0.56±0.13
A3	1/2MS+NAA 0.05+IBA 0.05	97.2±1.4 a	8.3±0.9 a	0.83±0.15
A4	1/2MS+NAA 0.1	85.1±3.1 b	5.1±1.1 abc	0.57±0.14
A5	1/2MS+IBA 0.1	76.9±4.5 c	4.2±1.9 bc	0.81±0.23
A6	1/2MS+NAA 0.1+IBA 0.05	90.4±3.6 b	5.7±0.6 abc	0.85±0.25
A7	1/2MS+NAA 0.05+IBA 0.1	89.3±2.7 b	6.8±0.5 ab	0.83±0.21
A8	1/2MS+NAA 0.1+IBA 0.1	87.5±3.0 b	3.1±2.1 c	0.87±0.31

注 小写字母代表 $P<0.05$ 的差异显著性

2.4 不同基质对移栽效果的影响

将温室消毒后, 第 1 天将生根苗封口膜揭开一半, 第 2 天全部揭开, 并适时用喷雾器喷淋叶面, 间隔时间逐渐加长, 练苗 3 d 后, 取出并洗净根部的培养基。分别移植到盛有蛭石、珍珠岩和 1/2 珍珠岩+1/2 蛭石基质

的育苗盘中, 基质用 0.5% 的 K_2MnO_4 溶液淋透后再用清水冲淋 3 遍, 喷 1/4MS 营养液。将育苗盘移入在温室内搭建的小拱棚内, 小拱棚距育苗盘 10~15 cm 高, 保持湿度 80%, 适当遮荫, 5 d 后逐步撤去拱棚膜, 8 d 后取出, 15 d 移入培养土中, 常规管理。基质对苗木成活率 ($F=19.176$; $S=0.009$) 影响达到了显著水下, 通过 LSD 多重比较可知 B3 基质组合效果较好, 其练苗成活率达 90% 以上 (表 6)。

表 6 不同基质对练苗成活的影响		
编号	基质	成活率/%
B1	蛭石	68.6±3.2 b
B2	珍珠岩	75.2±4.5 b
B3	1/2 珍珠岩+1/2 蛭石	90.5±3.1 a

3 小结

长白山野生梅花草组织培养过程中用于愈伤组织诱导的叶部位是下部, 适宜愈伤组织诱导的培养基为: 改良 MS+BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L; 适于不定芽分化的培养基为: 改良 MS+BA 1.0 mg/L+KT 1.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L。适于生根诱导的培养基为: 1/2MS+NAA 0.05 mg/L+IBA 0.05 mg/L。适于练苗的基质组合为: 1/2 珍珠岩+1/2 蛭石。

参考文献

[1] 高文由, 富国栋. 长白山西南坡野生经济植物志[M]. 吉林: 吉林省林业勘察设计院印刷, 1984: 244-245.
[2] 贾瑞冬, 郝喜龙, 牛林龙, 等. 梅花草的组织培养和快速繁殖[J]. 植物生理学通讯 2005, 41(6): 798.

Study on Tissue Culture and Rapid Propagation of Changbai Mountain Wild *Parnassia palustris* L.

LIU Bao-guang¹, TIAN Chun-yu²

(1. Cutting and culturing Forest Innovation Center of Jilin Province, Forest College of Baichuan University, Jilin, Jilin 132013; 2. Forestry Central Station of Jilin City Forestry Bureau, Jilin, Jilin 132013)

Abstract: Using tender leaf of changbai mountain wild *Parnassia palustris* L. as explants the tissue culture was studied. The vegetative propagation system was successful established. The improved MS medium supplemented with BA 1.0 mg/L, NAA 0.5 mg/L was suitable for callus induction and the rate was 65%. The improved MS medium supplemented with BA 1.0 mg/L, KT 1.0 mg/L and NAA 0.3 mg/L was suitable for adventitious bud differentiation induction and the rate was 11.2/g. The 1/2MS medium supplemented with NAA 0.05 mg/L, IBA 0.05 mg/L was suitable for root induction and the rate was 97.2%. The substrate of half perlite with half vermiculite was suitable for practice shoots and the rate was 90%.

Key words: *Parnassia palustris* L.; tissue culture; induction